

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 09.08.00.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 15.02.02 Bulletin 02/07.

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 :

⑦1 Demandeur(s) : *NEOVACS Société anonyme* — FR.

⑦2 Inventeur(s) : ZAGURY JEAN FRANCOIS, BIZZINI BERNARD, LE BUANEC HELENE et ZAGURY DANIEL.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : RINUY SANTARELLI.

⑤4 **UTILISATION D'IMMUNOGENES POUR TRAITER OU PREVENIR AU SEIN DES TUMEURS MALIGNES LES DEREGLEMENTS IMMUNITAIRES INDUITS PAR DES FACTEURS EXTRACELLULAIRES.**

⑤7 Vaccin renfermant à titre de principe actif un immunogène qui est

- un facteur cytokinique ou un facteur de régulation cellulaire particulièrement transcriptionnel ou un autre type de facteur à propriétés immunosuppressives / apoptotiques / angiogéniques anormalement produit par les cellules cancéreuses ou stromales de tumeurs malignes, ainsi qu'un excipient pharmaceutiquement acceptable permettant l'induction d'une réaction immunitaire systémique ou muco-sale avec formation d'anticorps de classe IgG ou IgA sécrétoire dirigée contre le facteur natif,
- ou qui dérive d'un tel facteur

et utilisation d'un tel immunogène pour l'obtention d'un médicament destiné à une utilisation en tant qu'anticancéreux.

FR 2 812 813 - A1



5 La présente invention concerne l'utilisation de préparations vaccinales médicamenteuses à usage thérapeutique ou prophylactique destinées à traiter ou prévenir au sein des tumeurs malignes les dérèglements immunitaires en particulier l'immunosuppression et l'apoptose des cellules immunitaires ou l'angiogénèse induits par des facteurs extracellulaires, cytokines ou autres facteurs de régulation en particulier transcriptionnels, 10 anormalement produits par les cellules cancéreuses ou les cellules stromales.

Les traitements conventionnels des cancers qu'ils soient d'origine virale, induits par des rétrovirus, ou l'EBV ou l'HPV ou encore les virus de l'hépatite, ou d'origine chronique, dus à l'amiante ou à des dérivés benzéniques, 15 qu'ils soient de type épithélial (carcinomes) ou conjonctif (sarcomes) ou encore sanguin (lymphomes) comportent l'ablation chirurgicale des tumeurs le plus souvent associée à une chimiothérapie et/ou une radiothérapie.

Bien qu'efficaces pour certains cancers, particulièrement pris à des stades précoces, ces traitements souvent difficilement tolérés sont insuffisants 20 et des récidives et des métastases compromettent l'évolution des malades.

C'est pourquoi lorsque les scientifiques dans les années 80 et 90 ont cloné et purifié des antigènes de tumeurs associés (TAA) ou spécifiques (TSA) aux cellules cancéreuses provenant de nombreuses tumeurs malignes (cancer du sein, de la prostate, colorectal, du col utérin; lymphome ATL), de 25 nombreuses expérimentations et essais cliniques de vaccination anti-cancer (Dvorak E. Experimental design for vaccine preparations against human malignant tumors. Med Hypotheses (1986) 20:429-52, Houghton AN. On course for a cancer vaccine. Lancet (1995) 345:1384-5, Herlyn D, Linnenbach A, Koprowski H, Herlyn M. Epitope- and antigen-specific cancer vaccines. Int Rev Immunol (1991) 7:245-57, Ostankovitch M, Choppin J, Guillet JG. Tumor cell antigenicity: cancers and vaccines. Rev Prat (1995) 45:1921-6, Zhu MZ, Marshall J, Cole D, Schlom J, Tsang KY. Specific cytolytic T-cell responses to human CEA from patients immunized with recombinant avipox-CEA vaccine. Clin Cancer Res (2000) 6:24-33, Tsunoda T, Tanimura H, Yamaue H, Tanaka 30 H, Matsuda K. Tumor specific CTL therapy for advanced cancer and

development for cancer vaccine. Hepatogastroenterology (1999) 46 :1287-92), utilisant comme antigènes les TAA et TSA ont été réalisés, visant à détruire spécifiquement les cellules malignes porteuses de ces antigènes grâce à l'action de cellules tueuses, particulièrement de lymphocytes cytolytiques (CTL),
5 porteurs de récepteurs spécifiques, induits par la réaction immunitaire vaccinale.

Les essais cliniques utilisant de tels vaccins réalisés chez les malades porteurs de différentes tumeurs (mélanome, cancer du sein , cancer colorectal, cancer de la vessie, ...) ont permis d'établir les faits suivants :

- 10 - Les préparations vaccinales anti cancer contenant les antigènes tumoraux (TAA ou TSA) présentés sous différentes formes ont été bien tolérées et n'ont généralement pas provoqué de complications régionales ou systémiques.
- 15 - De telles préparations vaccinales peuvent induire chez les malades une réponse immunitaire de type CTL (Tsunoda T, Tanimura H, Yamaue H, Tanaka H, Matsuda K. Tumor specific CTL therapy for advanced cancer and development for cancer vaccine. Hepatogastroenterology (1999) 1:1287-92, Schwaab T, Heaney JA, Schned AR, Harris RD, Cole BF, Noelle RJ, Phillips DM, Stempkowski L, Ernstoff MS. A randomized phase
20 II trial comparing two different sequence combinations of autologous vaccine and human recombinant interferon gamma and human recombinant interferon alpha2B therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: clinical outcome and analysis of immunological parameters. J Urol (2000) 163:1322-7, Steller MA, Gurski KJ, Murakami M, Daniel RW, Shah KV, Celis E, Sette A, Trimble EL, Park RC, Marincola FM. Cell-mediated immunological responses in cervical and vaginal cancer patients immunized with a lipidated epitope of human papillomavirus type 16 E7. Clin Cancer Res (1998) 4:2103-9), susceptible
25 in vitro de détruire spécifiquement les cibles cellulaires porteuses d'épitopes de TAA ou TSA complexés au Complexe Majeur
30 d'Histocompatibilité.

- Par contre à ce jour aucun essai clinique de phase III n'a pu montrer que ces préparations vaccinales, visant à détruire spécifiquement les cellules cancéreuses par la différenciation de cellules tueuses, étaient efficaces.

Ainsi dès 1992, après que Levine (The p53 tumor suppressor gene
5 and gene product. Princess Takamatsu Symp (1989) 20:221-30) ainsi que
d'autres équipes scientifiques eurent montré que la protéine p53 native qui a
des effets de réparation sur les brins d'ADN et des effets immunosuppresseurs du
cycle cellulaire ou un mutant de cette protéine était abondamment produite et
accumulée dans les tumeurs malignes, le même Levine propose de réaliser une
10 vaccination utilisant la protéine p53, apparaissant comme étant un antigène de
tumeur associé (TAA). Celle-ci était présentée à la surface de cellules
dendritiques (DC) ou adjuvantée dans un vecteur bactérien (type BCG) de
manière à induire une réponse immunitaire de type CTL dirigée contre les
cellules cancéreuses (Voir aussi WO-A-94/02167).

15 A l'appui de cette demande de brevet, des publications scientifiques
montrent le rôle bénéfique des cellules tueuses et le rôle péjoratif des anticorps
spécifiques dans l'évolution des tumeurs malignes (Theobald M, Biggs J,
Dittmer D, Levine AJ, Sherman LA. Targeting p53 as a general tumor antigen.
Proc Natl Acad Sci U S A (1995) 92:11993-7, Roth J. et al, p53 as a target for
20 cancer vaccines: recombinant canarypox virus vectors expressing p53 protect
mice against lethal tumor cell challenge, 1996, Proc Natl Acad Sci USA.;
93:4781-6).

A la suite de Levine, d'autres équipes modifiant le vecteur ou
l'adjuvant de l'immunogène p53 ont déposé une dizaine de demandes de
25 brevets sur l'utilisation de nouvelles présentations galéniques de vaccin anti
p53 visant également à induire la formation de cellules tueuses CTL ciblant les
cellules cancéreuses exprimant la protéine p53.

