

ROYAUME DU MAROC  
-----  
OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIÉTÉ (19)  
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE  
-----



المملكة المغربية  
-----  
المكتب المغربي  
للملكية الصناعية والتجارية  
-----

## (12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication : **MA 29044 B1** (51) Cl. internationale : **C07K 14/55**

(43) Date de publication :  
**01.11.2007**

---

(21) N° Dépôt :  
**29960**

(22) Date de Dépôt :  
**30.05.2007**

(30) Données de Priorité :  
**16.11.2004 CU 261-2004**

(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT :  
**PCT/CU2005/000009 16.11.2005**

(71) Demandeur(s) :  
**CENTRO DE INMUNOLGÍA MOLECULAR, Calle 216 esq. 15, Atabey, Playa, Ciudad de la Habana P.O.Box 16040 Habana 12100 (CU)**

(72) Inventeur(s) :  
**MONTERO CASIMIRO, José Enrique ; ALONSO SARDUY, Liván Bladimir ; PEREZ RODRIGUEZ, Rolando ; LAGE DAVILA, Agustín Bienvenido**

(74) Mandataire :  
**ABU-GHAZALEH INTELLECTUAL PROPERTY (TMP AGENTS)**

---

(54) Titre : **FORMULATIONS INMUNOTHERAPEUTIQUES A CAPACITE DE NEUTRALISATION DE L'INTERLEUKINE-2**

(57) Abrégé : L'INVENTION CONCERNE DES FORMULATIONS PHARMACEUTIQUES UTILES DANS LE TRAITEMENT DU CANCER, QUI PERMETTENT DE BLOQUER LA FIXATION DE L'INTERLEUKINE-2 (IL-2) SUR SON RÉCEPTEUR. PLUS PARTICULIÈREMENT, L'INVENTION CONCERNE DES FORMULATIONS THÉRAPEUTIQUES POUVANT AUGMENTER L'IMMUNOGÉNÉICITÉ DE L'IL-2 PAR COUPLAGE DE CELLE-CI À LA PROTÉINE DE TRANSPORT P64K DE LA NEISSERIA MENINGITIDIS DANS UN ADJUVANT DE TYPE MONTANIDE ISA 51 AFIN D'INDUIRE DES ANTICORPS DE BLOCAGE DE L'IL-2 À SON RÉCEPTEUR, ET DES PROCÉDÉS EFFICACES DE TRAITEMENT DE TUMEURS, NOTAMMENT DU CANCER DU SEIN. SELON UN AUTRE ASPECT, L'INVENTION CONCERNE UNE COMBINAISON THÉRAPEUTIQUE D'UN VACCIN À BASE D'IL-2 AVEC D'AUTRES VACCINS CONTRE LE CANCER À BASE D'ANTIGÈNES SPÉCIFIQUES DE TUMEURS OU DE FACTEURS

DE CROISSANCE TUMORALE, AINSI QUE DES MÉDICAMENTS DE CHIMIOTHÉRAPIE  
OU DE RADIOTHÉRAPIE UTILISÉS DE MANIÈRE GÉNÉRALE EN ONCOLOGIE.

**FORMULATIONS IMMUNOTHERAPEUTIQUES A CAPACITE DE NEUTRALISATION DE L'INTERLEUKINE-2 .**

5 **Résumé:**

La présente invention concerne des compositions pharmaceutiques basées sur des vaccins et des anticorps monoclonaux qui neutralisent l'Interleukine-2, qui sont utile dans le traitement des tumeurs.

Particulièrement, la présente invention concerne des formulations thérapeutiques  
10 pouvant augmenter l'immunogénicité de IL-2 par couplage de celle-ci à la protéine de transport P64k de la Neisseria Meningitidis dans un adjuvant de type Montanide ISA 51 afin d'induire des autoanticorps neutralisant IL-2 et des procédés efficaces pour le traitement des tumeurs, y compris le cancer du sein et le mélanome.

De plus, la présente invention concerne une combinaison thérapeutique du vaccin à  
15 base d'IL-2 avec d'autres vaccins contre le cancer à base d'antigènes spécifiques de tumeurs ou de facteurs de croissance tumorale, aussi bien que des médicaments de chimiothérapie ou de radiothérapie utilisés de manière générale en oncologie.

20

25

30

35

# FORMULATIONS IMMUNOTHERAPEUTIQUES A CAPACITE DE NEUTRALISATION DE L'INTERLEUKINE-2.

## Domaine de l'Invention.

5 La présente invention concerne des formulations pharmaceutiques pouvant augmenter la réaction immunitaire contre l'Interleukine-2 (IL-2) et augmentant les autoanticorps, ce qui bloque la fixation au récepteur, et qui sont utiles dans le traitement des tumeurs.

## Description de l'art antérieur.

10 La découverte de la capacité du Système Immunitaire et spécifiquement les cellules T à reconnaître les antigènes de la tumeur est l'une des piliers fondamentales pour le développement des stratégies pour la manipulation du système immunitaire avec le but à traiter les patients souffrant du cancer.

15 En conséquence, au développement des méthodologies pour récupérer les cellules T spécifiques infiltrant le stroma, connues sous le nom de lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL), ou provenues du sang périphérique des individus non traités ou après l'emploi des vaccins thérapeutiques pour le cancer, l'effort principal a été dirigé vers la stimulation de ces cellules pour augmenter leur capacité effectrices anti-tumeur *in vivo*.

20 En conséquence, les stratégies principales ont été dirigées pour augmenter leur activité cytotoxique spécifique contre une variété des antigènes associés aux tumeurs (TAA). La principale approche thérapeutique a été focalisé sur l'emploi *in vitro* de l'Interleukine-2 (IL-2) pour activer et augmenter le TIL des individus portant la tumeur qui sont re-infusés avec ces cellules (Rosenberg, S. A. et al. (1986) Science 233, 1318-1321; Kawakami, Y. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6458-6462; Kawakami, Y. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3515-3519). Toutefois, telles interventions ont des résultats thérapeutiques limités malgré la stimulation démontrée de la réponse immunitaire cellulaire obtenue *in vitro*.

25 Ceci est mené pour évaluer les modalités thérapeutiques selon l'emploi des protocoles d'immunisation spécifique active par des vaccins thérapeutiques pour le cancer, en créant des vecteurs de vaccin qui comportent des antigènes de la tumeur associés à IL-2 afin de faciliter l'induction de la réponse immunitaire cellulaire effectrice *in vivo*, mais ces approches ont donnés des faibles résultats (Rosenberg, S. A., et al. (1998) Nat. Med. 4, 321-327).

30 Actuellement, les principales stratégies cliniques s'orientent au développement d'une modalité selon le transfert adoptif des cellules T réactives d'un patient à ses propres antigènes de la tumeur. Ces cellules sont stimulées et développées *in vitro* en utilisant des anticorps monoclonaux anti-CD3 (mAb) et IL-2, et après la re-infusion dans l'administration parentérale de IL-2 dans le courant sanguin est fournie. Cette approche constitue une des interventions thérapeutiques principales conçues pour le traitement des patients souffrant du cancer, quoique les résultats thérapeutiques continus d'être discrets (Dudley, M. E., et al. (2002) Science 298, 850-854; Rosenberg, S. A. et al. (2004) Proc Natl Acad Sci U S A. 101 Suppl 2, 14639-45).

35 La conception raisonnable de toutes ces stratégies thérapeutiques est basée sur l'emploi de l'Interleukine-2 comme molécule essentielle dans l'activation cellulaire de la réponse immunitaire anti-tumeur (US 6,060,068 et US 5,830,452).

40 L'historique de la fonction IL-2 dans l'immunité est basé sur les expériences exécutées *in vitro*. De sa découverte, IL-2 a été reconnu par la capacité à stimuler la prolifération de cellule T (ainsi, l'acronyme IL-2 est le Facteur de Croissance des Cellules T). La démonstration supplémentaire de la prolifération des cellules T et la fonction *in vitro* pourrait être inhibée en utilisant un récepteur anti-IL-2 ou un anti-IL-2 a confirmé cette notion (Smith, KA. Immunol Rev 51:337-357, 1980).

