

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 04.05.01.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 08.11.02 Bulletin 02/45.

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

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATO-
MIQUE Etablissement de caractère scientifique techni-
que et industriel — FR et INSTITUT NATIONAL DE LA
SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE INSERM
— FR.

⑦② Inventeur(s) : MAILLÈRE BERNARD, BOURGAULT
VILLADA ISABELLE, POUVELLE MORATILLE SAN-
DRA et GUILLET JEAN GERARD.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET ORES.

⑤④ MELANGE DE PEPTIDES ISSUS DES PROTEINES E6 ET/OU E7 DE PAPILOMAVIRUS ET LEURS
APPLICATIONS.

⑤⑦ Mélange de peptides issus des protéines E6 et/ ou E7
d'un papillomavirus impliqué dans le cancer du col de l'utérus,
tel que HPV16 (papillomavirus de génotype 16),
HPV18, HPV30, HPV31, HPV32, HPV33, HPV34, HPV35,
HPV39, HPV40, HPV42, HPV43, HPV44, HPV45, HPV51,
HPV52, HPV56, HPV57 et HPV58, par exemple ainsi que
ses applications en tant que médicament (dans des compo-
sitions immunogènes, aptes à stimuler la production de lym-
phocytes T CD4+ anti-HPV in vivo et donc utiles pour la
vaccination contre les cancers du col de l'utérus et dans
d'autres cancers) ou en tant que réactif de diagnostic de
lymphocytes T spécifiques d'un HPV, notamment pour éva-
luer l'état immunitaire des patients.

Mélange de peptides issus des protéines E6 et/ ou E7
d'un papillomavirus impliqué dans des lésions bénignes de
la peau (verrues par exemple), tel que HPV10, HPV3 ou
HPV4 et ses applications en tant que médicament.

FR 2 824 326 - A1



La présente invention est relative à un mélange de peptides issus des protéines E6 et/ou E7 d'un papillomavirus impliqué dans le cancer du col de l'utérus, tel que HPV16 (papillomavirus de génotype 16), HPV18, HPV30, HPV31, HPV32, HPV33, HPV34, HPV35, HPV39, HPV40, HPV42, HPV43, HPV44, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV57 et HPV58, par exemple ainsi qu'à ses applications en tant que médicament (dans des compositions immunogènes, aptes à stimuler la production de lymphocytes T CD4+ anti-HPV *in vivo* et donc utiles pour la vaccination contre les cancers du col de l'utérus et dans d'autres cancers) ou en tant que réactif de diagnostic de lymphocytes T spécifiques d'un HPV, notamment pour évaluer l'état immunitaire des patients.

La présente invention est également relative à un mélange de peptides issus des protéines E6 et/ou E7 d'un papillomavirus impliqué dans des lésions bénignes de la peau (verrues par exemple), tel que HPV10, HPV3 ou HPV4 et à ses applications en tant que médicament.

Les papillomavirus humains (HPV) induisent des lésions bénignes de la peau et des muqueuses, mais interviennent également dans l'induction de lésions malignes. Ils ont été principalement impliqués dans le cancer du col de l'utérus qui constitue, dans le monde, la deuxième cause de mort par cancer chez les femmes.

Ils participent également au développement de certains cancers du pénis, de l'anus et de l'oropharynx. L'ADN de ces virus est en effet très souvent détecté par PCR dans les biopsies de patients (1). 20 à 50 % des cancers du pénis et 70 % des cancers de l'anus révèlent la présence d'ADN d'HPV.

Il existe en fait plus de 100 génotypes différents de papillomavirus ayant chacun une pathogénicité qui lui est propre. L'association entre l'infection à HPV et le cancer du col de l'utérus varie en effet en fonction des génotypes. On distingue les souches comme les virus HPV6 et HPV11 à risque faible ou nul de transformation maligne, des souches à risque élevé comme les virus HPV16 et HPV18. Quel que soit le pays, HPV16 est trouvé dans 40 à 60 % des cancers du col de l'utérus alors que HPV18 est présent dans 10 à 20 % des cas. La plupart des autres patientes atteintes de cancer du col de l'utérus sont infectées par HPV31, HPV33 ou HPV45.