Les essais expérimentaux associés à ces vaccins anti p53 ont
montré l'innocuité et l'immunogénicité évaluée par l'apparition de cellules
30 tueuses anti p53. Plus, le seul essai clinique de vaccination anti p53 réalisé et
publié a confirmé l'innocuité et l'immunogénicité du vaccin. Cependant aucun
essai de phase III n'a pu valider l'efficacité de cette stratégie vaccinale.

Or la demanderesse a découvert avec étonnement que l'immunosuppression et l'angiogénèse du micro environnement des cellules infectées par certains virus tel le VIH-1 et du micro environnement des cellules cancéreuses apportent une explication rationnelle à l'absence d'efficacité de ces stratégies vaccinales car ces stratégies antérieures ciblent la cellule cancéreuse et non le dérèglement de son micro environnement.

Les travaux de la demanderesse ont montré en effet que des facteurs solubles secrétés par les cellules infectées par le VIH-1, en particulier la protéine Tat ou par les cellules immunitaires de patients infectés par le VIH en particulier l'IFN α et le TGF β ou produits par des cellules cancéreuses, telles la protéine E7 de l'HPV dans le cancer du col utérin ou la protéine Tax du HTLV1 dans les leucémies ATL, avaient des propriétés immunosuppressives susceptibles d'inhiber les réactions immunitaires cellulaires au sein des tumeurs et de ce fait expliquaient l'inefficacité de ces vaccins.

L'étude bibliographique a permis de conforter ces observations de la demanderesse, en confirmant la présence de facteurs immunosuppresseifs relâchés dans le milieu extracellulaire de tumeurs malignes :

Certains de ces facteurs non encore identifiés ont été produits par

- des cellules de cancer colorectal (Ebert EC, Roberts AI, O'Connell SM, Robertson FM, Nagase H. Characterization of an immunosuppressive factor derived from colon cancer cells. *J Immunol.* (1987) 138:2161-8 ou Remacle-Bonnet MM, Pommier FJ, Kaplanski S, Rance RJ, Depieds RC. Inhibition of normal allogenic lymphocyte mitogenesis by a soluble inhibitor extracted from human colonic carcinoma. *J Immunol* (1976) 117:1145-51,

- des cellules de glioblastome (29-Fontana A, Hengartner H, de Tribolet N, Weber E. Glioblastoma cells release interleukin 1 and factors inhibiting interleukin 2-mediated effects. *J Immunol.* (1984) 132:1837-44),

- des mélanomes (30.Hersey P, Bindon C, Czerniecki M, Spurling A, Wass J, McCarthy WH. Inhibition of interleukin 2 production by factors released from tumor cells. *J Immunol.* (1983) 131:2837-42), ou

- des ascites malignes (Tamura K, Shibata Y, Matsuda Y, Ishida N. Isolation and characterization of an immunosuppressive acidic protein from ascitic fluids of cancer patients. *Cancer Res.* (1981) 41:3244-52, Oh SK,

Moolten FL. Non specific immunosuppressive factors in malignant ascites : further characterization and possible relationship to erythrocyte receptors of human peripheral T cells. *J Immunol.* (1981) 127:2300-7).

D'autres facteurs de régulation transcriptionnelle, comme rapporté
5 plus haut, sont d'origine cellulaire telle la protéine p53, accumulée dans
certaines tumeurs malignes, en particulier colorectale (Remvikos Y, Tominaga
O, Hammel P, Laurent-Puig P, Salmon RJ, Dutrillaux B, Thomas G. Increased
p53 protein content of colorectal tumours correlates with poor survival. *Br J*
10 *Cancer* 1992 66:758-64, Gan H, Ouyang Q, Wang Y. Expression of p53 protein
in colorectal cancer and its relationship to cell proliferative activity and
prognosis. *Chung Hua Chung Liu Tsa Chih* (1996) 18:244-6). La protéine p53,
relâchée par transport actif par des voies de sécrétion n'utilisant pas le signal
peptide ou par diffusion passive est présente dans le milieu extracellulaire, et
15 elle a été isolée par chromatographie sur fibre de verre à partir de sérum de
cancéreux (Zusman I, Sandler B, Gurevich P, Zusman R, Smirnof P, Tendler Y,
Bass D, Shani A, Idelevich E, Pfefferman R, Davidovich B, Huszar M, Glick J.
Comparative study of the role of serum levels of p53 antigen and its tumor cell
concentration in colon cancer detection. *Hum Antibodies Hybridomas.* (1996)
:123-8, Sandler B, Smirnof P, Tendler Y, Zinder O, Zusman R, Zusman I.
20 Specificity of polyclonal anti-p53 IgG for isolation of the soluble p53 antigen
from human serum. *Int J Mol Med.* 1998 1:767-70).

Des cytokines, telles le TGF β notoirement immunosuppressif; le
VEGF facteur de croissance angiogénique, l'IL-6 proinflammatoire ou l'IL10
également immunosuppressive, sont anormalement sécrétées et relâchées
25 dans le milieu extracellulaire de certaines cellules cancéreuses. La
demanderesse a elle-même montré que les cellules de lignée cancéreuses
SIHA, tout comme les cellules DU145 du cancer de la prostate et les cellules
MT2 de lignées leucémiques produisent anormalement et relâchent dans le
milieu extracellulaire des cytokines telles le VEGF et/ou l'IL6 tandis que les
30 cellules RAJI de lignées leucémiques secrètent dans le milieu extracellulaire de
l'IL10.

Dans ce contexte, la présente invention a pour objet l'utilisation comme médicament anticancéreux de nouvelles préparations vaccinales dénuées de toxicité et dirigées :

5 - soit contre des cytokines immunosuppressives, apoptotiques ou angiogéniques produites en excès par les cellules cancéreuses ou stromales de tumeurs malignes. Les exemples de vaccins anti-cytokines décrits dans EP-591.281 concernaient particulièrement des vaccins anti-IFN α utilisés contre le SIDA et d'autres affections immunitaires.

10 - soit contre des facteurs de régulation cellulaire particulièrement transcriptionnels ou d'autres facteurs à propriétés immunosuppressives, apoptotiques ou angiogéniques anormalement produits par les cellules cancéreuses. Les exemples d'immunogènes décrits dans WO-A-00/03732 dérivait de facteurs de régulation d'origine virale telles les protéines E7 du HPV 16, Tax du HTLV-1 et du Tat du HIV-1.

15 Dans ces nouvelles préparations vaccinales non toxiques, l'immunogène

1- est constitué par ou dérive de facteurs cytokiniques ou de facteurs de régulation cellulaire particulièrement transcriptionnels ou d'autres facteurs à propriétés immunosuppressives / apoptotiques / angiogéniques anormalement produits par les cellules cancéreuses ou stromales de tumeurs malignes.

20 2- est de préférence présenté sous une forme galénique permettant d'induire une réaction immunitaire induisant préférentiellement des anticorps de classe IgG et/ou IgA capables d'antagoniser localement les facteurs immunosuppressifs / apoptotiques / angiogéniques anormalement présents dans le milieu extracellulaire des tumeurs et d'en inhiber les effets.

25 La présente invention propose notamment l'utilisation comme médicament anticancéreux de vaccins dirigés particulièrement contre des facteurs pathogènes produits anormalement dans la matrice extracellulaire des tumeurs malignes et notamment

30 - la protéine TGF β : Le TGF β étant une cytokine immunosuppressive majeure produite par de nombreuses cellules cancéreuses ;

- la protéine IL10 : L'IL10 étant également une cytokine immunosuppressive majeure

- la protéine p53 : Si la protéine de régulation p53 produite anormalement par les cellules cancéreuses et accumulée dans les tumeurs peut représenter un antigène de tumeur associé (TAA) comme cela a été montré dans l'art antérieur, elle peut également agir dans sa configuration
5 extracellulaire comme facteur immunosuppresseur et apoptogène sur les cellules immunitaires comme illustré ci-après dans les exemples.