50

Récemment, il a été démontré par voie expérimentale que les tumeurs humaines peuvent réduire la réponse du Système Immunitaire à travers la génération des cellules T avec une capacité de suppression de l'immunité anti-tumeur. Ces cellules ont été caractérisées dans les modèles d'animaux et les patients montrant des marqueurs de différenciation différentes, quoique leur relevance diffère du modèle expérimental (Bach, J.F. (2003) Nat Rev Immunol 3, 189-198; Chakraborty, N.G., et al. (2004) Hum Immunol 65, 794-802; Markus, Y.M. y Sykes, M. (2004) J Clin Oncol 22, 1136-1151).

Le groupe de Différenciation 25 (CD25) constitue la chaîne alpha du récepteur IL-2. de plus, la structure du récepteur de cette cytokine comporte les chaînes bêta (CD122) et gamma (CD132). Elles sont exprimées constitutivement en se reposant sur les lymphocytes T et l'activation de ces cellules induit la synthèse de la chaîne alpha, la formation du récepteur hétérotrimérique à haute affinité et la sécrétion de IL-2. Le CD25 est exprimé constitutivement dans 5 - 10 % de CD4+ les lymphocytes T et au moins de 1 % des lymphocytes T CD8+ périphériques. Ces cellules sont anérgique et présentent une activité de suppression *in vitro* (Shevach, E.M. (2002) Nat Rev Immunol 2, 389-400). Il a été démontré récemment que l'administration passive de l'anti-CD25 mAb induit la réponse anti-tumeur dans certaines tumeurs expérimentales, quoique des autres soient réfractaires à telle thérapie (Onizuka, S. et al. (1999) Cancer Res 59, 3128-3133).

La capacité du Système Immunitaire à induire une réponse contre les auto-molécules est limitée, spécifiquement aux molécules solubles tels que les facteurs de croissance. Pourtant, l'immunisation active avec ces facteurs conjugués à une protéine de transport et émulsifiés dans des adjuvants lance l'induction de la réponse immunitaire contre ces molécules (U.S. 5.984.018). Les autoanticorps spécifiques générés contre les molécules autologues ou hétérologues inhibent la fixation à leur récepteur, en bloquant les mécanismes de la prolifération ciblée par cette fixation.

D'après ces résultats, il est accepté comme l'état de la technique qu'une réponse anti-tumeur dépend de la présence de IL-2. Par conséquence, nous avons décidé à caractériser *in vivo* l'impact sur l'évolution de la tumeur des autoanticorps anti-IL-2 induite par l'immunisation active avec le IL-2 conjugué à la molécule de transporteur dans un adjuvant.

Étonnamment, l'induction des autoanticorps de blocage de la fixation de IL-2 à son récepteur lance la réduction de la croissance de la tumeur, même dans les tumeurs qui sont résistantes à l'effet antitumeur induit par l'administration passive de l'anti-CD25 mAb. De plus, la présence de tels autoanticorps n'affecte pas la réponse immunitaire aux vaccins du cancer chez les sujets traités.

#### Description détaillée de l'invention:

La présente invention concerne des formulations thérapeutiques qui possèdent un effet dans le traitement des tumeurs, pour lesquelles le rôle du Système Immunitaire du sujet est important. En particulier, la présente invention comporte la génération des formulations immunothérapeutiques pouvant augmenter les autoanticorps qui bloquent la fixation de l'Interleukine-2 à son récepteur et inhibent le développement des tumeurs.

L'objet de la présente invention est une formulation thérapeutique qui inhibe la fixation de IL-2 à son récepteur, utile dans le traitement des patients souffrant du cancer, où cette formulation comporte le IL-2 ou de ses peptides conjugués à une protéine de transport; de plus, elle contient un adjuvant approprié. En particulier, la formulation thérapeutique de la présente invention inclut la protéine de transport P64k dérivée de *Neisseria meningitidis* et l'adjuvant est sélectionné à partir d'un groupe comportant l'hydroxyde d'aluminium et le Montanide ISA 51.

Dans un mode d'application de l'invention, la formulation thérapeutique comporte le IL-2 conjugué à P64k par une conjugaison chimique. Dans un autre mode d'application de

l'invention, la formulation comporte le IL-2 ou ses peptides et le P64k dans une protéine de fusion.

Aussi une formulation thérapeutique de la présente invention qui inhibe la fixation de IL-2 à son récepteur, utile dans le traitement des individus souffrant de cancer et qui inclut un anticorps monoclonal spécifique contre le IL-2 (hIL-2) humain.

Un procédé pour le traitement d'un patient souffrant du cancer fait aussi l'objet de l'invention qui est demandée pour le blocage de la fixation de IL-2 sur son récepteur pour déclencher une réponse immunitaire convenable contre la tumeur qui inclut l'administration d'une composition de vaccin qui contient IL-2 ou des anticorps contre le IL-2.

Un autre aspect de la présente invention parle sur la combinaison thérapeutique d'un vaccin selon le IL-2 avec des autres vaccins du cancer selon les antigènes de la tumeur spécifique ou des facteurs de croissance de la tumeur, aussi bien que les agents chimiothérapeutiques ou la radiothérapie, qui sont en emploi conventionnel actuellement.

Le terme "combinaison thérapeutique" concerne une combinaison physique (par exemple dans la forme de mélange) comme à l'association de deux composés en tant que organismes différents et séparés (exemples en forme de jeux de réactifs) et lorsqu'ils sont utilisés en combinaison pour traiter un patient. Ainsi, des combinaisons pharmaceutiques sont les combinaisons utiles dans le programme du traitement qui implique l'administration de deux composés, ou autant par une association physique autant par des doses administrées de façon indépendante au même patient au cours de la thérapie.

Le terme "vaccin du cancer" concerne un agent utile dans l'immunothérapie active de sorte qu'il cause chez le sujet soumis au traitement une réponse immunitaire qui reconnaît l'antigène utilisé dans le vaccin et qui peut être mesuré.

#### **1.- L'obtention de la composition immunogénique.**

La composition du vaccin de la présente invention contient comme principe actif l'Interleukine-2 (hIL-2r) recombinant humain conjugué à la protéine de transport, de préférence une protéine dérivée du complexe de la membrane externe de *Neisseria meningitidis* P64k (0474313 EP A2 et U.S. 5.286.484). De plus cette composition de vaccin comporte un adjuvant approprié. La composition de vaccin de la présente invention utilise de préférence le Montanide ISA 51 comme un adjuvant.

La conjugaison entre hIL-2r et la protéine de transport peuvent être faits par une conjugaison chimique ou une construction d'une fusion de protéine obtenue par des techniques de la génie génétique.

#### **- L'obtention d'une composition de vaccin qui contient le hIL-2r conjugué à la protéine P64k par une conjugaison chimique.**

Pour obtenir une conjugaison d'une protéine entre le hIL-2r et la protéine de P64k, tous les composants sont mélangés dans une proportion variable de 20:1 à 5:1 (mole de hIL-2r par mole de la protéine P64k), de préférence 10:1 (mole de hIL-2r par mole de la protéine P64k). Glutaraldéhyde est ajouté à ce mélange pour avoir une concentration finale qui se répartie entre 0,02 et 0,1 %, de préférence 0,5% et incubée à la température ambiante (RT) de 1 à 5 heures. Finalement, elle est dialysée de manière extensive dans une solution de tampon phosphate salé (PBS).

La réaction de conjugaison est vérifiée par 10% d'électrophorèse de gel de polyacrylamide SDS (Laemmli UK (1970) Nature 277,680-685).