Pour 1 % des patientes, on ne détecte pas d'ADN de papillomavirus.

Les expériences d'immortalisation *in vitro* de kératinocytes avec de l'ADN d'HPV ont révélé que deux gènes (E6 et E7) sont principalement responsables de la transformation des cellules. Dans ces expériences, l'ADN issu de souches virales à haut risque est capable de transformer les cellules, alors que les souches à faible
5 risque ne le sont pas. La protéine E6 se lie à la P53 qui possède une activité de suppression des tumeurs et induit sa dégradation. La protéine E7 se lie à la protéine PRb qui possède également une activité de suppression des tumeurs. Ces activités sont plus élevées pour les protéines E6 et E7 de souches à haut risque que pour les souches à faible risque. De plus, les gènes pRB et P53 sont mutés et inactifs dans les lignées
10 cellulaires du col de l'utérus ne présentant pas d'infection par HPV alors qu'ils ne le sont pas dans les lignées infectées. L'ensemble de ces observations suggère fortement que les protéines E6 et E7 sont des composants clés de l'infection par HPV et de l'induction d'états cancéreux.

En l'absence de traitements anti-viraux spécifiques des infections
15 par HPV, le développement de vaccins anti-HPV constitue une des voies prometteuses de lutte contre les formes de cancers qu'induisent ces virus.

L'utilisation de formes atténuées ou inactivées de virus est toutefois difficilement applicable en raison d'une part de l'absence actuelle de moyens de production du virus et d'autre part de la présence dans son génome de gènes transfor-
20 mants.

Une approche basée sur des peptides ou des sous-unités apparaît donc comme très intéressante. En particulier, on sait que des peptides choisis de manière adéquate sont capables de recruter à la fois des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et des lymphocytes T helper (lymphocytes T auxiliaires) de type TH1 dirigés
25 spécifiquement contre les cellules transformées.

Dans ce contexte, les protéines E6 et E7 constituent des cibles privilégiées, car elles participent directement à la cancérisation des cellules et leur expression précoce après l'infection persiste dans la cellule transformée.

Différentes stratégies de vaccination mettant en œuvre des peptides
30 issus de ces deux protéines ont ainsi été préconisées.

Ces stratégies s'appuient sur le fait que les lymphocytes T CD4+ ont un rôle majeur dans l'établissement des réponses immunitaires et en particulier des

CTL. De récents travaux ont montré qu'ils interviennent via les molécules CD40 dans l'activation des cellules dendritiques présentatrices de l'antigène qui sont nécessaires à la stimulation des CTL spécifiques (J.P. Ridge et al., *Nature*, 1998, **393**, 474 ; S.P. Schoenberger et al., *Nature*, 1998, **393**, 480 ; S.R. Bennett et al., *Nature*, 1998, **393**, 478 ; R.E.M. Toes et al., *Semin. Immunol.*, 1998, **10**, 443).

L'activation des lymphocytes T CD4+ se fait sous l'effet de la présentation des peptides viraux par les molécules HLA II, que portent les cellules présentatrices de l'antigène (APC ou *Antigen Presentation Cells*). Ces peptides, appelés épitopes T, résultent de la dégradation protéolytique des antigènes viraux par l'APC. Ils ont des longueurs variables, généralement de 13 à 25 acides aminés et possèdent une séquence qui les rend capables de se lier aux molécules HLA II.

Il est maintenant établi qu'un peptide, épitope T, est capable, au même titre que l'antigène natif, de stimuler *in vitro* des lymphocytes T CD4+ qui lui sont spécifiques ou de les recruter *in vivo*.

Les épitopes T sont donc suffisants pour induire une réponse CD4+. Toutefois, un des problèmes majeurs qui limite l'utilisation de ces peptides est que leur séquence varie d'un individu à l'autre, en raison du polymorphisme des molécules HLA II, qui sont des hétérodimères, exprimés sur les cellules présentatrices des antigènes (APC) et qui présentent aux lymphocytes T CD4+, les épitopes T desdits antigènes. Ces molécules sont capables de lier un répertoire important de peptides ayant des séquences très différentes, ce qui leur permet de présenter aux cellules T, plusieurs peptides par antigène.