- Le VEGF, facteur de croissance des cellules endothéliales : La cytokine VEGF étant une cytokine majeure de l'angiogénèse, activant la prolifération des cellules endothéliales.

10 - L'IL6, l'IFN γ et le TNF α , cytokines pro inflammatoires participant également aux processus d'angiogénèse, en activant l'expression des molécules d'adhérence des cellules endothéliales (ICAM, VCAM, E sélectine).

Tous ces vaccins visent à induire une réaction immunitaire avec formation d'anticorps de classe IgG (pour tous les cancers) et surtout de classe
15 IgA (pour les cancers épithéliaux) de manière à neutraliser localement, au sein de la tumeur, les facteurs pathogènes particulièrement immunosuppresseurs / apoptotiques / angiogéniques et à en bloquer leurs effets, permettant ainsi à l'immunité naturelle ou à un vaccin dirigé contre les antigènes TAA ou TSA de fonctionner normalement et d'éliminer les cellules malades.

20 **C'est pourquoi la présente demande a pour objet un vaccin caractérisé en ce qu'il renferme à titre de principe actif un immunogène qui est un facteur ou qui dérive d'un facteur cytokinique ou d'un facteur de régulation cellulaire particulièrement transcriptionnel ou d'un autre type de facteur à propriétés immunosuppresseurs / apoptotiques /
25 angiogéniques anormalement produit par les cellules cancéreuses ou stromales de tumeurs malignes, ainsi qu'un excipient pharmaceutiquement acceptable permettant l'induction d'une réaction immunitaire systémique ou muco-sale avec formation d'anticorps de classe IgG ou IgA sécrétoire dirigée contre le facteur natif.**

30 Dans des conditions préférentielles de mise en œuvre, l'immunogène dérive d'un facteur cytokinique ou d'un facteur de régulation cellulaire particulièrement transcriptionnel ou d'un autre type de facteur à propriétés immunosuppresseurs / apoptotiques / angiogéniques anormalement produit par

les cellules cancéreuses ou stromales de tumeurs malignes par traitement chimique, physique, par mutation génétique, par conditionnement adjuvant ou est le produit d'une vaccination génétique (vaccin à ADN) ou est un fragment protéique ou peptidique d'un tel facteur ou encore dérive d'un tel fragment

5 protéique ou peptidique.

Dans d'autres conditions préférentielles de mise en œuvre, l'immunogène est choisi parmi la TGF β , l'IL10, la protéine p53, le VEGF, l'IL6, l'IFN γ et le TNF α ou en dérive.

L'immunogène de ces préparations vaccinales, dénuées de toxicité

10 comme tout médicament, pourra dériver d'un facteur immunosuppresseif / apoptotique / angiogénique ou d'un de ses fragments peptidiques par traitement chimique, physique, par mutation génétique, par conditionnement adjuvant ou être le produit d'une vaccination génétique (vaccin à ADN). De tels traitements de l'immunogène qui ont été décrits dans WO-A-00/03732 peuvent être utilisés

15 dans la présente invention pour l'obtention d'un vaccin dénué de toute toxicité et en particulier dépourvu de tout caractère immunosuppresseif. Mais les immunogènes peuvent aussi être utilisés à l'état natif.

Les traitements chimiques consistent par exemple à détoxifier la protéine native ou recombinante par un traitement aux aldéhydes notamment le

20 formaldéhyde, aldéhyde monofonctionnel et donc n'agissant pas par couplage de molécules, conformément à la détoxification des toxines tétaniques ou diphtériques, ou consistent encore en des traitements bloquant les groupements sulfidryles, tels la carboxamidation, la maléimidation ou la carboxyméthylation ou en tout autre traitement bloquant d'autres résidus

25 aminés comme décrit dans des demandes antérieures de la demanderesse.

On pourra utiliser un mutant du facteur possédant au moins 70 %, de préférence au moins 80 % et tout particulièrement au moins 90 % d'homologie avec le facteur protéique natif ou encore un fragment protéique ou peptidique du facteur. Dans le cas d'un peptide, celui-ci sera de préférence porté par une

30 protéine porteuse tel le KLH ou le toxoïde tétanique. On pourra avantageusement utiliser aussi une protéine porteuse dans le cas du facteur protéique natif ou encore d'un fragment protéique de celui-ci.

Les produits décrits ci-dessus utilisés comme immunogènes, à l'exception des facteurs natifs, sont nouveaux, au moins pour la plupart d'entre eux. Ils entrent donc dans le cadre de l'invention.

Les traitements physiques peuvent être réalisés par la chaleur, les radiations U.V., les rayons X ou le contact avec une atmosphère riche en O₂. Ces traitements physiques générant des modifications intramoléculaires entre radicaux chimiques (groupement thiols par exemple), peuvent de manière appropriée changer la conformation de la molécule, l'inactiver fonctionnellement tout en conservant ses propriétés immunogènes.

Les modifications génétiques peuvent être obtenues par ingénierie génétique opérant des insertions, des délétions ou des substitutions de résidus. Les mutants génétiques pourront ou non subir un traitement chimique et/ou physique complémentaire. Les protéines modifiées ci-dessus peuvent par exemple être préparées à partir d'une protéine ayant une séquence identique ou similaire à une séquence peptidique d'un facteur ci-dessus. Tous ces procédés sont bien connus de l'état de la technique.

Un vaccin à ADN (vaccination génétique) pourra comprendre un plasmide comportant un gène promoteur d'expression comme celui du CMV et le gène codant pour un immunogène défini ci-dessus (facteur natif ou dérivé dont fragments).

Par "dérivent" ou "dériver" de facteurs immunosuppresseifs / apoptotiques / angiogéniques, l'on entend aussi que le composé immunogène peut être constitué de la totalité ou d'un fragment de la protéine de départ.

Il peut comporter une ou plusieurs modifications dans les acides aminés de cette protéine ou fragment telles que des délétions, substitutions, additions, ou fonctionnalisations telles qu'acylation d'acides aminés, dans la mesure où ces modifications restent dans le cadre précisé ci-dessus (absence de toxicité, caractères immunologiques). Par exemple, en général le remplacement d'un résidu leucine par un résidu isoleucine ne modifie pas de telles propriétés; les modifications doivent généralement concerner moins de 40% d'acides aminés, notamment moins de 30% de préférence moins de 20% et tout particulièrement moins de 10% du facteur protéique. Il est important que la protéine ou fragment modifié ne soit pas dénaturé comme on peut le faire par

exemple par un traitement physique comme la chaleur afin de préserver ses sites conformationnels pour que les anticorps induits par les dérivés modifiés soient actifs vis à vis de la protéine native.

De manière générale, en ce qui concerne les modifications,
5 l'homologie ou la similitude entre l'immunogène modifié et la protéine ou partie de protéine immunosuppressive native, ainsi que les dimensions du composé immunogène, de même que les modalités d'utilisation, ou de couplage du composé immunogène selon l'invention à une protéine immunogène telle que le toxoïde tétanique, on peut en particulier se référer à WO-A-86/06 414 ou à
10 EP-A-0.220.273 ou encore à PCT/US.86/00831, équivalents.

Un fragment peut comporter de 8 à 110 acides aminés par exemple, de préférence de 12 à 60 acides aminés et notamment de 12 à 40 acides aminés. Un tel fragment peut comporter aussi du ou des côtés C ou N terminal de 1 à 5 acides aminés supplémentaires c'est-à-dire différents du segment
15 d'origine. Un fragment doit en outre comporter une cystéine au moins pour pouvoir faire l'objet de la carboxyméthylation. Un fragment protéique pourra comporter la totalité des acides aminés de la séquence native, déléetée de moins de 25 acides aminés, de préférence moins de 15 acides aminés, particulièrement moins de 10 acides aminés et tout particulièrement moins de 5
20 acides aminés, voire même un seul acide aminé.

Pour le conditionnement adjuvant, l'immunogène pourra notamment être inclus dans une émulsion eau dans huile, en utilisant par exemple l'ISA 51.

