(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

COURBEVOIE

(11) **N° de publication :** ***3 148 027***

(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) **N° d'enregistrement national :** **23 04118**

(51) Int Cl[8] : ***C 07 K 14/48*** *(2023.01), C 07 K 7/00, C 12 P 19/34, C 07 K 16/22, A 61 K 38/18, A 61 P 11/06, 19/02, 11/00*

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt :** 24.04.23.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 25.10.24 Bulletin 24/43.

(56) **Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire :** *Se reporter à la fin du présent fascicule*

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

( ) **Demande(s) d'extension :**

(71) **Demandeur(s) :** *PEPTINOV SAS* — FR et *CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET METIERS (CNAM) Etablissement public national scientifique, culturel et professionnel* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** ZAGURY Jean-François, DO Hervé, MASCRET Aïda, SALLES Jean-Pierre, AZOULAI René, MOREAU Gabriel, LANGENFELD Florent, DESALLAIS Lucille et MOUHSINE Hadley.

(73) **Titulaire(s) :** PEPTINOV SAS, CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET METIERS (CNAM) Etablissement public national scientifique, culturel et professionnel.

(74) **Mandataire(s) :** Cabinet Lionel Vial.

(54) COMPOSITION VACCINALE ANTI-NGF.

(57) COMPOSITION VACCINALE ANTI-NGF

La présente invention concerne un polypeptide comprenant, ou constitué de :

- une première séquence constituée d'au moins 8 acides aminés contigus choisis au sein de la séquence s'étendant des acides aminés 122 à 136, de la sous-unité B de la protéine NGF et d'au plus 30 acides aminés contigus choisis au sein de la séquence complète de la sous-unité B de la protéine NGF; et/ou
- une deuxième séquence constituée d'au moins 8 acides aminés contigus choisis au sein de la séquence s'étendant des acides aminés 148 à 158 de la sous-unité B de la protéine NGF et d'au plus 30 acides aminés contigus choisis au sein de la séquence complète de la sous-unité B de la protéine NGF.

(pas de figure)

FR 3 148 027 - A1

Description

Titre de l'invention : COMPOSITION VACCINALE ANTI-NGF

Domaine de l'invention

[0001] La présente invention concerne des peptides ou des polypeptides utiles pour éliciter une réponse immunitaire dirigée contre le facteur de croissance des nerfs (*Nerve Growth Factor*, NGF).

Arrière-plan technique

[0002] La douleur chronique (DLRC) est un énorme besoin médical non satisfait et des médicaments sûrs plus efficaces sont absolument nécessaires. Parmi les formes ou les sources les plus courantes de douleur chronique, on peut citer : i) la douleur neuropathique (NP), associée à une lésion nerveuse dans le système nerveux périphérique ou central ; et ii) l'arthrose (OA), une dégénérescence progressive du cartilage des articulations, caractérisée par une inflammation et des douleurs.

[0003] Il n'existe pas de traitement complètement efficace pour traiter ces douleurs chroniques invalidantes très répandues et les traitements actuels (AINS et opioïdes) provoquent de graves effets secondaires indésirables.

[0004] Récemment, le système ligand-récepteur du NGF est apparu comme une nouvelle cible pour la NP et l'OA, avec un potentiel thérapeutique important. En effet, le NGF et ses récepteurs (TrkA et $p75^{NTR}$) semblent être les principaux régulateurs contrôlant à la fois les composantes neuropathiques et inflammatoires de la douleur. Des niveaux excessifs de NGF, provoqués par des lésions tissulaires ou d'autres facteurs, entraînent une sensibilisation rapide des nocicepteurs, réduisant le seuil de la sensation de douleur et augmentant l'intensité de la douleur ressentie (par exemple, allodynie et hyperalgésie). Des études génétiques humaines ont validé le NGF en tant que cible, puisque des mutations dans les gènes du récepteur TrkA et du NGF lui-même provoquent des formes congénitales d'insensibilité à la douleur (neuropathie sensorielle autonome héréditaire de type IV, HSAN IV et HSAN type V, respectivement). Ainsi, le blocage du système de signalisation du NGF est une approche rationnelle et bien validée du traitement de la douleur.

[0005] De fait, l'efficacité analgésique puissante de certains anticorps monoclonaux (AcM) anti-NGF, tels que le Tanezumab (Eli Lilly and Company) et le Fasinumab (Mirati Therapeutics), a été mise en évidence dans différents modèles précliniques de DLRC, de la NP aux modèles inflammatoires (douleur cancéreuse et arthrose, cystite interstitielle, respectivement), ainsi que dans des essais cliniques (Gondal *et al.* (2022) *Drugs Today (Barc.)* **58**:187-200.

[0006] En outre, d'autres pathologies sont également liées au NGF. En effet, le NGF est

largement exprimé dans les tissus pulmonaires. Dans différents micro-environnements, le NGF participe à l'apparition et au développement des maladies pulmonaires en modifiant les niveaux d'expression des protéines et en agissant sur la fonction cellulaire. Ainsi, le NGF peut intervenir dans certains mécanismes sous-jacents dans la fibrose pulmonaire (FP), la maladie à coronavirus 2019 (COVID-19), l'hypertension pulmonaire (HP), l'asthme, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et le cancer du poumon. En particulier, le NGF est un médiateur critique dans les mécanismes neuro-immunitaires de l'asthme et aggrave l'inflammation et le remodelage des voies respiratoires (Li *et al.* (2009) *Respirology* **14**:60-68). Les taux sériques de NGF sont également extrêmement élevés chez les sujets atteints de BPCO (Stabile *et al.* (2016) *J. Biol. Chem.* **397**:157-163).

[0007] Dans les tissus tumoraux, le NGF stimule l'angiogenèse, y compris les cancers du poumon non à petites cellules (CPNPC) (Lu *et al.* (2014) *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* **34**:359-362). Il est aussi présent dans les cancers du sein et produit par les cellules tumorales alors que les cellules épithéliales normales n'en produisent pas, et peut donc servir de diagnostic mais aussi être une cible de traitement. Aussi l'utilisation de thérapies anti-NGF pourrait être à la base de futures stratégies thérapeutiques dans les affections pulmonaires citées.

[0008] Toutefois, les anticorps monoclonaux sont affectés de nombreuses limitations bien connues : un coût élevé, la nécessité de ré-administration fréquente et le développement d'une réaction immunitaire dirigée contre les anticorps monoclonaux administrés.

[0009] C'est donc un objet de la présente invention que de surmonter ces inconvénients.

Résumé de l'invention

[0010] La présente invention découle de la mise en évidence inattendue, par les inventeurs, que des polypeptides dérivés de séquences s'étendant des acides aminés 122 à 136 et 148 à 158 de la sous-unité β de la protéine NGF humaine (hNGF) permettaient la production d'anticorps dirigés contre la protéine hNGF.

[0011] La présente invention concerne donc un polypeptide comprenant, ou constitué de :

[0012] - une première séquence constituée d'au moins 8 acides aminés contigus choisis au sein de la séquence s'étendant des acides aminés 122 à 136, notamment, de la sous-unité β de la protéine NGF et d'au plus 30 acides aminés contigus choisis au sein de la séquence complète de la sous-unité β de la protéine NGF, ou une séquence variante présentant au moins 75% d'identité avec la première séquence ; et/ou

[0013] - une deuxième séquence constituée d'au moins 8 acides aminés contigus choisis au sein de la séquence s'étendant des acides aminés 148 à 158 de la sous-unité β de la protéine NGF et d'au plus 30 acides aminés contigus choisis au sein de la séquence

complète de la sous-unité β de la protéine NGF, ou une séquence variante présentant au moins 75% d'identité avec la deuxième séquence ;

[0014] sous réserve que le polypeptide soit différent de la sous-unité β de la protéine NGF et qu'il ne soit pas constitué d'une portion de plus de 30 acides aminés contigus de la sous-unité β de la protéine NGF, et

[0015] sous réserve que des polypeptides respectivement constitués des séquences variantes de la première et de la deuxième séquence permettent d'éliciter une réponse immunitaire dirigée contre la protéine NGF .

[0016] Dans un mode de réalisation préféré, l'invention concerne plus particulièrement un polypeptide comprenant, ou constitué de :

[0017] - une première séquence constituée de SEQ ID NO 1 ou une séquence variante présentant au moins 75% d'identité avec la première séquence ; et/ou

[0018] - une deuxième séquence constituée de SEQ ID NO 2 ou une séquence variante présentant au moins 75% d'identité avec la deuxième séquence ; et/ou

[0019] La présente invention concerne également un acide nucléique codant pour un polypeptide tel que défini ci-dessus, ou le complémentaire de celui-ci.