Il existe quatre types différents de molécules HLA II par individu : 2 HLA-DR, 1 HLA-DQ et 1 HLA-DP ; la molécule HLA-DR dont la chaîne β est codée par le gène DRB1 (1^{er} gène) est la plus exprimée. On répertorie, actuellement plus de 200 allèles différents pour DRB1, qui définissent différents antigènes ou types comme résumé dans le Tableau I ci-après.

TABLEAU I

Molécules exprimées par différents allèles HLA-DRB1

Antigène	Allèle	Alias
DR1	DRB1*0101	DR1
DR3	DRB1*0301	DR3w17
DR4	DRB1*0401	DR4w4
	DRB1*0405	DR4w15
DR7	DRB1*0701	DR7
DR8	DRB1*0802	DR8w2
DR9	DRB1*0901	DR9
DR11	DRB1*1101	DR5w11
DR12	DRB1*1201	DR5w12
DR13	DRB1*1301	
	DRB1*1302	DR6w19
DR15	DRB1*1501	DR2w2b

5 Chaque allèle possède ses propres propriétés de liaison ; la spécificité large des molécules HLA II et l'existence de plusieurs isoformes et d'un polymorphisme font que chaque individu reconnaît dans un antigène, un ensemble de peptides dont la nature dépend des molécules HLA II qui le caractérise. Comme il existe un grand nombre d'allèles HLA II, il existe donc, pour un antigène donné, un nombre important d'épitopes T, propres à chaque allèle.

10 En outre, la répartition des allèles dans une population donnée, n'est pas homogène : par exemple, dans la population française, qui correspond à une population majoritairement caucasienne, seuls 7 allèles du locus DRB1 dépassent les 5 % ; il s'agit des allèles : DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*1101, DRB1*1301 et DRB1*1501, qui représentent 64 % de la population (4).

15 Ces mêmes allèles sont également majoritaires dans d'autres populations d'Europe, où leur fréquence varie de 53 % (Espagne) à 82 % (Danemark), ainsi qu'en Amérique du Nord (55-58 %).

20 Les molécules HLA-DRB3, -DRB4 et -DRB5 (2^{ème} gène), qui sont des molécules HLA-DR dont la chaîne β n'est pas codée par le gène DRB1, sont également présentes avec des fréquences alléliques importantes dans les différentes populations caucasiennes : 9,2 % pour DRB3*0101 (B3), 28,4 % pour DRB4*0101 (B4) et 7,9 % pour DRB5*0101 (B5). Elles couvrent donc à elles seules 45 % de la fréquence allélique des populations caucasiennes.

Les peptides présents dans une séquence peptidique et qui lient l'ensemble de ces allèles incluent les épitopes T de la majorité de la population caucasienne.

Un des moyens le plus utilisé pour définir les épitopes T CD4+ de type auxiliaire est de mesurer la capacité des peptides à faire proliférer les cellules mononucléées d'individus ayant été en contact avec l'antigène considéré.

Un certain nombre de documents proposent une sélection d'épitopes issus des protéines E6 ou E7 d'HPV16, aptes à être mis en œuvre pour la production d'un vaccin :

10 - La Demande internationale WO 00/14244 (Connaught Laboratories Ltd) préconise, pour obtenir une immunité spécifique sans entraîner de risques de transformation oncogénique, la mise en œuvre de constructions (vecteurs) dans lesquelles un certain nombre d'épitopes T dérivés à la fois d'E6 et d'E7 sont liés ensemble. De manière plus précise, les antigènes peuvent se présenter sous la forme
15 de protéines entières ou d'épitopes T. Par exemple, l'épitope T de la protéine E6 est de préférence l'épitope correspondant aux positions 29-38 de ladite protéine et les épitopes préférés de la protéine E7 sont ceux correspondant respectivement aux positions : 11-20, 49-57, 82-90, 86-93 ; l'utilisation d'une protéine E7 détoxifiée par délétion du site de liaison à la protéine Rb est également envisagée.