Une préparation vaccinale contenant l'immunogène anti immunosuppressif / apoptotique / angiogénique pourra être administrée sous
25 une forme galénique appropriée à induire une réponse immunitaire de type systémique par voie Intra Musculaire (IM), Sous Cutanée (SC), Intra Dermique (ID) ou de type mucosal par voies intra nasale, orale, vaginale ou rectale.

Une préparation vaccinale contenant l'immunogène anti immunosuppressif / apoptotique / angiogénique pourra également contenir
30 d'autres immunogènes, tels les antigènes TAA ou TSA de cancer ou des adjuvants telles des cytokines ou des protéines d'entérotoxines, type CTB ou Lt mutant (LT μ) (Freytag LC, Clements JD, Bacterial toxins as mucosal adjuvants *Curr Top Microbiol Immunol*; (1999) 236:215-36).

Une préparation galénique à visée systémique, administrée par voie SC, IM, ID, pourra être une émulsion eau renfermant l'immunogène, dans huile, ou une suspension de phosphate de calcium enchâssant l'immunogène, ou de l'hydroxyde d'aluminium adsorbant l'immunogène.

5 Une préparation galénique visant une réponse immunitaire mucoale administrée préférentiellement par voie nasale ou orale, mais aussi par voie vaginale ou rectale surtout pour des rappels, pourra être notamment constituée de micro sphères de polymères biodégradables, tels les PLG (poly(lactide-co-glycolides)), PLA ((poly(lactides)) et les PCL, (poly(epsilon-caprolactones)) à
10 forme retard (Baras B. et al, Single-dose mucosal immunization with biodegradable microparticles containing a Schistosoma mansoni antigen. Infect Immun. (1999) 67:2643-8) dans lesquelles sont incluses les molécules d'antigènes, de suspensions aqueuses de phosphate de calcium enchâssant ou adsorbant l'antigène, de nanoparticules, telles les nanoparticules de chitosan.

15 Les préparations vaccinales pourront être conditionnées pour la voie intra nasale sous forme de gel avec comme excipient le carbopol, de gouttes nasales ou de spray et pour la voie orale sous forme de capsules gastrorésistantes, de dragées ou de granules gastrorésistants.

- Dans le cas de vaccin ADN administré par voie systémique ou
20 mucoale, la présentation galénique du plasmide pourra être une suspension dans un liquide physiologique tel le PBS physiologiques (tampon phosphate = PBS). Les plasmides pourront être inclus dans des microsphères de polymères biodégradable (PLG, PLA, PCL) et administrées dans des capsules gastrorésistantes pour ingestion (voie orale). L'ADN pourra également être
25 exprimé dans un vecteur vivant bactérien, type salmonelle ou viral type adénovirus ou poxvirus.

La présente demande a aussi pour objet l'utilisation à titre d'immunogène d'un facteur qui est un facteur cytokinique ou un facteur de
régulation cellulaire particulièrement transcriptionnel ou un autre type de facteur
30 à propriétés immunosuppressives / apoptotiques / angiogéniques anormalement produit par des cellules cancéreuses ou stromales de tumeurs malignes ou qui dérive d'un tel facteur.

La présente demande a encore pour objet l'utilisation d'un immunogène qui est un facteur ou qui dérive d'un facteur cytokinique ou d'un facteur de régulation cellulaire particulièrement transcriptionnel ou d'un autre type de facteur à propriétés immunosuppressives / apoptotiques / angiogéniques anormalement produit par des cellules cancéreuses ou stromales de tumeurs malignes pour l'obtention d'un médicament destiné à une utilisation en tant qu'anticancéreux par mécanisme de réduction des effets, sur le micro environnement desdites cellules cancéreuses ou stromales de tumeurs malignes, d'un facteur cytokinique ou d'un facteur de régulation cellulaire particulièrement transcriptionnel ou d'un autre type de facteur à propriétés immunosuppressives / apoptotiques / angiogéniques anormalement produit par lesdites cellules cancéreuses ou stromales de tumeurs malignes.

La présente demande a enfin pour objet un immunogène qui est un facteur ou qui dérive d'un facteur cytokinique ou d'un facteur de régulation cellulaire particulièrement transcriptionnel ou d'un autre type de facteur à propriétés immunosuppressives / apoptotiques / angiogéniques anormalement produit par les cellules cancéreuses ou stromales de tumeurs malignes pour son utilisation dans une méthode de traitement thérapeutique du corps humain ou animal, c'est-à-dire à titre de médicament, notamment de vaccin curatif ou préventif.

Les immunogènes objet de la présente invention possèdent de très intéressantes propriétés pharmacologiques. Ils sont doués notamment de remarquables propriétés antagonistes, réductrices, inhibitrices ou notamment neutralisantes, des propriétés immunosuppressives / apoptotiques / angiogéniques de facteurs anormalement produits par les cellules cancéreuses ou stromales de tumeurs malignes.

Ces propriétés sont illustrées ci-après dans la partie expérimentale. Elles justifient l'utilisation des vaccins et immunogènes ci-dessus décrits à titre de médicament.

Les médicaments selon la présente invention trouvent leur emploi par exemple dans le traitement tant curatif que préventif de cancers d'origine épithéliale comme par exemple le cancer colorectal, le cancer de la prostate, le

cancer du sein et d'origine conjonctive tels les sarcomes ou d'origine sanguine tels les lymphomes type Epstein-Barr ou les leucémies.

La présente demande a également pour objet un procédé d'immunisation active de patients caractérisé en ce que l'on utilise à titre
5 d'immunogène un composé immunogène tel que défini ci-dessus avantageusement associé à un adjuvant d'immunité minéral, huileux ou de synthèse, ou encore un composé immunogène tel que défini ci-dessus, avantageusement couplé par exemple à l'aide d'un dialdéhyde ou associé à une protéine augmentant son immunogénicité.

10 Ces immunisations peuvent être réalisées tant à titre curatif qu'à titre préventif.

Les conditions préférentielles de mise en oeuvre des vaccins ci-dessus décrits s'appliquent également aux autres objets de l'invention visés ci-dessus.

15 Les exemples qui suivent illustrent la présente invention.

La figure 1 montre l'inhibition de la prolifération cellulaire par le TGF β exprimée en % de prolifération cellulaire ((cpm contrôle/cpm échantillon) x 100) à trois concentrations (30, 10 et 3 ng/ml) de TGF β et de protéine p24. Le contrôle correspond à une concentration de protéine recombinante utilisée
20 égale à 0.

Exemple 1 : Vaccin à base de l'immunogène VEGF destinée à induire une réaction immunitaire systémique avec formation préférentielle d'anticorps spécifiques de classe IgG.

25 Le vaccin est formé d'une émulsion eau dans huile constituée de 50 % d'ISA 51 (Seppic, Paris) et de 50 % d'une solution aqueuse de VEGF (20 à 200 μ g/dose).

Exemple 2 : Vaccin à base de l'immunogène plasmidique pour
30 vaccination ADN de type systémique IL10.

Les plasmides codant pour l'IL10 (50 à 200 µg/dose) sont mis en suspension dans 0,2 à 1 ml de PBS pour administration intramusculaire.

Exemple 3 : Vaccin à base de l'immunogène p53 destinée à induire une réaction immunitaire de type mucosale avec formation préférentielle d'anticorps anti p53 de classe IgA .

L'immunogène p53 (20 à 100 µg/dose) est inclus dans un gel de phosphate de calcium en présence ou non d'adjuvant LTµ (5 à 20 µg/dose) pour l'instillation intra nasale. La préparation est administrée par voie intranasale soit sous forme de gouttes nasales, soit sous forme d'un gel par addition de carbopol.