**- L'obtention d'une composition de vaccin qui contient une protéine de fusion entre hIL-2r et la protéine P64k.**

Le gène qui code pour le IL-2 (447 pb) humain est amplifié par la réaction de chaîne de polymérase (PCR) en utilisant des amorces spécifiques. Le fragment d'AND résultant est digéré et attaché dans un site de fixation spécifique d'un vecteur d'expression dans lequel il est cloné le gène qui code pour la protéine de transport, afin que la protéine résultante inclue une copie de toutes les molécules ou plusieurs. Il peut être utilisé tout vecteur d'expression à partir des cellules de mammifère aussi bien qu'en provenance d'une bactérie ou d'une levure. Le vecteur peut inclure aussi six histidines dans la fin N-terminal de la protéine de transport. Le plasmide résultant est vérifié par l'analyse de restriction dans l'électrophorèse sur gel d'agarose, l'analyse de la séquence d'AND en utilisant l'enzyme Sequenace 2,0 (Amersham-USB), et finalement, l'analyse de la production de la protéine de fusion dans toute souche d'expression de *Eschericia coli*, pendant la technique de "transfert de type western", en utilisant un anticorps monoclonal anti-hIL-2 spécifique. Afin d'obtenir la protéine, les parois cellulaires bactériennes sont brisées en utilisant une méthode de rupture forte, et ensuite la protéine est purifiée par une combinaison des méthodes de précipitation différentielle avec le sulfate d'ammonium et des méthodes chromatographiques. Finalement, la protéine est filtrée dans des conditions stériles et conservée à une température de -20°C ou lyophilisée et conservée à 4°C jusqu'à son emploi ultérieur.

**- Obtention des compositions de vaccin qui contiennent des peptides dérivés de hIL-2r conjugués chimiquement à la protéine P64k ou couplés comme une protéine hybride.**

Les peptides dérivés de la séquence d'acides aminés de IL-2 obtenus par synthèse chimique peuvent être couplés par conjugaison chimique à la protéine P64k, comme il est décrit dans 5,984,018 Américain. Alternativement, les protéines hybrides du peptide dérivé de hIL-2r et de la protéine P64k sont obtenues essentiellement par le même procédé décrit dans la section précédente. Les exemples peuvent inclure les peptides à partir des régions suivantes:

- |                           |                                    |
|---------------------------|------------------------------------|
| 1) Peptide                | N <sup>33</sup> -A <sup>50</sup>   |
| Nombre des acides aminés: | 18                                 |
| Séquence:                 | NPKLTRMLTFKFYMPKKA                 |
| 2) Peptide                | T <sup>113</sup> -T <sup>133</sup> |
| Nombre des acides aminés: | 21                                 |
| Séquence:                 | TIVEFLNRWITFCQSIISTLT              |

**- Electrophorèse du conjugué chimique hIL-2r-P64k.**

Elle peut être effectuée par une électrophorèse SDS sur gel de polyacrylamide 10% (Laemmli U.K. (1970) Nature 277,680-685). Il appliqué 15 µg d'échantillon par puits et tachée par Coomassie.

**2.- Caractérisation de l'effet produit par la composition du vaccin qui contient le hIL-2r et la protéine P64k. Les études précliniques.**

**- Immunogénicité de la composition du vaccin.**

Afin d'étudier chez les animaux l'immunogénicité de la préparation du vaccin de la présente invention, des souris femelles BALB/c âgées de 8 à 12 semaines et pesant 18 à 20 g ont été utilisées. Pendant l'expérience, les souris sont logées sous des conditions

standard pour l'alimentation et la manipulation établies sous des procédures standard d'opération (PSO), selon les bonnes pratiques de Soins et d'Utilisation des Animaux expérimentaux.

5 On peut suivre différents programmes d'immunisation:

10 - Programme A, quatre doses de 4- $\mu$ g équivalents de hIL-2r conjuguées au vaccin hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 dans 0,1 mL sont administrées par voie intramusculaire toutes les deux semaines, en alternant les emplacements d'immunisation dans les membres.

15 - Programme B quatre doses de 10- $\mu$ g équivalents de hIL-2r conjuguées au vaccin hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 dans 0,1 mL sont administrées par voie intramusculaire. Les deux premières posologies sont administrées simultanément dans des emplacements d'immunisation indépendants dans deux membres et deux semaines plus tard, deux posologies sont administrées dans les deux autres membres.

**- Evaluation de la réponse d'anticorps contre le hIL-2r induit par le vaccin hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51.**

20 Les titres d'auto-anticorps peuvent être décelés par un des procédés disponibles dans l'état de la technique pour mesurer les anticorps « bloquants » ou par l'évaluation de la réponse immunitaire spécifique dans le sang périphérique, en mesurant les anticorps spécifiques ou les cellules B.

25 Les anticorps anti-hIL-2r induits par le vaccin hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 peuvent être évalués par un test ELISA indirect (enzyme-linked immunosorbent assay) avec le sérum sanguin provenant des animaux immunisés comme il est décrit: dans des plaques de six puits

30 Des plaques microtitres à fond plat de 96 puits (Costar, High Binding, USA) sont couvertes par 50  $\mu$ L/puits de hIL-2r, préparées à une concentration de 10  $\mu$ g/mL dans une solution de carbonate-bicarbonate 0,1M, pH 9,6. Les plaques sont incubées la nuit à 4°C, et lavées deux fois avec 200  $\mu$ L/puits de PBS contenant 0,05 % de Tween 20 (PBS-Tween 20). Après une incubation d'une heure à 37°C avec 100  $\mu$ L/puits contenant 1 % de l'albumine du sérum-albumine bovin (PBS-BSA 1 %), les plaques sont lavées 35 avec 200  $\mu$ L/puits de PBS-Tween 20 et ajoutées ensuite 50  $\mu$ L/puits des échantillons de sérum à des différentes dilutions dans PBS-BSA 1 %. Après une heure d'incubation à 37 °C, les plaques sont lavées avec PBS-Tween 20 et 50  $\mu$ L/puits d'un Anticorps anti-souris de brebis conjugué au phosphatase alcalin (Jackson Immunoresearch Laboratories) diluées 1/5000 dans PBS-BSA est ajoutée et incubée 1 heure à 37°C. Les plaques sont 40 lavées et 50  $\mu$ L/puits de la solution substrat est ajoutée, consistant en 1  $\mu$ g/mL de p-nitrophenylphosphate (Sigma) dans une solution de tampon diethanolamine, pH 9,8. Après incubation des plaques 30 minutes à la température ambiante (RT), l'absorbance du produit de la réaction est mesurée dans un lecteur ELISA (Organon Teknika, Austria) à 405 nm.

45

**- Evaluation de la réponse d'anticorps anti-hEGF induite par un vaccin basé sur EGF**

Les titres auto-anticorps peuvent être décelés dans le sérum par un des procédés disponibles dans l'état de technique pour la mesure des anticorps « bloquants » ou pour



l'évaluation de la réponse immunitaire spécifique dans le sang périphérique, en mesurant les anticorps spécifiques ou les cellules B.

Les anticorps anti- hEGF induits par un vaccin base sur EGF peuvent être évalués par un test ELISA indirect (enzyme-linked immunosorbent assay) avec le sérum sanguin provenant des animaux immunisés, comme il est décrit dans Gonzalez, G., et al. (2002) Vaccine Research 5, 233-244.

5  
10 **- l'effet sur la prolifération de la lignée de cellules CTLL-2 après incubation avec le sérum sanguin à partir des animaux vaccinés par hIL-2-P64k/Montanide ISA 51 ou par un Anticorps Monoclonal Spécifique (mAb) à hIL-2r.**

La lignée de cellule T IL-2-dépendent est maintenue dans le milieu contenant RPMI-1640 1U/mL de hIL-2h sous une prolifération continue. La culture de CTLL-2 est effectuée dans un flacon de culture de 75 cm<sup>2</sup> contenant 25 mL de RPMI-1640 avec 8 à 20 % de sérum de fœtus de veau (FCS) avec 0,5x10<sup>5</sup> -10<sup>6</sup> cellules/mL en suspension. Les cellules sont utilisées deux jours après l'expansion *in vitro*.