[0020] La présente invention concerne également :

[0021] - au moins un polypeptide tel que défini ci-dessus, ou

[0022] - au moins un acide nucléique tel que défini ci-dessus,

[0023] pour une utilisation à titre de médicament, notamment de vaccin, en particulier à visée humaine ou vétérinaire. Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le médicament, notamment le vaccin, tel que défini ci-dessus comprend également au moins un autre composé destiné à la prévention ou au traitement d'une maladie liée ou due à la protéine NGF.

[0024] La présente invention concerne également une composition pharmaceutique, notamment vaccinale, comprenant, à titre de substance active :

[0025] - au moins un polypeptide tel que défini ci-dessus, ou

[0026] - au moins un acide nucléique tel que défini ci-dessus,

[0027] éventuellement en association avec au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, la composition pharmaceutique, notamment vaccinale, telle que définie ci-dessus comprend également au moins un autre composé destiné à la prévention ou au traitement d'une maladie liée ou due à la protéine NGF.

[0028] La présente invention concerne également l'utilisation d'un polypeptide tel que défini ci-dessus, pour la préparation d'un anticorps, d'un fragment d'anticorps ou d'un aptamère.

[0029] La présente invention concerne également une méthode de préparation d'un anticorps, d'un fragment d'anticorps ou d'un aptamère comprenant une étape

d'administration d'un polypeptide tel que défini ci-dessus à un organisme producteur d'anticorps ou une étape de sélection par affinité d'un anticorps, d'un fragment d'anticorps ou d'un aptamère qui se lie au polypeptide tel que défini ci-dessus.

[0030] La présente invention concerne également un anticorps, un fragment d'anticorps, ou un aptamère anti-NGF spécifiquement dirigé contre le polypeptide tel que défini ci-dessus, sous réserve que le polypeptide ne comprenne pas plus de deux résidus d'acides aminés en plus de la première ou de la deuxième séquence ou de leurs séquences variantes respectives.

[0031] La présente invention concerne également un anticorps, un fragment d'anticorps, ou un aptamère tel que défini ci-dessus, pour une utilisation à titre de médicament. Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le médicament tel que défini ci-dessus comprend également au moins un autre composé destiné à la prévention ou au traitement d'une maladie liée ou due à la protéine NGF.

[0032] La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, un anticorps, un fragment d'anticorps, ou un aptamère tel que défini ci-dessus, éventuellement en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, la composition pharmaceutique telle que définie ci-dessus comprend également au moins un autre composé destiné à la prévention ou au traitement d'une maladie liée ou due à la protéine NGF.

[0033] La présente invention concerne également un polypeptide tel que défini ci-dessus, un acide nucléique (ARN ou ADN) tel que défini ci-dessus, ou une composition pharmaceutique telle que définie ci-dessus, pour une utilisation dans une méthode pour éliciter une réponse immunitaire dirigée contre la protéine NGF chez un individu. Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le polypeptide, l'acide nucléique ou la composition pharmaceutique est utilisé en combinaison avec au moins un autre composé utile pour éliciter une réponse immunitaire dirigée contre la protéine NGF.

[0034] La présente invention concerne également une méthode pour éliciter une réponse immunitaire dirigée contre la protéine NGF chez un individu, comprenant l'administration à l'individu d'une quantité efficace d'un polypeptide tel que défini ci-dessus, d'un acide nucléique tel que défini ci-dessus, ou d'une composition pharmaceutique telle que définie ci-dessus. Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le polypeptide, l'acide nucléique ou la composition pharmaceutique est administrée en combinaison avec au moins un autre composé utile pour éliciter une réponse immunitaire dirigée contre la protéine NGF.

[0035] La présente invention concerne également l'utilisation d'un polypeptide tel que défini ci-dessus ou d'un acide nucléique tel que défini ci-dessus pour la préparation d'un médicament destiné à éliciter une réponse immunitaire dirigée contre la protéine

NGF chez un individu. Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le médicament comprend également au moins un autre composé utile pour éliciter une réponse immunitaire dirigée contre la protéine NGF.

[0036] La présente invention concerne également un polypeptide tel que défini ci-dessus, un acide nucléique tel que défini ci-dessus, une composition pharmaceutique telle que définie ci-dessus, ou un anticorps, un fragment d'anticorps ou un aptamère tel que défini ci-dessus, pour une utilisation dans une méthode de prévention ou de traitement d'une maladie liée ou due à la protéine NGF chez un individu. Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le polypeptide, l'acide nucléique, la composition pharmaceutique, ou l'anticorps, le fragment d'anticorps ou l'aptamère est utilisé en combinaison avec au moins une autre thérapie destinée à la prévention ou au traitement d'une maladie liée à la protéine NGF.

[0037] La présente invention concerne également une méthode de prévention ou de traitement d'une maladie liée ou due à la protéine NGF chez un individu, comprenant l'administration à l'individu d'une quantité efficace d'un polypeptide tel que défini ci-dessus, d'un acide nucléique tel que défini ci-dessus, d'une composition pharmaceutique telle que définie ci-dessus, ou d'un anticorps, d'un fragment d'anticorps ou d'un aptamère tel que défini ci-dessus. Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, la méthode comprend au moins une autre thérapie destinée à la prévention ou au traitement d'une maladie liée à la protéine NGF.

[0038] La présente invention concerne également l'utilisation d'un polypeptide tel que défini ci-dessus, d'un acide nucléique tel que défini ci-dessus, ou d'un anticorps, d'un fragment d'anticorps ou d'un aptamère tel que défini ci-dessus, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement d'une maladie liée ou due à la protéine NGF chez un individu. Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le médicament comprend au moins un autre composé destiné à la prévention d'une maladie liée ou due à la protéine NGF.

[0039] La présente invention concerne également des produits contenants :

[0040] - un polypeptide ou un acide nucléique tel que défini ci-dessus, et

[0041] - au moins un autre composé destiné à la prévention ou au traitement d'une maladie liée ou due à la protéine NGF,

[0042] comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour la prévention ou le traitement d'une maladie liée ou due à la protéine NGF.

Description de l'invention

[0043] A titre préliminaire, on rappellera que le terme « comprenant » signifie « incluant », « contenant » ou « englobant », c'est-à-dire que lorsqu'un objet « comprend » un élément ou plusieurs éléments, d'autres éléments que ceux mentionnés peuvent

également être compris dans l'objet. *A contrario*, l'expression « consistant en » signifie « constitué de », c'est-à-dire que lorsqu'un objet « consiste en » un élément ou plusieurs éléments, l'objet ne peut pas comprendre d'autres éléments que ceux mentionnés.

Polypeptide

[0044] *Définition de la protéine NGF*

[0045] La protéine NGF est le *Nerve Growth Factor* (facteur de croissance des nerfs), également nommée NGF, Beta -HSAN5 ou encore NGFB, elle est bien connue de la personne du métier. Le NGF est une protéine multimérique comprenant des sous-unités α, β et γ, généralement avec la stœchiométrie $\alpha_2\beta_2\gamma_2$. La sous-unité β du NGF, ou β-NGF, est porteuse de l'activité catalytique. NGF est parfois utilisé comme synonyme de β-NGF.

[0046] *Espèces et séquences préférées de la sous-unité • de la protéine NGF*

[0047] De préférence, la sous-unité β de la protéine NGF selon l'invention est sélectionnée dans le groupe constitué de la sous-unité β de la protéine NGF humaine, de la sous-unité β de la protéine NGF de souris, de la sous-unité β de la protéine NGF de rat, de la sous-unité β de la protéine NGF de lapin, de la sous-unité β de la protéine NGF de singe, de la sous-unité β de la protéine NGF de chien, de la sous-unité β de la protéine NGF de chat, de la sous-unité β de la protéine NGF de cheval, de la sous-unité β de la protéine NGF de cochon, de la sous-unité β de la protéine NGF de mouton, et de la sous-unité β de la protéine NGF de dromadaire. De manière particulièrement préférée, la protéine NGF est la sous-unité β de la protéine NGF humaine (hNGF).