Exemple 4 : Vaccin à base de l'immunogène IL10 destinée à induire une réaction immunitaire de type réaction mucosale avec formation préférentielle d'anticorps anti IL10 de classe IgA :

On a préparé des micro sphères de PLG contenant l'immunogène (100 à 300µg/dose) et un mutant de la toxine LT (5-25µg/dose)

L'inclusion de l'IL10 et du LTµ est réalisée dans les micro sphères biodégradables selon le protocole de Baras B. et al (Baras B. et al, Single-dose mucosal immunization with biodegradable microparticles containing a Schistosoma mansoni antigen. Infect Immun. (1999) 67:2643-8).

Exemple 5 : Vaccin à base de l'immunogène plasmidique IFNγ pour vaccination ADN de type mucosale.

Les plasmides d' IFNγ (100-500µg/dose) en présence de LTµ (5-20µg/dose) sont inclus dans des micro sphères de PLG selon le protocole décrit par Baras B. et al. L'administration par voie orale se fait par gavage ou par ingestion de capsules gastrorésistantes contenant les micro sphères et un excipient à base d'alginate.

30

Les immunogènes servant à la préparation des vaccins ci-dessus ont été préparés comme suit :

Préparation 1 : Immunogène anti IL6

Immunogène IL6 dérivé de la cytokine recombinante IL6 par traitement au formol suivi d'un traitement par le glutaraldéhyde :

A 1 ml d'une solution d'IL6 à 1 mg/ml dans du tampon phosphate
 5 stérile, on ajoute 28 µl d'une solution de formol (35 %) dilué au 1/10 dans du
 tampon phosphate stérile. Après addition de merthiolate au 1/10.000, le
 mélange est placé 9 jours à l'étuve à 37°C. Il est ensuite additionné de
 glutaraldéhyde à la concentration 0,0026 M. Après 3 minutes, le mélange est
 additionné de 100 µl de glycine à 50 mg/ml pour bloquer les groupements
 10 aldéhydiques en excès et il est dialysé contre un grand volume de tampon
 phosphate. L'immunogène est ainsi stabilisé.

Caractéristiques de l'IL6

L'antigénicité de la cytokine recombinante IL6 traitée par rapport à
 celle de la protéine recombinante native a été mesurée à l'aide d'un test ELISA
 15 de R&D (D6050) : la cytokine recombinante IL6 détoxiquée présente une
 antigénicité égale à l'antigénicité de la protéine native correspondante.

L'absence de toxicité in vitro est mesurée par un test de prolifération
 cellulaire. Des cellules mononucléées du sang périphérique humain sont
 cultivés en présence du superantigène SEB et en présence d'une dose de la
 20 protéine recombinante IL6 native ou détoxiquée correspondant à 10 fois et 30
 fois la dose physiologique de la cytokine native. La prolifération cellulaire est
 exprimée en % de prolifération cellulaire [cpm (coups par minute) contrôle/cpm
 échantillon] x 100). Le contrôle correspond à une concentration de protéine
 recombinante utilisée égale à 0. Les résultats sont présentés dans le tableau
 25 suivant :

		% de prolifération cellulaire
IL6 native	0 ng/ml	100
IL6 native	30 ng/ml	98
IL6 traitée	30 ng/ml	95

L'IL6 traitée utilisée à des doses 10 fois et 30 fois supérieures aux doses physiologiques ne modifie pas la prolifération des cellules mononucléées du sang périphérique humain activés par le SEB.

5 Préparation 2 : Immunogène anti p53

L'immunogène p53 a été détoxiqué par traitement au formol selon le protocole décrit par Ramon (Ramon G, Sur le pouvoir flocculant et les propriétés immunisantes d'une toxine diphtérique rendue anatoxique (anatoxine). C.r. hebdomadaire. Séances Acad. Sci. (1923) 177 : 1338-1340), suivi d'un traitement au glutaraldéhyde de la protéine p53 recombinante (sc-4246, Santa Cruz) dans les conditions suivantes : à 10 µl d'une solution de p53 native à 1 mg/ml, on ajoute 3 µl d'une solution de formol diluée au 1/100 dans du tampon phosphate stérile. Le mélange est placé 2 jours à l'étuve à 37 °C. Il est ensuite additionné de 25 µl de glutaraldéhyde au 1/100. Après 15 minutes de réaction à température de laboratoire, on ajoute 2 µl de glycine 2M pour bloquer les groupements aldéhydiques en excès.

Caractéristique de l'immunogène p53

L'antigénicité de la protéine recombinante p53 traitée par rapport à celle de la protéine recombinante native a été mesurée à l'aide d'un test ELISA d'Amersham Pharmacia Biotech (p53 Rapid Format Pantropic Human ELISA, VQIA26) : Les protéines p53 native et traitée présentent une antigénicité équivalente.

Absence de toxicité in vitro : la protéine p53 traitée utilisée à des doses dix fois et 30 fois supérieures aux doses physiologiques (0,5 à 5 ng/ml) ne modifie pas la prolifération de cellules mononucléées du sang périphérique humain activées par le SEB ou par les anticorps anti CD3. La mesure de la prolifération a été réalisée par le test à la ³H-thymidine.

Préparation 3 : Immunogène anti VEGF

30 L'immunogène VEGF dérivé de VEGF (293-VE-010 ; R&D) est obtenu par traitement à la glutaraldéhyde dans les conditions suivantes : à 100 µl d'une solution de VEGF natif à 5 µg/ml dans du tampon phosphate, on ajoute 5 µl d'une solution de glutaraldéhyde diluée au 1/500 dans du tampon phosphate

stérile. Après 5 minutes de réaction à température ambiante, on ajoute 2 µl de glycine 1M pour bloquer la réaction.

Caractéristique du VEGF

5 L'antigénicité de la cytokine VEGF traitée par rapport à celle de la cytokine recombinante native a été mesurée à l'aide d'un test ELISA de R&D (DVE00) : les cytokines native et traitée présentent une antigénicité équivalente.

10 L'absence de toxicité in vitro a été mesurée à l'aide d'un test de prolifération cellulaire. Des cellules mononucléées du sang périphérique humain sont cultivées en présence du superantigène SEB et en présence d'une dose de la protéine recombinante VEGF native ou traitée correspondant à 10 fois et 30 fois la dose physiologique de la cytokine native. La prolifération cellulaire est exprimée en % de prolifération cellulaire ((cpm contrôle/cpm échantillon) x 100).

15 Le contrôle correspond à une concentration de protéine recombinante utilisée égale à 0. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

		% de prolifération cellulaire
VEGF natif	0 ng/ml	100
VEGF natif	30 ng/ml	92
VEGF traité	30 ng/ml	97

20 La cytokine VEGF traitée utilisée à des doses 10 fois et 30 fois supérieures aux doses physiologiques ne modifie pas la prolifération des cellules mononucléées du sang périphérique humain activées par le SEB.

Préparation 4 : Immunogène anti TGFβ

25 Immunogène TGFβ dérivé du TGFβ est détoxiqué par traitement au formol selon le protocole décrit par Ramon (Ramon G, Sur le pouvoir floculant et les propriétés immunisantes d'une toxine diphtérique rendue anatoxique (anatoxine). C.r. heb. Scéances Acad. Sci. (1923) 177 : 1338-1340), suivi d'un traitement à la glutaraldéhyde, conformément au protocole décrit pour l'immunogène p53.

Caractéristique de l'immunogène TGF β

L'antigénicité de la cytokine TGF β traitée par rapport à celle de la protéine recombinante native a été mesurée à l'aide d'un test ELISA de R&D
5 (DB100) : Les cytokines TGF β native et traitée présentent une antigénicité équivalente.

L'absence de toxicité de la cytokine TGF β traitée a été mesurée par un test de prolifération de cellules T décrit dans l'exemple A1. Ce test montre que le TGF β détoxiqué utilisé à des doses physiologiques de 0,5 à 5 ng/ml ne
10 diminue pas la prolifération des lymphocytes.