Pour réaliser l'essai, les cellules sont extraites de la culture *in vitro* et lavées pas moins de quatre fois avec le RPMI-1640 ou le PBS. Dans des plaques de culture microtitres à fond plat de 96 puits (Costar, High Binding, USA), 5x10<sup>3</sup> cellules sont cultivées. Ces cellules sont traitées avec des dilutions de sérum provenant de l'animal immunisé avec le vaccin hIL-2-P64k/Montanide ISA 51 avec un ELISA titré à IL-2 de 1:10000 ou avec un mAb anti-IL-2 spécifique et 1U/mL de hIL-2r est ajouté. La culture est réalisée pendant 24 heures dans une atmosphère humide à 37 °C dans un incubateur de 5 % CO<sub>2</sub>. La prolifération a été déterminée par palpitation avec [<sup>3</sup>H]thymidine (1 µCi/well) pendant les heures 18 à 24 finales de culture. L'incorporation de thymidine est mesurée dans un scintillateur à liquide. Toute la manipulation est faite sous des conditions stériles.

30 **3- L'effet Anticancéreux du vaccin hIL-2-P64k/Montanide ISA 51. Etudes précliniques.**

Afin d'étudier chez les animaux l'effet anticancéreux de la préparation du vaccin de la présente invention, les souris femelles BALB/c âgées de 8 à 12 semaines et pesants 18 à 20 g sont utilisés. Les animaux peuvent être immunisés avec le vaccin hIL-2-P64k/Montanide ISA 51 selon les tableaux A et B détaillés auparavant, et une semaine plus tard, ils sont inoculés avec une lignée de cellules de tumeur, comme le carcinome de sein F3II à 5x10<sup>4</sup> cellules/animal par voie sous cutanée de manière orthotopique. Les souris portant des tumeurs palpables sont marquées comme positives et la croissance de la tumeur est mesurée en utilisant un adipomètre, la longueur de la surface la plus longue (a) et sa largeur perpendiculaire (b) sont définies, et la taille de la tumeur rapportée comme Tumeur a x b. sont vérifiées de façon périodique.

Les auteurs de la présente invention ont trouvé par surprise et à l'improviste que la neutralisation de liaison de IL-2 à son récepteur chez les sujets portant une tumeur maligne, la réponse immunitaire contre cette tumeur est augmentée, en induisant une réduction de la taille de la tumeur. L'état de la technique précédente a indiqué que telle action entraînerait une inhibition de la réponse du système immunitaire de l'individu à la tumeur.

Les auteurs ont constaté que cet effet sur la croissance de la tumeur est obtenu lorsque les niveau de IL-2 circulant sont sensiblement réduits, quand le sujet est sous une thérapie active avec la composition du vaccin de la présente invention comme lorsque

cette réduction est obtenue sous une thérapie passive avec des anticorps anti-IL-2 monoclonaux.

Pour cette raison, la présente invention résulte à des avantages incontestables pour le traitement des patients souffrant des tumeurs malignes et fournit un procédé de vaccination avec IL-2 qu'est efficace, simple et beaucoup moins ennuyant et agressif pour les patients que les traitements conventionnels utilisés dans ces cas. Les exemples suivants incluent les détails expérimentaux, illustrant l'efficacité immunologique de la composition de vaccin objet de l'invention.

#### 10 EXEMPLES:

Le IL-2 (hIL-2r) recombinant humain utilisé dans la composition du vaccin de la présente invention est disponible sur le marché (U.S. 5.614.185).

La protéine P64k provenant de *Neisseria Meningitidis* utilisée dans le vaccin est obtenue par la recombinaison génétique *in vitro* décrite dans EP 0474313 A2 et U.S. 5,286,484.

#### 15 EXEMPLE 1: La réponse d'anticorps induite par le vaccin hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51.

Afin de favoriser l'immunogénicité contre l'Interleukine-2 humaine, il a été conjugué chimiquement à la protéine P64k de la protéine de transport de la *Neisseria Meningitidis*. La conjugaison chimique peut être effectuée par le procédé de Glutaraldéhyde (U.S. 5.984.018). L'efficacité de la conjugaison est vérifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% SDS, en appliquant des échantillons de chaque composant de façon séparée (hIL-2r, P64k) comparé contre le conjugué chimique hIL-2r-P64k et un modèle standard du poids moléculaire. Il est possible à vérifier qu'un conjugué est obtenu à cause de l'existence d'un régime continu dans voie où le hIL-2r-P64k a été appliqué (Figure 1).

Afin d'évaluer la réponse de l'anticorps à hIL-2r induit par le vaccin hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51, des souris BALB/c ont été immunisées avec les programmes A et B. le sérum immun A provenant d'un animal qui répond au vaccin hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 a été utilisé comme témoin positif, et un sérum pré-immune comme témoin négatif. Il a été défini comme le titre d'anticorps des animaux immunisés, la plus grande dilution à laquelle la densité optique des sérums a été plus grande que la valeur moyenne de la densité optique du sérum pré-immune plus cinq fois l'écart type. Afin de définir les titres dans les animaux témoins, le même critère précédent a été utilisé à moins que PBS-BSA 1% au lieu du sérum pré-immune en tant que témoin négatif ont été utilisés.

La réponse d'anticorps a été induite atteignant des titres de 1:100 à 1:50000. ce protocole d'immunisation reste environ 52 jours, raison pour laquelle il a été nécessaire à la modifier pour obtenir des titres d'anticorps similaires ou meilleurs dans une période de temps plus courte, ainsi nous avons utilisé le programme B et nous avons obtenu des résultats similaires, tel que présenté dans la Figure 2.

#### 45 EXEMPLE 2: Essai de prolifération de la lignée de cellules CTLL-2 traitées par le sérum sanguin provenant des animaux immunisés par le vaccin hIL-2-P64k/Montanide ISA 51.

La capacité de liaison de IL-2 *in vitro* des anticorps du sérum générés chez des animaux immunisés par le vaccin hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 a été évaluée par leur culture avec la lignée de cellules T IL-2-dépendent CTLL-2. Les cellules CTLL-2 ont été cultivées dans une culture sur plaques en présence de IL-2 pour les laisser croître et les différentes dilutions du sérum sanguin provenant d'un animal avec environ 1:10000 titres d'anticorps ont été ajoutés. Il a été observé une corrélation directe entre la concentration

du sérum et l'inhibition de la prolifération de la lignée de cellules CTLL-2 (Figure 3). Elle démontre la capacité de neutralisation de IL-2 in vitro du sérum provenant des animaux vaccinés.

5 **EXEMPLE 3: Les expériences anticancéreuse chez des animaux traités par le vaccin hIL-2-P64k/Montanide ISA 51.**

Des animaux ont été immunisés par le vaccin hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 suivant le programme B. une semaine plus tard, les animaux ont été attaqués par  $5 \times 10^4$  F3II cellules de tumeur. La cinétique de croissance de la tumeur a été plus lente dans les animaux immunisés par hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 par rapport au groupe témoin, immunisés par PBS-P64k/Montanide ISA 51 (Figure 4a). Il y avait des différences significatives statistiques observées dans la taille de la tumeur entre ces deux groupes.

10 **EXEMPLE 4: Essai de prolifération de la lignée de cellules CTLL-2 traitées par mAb anti-IL-2 spécifique.**

La capacité de liaison de IL-2 in vitro des anticorps spécifiques contre le hIL-2r produit par l'hybridome S4B6 (ATCC # HB-8794) a été évaluée par sa culture avec la lignée de cellules T IL-2-dépendent CTLL-2. Les cellules CTLL-2 ont été cultivées dans des cultures sur plaques en présence de IL-2 pour les laisser croître et les différentes dilutions d'anticorps ont été ajoutées. Il a été observé une corrélation directe entre la concentration de l'anticorps et l'inhibition de la prolifération de la lignée de cellules CTLL-2 (Figure 5). Il a été constaté que une dilution d'anticorps de 1:100 est capable à inhiber plus de 80% de la prolifération de la lignée de cellules CTLL-2, démontrant la capacité de neutralisation IL-2 in vitro de l'anticorps monoclonal.