[0048] De préférence :

- la sous-unité β de la protéine NGF humaine (hNGF) est telle que décrite dans la base de données UniProt/Swissprot sous la référence P01138 et est constituée de SEQ ID NO : 3,
- la sous-unité β de la protéine NGF de souris (mNGF) est telle que décrite dans la base de données UniProt/Swissprot sous la référence P01139 et est constituée de SEQ ID NO : 4,
- la sous-unité β de la protéine NGF de rat est telle que décrite dans la base de données NCBI Genbank sous la référence NP_001263984.1 et est constituée de SEQ ID NO : 5,
- la sous-unité β de la protéine NGF de lapin est telle que décrite dans la base de données NCBI Genbank sous la référence XP_051712092.1 et est constituée de SEQ ID NO : 6,
- la sous-unité β de la protéine NGF de singe est telle que décrite dans la base de données Genbank sous la référence NP_001012439.1 et est constituée de SEQ ID NO : 7,

- la sous-unité β de la protéine NGF de chien est telle que décrite dans la base de données Uniprot/SwissProt sous la référence A0A8I3PYI3 et est constituée de SEQ ID NO : 8,
- la sous-unité β de la protéine NGF de chat est telle que décrite dans la base de données Genbank sous la référence XP_004001166.2 et est constituée de SEQ ID NO : 9.
- la sous-unité β de la protéine NGF de cheval est telle que décrite dans la base de données Genbank sous la référence XP_001496237.2 et est constituée de SEQ ID NO : 10,
- la sous-unité β de la protéine NGF de cochon est telle que décrite dans la base de données Genbank sous la référence XP_020945655.1 et est constituée de SEQ ID NO : 11,
- la sous-unité β de la protéine NGF de mouton est telle que décrite dans la base de données UniProt/Swissprot sous la référence A0A481MW93 et est constituée de SEQ ID NO : 12
- la sous-unité β de la protéine NGF de dromadaire est telle que décrite dans la base de données UniProt/Swissprot sous la référence A0A5N4DT36 et est constituée de SEQ ID NO : 13.

[0049] *Numérotation des résidus d'acides aminés*

[0050] Comme on l'entend ici, la numérotation des résidus d'acides aminés de la sous-unité β de la protéine NGF commence sur le premier résidu d'acide aminé, généralement une méthionine (M), formant l'extrémité N-terminale de la sous-unité β de la protéine NGF complète codée par le cadre ouvert de lecture du gène de la sous-unité β du NGF (β-NGF), c'est-à-dire incluant son peptide signal et le propeptide constitutif du pro-NGF. Par ailleurs, la numérotation des résidus d'acides aminés de la sous-unité β de la protéine NGF utilisée ici est définie par référence à la sous-unité β de la protéine NGF humaine. Il est ainsi aisé pour l'homme du métier de déterminer le résidu d'acide aminé d'une sous-unité β de la protéine NGF correspondant à un numéro de position auquel il est fait référence selon l'invention : il suffit d'aligner la séquence de la sous-unité β de la protéine NGF pour laquelle on souhaite déterminer le résidu d'acide aminé correspondant à un numéro de position avec une séquence de la sous-unité β de la protéine NGF humaine, notamment SEQ ID NO : 3, de manière à optimiser le pourcentage d'identité entre les deux séquences alignées, puis d'identifier le résidu d'acide aminé correspondant au numéro de position recherché comme étant celui qui est aligné avec le résidu d'acide aminé de la séquence de la sous-unité β de la protéine NGF humaine qui porte ce numéro de position.

[0051] *Première et deuxième séquences*

[0052] De préférence, la première séquence et la deuxième séquence sont constituées d'au

moins 9, 10, 11, 12 acides aminés contigus respectivement choisis au sein de l'une des séquences s'étendant des acides aminés 122 à 136 ou 148 à 158 de la sous-unité β de la protéine NGF, ou sont constituées respectivement au moins de la séquence s'étendant des acides aminés 122 à 136 ou 148 à 158 de la sous-unité β de la protéine NGF.

[0053] De préférence également, la première séquence et la deuxième séquence selon l'invention sont constituées respectivement au plus de 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20 acides aminés contigus choisis au sein de la séquence complète de la sous-unité β de la protéine NGF, ou sont constituées respectivement au plus des séquences 122 à 136 et 148 à 158, respectivement, de la sous-unité β de la protéine NGF.

[0054] De manière préférée, la première et la deuxième séquences selon l'invention sont respectivement constituées de SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 2.

[0055] SEQ ID NO : 1 et 2 représentent respectivement les portions 122 à 136 et 148 à 158 de la sous-unité β de la protéine NGF humaine, notamment représentée par SEQ ID NO : 3.

Séquence	SEQ ID NO :	Résidus d'acides aminés de β-hNGF
SSSHPIFHRGEFSVC	1	122-136
TATDIKGKEVM	2	148-158

[0056] *Séquences variantes*

[0057] Une séquence variante selon l'invention, qui présente au moins 75% d'identité avec la première ou la deuxième séquence présentée ci-dessus, présente de manière préférée au moins 80%, 85%, 90%, 95% ou 98% d'identité avec la première ou la deuxième séquence ci-dessus.

[0058] Comme on l'entend ici, le pourcentage d'identité entre deux séquences peptidiques peut être déterminé en réalisant un alignement optimal sur toute la longueur des séquences, en déterminant le nombre de positions alignées pour lesquelles les acides aminés sont identiques dans chaque séquence et en divisant ce nombre par le nombre total d'acides aminés dans la plus longue des deux séquences. L'alignement optimal est celui qui donne le pourcentage d'identité le plus élevé entre les deux séquences.

[0059] De manière préférée également, une séquence variante selon l'invention présente au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 98% d'identité avec SEQ ID NO : 1 ou SEQ ID NO : 2.

[0060] La séquence variante selon l'invention est telle qu'un polypeptide constitué de la séquence variante doit permettre d'éliciter une réponse immunitaire dirigée contre la protéine NGF ; c'est-à-dire que l'administration d'un tel peptide, éventuellement

cyclisé par formation d'au moins un pont disulfure inter-cystéines, si nécessaire après adjonction d'une ou deux cystéines au sein du peptide, et/ou à son extrémité N-terminale et/ou à son extrémité C-terminale, le peptide étant éventuellement lié à une molécule porteuse, notamment une protéine porteuse, telle que la KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*), à un animal, tel qu'une souris, un rat ou un lapin, provoque la production d'anticorps dirigés contre un NGF, notamment un NGF de la même espèce que celle à laquelle appartient la séquence avec laquelle la séquence variante présente le pourcentage d'identité le plus élevé. L'homme du métier sait bien comment déterminer si un anticorps est dirigé contre le NGF, notamment en mettant en œuvre un test ELISA. De manière préférée, les anticorps élicités par administration du peptide conjugué sont bloquants ou neutralisants, c'est-à-dire qu'ils empêchent la protéine NGF d'exercer tout ou partie, notamment au moins 10%, 25%, 50%, 75%, de son activité, par exemple mesurée *in vitro*.

[0061] *Longueur du polypeptide*

[0062] Le polypeptide selon l'invention comprend de préférence au plus 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40 ou 30 résidus d'acides aminés. Il est différent de la sous-unité β de la protéine NGF et n'est pas constitué d'une portion de plus de 30 résidus d'acides aminés contigus de la sous-unité β de la protéine NGF. Comme la personne du métier le comprend bien, cela n'exclut pas qu'il puisse être constitué de deux ou plus portions de la sous-unité β de la protéine NGF d'au plus 30 résidus d'acides aminés contigus, dans la mesure où ces portions ne sont pas agencées de manière à reconstituer une portion de la sous-unité β de la protéine NGF de plus de 30 acides aminés contigus.

[0063] Comme cela apparaîtra clairement à l'homme du métier, le polypeptide selon l'invention peut comprendre plusieurs répétitions, par exemple 2, 3, 4, 5, 10 ou 20 répétitions, respectivement des première et deuxième séquences et de la séquence variante selon l'invention.

[0064] *Séquences en plus des séquences de la première et deuxième séquences et des séquences variantes*

[0065] Par ailleurs, le polypeptide selon l'invention peut également comprendre des séquences ne provenant pas de la sous-unité β de la protéine NGF, et notamment des séquences comprenant des épitopes appartenant à d'autres protéines, ce qui permet d'éliciter ou de générer une réponse immunitaire dirigée contre ces autres protéines.

[0066] En outre, le polypeptide selon l'invention peut comprendre des séquences d'épitope(s) T exogène(s), préférablement universel(s), ce qui permet de renforcer l'immunogénicité du polypeptide selon l'invention.

[0067] Le polypeptide selon l'invention peut également comprendre au moins une séquence d'une protéine porteuse, par exemple une particule de type virale (VLP), comme cela est notamment décrit dans la demande internationale WO 05/117983 pour le TNF.

[0068] *Cyclisation du polypeptide*

[0069] Le polypeptide selon l'invention est de préférence cyclisé. Cette cyclisation peut être de tout type connu de la personne du métier. Le choix de la stratégie de cyclisation selon l'invention peut notamment tenir compte de la meilleure présentation antigénique des épitopes contenus dans le polypeptide selon l'invention.

[0070] En fonction des groupes fonctionnels présents dans le polypeptide, cette cyclisation peut s'effectuer de plusieurs manières différentes, comme par exemple : de son extrémité C-terminale à son extrémité N-terminale, de son extrémité N-terminale à une chaîne latérale, d'une chaîne latérale à son extrémité C-terminale ou encore entre deux chaines latérales. Parmi les diverses modalités de cyclisation de polypeptides, il est possible de citer la lactamisation, la lactonisation ou la formation d'un pont disulfure. En particulier, lors de la formation d'un pont disulfure inter-cystéines, c'est-à-dire entre les radicaux –SH de deux cystéines, les cystéines peuvent être déjà présentes dans la séquence variante selon l'invention ou dans la première et deuxième séquences selon l'invention, ou bien être ajoutées au sein de ces séquences, ainsi qu'à leur extrémité N-terminale et/ou C-terminale.