20 - La Demande EP 0 451 550 (Behringwerke) décrit des épitopes séroactifs et notamment des épitopes issus de la protéine E6 ou de la protéine E7 d'HPV16, ainsi qu'un vaccin contenant un ou plusieurs desdits épitopes.

- Le Brevet EP 0 561 885 (University of Queensland et CSL Ltd) décrit un vaccin à sous-unités contre le virus du papillome HPV16, qui comprend la
25 séquence DRAHYNI de la protéine E7 (positions 48-54), considérée comme induisant une réponse immunitaire significativement plus importante que d'autres épitopes.

- La Demande de Brevet 0 386 734 (Behringwerke) décrit deux régions immunogéniques dominantes dans la protéine E7 d'HPV16, correspondant respectivement aux positions 12-27 et 36-52 et leur mise en œuvre dans des réactifs de
30 détection.

- Luxton et al. ont mis en avant l'importance de l'immunité cellulaire dans le contrôle des infections génitales à HPV et ont, en conséquence, étudié la

réponse T proliférative aux infections HPV ; dans la mesure où l'immunisation de souris avec des peptides dérivés des protéines E6 et E7 d'HPV16 protègent contre une épreuve virulente constituée par des cellules cancéreuses transformées par HPV16, ils ont en particulier montré l'intérêt de la protéine E7 d'HPV16 et cherché à identifier des épitopes T dans cette protéine. Pour ce faire, ils ont réalisé des peptides synthétiques de 15 acides aminés, dont la séquence est chevauchante sur 5 acides aminés, de façon à obtenir une série de peptides représentant l'ensemble de la séquence de la protéine E7. Ils ont montré que la réponse T proliférative dépend de l'état de la patiente et que chez les individus asymptomatiques, les peptides situés dans les régions N- et C-terminale (peptides 1-34 et 70-98) induisent une réponse immunologique, alors que ce n'est pas le cas chez les patientes présentant une dysplasie cervicale. Ils ont principalement montré que le peptide E7 80-94 du génotype HPV16 fait proliférer les cellules de 6 individus sur les sept testés (*J. Gen. Virol.*, 1996, **77**, 1585) (voir Tableau II ci-après).

15 - G. Strang et al. ont défini quatre épitopes T de HPV16 dont un est présent dans E6 (*J. Gen. Virol.*, 1990, **71**, 423).

- A. Altmann et al. ont isolé des lignées de lymphocytes T spécifiques de E7 à partir de deux patientes et caractérisé les peptides reconnus (*Eur. J. Cancer*, 1992, **28**, 326). L'étude a été réalisée avec des peptides synthétiques de 14 acides aminés, dont la séquence est chevauchante sur 10 acides aminés, de façon à obtenir une série de peptides représentant l'ensemble de la séquence de la protéine E7.

20 - T. Tsukui et al. ont étudié la sécrétion en IL2 de cellules sanguines chez 140 patientes HPV16+ et ayant différents stades de lésion (*Cancer Res.*, 1996, **56**, 3967).

25 - M. Nakagawa et al. ont principalement observé que le peptide 24-45 de E6 du génotype HPV16 provoque la prolifération des cellules de 13 individus sur 63 testés (*Immunol.*, 1996, **3**, 205). Ils ont également étudié les réponses observées avec la protéine E7 et ont montré que l'on observe peu de réponse avec cette protéine.

- A.S. Kadish et al. ont étudié la réponse proliférative des cellules de patientes HPV16+ à des peptides de E6 et E7 (*Cancer Inst.*, 1997, **89**, 1285).

30 - T.D. de Gruijl et al. ont étudié la prolifération de cellules de patientes infectées par HPV et ont observé que parmi les peptides couvrant la

séquence de la protéine E7 du virus HPV16, le peptide 67-98 stimule les cellules d'une majorité de patientes (*Cancer Res.*, 1998, **58**, 1700).

L'ensemble des séquences de E6 et E7 identifiées comme épitopes T chez les patientes étudiées est illustré au Tableau II.