15 **EXEMPLE 5: L'effet anticancéreux de anti-IL-2 mAb et un anti-CD25 mAb (ATCC - PC61). Le modèle expérimental F3II (carcinome du sein).**

Des souris ont été traitées par une dose quotidienne de 1 mg d'anticorps monoclonal spécifique (anti-IL-2 mAb ou anti-CD25 mAb) pendant cinq jours consécutifs. Deux jours plu tard, les souris ont été attaquées par  $5 \times 10^4$  cellules/souris de F3II du carcinome du sein par une injection sous cutanée orthotopique. La longueur de la surface la plus longue (a) et sa largeur perpendiculaire (b) ont été mesurées de façon périodique. La taille de la tumeur dans le groupe témoin (traité par PBS) a été plus élevée que dans le groupe traité par le anti-IL-2 mAb (Figure 6). La taille de la tumeur entre les deux groupes expérimentaux a été différente de point de vue statistique. Cependant, la taille de la tumeur dans les animaux traités par l'anti-CD25 mAb (ATCC - PC61) a été similaire à celle du groupe témoin. Ce résultat montre que les anticorps neutralisant IL-2 ont un effet anticancéreux fort même dans les tumeurs où l'enlèvement des cellules régulatrices de CD25 n'a aucun effet.

20 **EXEMPLE 6: L'effet anticancéreux de l'anti-IL-2 mAb et un anti-CD25 mAb (ATCC - PC61). Le modèle expérimental de EL4 (lymphome).**

Les animaux C57BL/6 ont été attaqués par voie sous cutanée de  $5 \times 10^4$  cellules/souris de lymphome EL4. Les animaux ont été traités par voie intraveineuse avec une dose de 1mg de l'anti-CD25 mAb (PC61) deux jours avant le déclenchement de la tumeur ou avec une dose quotidienne de 1 mg d'un anti-IL-2 mAb (S4B6) pendant cinq jours consécutifs commençant six jours avant l'inoculation de la tumeur. Des autres groupes ont été co-administrés avec l'anti-CD25 et l'anti-IL-2 mAbs selon un programme similaire décrit auparavant.

50 La croissance de la tumeur de chaque groupe de souris a été enregistrée. La taille de la tumeur dans chaque souris a été mesurée dans deux dimensions perpendiculaires deux

fois par semaine après le déclenchement de la tumeur. Les différences statistiques pour la tumeur EL4 sont \* $p=0,0232$ , \*\* $p=0,0039$ , \*\*\* $p<0,0001$ .

La Figure 7 montre que la combinaison de deux anticorps monoclonaux a un fort effort sur la croissance de la tumeur.

5

**EXEMPLE 7: L'induction des auto-anticorps anti-IL-2 n'affecte pas la réponse au vaccin du cancer EGF.**

Pour évaluer si la réponse de l'anticorps contre le hEGF induit par le vaccin hEGF-P64k/Montanide ISA 51, a été affectée par la vaccination précédente avec le hIL-2r, qui nécessite l'induction des auto-anticorps, les animaux BALB/c immunisés par le vaccin préparé hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 selon le programme A et immunisés 9 jour plus tard par le vaccin préparé hEGF-P64k/Montanide ISA 51 ou par hEGF/Montanide ISA 51. Dans toutes les expériences où il a été immunisé avec le vaccin de hEGF, 4  $\mu\text{g}$  équivalent de hEGF conjugué dans le vaccin préparé dans un volume de 0,1mL, administré par voie intramusculaire. Un sérum immun des animaux répondants au vaccin hEGF-P64k/Montanide ISA 51 a été utilisé en tant que témoin positif et un sérum pré-immun en tant que témoin négatif. Il a été défini comme titres des anticorps chez les animaux immunisés, la plus grande dilution à laquelle la densité optique de sérums a été plus grande que la valeur moyenne de la densité optique du sérum pré-immun plus de cinq fois l'écart type. Afin de définir les titres chez les animaux témoins, le même critère précédent a été utilisé sauf que le PBS-BSA 1% au lieu d'un sérum pré-immun comme témoin négatif ont été utilisés. Il a été obtenu que les titres des anticorps contre le EGF induit par la vaccination par EGF/Montanide ISA 51 ou hEGF-P64k/Montanide ISA 51 ne sont pas infectés par l'induction des auto-anticorps contre le hIL-2r comme le cas dans la Figure 8.

25

**EXEMPLE 8: Neutralisation de l'Interleukine-2 in vivo rétablit l'activité cytolytique évaluée dans les cellules du ganglion lymphatique des hôtes portant la tumeur**

L'effet de neutralisation de IL-2 sur la réponse immunitaire à un antigène nominal dans l'hôte portant la tumeur a été évalué. Des souris femelles C57BL/6J (H-2b) ont été maintenues sous des conditions de logement standard. Pour toutes les expériences, les souris âgées entre 6 et 12 semaines ont été utilisées. L'ovalbumine (OVA) et des peptides: OVA grade VII (Sigma, St. Louis, MO) a été la protéine Ag modèle utilisée pendant ces expériences. Les peptides dominants OVA<sub>275-264</sub> (SIINFEKL) ont été utilisés à une pureté > 90%. L'essai de prolifération: les souris C57BL/6 ont été déclenchées par 10<sup>4</sup> cellules de la tumeur MB16F10 ou PBS par voie sous cutanée dans le flanc gauche. Les diamètres de la tumeur sont mesurés de façon périodique. Trois semaines plus tard, ces souris ont été immunisées s.c. le jour 0 avec 1 mg de OVA avec 100  $\mu\text{g}$ /souris de l'acide Polyinosinique: polycytidylique [poly I:C] (PIC) (Sigma, St. Louis, MO) et dans les 2 jours suivants uniquement le PIC a été administré. Simultanément, les animaux ont été triés par l'anticorps monoclonal spécifique à hIL-2r ( $\alpha\text{IL-2}$ ) ou PBS cinq jours consécutifs. L'activité cytolytic in vivo a été déterminée en utilisant les cellule spléniques provenant des souris naïves marquées différentiellement par le colorant fluorescent CFSE (Molecular Probes, Paisley, UK). Les cellules marquées par CFSEhigh ont été utilisées en tant que cibles et pulsées par SIINFEKL (1  $\mu\text{M}$ ; 90 min à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>), alors que les cellules marquées par CFSElow ont été laissées non pulsées pour servir en tant que témoin interne. Les cellules cibles à peptide pulsé ont été lavées de manière extensive pour enlever le peptide libre et ensuite co-injectées par voie intraveineuse dans un rapport de 1:1 aux souris immunisées précédemment. Seize heures plus tard, les ganglions lymphatiques et les rates ont été enlevées et les événements totaux correspondant à toutes les intensités de fluorescence (CFSElow et

50

CFSE<sup>high</sup>) ont été déterminées par cytométrie en flux. Le rapport entre les pourcentages de vs SIINFEKL-couvertes non couvertes (CFSE<sup>int</sup>/CFSE<sup>high</sup>) a été calculé pour obtenir la valeur numérique de cytotoxicité. L'activité cytolytique des cellules de la ganglions lymphatiques au peptide OVA est évaluée in vivo dans les souris C57BL/6 immunisées par OVA plus PIC qui a donné une réponse maximale. L'administration d'une dose quotidienne pendant 5 jours consécutifs de 1 mg de l'anticorps monoclonal anti-IL-2 par injection intraveineuse n'affecte pas la réponse cytolytique chez ces animaux. Les souris C57BL/6 déclenchées par la tumeur MB16F10 deviennent immunosupprimées par une activité cytolytique réduite à OVA. Cependant, l'administration in vivo d'un anticorps monoclonal avec une capacité de neutralisation IL-2 restitue la réponse immunitaire des cellules de la ganglions lymphatique (Figure 9).

**EXEMPLE 9: Neutralisation de l'Interleukine-2 in vivo restitue l'activité cytolytique évaluée dans les cellules spléniques des hôtes portant la tumeur**

L'effet de la neutralisation de IL-2 sur la réponse immunitaire à un antigène nominal chez un hôte portant la tumeur a été évalué. Les souris C57BL/6 ont été immunisées par OVA plus PIC et l'activité cytolytique des cellules spléniques à un peptide OVA a été évaluée in vivo en obtenant une réponse maximale. L'administration d'une dose quotidienne pendant 5 jours consécutifs de 1 mg de l'anticorps monoclonal anti-IL-2 par injection intraveineuse n'affecte pas la réponse cytolytique chez ces animaux. Les souris C57BL/6 déclenchées par la tumeur MB16F10 deviennent immunosupprimées avec une activité cytolytic réduite à OVA. Cependant, l'administration in vivo d'un anticorps monoclonal avec une capacité de neutralisation de IL-2 restitue la réponse immunitaire des cellules spléniques (Figure 10).