[0071] *Modifications post-traductionnelles, analogues d'acides aminés*

[0072] En outre, le polypeptide selon l'invention peut comprendre des modifications post-traductionnelles, telles que des glycosylations, des méthylations, des acylations, notamment par des acides gras, ou des phosphorylations. En particulier, l'extrémité N-terminale du polypeptide selon l'invention peut être acétylée et l'extrémité C-terminale peut être modifiée par amidation.

[0073] Le polypeptide selon l'invention peut également comprendre un ou plusieurs analogues ou dérivés d'acides aminés, dont les acides aminés non naturels ou non standards.

[0074] *Molécule porteuse*

[0075] De manière préférée également, le polypeptide selon l'invention est fixé ou lié, notamment par liaison covalente, à une molécule porteuse, notamment une protéine porteuse.

[0076] En particulier, la molécule porteuse peut être la protéine *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH), l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg), l'albumine sérique bovine (BSA), le toxoïde du tétanos (TT) et le toxoïde de la diphtérie (DT).

[0077] Le toxoïde de la diphtérie (DT) selon l'invention est de préférence choisi dans le groupe constitué de CRM 197, de CRM 176, de CRM 228, de CRM 45, de CRM 9, de CRM 102, de CRM 103, et de CRM 107.

[0078] De manière particulièrement préférée, la molécule porteuse est CRM 197.

[0079] La liaison du polypeptide selon l'invention à une molécule porteuse, notamment une protéine porteuse, peut être réalisée à l'aide d'un agent de couplage hétérobi-

fonctionnel, tel que l'ester de N-γ-maleimidobutyryl-oxysuccinimide (GMBS) et le derivé sulfo-GMBS, l'ester du m-maléimidobenzoyl-n-hydroxysuccinimide (MBS) et le derivé sulfo-MBS, le succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), un carbodiimide, le bis-diazonium-benzidine (BDB) ou le glutaraldéhyde.

[0080] Lorsque le glutaraldéhyde est utilisé, il est de préférence fixé sur une lysine (K) qui, si elle n'est pas présente dans une première ou une deuxième séquence, ou une séquence variante selon l'invention, peut être ajoutée, notamment à son extrémité N-terminale ou C-terminale. Par ailleurs, lorsqu'une lysine est présente dans une portion selon l'invention à une position non souhaitée, il est préférable d'utiliser une autre technique de conjugaison.

[0081] Lorsque le BDB est utilisé, il est de préférence fixé sur une tyrosine (Y) qui, si elle n'est pas présente dans une première ou une deuxième séquence, ou une séquence variante selon l'invention, peut être ajoutée, notamment à son extrémité N-terminale ou C-terminale. Par ailleurs, lorsqu'une tyrosine est présente dans une portion selon l'invention à une position non souhaitée, il est possible de mettre en œuvre, à la place, une séquence variante dans laquelle la tyrosine est substituée par un autre acide aminé, tel qu'une phénylalanine (F).

[0082] Lorsque le GMBS, le MBS ou le SMCC sont utilisés, ils sont de préférence fixés sur une cystéine (C), qui si elle n'est pas présente dans une première ou une deuxième séquence, ou une séquence variante selon l'invention, peut être ajoutée, notamment à son extrémité N-terminale ou C-terminale. Par ailleurs, lorsqu'une cystéine est présente dans une première ou une deuxième séquence, selon l'invention à une position non souhaitée, il est possible de mettre en œuvre, à la place, une séquence variante dans laquelle la cystéine est substituée par un autre acide aminé, tel qu'une sérine.

[0083] De manière tout particulièrement préférée le polypeptide selon l'invention est fixé sur la protéine porteuse CRM197 selon une construction représentée par une formule sélectionnée dans le groupe constitué des formules suivantes :

Polypeptide	SEQ ID NO :
[cycloS-S(Acétyl+C**SSSHPIFHRGEFSVC**)EGE–Ahx-C]$_n$–CRM197	14
[cycloS-S(C**TATIKGKEVM**C)EGE–Ahx-C]$_n$–CRM197	15

[0084] où :

– CRM197 désigne la protéine porteuse,

– Acétyl+ indique que l'extrémité N-terminale est acétylée,

- cycloS-S() indique une cyclisation par pont disulfure entre les groupements sulfhydriles des cystéines présentes en C-terminal et en N-terminal,
- Ahx indique un acide aminé non-naturel de type acide amino-héxanoïque,
- les crochets ($[X]_n$) indiquent qu'un ou plusieurs polypeptides sont fixés sur la protéine porteuse et
- la partie soulignée et en gras représente la première ou deuxième séquence selon l'invention

[0085] *Préparation du polypeptide*

[0086] Le polypeptide selon l'invention peut être préparé par toute méthode connue dans l'état de la technique et notamment par synthèse chimique. Il est également possible de le préparer par expression de l'acide nucléique selon l'invention dans des cellules eucaryotes ou procaryotes.

[0087] *Activité du polypeptide*

[0088] Le polypeptide selon l'invention, si nécessaire lié à une molécule porteuse, est immunogène, c'est-à-dire qu'il peut éliciter, ou provoquer, une réaction immunitaire, notamment de type humoral, c'est-à-dire la production d'anticorps, par un individu, notamment de type mammifère, auquel il est administré. En particulier, le polypeptide selon l'invention permet d'éliciter une réponse immunitaire dirigée contre la protéine NGF, notamment des anticorps anti-NGF, de préférence des anticorps anti-NGF bloquants ou neutralisants, c'est-à-dire qu'ils empêchent la protéine NGF d'exercer tout ou partie, notamment au moins 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, de son activité, par exemple mesurée *in vitro*.

Acide nucléique

[0089] L'acide nucléique selon l'invention est de l'ARN ou de l'ADN, de préférence de l'ADN. On préfère que l'acide nucléique selon l'invention soit lié de manière opératoire à une séquence promotrice procaryote et/ou eucaryote, notamment de mammifère ou de virus. Par ailleurs, l'acide nucléique selon l'invention peut être inclus dans un vecteur, tel qu'un plasmide ou un virus.

Anticorps, fragments d'anticorps et aptamères

[0090] Les anticorps, fragments d'anticorps, et aptamères selon l'invention sont dits être spécifiquement dirigés contre un polypeptide tel que défini ci-dessus lorsqu'ils ne présentent essentiellement pas de liaison à un autre polypeptide, qui ne comprend pas le polypeptide défini ci-dessus, dans des conditions permettant la liaison des anticorps, fragment d'anticorps, et aptamères selon l'invention aux polypeptides contre lesquels ils sont spécifiquement dirigés.

[0091] L'anticorps selon l'invention peut être polyclonal ou monoclonal, de préférence monoclonal. Par ailleurs, comme on l'entend ici, les « fragments d'anticorps » com-

prennent au moins une partie de liaison à l'antigène de l'anticorps dont ils sont issus, et sont notamment de type Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv stabilisé par disulfure (dsFv), région V dimérisée (diacorps), trimérisée, tétramérisée ou pentamérisée, Fv à chaine unique (scFv), région déterminant la complémentarité (CDR).

[0092] Les anticorps peuvent être de toute espèce, notamment humains, de souris, de rat, de lapin ou de camélidé. Par ailleurs, lorsqu'ils ne sont pas humains, ils peuvent également être humanisés, c'est-à-dire que les parties constantes de ces anticorps sont remplacées partiellement ou en totalité par des parties constantes correspondantes humaines.

[0093] Les anticorps selon l'invention peuvent être obtenus par immunisation d'un animal à l'aide d'un polypeptide selon l'invention selon des techniques bien connues de l'homme du métier.

[0094] Comme on l'entend ici, les aptamères sont des acides nucléiques, en particulier des ARN, capables de se lier spécifiquement à une cible moléculaire, telle qu'une protéine. Les aptamères peuvent notamment être obtenus par mise en œuvre de la technique SELEX bien connue de l'homme du métier, à partir des polypeptides selon l'invention.

Utilisation thérapeutique

[0095] *Maladies*

[0096] Diverses maladies peuvent être traitées selon l'invention, et en particulier les douleurs chroniques. D'autres exemples d'affections ou de troubles comprennent l'asthme, le psoriasis, l'arthrose, et l'arthrite.

[0097] L'invention est utile pour le traitement ou la prévention de douleurs chroniques, qui sont souvent associées à des niveaux accrus de NGF.