Préparation 5 : Immunogène anti IL10

a) Immunogène IL10 dérivé de l'IL10 par traitement au formol

L'IL10 est obtenu à partir de la protéine de fusion de l'IL10 par
15 traitement au formol à 37°C suivi d'un traitement court à la glutaraldéhyde, conformément au protocole décrit pour l'immunogène p53. La protéine de fusion IL10a été produite chez E.Coli à partir d'un ADNc cloné dans le plasmide d'expression bactérien prSetA et purifié sous forme d'une protéine de fusion avec Tag His. Cette protéine de fusion purifiée est homogène en
20 électrophorèse d'acrylamide et en Western blot.

Caractéristique de l'immunogène IL10

L'antigénicité de la cytokine IL10 traitée par rapport à celle de la protéine recombinante native a été mesurée à l'aide d'un test ELISA de R&D
25 (D1000) : Les cytokines IL10 native et traitée présentent une antigénicité équivalente.

L'absence de toxicité in vitro est mesurée par un test de prolifération cellulaire. La cytokine IL10 traitée utilisée à des doses 10 fois et 30 fois supérieures aux doses physiologiques ne modifie pas la prolifération des
30 cellules mononucléées du sang périphérique humain activées par le SEB.

b) Immunogène plasmidique IL10 pour vaccination d'ADN

L'immunogène plasmidique IL10 est représenté par un ADNc de IL10 cloné dans le plasmide d'expression bactérien prSetA.

Préparation 6 : Vaccin anti TNF α

- 5 a) Immunogène TNF α dérivé du TNF α par traitement chimique

L'immunogène dérivé du TNF α (Pérotech inc., Rocky Hill) est obtenu par traitement au formol à 37°C suivi d'un traitement court à la glutaraldéhyde, conformément au protocole décrit pour l'immunogène p53.

10

Caractéristique du TNF α :

L'antigénicité de la cytokine TNF α traitée par rapport à celle de la protéine recombinante native a été mesurée à l'aide d'un test ELISA de R&D (DTA50) : Les cytokines TNF α native et traitée présentent une antigénicité équivalente.

15

L'absence de toxicité in vitro est mesurée par un test de prolifération cellulaire. La cytokine TNF α traitée utilisée à des doses 10 fois et 30 fois supérieures aux doses physiologiques ne modifie pas la prolifération des cellules mononucléées du sang périphérique humain activés par le SEB.

20

- b) Immunogène plasmidique TNF α pour vaccination ADN

L'immunogène plasmidique TNF α est représenté par un ADNc de TNF α cloné dans le plasmide d'expression bactérien prSetA.

25

Préparation 7 : Immunogènes IFN γ

a) L'immunogène IFN γ dérivé de l' IFN γ (Pérotech inc., Rocky Hill) est obtenu par traitement au formol à 37 °C suivi d'un traitement court à la glutaraldéhyde, conformément au protocole décrit pour l'immunogène p53.

Caractéristique de l'immunogène :

30

L'antigénicité de la cytokine IFN γ traitée par rapport à celle de la protéine recombinante native a été mesurée à l'aide d'un test ELISA de R&D

(DTA50) : Les cytokines IFN γ native et traitée présentent une antigénicité équivalente.

L'absence de toxicité in vitro est mesurée par un test de prolifération cellulaire. La cytokine IFN γ traitée utilisée à des doses 10 fois et 30 fois
5 supérieures aux doses physiologiques ne modifie pas la prolifération des cellules mononucléées du sang périphérique humain activés par le SEB.

b) Immunogène plasmidique IFN γ pour vaccination ADN

L'immunogène plasmidique IFN γ est représenté par un ADNc de
10 l'IFN γ cloné

Etude pharmacologique

A - Présence dans le milieu extracellulaire de tumeurs malignes, de
molécules participant à l'immunosuppression, l'apoptose ou l'angiogénèse du
15 micro environnement des cellules cancéreuses.

Expérimentation A1 : La protéine p53 qui s'accumule dans les
tumeurs malignes et est présente dans les milieux extracellulaires dont le
sérum (Zusman I, Sandler B, Gurevich P, Zusman R, Smirnov P, Tendler Y,
20 Bass D, Shani A, Idelevich E, Pfefferman R, Davidovich B, Huszar M, Glick J.
Comparative study of the role of serum levels of p53 antigen and its tumor cell
concentration in colon cancer detection. Hum Antibodies Hybridomas. (1996)
:123-8), active la surproduction par les APC d'IFN α , médiateur de
l'immunosuppression, et de TNF α , cytokine participant à l'expression des
25 molécules d'adhérence des cellules endothéliales et à l'apoptose des cellules
immunitaires.

Protocole expérimental

Des macrophages, qui proviennent de la différenciation de monocytes éluutriés
30 cultivés pendant 5 jours dans des poches de téflon en présence de GMC-SF (F.
Sallusto et al, Efficient presentation of soluble antigen by cultured human
dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating

factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. J Exp Med (1994) 179, 1109), sont activés avec du LPS pendant 16 heures. Ces macrophages ainsi activés sont ensuite cultivés en présence de doses croissantes (0 – 10 µg/ml) de la protéine recombinante p53 native (sc-4246, 5 Santa Cruz) et de protéine contrôle,) dans du milieu sans sérum pendant 24 heures. La protéine contrôle a été la protéine recombinante p24 (protéine du HIV-1, origine ANRS)

Résultats :

10 La mesure de la surproduction APC d'IFN α et de TNF α dans les surnageants (SN) de culture des APCs s'effectue respectivement par le test biologique standard de l'IFN α , utilisant la lyse des cellules MDBK par le VSV (S. Rubinstein et al, Convenient assay for interferons. J. Virol (1981) 37, 755) et par un test ELISA de R&D (DTA50, R&D).

15 Le titre d'IFN α dans les surnageant correspond à l'inverse de la plus forte dilution des surnageants induisant 50 % de protection des cellules contre l'effet cytopathique du VSV. La mesure de TNF α dans les surnageants est réalisée en suivant le protocole décrit par le producteur et est exprimée en pg/ml. Les résultats sont représentés dans le tableau suivant

p53 expérimental	Titre d'IFN α (dilution ⁻¹)	TNF α (pg/ml)
10 µg/ml	128	8700
3 µg/ml	64	6200
1 µg/ml	32	5600
0,3 µg/ml	12	2600
0,1 µg/ml	6	1300
00 µg/ml	2	200

p24 contrôle	Titre d'IFN α (dilution ⁻¹)	TNF α (pg/ml)
10 μ g/ml	2	250
3 μ g/ml	2	200
1 μ g/ml	2	200
0,3 μ g/ml	2	200
0,1 μ g/ml	2	200
00 μ g/ml	2	200

La protéine recombinante p53 native induit la surproduction d'IFN α et de TNF α , alors que la protéine recombinante p24 utilisée dans les contrôles n'induit aucune synthèse.

- 5 Un lysat de culture de cellules d'insectes à baculovirus exprimant la protéine p53 a donné des résultats similaires à ceux décrits pour la protéine recombinante p53 produite chez E Coli.

10 Expérimentation A2 : La cytokine TGF β , relâchée dans le milieu extracellulaire par des cellules cancéreuses inhibe la prolifération de cellules T et active la production par les macrophages de l'IFN α , cytokine immunosuppressive majeure.

Protocole expérimental

- 15 Des cellules mononucléées du sang périphérique humain, isolées sur gradient de Ficoll à partir du sang périphérique de sujet sain, sont cultivés en présence de l'anticorps anti-CD3 et en présence de doses croissantes (0-30 ng/ml) de la protéine recombinante TGF β active (240-B-002, R&D) et de doses croissantes (0-30 ng/ml) d'une protéine contrôle, la protéine recombinante p24.

- 20 L'inhibition de la prolifération des cellules T est mesurée à l'aide d'un test de prolifération cellulaire (Lachgar A., Bernard J., Bizzini B., Astgen A., Le Coq H., Fouchard M., Chams V., Feldman M., Richardson M., Rappaport J., Burny A. & J.F. Zagury : Repair of the in vitro HIV-1-induced immunosuppression and blockade of the generation of functional suppressive
25 CD8 cells by anti-alpha interferon and anti-Tat antibodies. Biomed & Pharmacother. (1996) 50:13-18).