**EXEMPLE 10: Dénombrement des cellules sanguines chez des animaux immunisés par le vaccin préparé hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51.**

L'objectif est d'évaluer si l'immunisation par le vaccin préparé hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 a induit des changements dans le nombre des cellules sanguines, le dénombrement prend les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes, autant des animaux immunisés par le vaccin préparé (selon le programme A) ou des animaux sans vaccination, aux jours 100 après la première immunisation. Comme indiqué dans la Figure 11, on ne peut pas obtenir des différences dans les dénombrements des cellules entre les groupes analysés.

**DESCRIPTION BRÈVE DES FIGURES:**

**Figure 1-** Electrophorèse de hIL-2r-P64k chimique conjugué. Les bandes de la gauche à la droite correspondent aux P64k, hIL-2r, hIL-2r-P64k et un modèle standard du poids moléculaire, respectivement.

**Figure 2-** Les titres des anticorps contre le hIL-2r induit par la vaccination hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 en utilisant des programmes de l'immunisation tous expliqués auparavant. L'axe y représente la moyenne de titre des anticorps contre IL-2. L'axe x représente les groupes qui correspondent aux animaux immunisés avec:  
Témoin : P64k/Montanide ISA 51.

Progr. A IL-2: hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 selon le programme A

Progr. B IL-2: hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 selon le programme B.

**Figure 3-** Prolifération de la lignée CTLL-2 en présence de hIL-2r et les différentes dilutions provenant du sérum d'animal immunisé par le vaccin hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 et qui possèdent des titres de l'ordre de 1:1000 jusqu'au 1:50 000.

5 **Figure 4-** Croissance de la tumeur des animaux vaccinés par le vaccin de hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 ou par P64k/Montanide ISA 51 (groupe témoin) et déclenché plus tard par la tumeur F3II. L'axe **y** représente la zone de la tumeur défini comme le diamètre le plus grand x le diamètre le plus petit sélectionnés de façon perpendiculaire.

10 **Figure 5-** Prolifération de la lignée de CTLL-2 en la présence de hIL-2r et les différentes dilutions provenant des anticorps contre IL-2.

**Figure 6-** La croissance de la tumeur des animaux traités par l'anti-IL-2 mAb, avec l'anti-CD25 mAb ou PBS (groupe témoin) et déclenché par la lignée de cellules de la tumeur F3II. L'axe **y** représente la zone de la tumeur défini en tant que le plus grand diamètre x le plus petit diamètre sélectionnés de façon perpendiculaire.

20 **Figure 7-** La croissance de la tumeur des animaux traités par le  $\alpha$ CD25 mAb, avec l'anti-CD25 mAb ou le PBS (groupe témoin) et déclenché plus tard par le lymphome EL4. L'axe **y** représente la zone de la tumeur défini en tant que le plus grand diamètre x le plus petit diamètre sélectionnés de façon perpendiculaire.

25 **Figure 8-** Les titres d'anticorps Antibody au EGF induit par la vaccination par hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 et hEGF-P64k/Montanide ISA 51. L'axe **y** représente la moyenne géométrique des titres des anticorps au EGF. L'axe **x** représente les groupes immunisés par:

hIL-2r: hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51.

hEGF: hEGF/Montanide ISA 51

hIL-2r+hEGF: hIL-2r-P64k/Montanide + hEGF/Montanide.

30 hEGF/P64k: hIL-2r-P64k/Montanide + hEGF/Montanide.

hIL-2r+hEGF/P64k: hIL-2r-P64k/Montanide + hEGF/P64k/Montanide.

**Figure 9** – Les anticorps induits par l'Interleukine-2 restaure l'activité cytolytique évaluée dans les ganglions lymphatiques des hôtes portant la tumeur.

35 Toutes les souris ont immunisées par voie sous cutanée le jour 0 avec 1 mg de OVA plus 100  $\mu$ g par souris de PIC et les 2 jours suivantes uniquement le PIC a été administré. L'activité cytolytique in vivo a été déterminée en utilisant les cellules spléniques provenant des souris naïves marquées différemment par le colorant fluorescent CFSE. Les cellules marquées par CFSE<sup>high</sup> ont été utilisées en tant que cibles et pulsées par SIINFEKL, alors que les cellules marquées par CFSE<sup>low</sup> ont été laissées intactes pour servir comme témoin interne, ensuite co-injectées par voie intraveineuse dans un rapport de 1:1 aux souris immunisées auparavant. L'activité cytolytique a été évaluée dans les cellules du ganglion lymphatique.

40 Les animaux témoins traités par PBS, les animaux  $\alpha$ IL-2 traités par un anticorps monoclonal neutralisant le IL-2, les animaux MB16F10 similaires au témoin mais déclenchés par MB16F10, les souris portant la tumeur  $\alpha$ IL-2+MB16F10 –MB16F10 traités par l'anticorps monoclonal neutralisant le IL-2.

45 **Figure 10** – Les anticorps induits par l'Interleukine-2 restaure l'activité cytolytique évaluée dans les cellules spléniques des hôtes portant la tumeur.

50

- Toutes les souris ont été immunisées par voie sous cutanée le jour 0 par 1 mg de OVA plus 100 µg par souris de PIC et les 2 jours suivants uniquement PIC a été administré. L'activité cytolytique in vivo a été déterminée en utilisant les cellules spléniques provenant des souris naïves marquées de façon différentielle par le colorant fluorescent
- 5 CFSE. Les cellules marquées par CFSE<sup>high</sup> ont été utilisées en tant que cibles et pulsées par SIINFEKL, alors que les cellules marquées par CFSE<sup>low</sup> ont été laissées intactes por servir comme témoin interne, ensuite co-injectées par voie intraveineuse dans un rapport de 1:1 aux souris immunisés auparavant. L'activité cystolique a été évaluée dans les cellules spléniques.
- 10 Les animaux témoins traités par PBS, les animaux αIL-2 traités par un anticorps monoclonal neutralisant IL-2, les animaux MB16F10 similaires au témoin mais déclenchées par MB16F10, les souris portant la tumeur αIL-2+MB16F10 –MB16F10 traitées par l'anticorps monoclonal neutralisant IL-2.
- 15 **Figure 11-** L'hémogramme (leucocytes (globules blancs), érythrocytes (globules rouges) et les plaquettes) dans les animaux immunisés par le vaccin hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 par rapport au témoin (P64k/Montanide ISA 51).