[0098] L'invention peut être utilisée en prévention, en traitement symptomatique, ou encore en traitement de la maladie elle-même. L'invention peut être utilisée pour le traitement de l'asthme et d'autres troubles associés à une hyperréactivité des voies respiratoires, typiquement caractérisés par des épisodes de toux et/ou de problèmes respiratoires.

[0099] L'invention est également utile dans la gestion d'autres conditions inflammatoires, telles que la sclérose en plaques, la colite, une maladie inflammatoire chronique de l'‘intestin, notamment la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique, la cystite vésicale, l'eczéma, la dermatite de contact, l'arthrite, y compris l'arthrite chronique et la polyarthrite rhumatoïde, et le psoriasis.

[0100] L'invention est également utile dans le traitement de maladies qui peuvent être associées à des niveaux accrus de NGF, y compris, par exemple, l'arthrose, le lupus érythémateux, mais aussi la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), le cancer pulmonaire, l'hyperalgésie et la douleur chronique.

[0101] *Individu*

[0102] Le ou les individus selon l'invention sont des animaux, de préférence des

mammifères ou des marsupiaux, plus préférablement des humains, des chevaux, des bovins, des cochons, des moutons, des chèvres, des dromadaires, des chiens ou des chats, le plus préférablement des humains.

[0103] *Administration*

[0104] De préférence, le polypeptide, la composition pharmaceutique, le médicament ou le produit selon l'invention est administré sous une forme administrable par la voie orale, mucosale, notamment sublinguale, parentérale, intrapéritonéale, transcutanée, intra-dermique, sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse ou intra-artérielle.

[0105] *Doses*

[0106] Dans le cadre de l'invention, le polypeptide selon l'invention peut être administré à des doses allant par exemple de 1 ng à 1 g, de préférence de 1 µg à 1 mg.

[0107] *Véhicule pharmaceutiquement acceptable*

[0108] Comme on l'entend ici, un « véhicule pharmaceutiquement acceptable » regroupe l'ensemble des composés, notamment les excipients, pouvant être administrés à un individu en conjonction avec un principe actif pharmacologique.

[0109] *Adjuvant*

[0110] Par ailleurs, notamment lorsqu'il est utilisé dans un cadre vaccinal ou prophylactique le polypeptide selon l'invention peut être associé ou combiné à un adjuvant, ou la composition pharmaceutique, le médicament ou le produit selon l'invention peut comprendre un adjuvant. L'adjuvant peut être de tout type adapté à augmenter la réponse immunitaire d'un individu, animal ou humain, à l'administration d'un polypeptide. Il peut ainsi s'agir d'adjuvant complet ou incomplet de Freund, de Montanide ISA51 VG, d'alun ou de phosphate de calcium par exemple, le Montanide ISA51 VG et l'alun étant préférés. L'adjuvant peut être associé au polypeptide selon l'invention en réalisant un mélange 1/1 en volume d'une solution d'adjuvant et d'une solution comprenant le polypeptide.

[0111] *Autre thérapie*

[0112] Comme on l'entend ici, l'expression « autre thérapie » désigne une thérapie pharmacologique avec au moins un autre composé différent du polypeptide selon l'invention ou une thérapie non-pharmacologique comme par exemple dans le cas du traitement de l'asthme de l'utilisation d'anticorps anti-IgGE.

[0113] *Autre composé*

[0114] Un autre composé, utile pour éliciter une réponse immunitaire dirigée contre la protéine NGF selon l'invention, peut notamment être un polypeptide différent de celui de l'invention et aussi dérivé de la protéine NGF.

[0115] En outre, notamment lorsqu'il est utilisé dans un cadre vaccinal ou qu'il est compris dans un vaccin ou une composition vaccinale, le polypeptide selon l'invention peut être combiné à d'autres antigènes destinés à éliciter une réponse immunitaire contre

une cible différente de la protéine NGF. Ce type de combinaison est utile pour la préparation de vaccins multivalents.

[0116] Comme on l'entend ici, l'expression « en combinaison » ou « produit de combinaison » signifie que le polypeptide tel que défini ci-dessus et l'autre composé tel que défini ci-dessus peuvent être associés au sein d'une même composition pharmaceutique ou d'un même médicament, et donc être administrés ensemble, ou bien être administrés de manière séparée, c'est-à-dire selon des voies d'administration distinctes et/ou des régimes d'administration distincts, sous réserve que lorsqu'ils sont administrés de manière séparée les périodes d'activité prophylactique ou thérapeutique du polypeptide tel que défini ci-dessus et de l'autre composé tel que défini ci-dessus se recouvrent en totalité ou en partie.

[0117] Ainsi, lorsque le polypeptide et l'autre composé sont administrés de manière séparée, le polypeptide tel que défini ci-dessus sera de préférence administré dans les 24 heures, plus préférablement dans les 2 heures, et encore plus préférablement dans l'heure, suivant l'administration de l'autre composé que défini ci-dessus, et son administration sera éventuellement poursuivie les jours suivants. Réciproquement, l'autre composé tel que défini ci-dessus sera de préférence administré dans les 24 heures, plus préférablement dans les 2 heures, et encore plus préférablement dans l'heure, suivant l'administration du polypeptide tel que défini ci-dessus, et son administration sera éventuellement poursuivie les jours suivants. Dans un autre mode de réalisation préférée de l'invention, lorsque le polypeptide tel que défini ci-dessus et l'autre composé tel que défini ci-dessus sont administrés de manière séparée, ils sont administrés essentiellement simultanément.

[0118] [Tableaux1]

SEQ ID NO :	**Dénomination**	**Séquences**
1	PPV-11-13	SSSHPIFHRGEFSVC
2	PPV-11-18	TATDIKGKEVM
3	Beta-nerve growth factor [Homo sapiens] Humain	>sp|P01138|NGF_HUMAN|1-241
		MSMLFYTLITAFLIGIQAEPHSESNVPAGHTIPQAH WTKLQHSLDTALRRARSAPAAAIAARVAGQTRNI TVDPRLFKKRRLRSPRVLFSTQPPREAADTQDLDF EVGGAAPFNRTHRSKRSSSHPIFHRGEFSVCDSVS VWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQY FFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFV KALTMDGKQAAWRFIRIDTACVCVLSRKAVRRA
4	Beta-nerve growth factor [Mus musculus] Souris	>sp|P01139|NGF_MOUSE|1-241
		MSMLFYTLITAFLIGVQAEPYTDSNVPEGDSVPEA HWTKLQHSLDTALRRARSAPTAPIAARVTGQTRNI TVDPRLFKKRRLHSPRVLFSTQPPPTSSDTLDLDFQ AHGTIPFNRTHRSKRSSTHPVFHMGEFSVCDSVSV WVGDKTTATDIKGKEVTVLAEVNINNSVFRQYFF ETKCRASNPVESGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVK ALTTDEKQAAWRFIRIDTACVCVLSRKATRRG
5	Beta-nerve growth factor precursor [Rattus norvegicus] Rat	>NCBI Reference Sequence NP_001263984.1|1-241
		MSMLFYTLITAFLIGVQAEPYTDSNVPEGDSVPEA HWTKLQHSLDTALRRARSAPAEPIAARVTGQTRNI TVDPKLFKKRRLRSPRVLFSTQPPPTSSDTLDLDFQ AHGTISFNRTHRSKRSSTHPVFHMGEFSVCDSVSV WVGDKTTATDIKGKEVTVLGEVNINNSVFKQYFF ETKCRAPNPVESGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVK ALTTDDKQAAWRFIRIDTACVCVLSRKAARRG