L'activation de la production d'IFN α par les macrophages est mesurée selon le protocole décrit dans l'expérimentation A1. Les macrophages activés sont cultivés en présence de doses croissantes (0–1 μ g/ml) de la protéine recombinante TGF β active et d'une protéine contrôle, la protéine
5 recombinante p24, dans du milieu sans sérum pendant 24 heures.

Résultats :

Inhibition de la prolifération cellulaire par le TGF β :

La prolifération cellulaire est exprimée en % de prolifération cellulaire
10 ((cpm contrôle/cpm échantillon) x 100) à trois concentrations (30, 10 et 3 ng/ml) de TGF β et de protéine p24. Le contrôle correspond à une concentration de protéine recombinante utilisée égale à 0. Les résultats sont présentés dans la figure 1 :

Ces résultats montrent que la prolifération cellulaire est diminuée de
15 manière dose dépendante par le TGF β actif, alors qu'elle ne l'est pas par la p24.

Activation par le TGF β de la surproduction d'IFN α par les macrophages.

20 Le titre d'IFN α dans les surnageants correspond à l'inverse de la plus forte dilution des surnageants induisant 50 % de protection contre l'effet cytopathique du VSV. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

TGF β expérimental	Titre d'IFN α
1 μ g/ml	16
300 ng/ml	8
100 ng/ml	4
30 ng/ml	2
00 ng/ml	0

P24 contrôle	Titre d'IFN α
1 $\mu\text{g/ml}$	0
300 ng/ml	0
100 ng/ml	0
30 ng/ml	0
00 ng/ml	0

La protéine recombinante TGF β active induit la surproduction d'IFN α , alors que la protéine recombinante p24 n'induit aucune synthèse.

- 5 Expérience de vaccination 1 : Vaccination anti-IL10 de la souris pour l'induction d'une immunité systémique et mucosale avec formation préférentielle d'anticorps spécifiques de classes IgG et IgA.

Protocole d'immunisation

- 10 Jour 0 : Injection IM d'une suspension d'immunogène plasmidique exprimant l'IL10 (100 μg) dans 0,2 ml de PBS préparée à l'exemple 2.

Jour 7, jour 8, jour 9 : Administration par gavage de suspensions aqueuses de micro sphères (PLGA) incluant l'immunogène IL10 (100 $\mu\text{g/dose}$) et l'adjuvant LT μ (5 $\mu\text{g/dose}$).

- 15 Les souris contrôles reçoivent les mêmes préparations sans immunogène.

Suivi :

- 20 On sacrifie les animaux 15 jours après la dernière immunisation et on constate l'absence de toxicité (mesurée par l'absence de signes cliniques (comportement ; poils ; poids) et par examen anatomique après autopsie.

Réaction immunitaire testée par la présence dans le sérum d'anticorps de type IgG et IgA , mesurée par ELISA et exprimée par la densité optique 15 jours après le dernier gavage.

	Souris contrôle (D.O)	Souris immunisées (D.O)
Ac anti IL10 classe IgG	0,2	0,920
Ac anti IL10 classe IgA	0,1	0,780

Résultats :

Innocuité clinique et absence de lésions anatomiques.

Présence d'anticorps (Ac) anti IL10 de type IgG et de type IgA dans

5 le sérum

Expérience de vaccination 2 : Vaccination anti-VEGF de la souris par l'induction d'une immunité systémique et mucosale avec formation préférentielle d'anticorps spécifique de classe IgG et IgA.

10

Protocole d'immunisation

Jour 0 : Injection IM d'une suspension d'immunogène VEGF (20 µg) dans l'ISA 51 préparée à l'exemple 1.

Jour 7, jour 14, jour 21 : Administration intranasale à l'aide de pipette
15 Hamilton de 10 µl d'une suspension aqueuse contenant 20 µg d'immunogène et 5 µg de LTµ enchâssés dans un gel de phosphate de calcium.

Les souris contrôles reçoivent les mêmes préparations sans immunogène

20

Suivi :

On sacrifie les animaux 15 jours après la dernière immunisation et on constate l'absence de toxicité (mesurée par l'absence de signes cliniques (comportement ; poils ; poids) et par examen anatomique après autopsie.

Réaction immunitaire testée par la présence dans le sérum
25 d'anticorps de type IgG et IgA , mesurée par ELISA et exprimée par la densité optique 15 jours après la dernière instillation.

	Souris contrôle (D.O)	Souris immunisées (D.O)
Ac anti VEGF classe IgG	0,27	1,64
Ac anti VEGF classe IgA	0,15	1,118

Résultats :

Innocuité clinique et absence de lésions anatomiques.

5 Présence d'anticorps anti VEGF de type IgG et de type IgA dans le sérum.

Expérience de vaccination 3 : Vaccination anti p53 de la souris par l'induction d'une immunité systémique et mucosale avec formation préférentielle d'anticorps spécifique de classe IgG et IgA.

10

Protocole d'immunisation

Jour 0 : Injection IM d'une suspension d'immunogène p53 (20 µg) dans l'ISA 51 préparée comme à l'exemple 1.

15 Jour 7, jour 14, jour 21 : Administration intra nasale à l'aide de pipette Hamilton de 10 µl d'une suspension aqueuse contenant 20 µg d'immunogène et 5 µg de LTµ enchâssés dans un gel de phosphate de calcium.

Les souris contrôles reçoivent les mêmes préparations sans immunogène

20

Suivi :

On sacrifie les animaux 15 jours après la dernière immunisation et on constate l'absence de toxicité (mesurée par l'absence de signes cliniques (comportement ; poils ; poids) et par examen anatomique après autopsie.

25

Réaction immunitaire testée par la présence dans le sérum et dans la salive d'anticorps de type IgG et IgA , mesurée par ELISA et exprimée par la densité optique 15 jours après la dernière instillation.

30

Résultats :

Innocuité clinique et absence de lésions anatomiques.

Présence d'anticorps anti p53 de type IgG et de type IgA dans le sérum et dans la salive.

sérum	Souris contrôle (D.O)	Souris immunisées (D.O)
Ac anti p53 classe IgG	0,184	1,492
Ac anti p53 classe IgA	0,208	1,071

5

salive	Souris contrôle (D.O)	Souris immunisées (D.O)
Ac anti p53 classe IgG	0,184	1,5
Ac anti p53 classe IgA	0,208	0,980

Expérience de vaccination 4 : Vaccination anti IL6 de la souris pour l'induction d'une immunité systémique avec formation d'anticorps spécifiques de classe IgG

10

Protocole d'immunisation

Jour 0 : Injection IM d'une suspension d'immunogène IL6 (20 µg) dans l'ISA 51 préparée comme à l'exemple 1.

15

Jour 21 : Rappel par voie IM d'une émulsion d'IL6 (5 µg) dans l'ISA 51

Les souris contrôles reçoivent les mêmes préparations sans immunogène

20

Suivi :

On sacrifie les animaux 15 jours après le rappel et on constate l'absence de toxicité (mesurée par l'absence de signes cliniques (comportement ; poils ; poids) et par examen anatomique après autopsie.

25

Réaction immunitaire testée par la présence dans le sérum d'anticorps de type IgG et IgA , mesurée par ELISA et exprimée par la densité optique 7 jours après le rappel.

	Souris contrôle (D.O)	Souris immunisées (D.O)
Ac anti IL6 classe IgG	0,280	2,356
Ac anti IL6 classe IgA	0,230	0,320

Résultats :

Innocuité clinique et absence de lésions anatomiques.

5 Présence d'anticorps anti IL6 de type IgG dans le sérum.

Expérience de vaccination 5 : Vaccination anti IL6 de la souris par l'induction d'une immunité systémique et mucosale avec formation préférentielle d'anticorps spécifique de classe IgG et IgA.

10

Protocole d'immunisation

Jour 0 : Injection IM d'une suspension d'immunogène IL6 (20 µg) dans l'ISA 51 préparée comme à l'exemple 1.