20

**FORMULATIONS IMMUNOTHERAPEUTIQUES A CAPACITE DE NEUTRALISATION DE L'INTERLEUKINE-2 .****Revendications:**

- 5 1. Une formulation thérapeutique pour obtenir une réponse immunitaire contre l'IL-2, utile dans le traitement des patients souffrant du cancer, comportant au moins un de:  
A.- IL-2 ou tout dérivé de celui-ci par couplage à toute protéine de transport génétiquement ou par conjugaison chimique qui contient un adjuvant approprié.  
10 B.- Un anticorps monoclonal anti-IL-2.  
C.- Un vaccin du cancer selon des antigènes spécifiques de tumeurs ou de facteurs de croissance.  
D.- Un anticorps monoclonal anti-CD25.
- 15 2. Une formulation thérapeutique pour obtenir une réponse immunitaire contre IL-2, selon la revendication 1 comportant l'administration dans une voie simultanée ou séquentielle de A + C ou A + D ou B + C ou B + D.
- 20 3. Une formulation thérapeutique pour obtenir une réponse immunitaire contre IL-2, selon la revendication 1 comportant IL-2 ou tout dérivé de celui-ci par couplage de la protéine de transport et à un adjuvant approprié.
- 25 4. Une formulation thérapeutique pour obtenir une réponse immunitaire contre IL-2, selon la revendication 3 comportant IL-2 par couplage à une protéine de transport et à un adjuvant approprié.
- 30 5. Une formulation thérapeutique pour obtenir une réponse immunitaire contre IL-2, selon la revendication 4, où la protéine de transport utilisée est P64k dérivée de la *Neisseria meningitidis*.
- 35 6. Une formulation thérapeutique pour obtenir une réponse immunitaire contre IL-2, selon la revendication 5, où l'adjuvant est sélectionné du groupe comportant l'hydroxyde d'aluminium et le type de Montanide ISA 51.
- 40 7. Une formulation thérapeutique pour obtenir une réponse immunitaire contre le IL-2, selon la revendication 6, où l'adjuvant est le Montanide ISA 51.
- 45 8. Une formulation thérapeutique pour obtenir une réponse immunitaire contre le IL-2, selon la revendication 1, comportant un produit chimique conjugué entre IL-2 et P64k.
9. Une formulation thérapeutique pour obtenir une réponse immunitaire contre IL-2, selon la revendication 1, comportant une protéine de fusion entre IL-2 et P64k.
- 50 10. Une formulation thérapeutique pour obtenir une réponse immunitaire contre IL-2, selon la revendication 1, comportant une protéine de fusion entre les peptides dérivés de IL-2 et P64k.
11. Une formulation thérapeutique pour obtenir une réponse immunitaire contre IL-2, selon la revendication 1, comportant un anticorps monoclonal spécifique contre le IL-2 humain.



- 5 12. Une formulation thérapeutique pour obtenir une réponse immunitaire contre le IL-2, selon la revendication 2 comportant l'administration à un sujet IL-2 ou tout dérivé de celui-ci par couplage à une protéine de transport et un adjuvant en combinaison avec un vaccin du cancer selon des antigènes spécifiques de tumeurs ou de facteurs de croissance.
13. Une formulation thérapeutique pour obtenir une réponse immunitaire contre IL-2, selon la revendication 12, où le vaccin du cancer comporte EGF.
- 10 14. Une formulation thérapeutique pour obtenir une réponse immunitaire contre IL-2, selon la revendication 2 comportant l'administration à un sujet de IL-2 ou tout dérivé de celui-ci par couplage à une protéine de transport et un adjuvant en combinaison avec un anticorps monoclonal spécifique anti-CD25.
- 15 15. Une formulation thérapeutique pour obtenir une réponse immunitaire contre IL-2, selon la revendication 13 comportant un anticorps monoclonal spécifique anti-CD25.
- 20 16. Une formulation thérapeutique selon les revendications 1 à 15, pour la fabrication d'un médicament pour obtenir une réponse immunitaire contre IL-2 pouvant inhiber la croissance tumorale chez des patients souffrant du cancer.
17. L'utilisation des formulations thérapeutiques des revendications 1 à 15, pouvant inhiber la croissance tumorale.

Figure 1

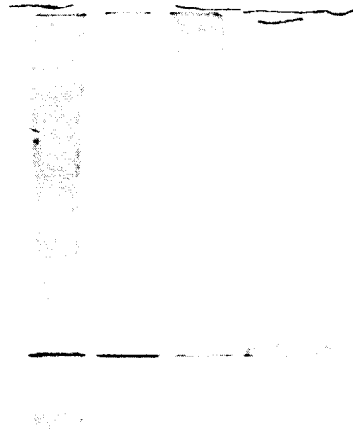
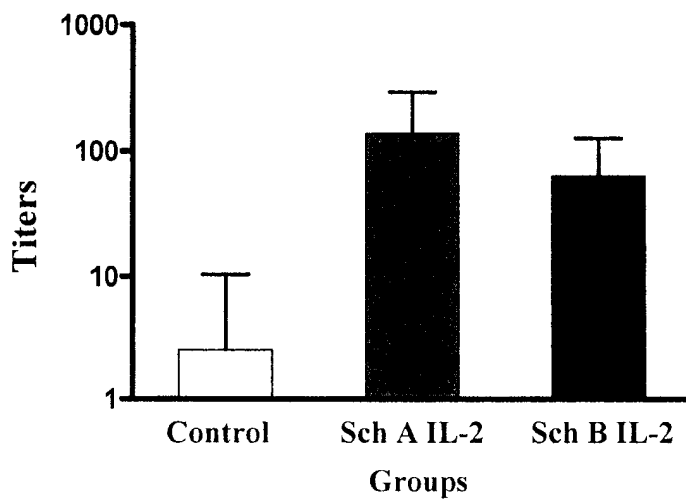


Figure 2



~

Figure 3

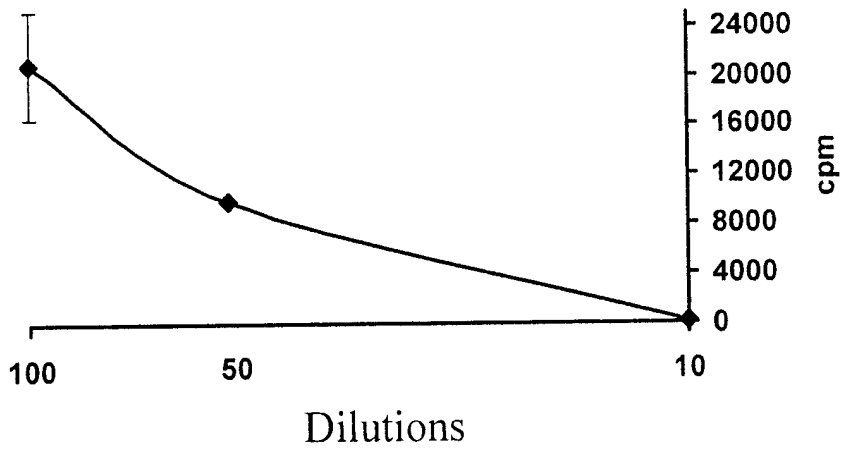
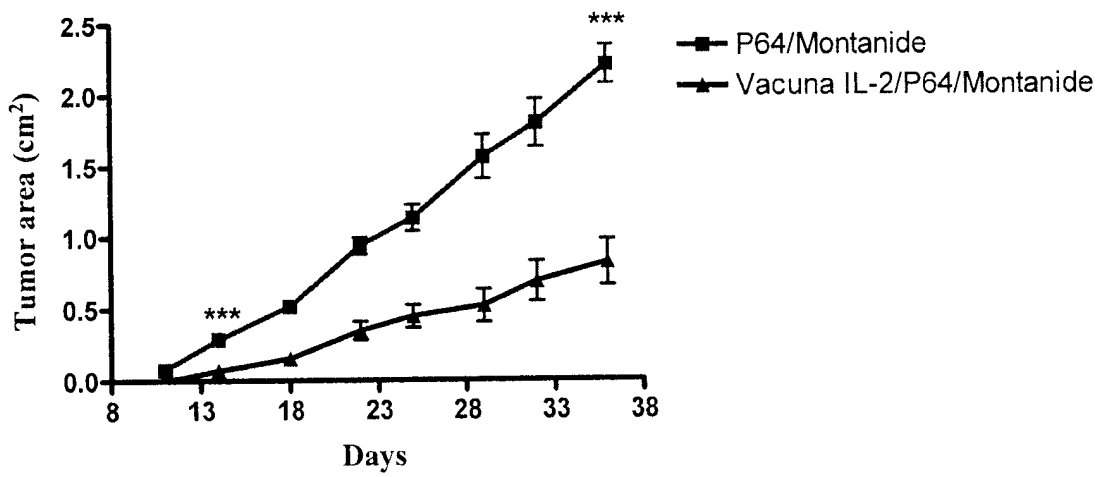