6	Beta-nerve growth factor [Oryctolagus cuniculus] Lapin	>NCBI Reference Sequence XP_051712092.1|1-241
		MSMLFYTLITALLIGIQAEPHADSNVPAGHALPQA HWTKLQHSLDTALRRARAAPAVAIAARVAGQTR NITVDPRLFKKRRLRSPRVLFSTQPPLAAVDFEELD LEVDVGSPSNRTYRSKRSAPHPVFHMGEFSVCDSV SVWVGDKTTATDIKGNEVKVLGEVNINNSVFKQY FFETKCRDPNPVESGCRGIDAKHWNSYCTTTHTFV KALTTDDKQAAWRFIRIDTACVCVLSRKASRRG
7	Beta-nerve growth factor precursor [Pan troglodytes] Chimpanzé	>NCBI Reference Sequence NP_001012439.1|122-241
		MSMLFYTLITAFLIGTQAEPHSESNVPAGHTIPQAH WTKLQHSLDTALRRARSAPAAAIAARVAGQTRNI TVDPRLFKKRRLRSPRVLFSTQPPPEAADTQDLDF EVGGAAPFNRTHRSKRSSSHPIFHRGEFSVCDSVS VWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQY FFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFV KALTMDGKQAAWRFIRIDTACVCVLSRKAVRRA
8	Beta-nerve growth factor [Canis lupus familiaris] Chien	>tr|A0A8I3PYI3|A0A8I3PYI3_CANLF|1-241
		MSMLFYTLITALLIGIRAEPHPESHVPAGHAIPHAH WTKLQHSLDTALRRARSAPAGAIAARVTGQTRNI TVDPKLFKKRRLRSPRVLFSTHPPPVAADAQDLDL EAGSTASVNRTHRSKRSSSHPVFHRGEFSVCDSVS VWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQY FFETKCRDPTPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFV KALTMDGKQAAWRFIRIDTACVCVLSRKAGRRA
9	Beta-nerve growth factor [Felis catus] Chat	>NCBI Reference Sequence XP_004001166.2|1-241
		MSMLSYTLITALLIGIQAEPHPESNVPAGHTIPQAH WTKLQHSLDTALRRARSTPAGAIAARVAGQTRNI TVDPKLFKKRRLRSPRVLFSTHPPPVAADTQGLDL EAGGAASFNRTHRSKRSSSHPVFHRGEFSVCDSVS VWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQY FFETKCRDPTPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFV KALTMDGKQAAWRFIRIDTACVCVLSRKAGRRA

10	Beta-nerve growth factor [Equus caballus] Cheval	>NCBI Reference Sequence XP_001496237.2|1-241
		MSMLFYTLITALLIGTQAEPHTESNVPAGHAIPQA HWTKLQHSLDTALRRARSAPARAIAARVAGQTRN ITVDPKLFKKRRLRSPRVLFSTQPPPVAADTQDLDF EAGGAASFNRTHRSKRSSSHPVFHRGEFSVCDSVS VWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQY FFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFV KALTMDGKQAAWRFIRIDTACVCVLSRKTGRKA
11	Beta-nerve growth factor [Sus scrofa] Cochon	>NCBI Reference Sequence XP_020945655.1|1-241
		MSMLFYTLITALLIGVQAEPHTESNVPAGHAIPQA HWTKLQHSLDTALRRAHSAPAGAIAARVAGQTR NITVDPKLFKKRRLRSPRVLFSTQPPPVAADTQDP DLEASGAASFNRTHRSKRSSSHPVFHRGEFSVCDS VSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFK QYFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTH TFVKALTMDGKQAAWRFIRIDTACVCVLSRKAGR RA
12	Beta-nerve growth factor [Ovis aries] Mouton	>tr|A0A481MW93|A0A481MW93_SHEEP|1-220
		ITALLIGIQAAPHTESNVPAGHAIPQAHWIKLQHYL DTVLRRAHSAQAGPIAARVAGQTHNITVDPKLFK KRRLRSPRVLFSTQPPPVAADTQDLDFEAGGAASF NRTHRSKRSSSHPVFHRGEFSVCDSVSVWVGDKT TATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQYFFETKCRDP NPVDSGCRGIDAKHWNSYCTTTHTFVKALTMDG KQAAWRFIRIDTA
13	Beta-nerve growth factor [Camelus dromedarius] Dromadaire	>tr|A0A5N4DT36|A0A5N4DT36_CAMDR|1-242
		MSMLFYTLITALLIGIQAEPHTKSNVPAGHDVPQA HWTKLQHSLDTALRRAHSAPAGAIAARVAGQTR NITVDPKLFKKRRLRSPRVLFSTQPPPVAADTQDL DLEANRAASFNRTHRSKRSAPSHPIFHRGEFSVCD SVSVWVADKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFK QYFFETKCRDPNPDESGCRGIDSKHWNSYCTTTHT FVRALTMDGKQAAWRFIRIDTACVCVLSRKAGRR A
14		[cycloS-S(Acétyl+C**SSSHPIFHRGEFSVC**)EGE–Ahx-C]$_n$–CRM197

15		[cycloS-S(C**<u>TATIKGKEVM</u>**C)EGE–Ahx-C]$_n$–CRM197

Liste des séquences

[0119] L'invention est davantage illustrée à l'aide des figures et des Exemples, non limitatifs, qui suivent.

Description des figures

[Fig. 1]

[0120] La [Fig.1] représente les titres$_{50}$ d'anticorps anti-hNGF (axe des ordonnées, unités arbitraires) mesurés à partir des sérums de six de souris SWISS immunisées avec le peptide PPV-11-13 conjugué. L'axe des abscisses correspond au temps de prélèvement des sérums en jours avant ou après la première immunisation (J0).

[Fig. 2]

[0121] La [Fig.2] représente les titres$_{50}$ d'anticorps anti-hNGF (axe des ordonnées, unités arbitraires) mesurés à partir des sérums de six de souris SWISS immunisées avec le peptide PPV-11-18 conjugué. L'axe des abscisses correspond au temps de prélèvement des sérums en jours avant ou après la première immunisation (J0).

EXEMPLES

[0122] <u>Exemple 1 : Reconnaissance de la sous-unité β de la protéine NGF humaine (β-hNGF) par des sérums de souris immunisées avec un peptide dérivé de la β-hNGF</u>

[0123] Un peptide comprenant la séquence 122-136 de la sous-unité β de la protéine NGF humaine (PPV-11-13, voir Tableau 2) a été synthétisé par synthèse chimique en phase solide selon des méthodes standard bien connues de la personne du métier, puis cyclisé par formation d'un pont disulfure entre deux cystéines du peptide. Il a ensuite été couplé à une protéine porteuse, la KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*), à l'aide de l'agent de couplage glutaraldéhyde.

[0124] Des souris SWISS (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) exemptes d'organismes pathogènes spécifiques ont été immunisées par voie sous-cutanée avec 25 µg d'équivalent peptide PPV-11-13 émulsionné en adjuvant Montanide ISA 51 VG (n = 6). Les souris ont reçu trois injections sous-cutanées (J0, J28 et J84).

[0125] [Tableaux2]

Peptide	Résidus d'acides aminés de β-hNGF	**Construction**	**SEQ ID NO :**
PPV-11-13	122-136	[cycloS-S(Acétyl+C**<u>SSSHPIFHRGEFSVC</u>**EGE–K)]$_n$–KLH	16

[0126] *Les acides aminés soulignés en gras correspondent aux résidus d'acides aminés*

122-136 de la séquence de la sous-unité β *de la protéine NGF humaine (Swissprot P01138)*

[0127] Peptide PPV-11-13 dérivé de la sous-unité β de la protéine NGF humaine utilisé pour l'immunisation

[0128] La quantité relative d'anticorps anti-β-hNGF est évaluée dans les sérums de souris à J-4 (pré-immun), J56, J98 et J126 par ELISA.

[0129] On observe que l'ensemble des souris immunisées ont produit des anticorps reconnaissant la protéine β-hNGF ([Fig.1]). Le peptide PPV-11-13 conjugué permet d'induire une réponse immunitaire contre la sous-unité β de la protéine NGF humaine, chez la souris.

[0130] Exemple 2 : Reconnaissance de la sous-unité β de la protéine NGF humaine (β-hNGF) par des sérums de souris immunisées avec un peptide dérivé de la β-hNGF

[0131] Un peptide comprenant la séquence 148-158 de la sous-unité β de la protéine NGF humaine (PPV-11-18, voir Tableau 3) a été synthétisé par synthèse chimique en phase solide selon des méthodes standard bien connues de la personne du métier, puis cyclisés par formation d'un pont disulfures entre deux cystéines du peptide. Il a ensuite été couplé à une protéine porteuse, la CRM 197, à l'aide de l'agent de couplage maléimide.

[0132] Des souris SWISS (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) exemptes d'organismes pathogènes spécifiques ont été immunisées par voie sous-cutanée avec 25 µg d'équivalent peptide PPV-11-18 émulsionné en adjuvant Montanide ISA 51 VG (n = 6). Les souris ont reçu trois injections sous-cutanées (J0, J28 et J84).

[0133] [Tableaux3]

Peptide	Résidus d'acides aminés de β-hNGF	**Construction**	**SEQ ID NO :**
PPV-11-18	148-158	[cycloS-S(C**TATDIKGKEVM**CEGE–Ahx-C)]$_n$–CRM 197	17

[0134] *Les acides aminés soulignés en gras correspondent aux résidus d'acides aminés 148-158 de la séquence de la* sous-unité β *de la protéine NGF humaine (Swissprot P01138)*

[0135] Peptide PPV-11-18 dérivé de la sous-unité β de la protéine NGF humaine utilisé pour l'immunisation

[0136] La quantité relative d'anticorps anti- β-hNGF est évaluée dans les sérums de souris à J-4 (pré-immun), J56, J98 et J126 par ELISA.