15 Jour 7, jour 8, jour 9 : Administration par gavage de micro sphères de PLG contenant l'immunogène (100 µg/dose) et l'adjuvant LTµ (5 µg/dose).

Les souris contrôles reçoivent les mêmes préparations sans immunogène

Suivi :

20 On sacrifie les animaux 15 jours après le dernier gavage et on constate l'absence de toxicité (mesurée par l'absence de signes cliniques (comportement ; poils ; poids) et par examen anatomique après autopsie.

25 Réaction immunitaire testée par la présence dans le sérum d'anticorps de type IgG et IgA , mesurée par ELISA et exprimée par la densité optique 15 jours après le dernier gavage.

	Souris contrôle (D.O)	Souris immunisées (D.O)
Ac anti IL6 classe IgG	0,250	1,400
Ac anti IL6 classe IgA	0,175	1,62

Résultats :

Innocuité clinique et absence de lésions anatomiques.

Présence d'anticorps anti IL6 de type IgG et de type IgA dans le

5 sérum.

REVENDEICATIONS

1. Un vaccin caractérisé en ce qu'il renferme à titre de principe actif un immunogène qui est
 - 5 - un facteur cytokinique ou un facteur de régulation cellulaire particulièrement transcriptionnel ou un autre type de facteur à propriétés immunosuppressives / apoptotiques / angiogéniques anormalement produit par les cellules cancéreuses ou stromales de tumeurs malignes, ainsi qu'un excipient pharmaceutiquement acceptable permettant l'induction d'une réaction
 - 10 immunitaire systémique ou mucosale avec formation d'anticorps de classe IgG ou IgA sécrétoire dirigée contre le facteur natif,
 - ou qui dérive d'un tel facteur.
2. Un vaccin selon la revendication 1 caractérisé en ce que
 - 15 l'immunogène dérive d'un facteur cytokinique ou d'un facteur de régulation cellulaire particulièrement transcriptionnel ou d'un autre type de facteur à propriétés immunosuppressives / apoptotiques / angiogéniques anormalement produit par les cellules cancéreuses ou stromales de tumeurs malignes par traitement chimique, physique, par mutation génétique, par conditionnement adjuvant ou est le produit d'une vaccination génétique (vaccin à ADN) ou est un
 - 20 fragment protéique ou peptidique d'un tel facteur ou encore dérive d'un tel fragment protéique ou peptidique.
3. Un vaccin selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que l'immunogène est choisi parmi la TGF β , l'IL10, la protéine p53, le VEGF, l'IL6, l'IFN γ et le TNF α ou en dérive.
- 25 4. Un vaccin selon la revendication 1, 2 ou 3 caractérisé en ce que l'immunogène est la TGF β ou en dérive .
5. Un vaccin selon la revendication 1, 2 ou 3 caractérisé en ce que l'immunogène est l'IL10 ou en dérive .
6. Un vaccin selon la revendication 1, 2 ou 3 caractérisé en ce que
- 30 l'immunogène est la protéine p53 ou en dérive .
7. Un vaccin selon la revendication 1, 2 ou 3 caractérisé en ce que l'immunogène est le VEGF ou en dérive .

8. Un vaccin selon la revendication 1, 2 ou 3 caractérisé en ce que l'immunogène est l'IL6 ou en dérive .

9. Un vaccin selon la revendication 1, 2 ou 3 caractérisé en ce que l'immunogène est l'IFN γ ou en dérive .

5 10. Un vaccin selon la revendication 1, 2 ou 3 caractérisé en ce que l'immunogène est le TNF α ou en dérive.

11. Un vaccin selon l'une des revendications 1 à 10 caractérisé en ce qu'il renferme à titre de principe actif un immunogène qui est un mutant du facteur ou fragment de facteur natif.

10 12. Utilisation d'un immunogène qui est un facteur ou qui dérive d'un facteur cytokinique ou d'un facteur de régulation cellulaire particulièrement transcriptionnel ou d'un autre type de facteur à propriétés immunosuppressives / apoptotiques / angiogéniques anormalement produit par des cellules cancéreuses ou stromales de tumeurs malignes pour l'obtention d'un
15 médicament destiné à une utilisation en tant qu'anticancéreux par mécanisme de réduction des effets, sur le micro environnement desdites cellules cancéreuses ou stromales de tumeurs malignes, d'un facteur cytokinique ou d'un facteur de régulation cellulaire particulièrement transcriptionnel ou d'un autre type de facteur à propriétés immunosuppressives / apoptotiques / angiogéniques
20 anormalement produit par lesdites cellules cancéreuses ou stromales de tumeurs malignes.

13. Utilisation selon la revendication 12 caractérisée en ce que l'immunogène est choisi parmi la TGF β , l'IL10, la protéine p53, le VEGF, l'IL6, l'IFN γ et le TNF α ou en dérive.

25

1 / 1

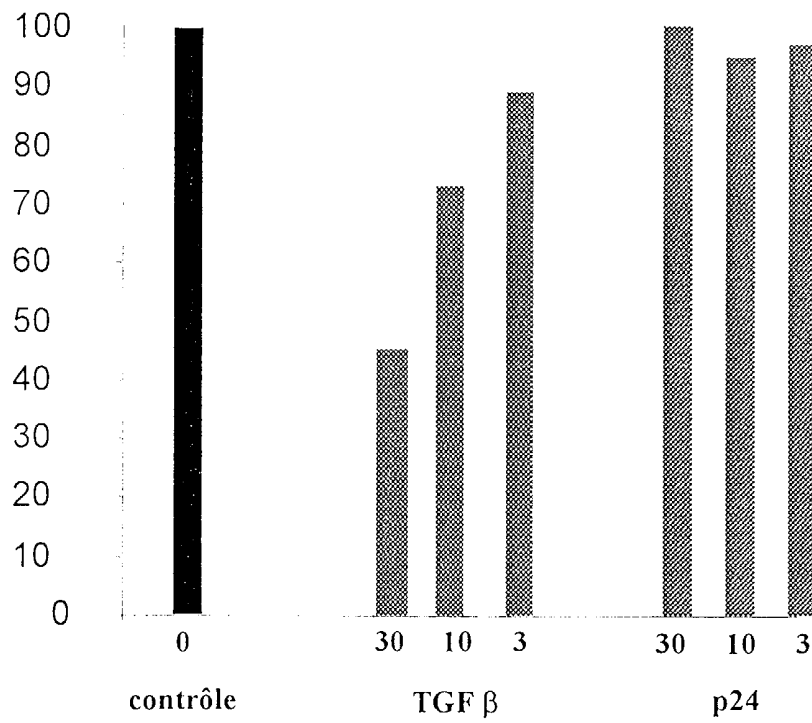


Fig. 1

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

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

2812813

N° d'enregistrement
nationalFA 594438
FR 0010480

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		
D, X	WO 92 22577 A (PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC) 23 décembre 1992 (1992-12-23) * page 2, ligne 1 - ligne 15 * * page 11, ligne 16 - ligne 18 * ---	1-13	A61K38/17 A61K38/19 A61K48/00 A61P35/00
D, X	WO 94 02167 A (UNIV PRINCETON) 3 février 1994 (1994-02-03) * le document en entier * ---	1-3, 6, 11-13	
X	WO 96 10423 A (SLOAN KETTERING INST CANCER ;LUDWIG INST CANCER RES (US)) 11 avril 1996 (1996-04-11) * le document en entier * ---	1-3, 6, 11-13	
X	WO 97 09064 A (ANGELETTI P IST RICHERCHE BIO ;CILIBERTO GENNARO (IT); SAVINO ROCC) 13 mars 1997 (1997-03-13) * le document en entier * ---	1-3, 8, 11-13	
A	LE BUANEC H ET AL: "HPV-16 E7 but not E6 oncogenic protein triggers both cellular immunosuppression and angiogenic processes." BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY, vol. 53, no. 9, octobre 1999 (1999-10), pages 424-431, XP000990246 -----		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
13 mars 2001		Teyssier, B	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		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	
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			

1