Figure 4



~

Figure 5

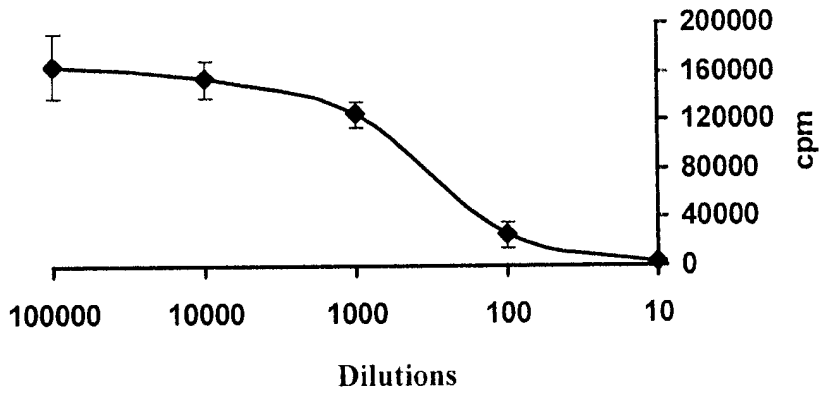
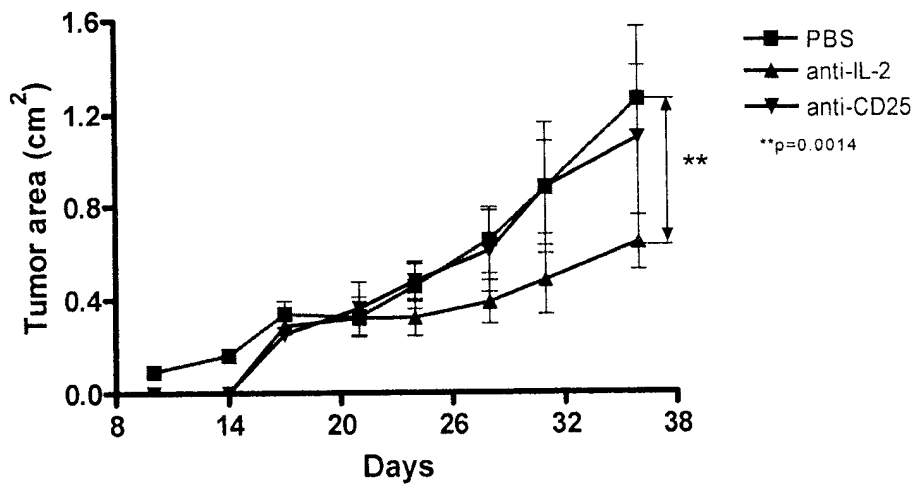


Figure 6



A

Figure 7

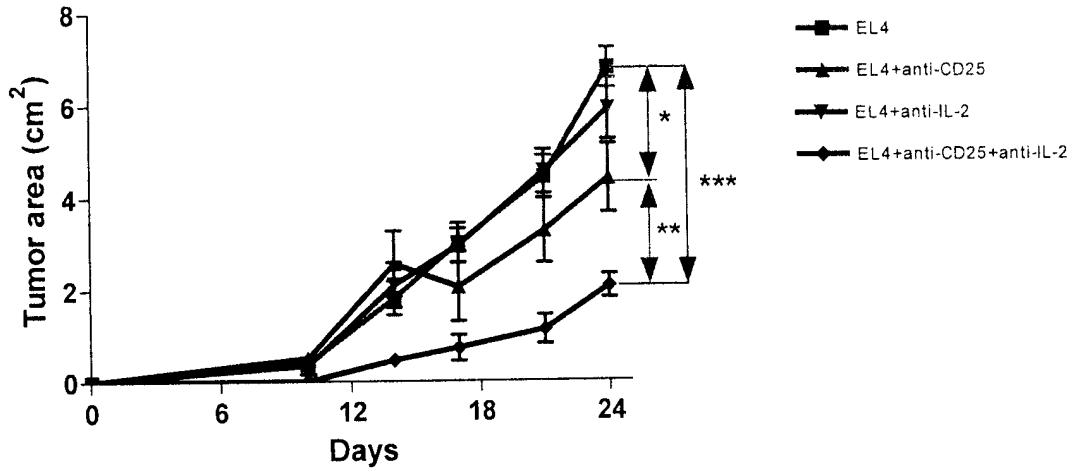
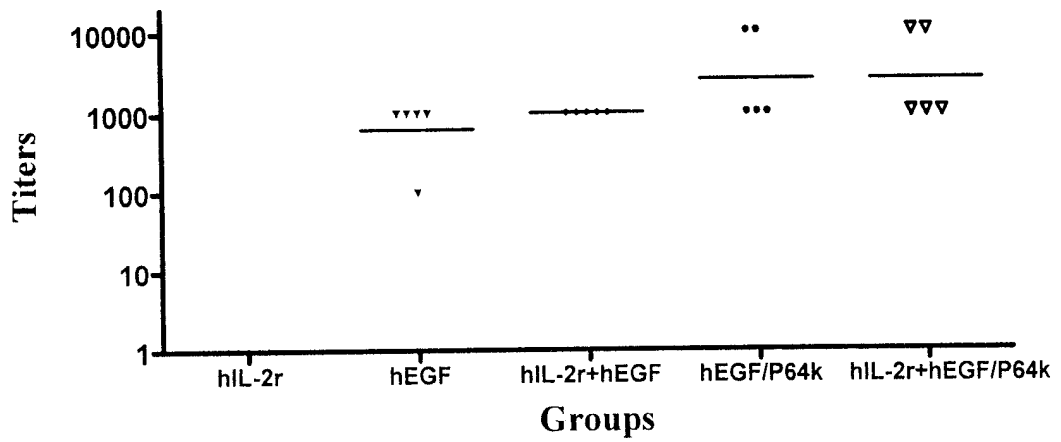


Figure 8



A

5/6

Figure 9

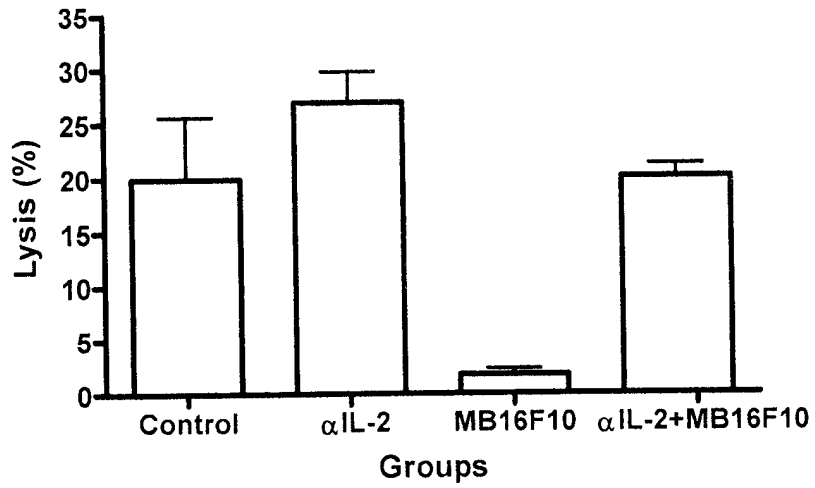
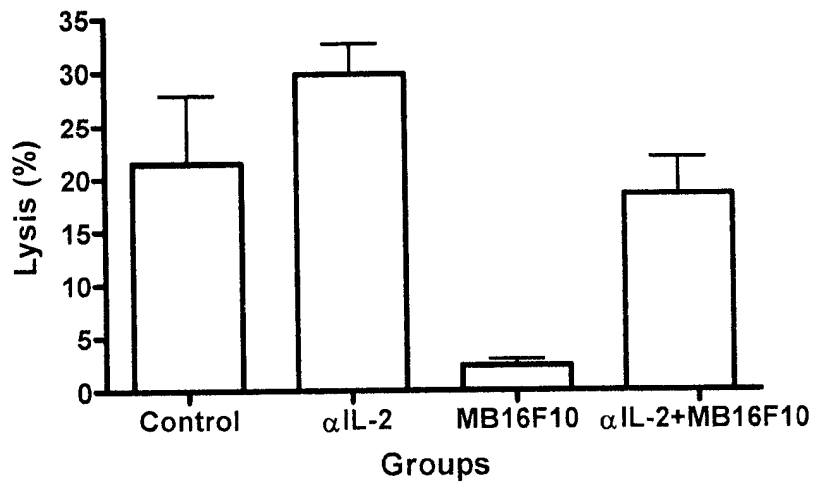


Figure 10



A

Figure 11