[0137] On observe que l'ensemble des souris immunisées ont produits des anticorps recon-

naissant la protéine β-hNGF ([Fig.2]). Le peptide PPV-11-18 conjugué permet d'induire une réponse immunitaire contre la sous-unité β de la protéine NGF humaine, chez la souris.

Revendications

[Revendication 1] Polypeptide comprenant, ou constitué de :
- une première séquence constituée d'au moins 8 acides aminés contigus choisis au sein de la séquence s'étendant des acides aminés 122 à 136 de la sous-unité β de la protéine NGF et d'au plus 30 acides aminés contigus choisis au sein de la séquence complète de la sous-unité β de la protéine NGF, ou une séquence variante présentant au moins 75% d'identité avec la première séquence ; et/ou
- une deuxième séquence constituée d'au moins 8 acides aminés contigus choisis au sein de la séquence s'étendant des acides aminés 148 à 158 de la sous-unité β de la protéine NGF et d'au plus 30 acides aminés contigus choisis au sein de la séquence complète de la sous-unité β de la protéine NGF, ou une séquence variante présentant au moins 75% d'identité avec la deuxième séquence ;
sous réserve que le polypeptide soit différent de la sous-unité β de la protéine NGF et qu'il ne soit pas constitué d'une portion de plus de 30 acides aminés contigus de la sous-unité β de la protéine NGF, et
sous réserve que des polypeptides respectivement constitués des séquences variantes de la première et la deuxième séquence permettent d'éliciter une réponse immunitaire dirigée contre la protéine NGF.

[Revendication 2] **2**. Polypeptide selon la revendication 1, dans lequel la première séquence et la deuxième séquence sont constituées d'au moins 12 acides aminés contigus respectivement choisis au sein de la séquence s'étendant des acides aminés 122 à 136, 148 à 158 de la sous-unité β de la protéine NGF.

[Revendication 3] Polypeptide selon la revendication 1 ou 2, dans lequel la première séquence et la deuxième séquence sont respectivement constituées au plus des acides aminés 122 à 136, 148 à 158 de la sous-unité β de la protéine NGF.

[Revendication 4] Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel la sous-unité β de la protéine NGF est sélectionnée dans le groupe constitué de la sous-unité β de la protéine NGF humaine (hNGF), de la sous-unité β de la protéine NGF de souris, de la sous-unité β de la protéine NGF de rat, de la sous-unité β de la protéine NGF de lapin, de la sous-unité β de la protéine NGF de singe, de la sous-unité β de la protéine NGF de chien, de la sous-unité β de la protéine NGF de chat, de la sous-unité β de la protéine NGF de cheval, de la sous-unité β de la protéine NGF de

cochon, de la sous-unité β de la protéine NGF de mouton et de la sous-unité β de la protéine NGF de dromadaire.

[Revendication 5] Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4, dans lequel la sous-unité β de la protéine NGF est la sous-unité β de la protéine NGF humaine (hNGF).

[Revendication 6] Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5, dans laquelle la première séquence et la deuxième séquence sont respectivement constituées de la séquence SSSHPIFHRGEFSVC (SEQ ID NO : 1) et de la séquence TATDIKGKEVM (SEQ ID NO : 2).

[Revendication 7] Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 6, dans lequel le polypeptide est sous forme cyclisée.

[Revendication 8] Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel le polypeptide est lié à une molécule porteuse.

[Revendication 9] Acide nucléique codant pour un polypeptide tel que défini dans l'une des revendications 1 à 8, ou le complémentaire de celui-ci.

[Revendication 10] Composition pharmaceutique comprenant, à titre de substance active :
- au moins un polypeptide tel que défini dans l'une des revendications 1 à 8, ou
- au moins un acide nucléique tel que défini dans la revendication 9,
éventuellement en association avec au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

[Revendication 11] Utilisation d'un polypeptide tel que défini dans l'une des revendications 1 à 8, pour la préparation d'un anticorps, d'un fragment d'anticorps ou d'un aptamère.

[Revendication 12] Anticorps, fragment d'anticorps, ou aptamère anti-NGF spécifiquement dirigé contre le polypeptide tel que défini dans l'une des revendications 1 à 8, sous réserve que le polypeptide ne comprenne pas plus de deux résidus d'acides aminés en plus de la première, ou de de la deuxième ou de leurs séquences variantes respectives.

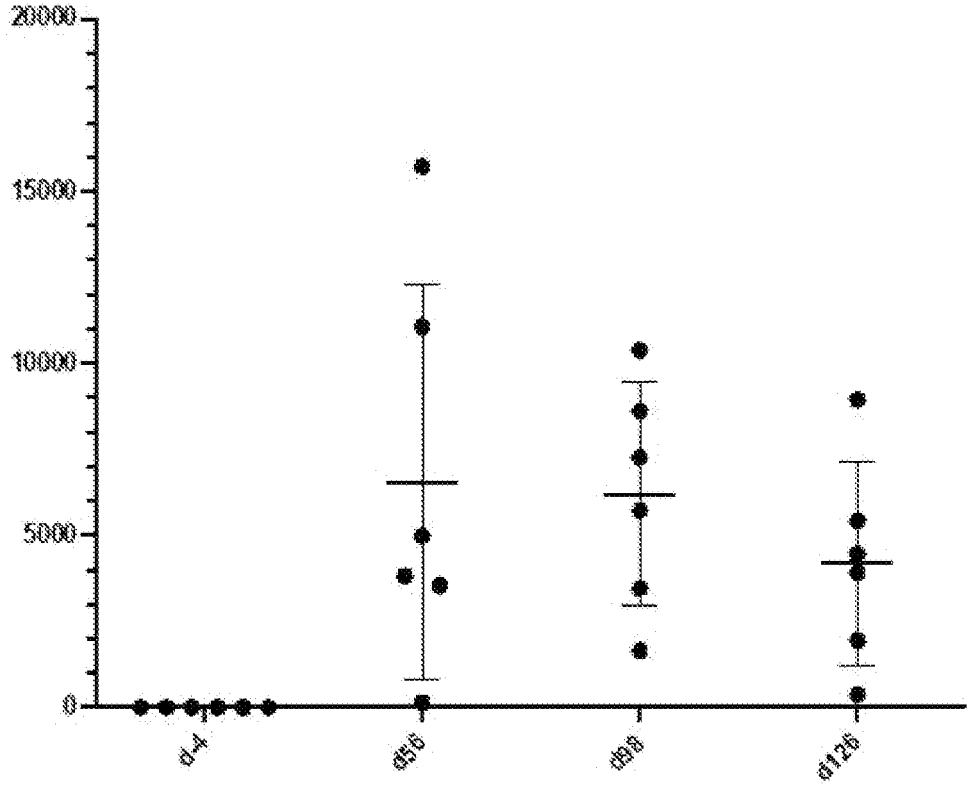
[Revendication 13] Anticorps, fragment d'anticorps, ou aptamère selon la revendication 12, pour une utilisation à titre de médicament.

[Revendication 14] Polypeptide tel que défini dans l'une des revendications 1 à 8, acide nucléique tel que défini dans la revendication 9, composition pharmaceutique telle que définie dans la revendication 10, ou anticorps, fragment d'anticorps ou aptamère tel que défini dans la revendication 13, pour une utilisation dans une méthode de prévention ou de traitement d'une maladie liée ou due à la protéine NGF chez un individu.

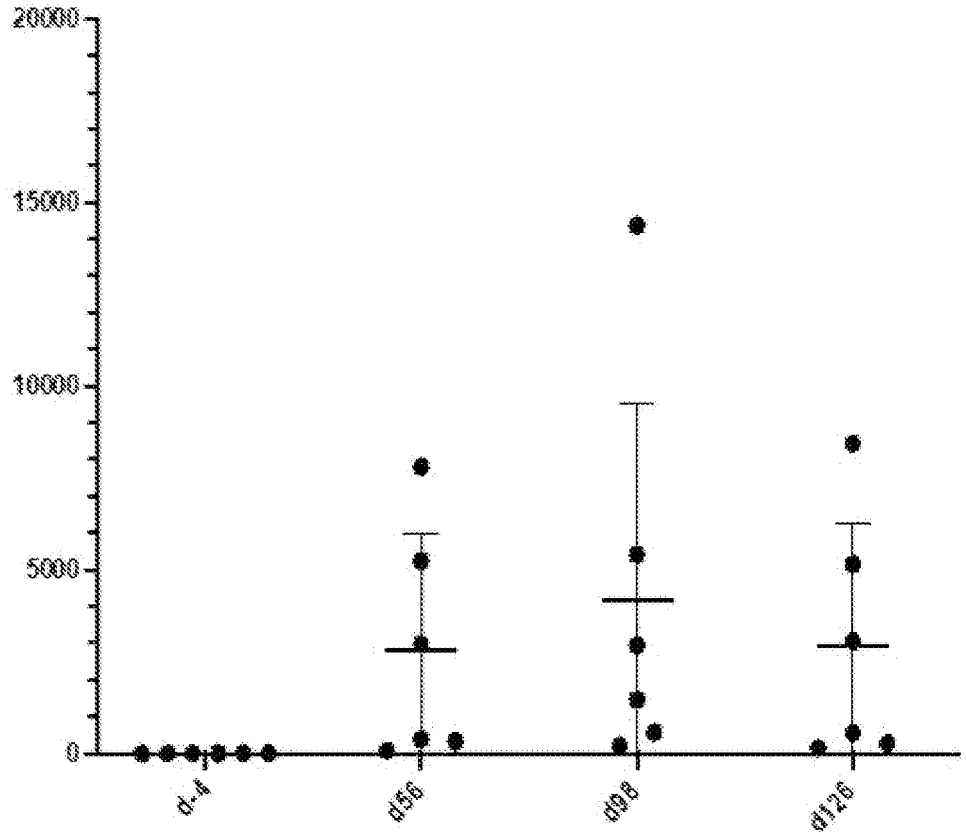
[Revendication 15] Polypeptide, acide nucléique, composition pharmaceutique, ou anticorps, fragment d'anticorps ou aptamère pour une utilisation selon la revendication 14, dans laquelle la maladie liée ou due à la protéine NGF est sélectionnée dans le groupe constitué :

- des maladies allergiques, de l'asthme des troubles associés à une hyperréactivité des voies respiratoires, typiquement caractérisés par des épisodes de toux et/ou de problèmes respiratoires ;
- la sclérose en plaques, la colite, une maladie inflammatoire chronique de l'intestin, la cystite vésicale, l'eczéma, la dermatite de contact, l'arthrite, y compris l'arthrite chronique et l'arthrite rhumatoïde, et le psoriasis ;
- l'arthrose, le lupus érythémateux, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), le cancer pulmonaire, les l'hyperalgésie et la douleur chronique.

[Fig. 1]


20000
15000
10000
5000
0
d-4
d56
d98
d126

[Fig. 2]


20000
15000
10000
5000
0
d-4
d56
d98
d126

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement national

FA 924770
FR 2304118

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 2005/019266 A2 (AMGEN INC [US]; WILD KENNETH D [US] ET AL.) 3 mars 2005 (2005-03-03)	1-9, 12-15	A61K 38/18 A61P 11/00 A61P 11/06
Y	* page 95, ligne 19 - page 96, ligne 21; revendications 26-27; tableaux 8,9,10 *	10,11	A61P 19/02 C07K 14/48 C07K 16/22

X	WO 2011/049758 A1 (AMGEN INC [US]; WILD KENNETH D [US] ET AL.) 28 avril 2011 (2011-04-28)	1-9, 12-15	C07K 7/00 C12P 19/34
Y	* page 94, ligne 15 - page 96, ligne 8; revendications 1-25; tableaux 8, 9, 10 *	10,11	

X	KR 2007 0018757 A (UNKNOWN) 14 février 2007 (2007-02-14)	1-9, 12-15	
Y	* le document en entier *	10,11	

X	AU 2016 247 195 A1 (AMGEN INC [US]; SQUIBB & SONS LLC [US]) 10 novembre 2016 (2016-11-10)	1-9, 12-15	
Y	* page 93, ligne 1 - ligne 8; revendications 26-29; tableaux 8,9,10 *	10,11	
	-----		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
X	US 6 881 719 B2 (TEXAS A & M UNIV SYS [CA]) 19 avril 2005 (2005-04-19) * tableau 10 *	1-9	A61K C07K

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
9 avril 2024	Jacques, Patrice

CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
A : arrière-plan technologique
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons
.....
& : membre de la même famille, document correspondant

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 2304118 FA 924770

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **09-04-2024**
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2005019266 A2	03-03-2005	AR 045056 A1	12-10-2005
		AR 075790 A2	27-04-2011
		AU 2004267030 A1	03-03-2005
		AU 2010202177 A1	17-06-2010
		BR PI0412567 A	19-09-2006
		CA 2534585 A1	03-03-2005
		CN 1849138 A	18-10-2006
		CN 102358903 A	22-02-2012
		CN 102408483 A	11-04-2012
		CY 1113167 T1	13-04-2016
		DK 1648509 T3	07-01-2013
		EA 200600254 A1	29-12-2006
		EA 201000245 A1	30-12-2010
		EP 1648509 A2	26-04-2006
		EP 2364728 A1	14-09-2011
		ES 2392954 T3	17-12-2012
		GE P20104887 B	10-02-2010
		GE P20146050 B	10-03-2014
		GE P20196963 B	10-04-2019
		HK 1088534 A1	10-11-2006
		HK 1096310 A1	01-06-2007
		HR P20060033 A2	30-04-2007
		HR P20120882 T1	28-02-2013
		IL 173076 A	29-10-2015
		IL 214281 A	31-07-2016
		JP 4489077 B2	23-06-2010
		JP 5264798 B2	14-08-2013
		JP 5965964 B2	10-08-2016
		JP 2007537703 A	27-12-2007
		JP 2010006812 A	14-01-2010
		JP 2010162028 A	29-07-2010
		JP 2012161316 A	30-08-2012
		JP 2012250986 A	20-12-2012
		JP 2015042670 A	05-03-2015
		JP 2015155413 A	27-08-2015
		JP 2017079782 A	18-05-2017
		MA 27952 A1	01-06-2006
		ME 02785 B	31-12-2012
		ME P31508 A	10-10-2010
		MX 341869 B	06-09-2016
		MX PA06000583 A	30-03-2006
		NZ 544751 A	31-05-2009
		NZ 588527 A	29-06-2012
		NZ 599196 A	31-01-2014
		PL 1648509 T3	28-02-2013
		PT 1648509 E	18-10-2012

EPO FORM P0465

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 2304118 FA 924770

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **09-04-2024**
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
		RS 20060022 A	05-06-2008
		RS 20100555 A	31-08-2011
		SG 10201404744R A	30-10-2014
		SI 1648509 T1	31-12-2012
		TN SN06010 A1	03-10-2007
		TW I385180 B	11-02-2013
		TW 200911833 A	16-03-2009
		TW 201311721 A	16-03-2013
		TW 201534621 A	16-09-2015
		UA 97086 C2	10-01-2012
		UA 115960 C2	25-01-2018
		US 2005074821 A1	07-04-2005
		US 2008033157 A1	07-02-2008
		US 2009155274 A1	18-06-2009
		US 2011040076 A1	17-02-2011
		US 2011091476 A1	21-04-2011
		US 2016237147 A1	18-08-2016
		US 2016304596 A1	20-10-2016
		WO 2005019266 A2	03-03-2005
		ZA 200600847 B	31-01-2007
WO 2011049758 A1	28-04-2011	AR 078569 A1	16-11-2011
		AU 2010308418 A1	10-05-2012
		AU 2014203316 A1	10-07-2014
		BR 112012008282 A2	22-11-2016
		CA 2775924 A1	28-04-2011
		CL 2012000881 A1	08-02-2013
		CN 102762228 A	31-10-2012
		CO 6541558 A2	16-10-2012
		CR 20120198 A	30-07-2012
		EA 201290189 A1	30-10-2012
		EP 2485760 A1	15-08-2012
		EP 3028717 A1	08-06-2016
		JP 2013507385 A	04-03-2013
		JP 2014169326 A	18-09-2014
		JP 2017014286 A	19-01-2017
		KR 20120117007 A	23-10-2012
		MA 33724 B1	01-11-2012
		ME 00226 B	10-02-2011
		MT P4289 B	12-05-2011
		MX 343748 B	22-11-2016
		NZ 599431 A	25-07-2014
		NZ 625391 A	26-02-2016
		PE 20121028 A1	06-08-2012
		SG 10201603945R A	28-07-2016
		TN 2012000136 A1	19-09-2013

EPO FORM P0465

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 2304118 FA 924770

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **09-04-2024**
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
		TW 201125581 A	01-08-2011
		UA 102775 C2	12-08-2013
		US 2010034818 A1	11-02-2010
		WO 2011049758 A1	28-04-2011
		ZA 201203135 B	30-01-2013
KR 20070018757 A	14-02-2007	AUCUN	
AU 2016247195 A1	10-11-2016	AUCUN	
US 6881719 B2	19-04-2005	AT E340571 T1	15-10-2006
		AU 2821201 A	31-07-2001
		CA 2397670 A1	26-07-2001
		DE 60123399 T2	23-08-2007
		DK 1265605 T3	12-02-2007
		EP 1265605 A1	18-12-2002
		ES 2273849 T3	16-05-2007
		US 2003211982 A1	13-11-2003
		WO 0152843 A1	26-07-2001

EPO FORM P0465

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82