TABLEAU II

Documents	Peptides HPV16 (positions)	Propriétés
WO 00/14244	E6 : 29-38 E7: 11-20, 49-57, 82-90, 86-93	
EP 0 451 550	E6 : 7-37 E7: 6-26, 9-19, 7-21, 10-23, 36-52, 40-54	
EP 0 561 885	E7: 48-54, 44-54, 44-62, 44-57, 44-56, 44-60, 44-48, 38-41, 10-14, 11-14	
EP 0 375 555	E7: 45-58	
EP 0 386 734	E7 : 12-27, 12-23, 12-20, 12-19 et 36-52	
Strang et al. (14)	E6 : 42-57	Reconnu par clone restreint à DR7
Altmann et al. (15)	E7 : 5-18 E7 : 17-34 E7 : 69-82	Reconnu par lignée d'un patient DR1 DR11 Reconnu par lignée d'un patient DR4 DR13 Reconnu par clone d'un patient DR4 DR13
Tsukui et al. (17)	E6 : 1-45 E6 : 59-112 E6 : 111-158 E7 : 1-35 E7 : 27-60 E7 : 51-98	Sécrétion d'IL2 (activation des cellules) de patientes 0/140 6/140 11/140 3/140 4/140 7/140
Luxton et al. (16)	E7 : 1-14 E7 : 10-24 E7 : 20-34 E7 : 25-49 E7 : 30-44 E7 : 40-54 E7 : 45-64 E7 : 55-74 E7 : 70-98	Prolifération de cellules de patientes (CIN ou saine) 0/31 CIN et 1/15 saine 0/31 CIN et 3/15 saines 0/31 CIN et 0/15 saine 3/31 CIN 2/31 saines 0 CIN et 0 saine 2/31 CIN et 1/15 saine 2/31 CIN et 1/15 saine 4/31 CIN et 7/15 saines
Nakagawa et al. (18)	E6 : 4-29 E6 : 24-45 E6 : 109-122 E7 : 21-30 E7 : 44-57 E7 : 62-79	Prolifération de cellules de patientes (CIN ou saine) 3/22 CIN et 12/65 saines 1/22 CIN et 15/65 saines 1/22 CIN et 8/65 saines 0/22 CIN et 5/65 saines 3/22 CIN et 9/65 saines 3/22 CIN et 10/65 saines
Kadish et al. (19)	E6 : 1-31 E6 : 22-51 E6 : 42-71 E6 : 62-91 E6 : 82-111 E6 : 102-131 E6 : 122-151 E6 : 142-159 E6 : 17-31 E6 : 117-131 E6 : 137-151 E7 : 62-80 E7 : 72-97	Prolifération de cellules de patientes (CIN ou saine) 17/48 17/46 8/43 0/30 5/34 14/43 19/48 17/49 12/23 12/23 9/23 11/35 19/48
De Gruijl et al. (20)	E7 : 1-32 E7 : 19-56 E7 : 43-80 E7 : 67-98	8/28 10/28 10/28 17/28

De grandes différences sont observées entre les études, traduisant le peu de précision de cette approche. Il est en effet difficile au vu de la diversité des réponses observées de définir des séquences d'épitopes T pour l'ensemble de la population. Ces séquences ne sont adaptées qu'aux patientes ayant servi à ces travaux.

5 Ces différences de réponse s'expliquent d'une part par la représentativité des échantillons qui n'est pas évaluée. En particulier, dans les études où les patientes ne sont pas typées pour leurs molécules HLA, nul ne sait si les différents allèles sont représentés selon les fréquences de la population générale. Une réponse commune à de nombreux patients, à un peptide particulier peut alors résulter d'un biais de l'échantillonnage et
10 non de la capacité effective d'un peptide à être reconnu par l'ensemble des patients. D'autre part, dans le cas de l'infection par HPV, la persistance de l'antigène peut induire un état de tolérance immunitaire contre les épitopes T du virus, les mieux reconnus par les cellules T, comme il l'a été montré dans un modèle de souris transgénique pour la protéine E7 de HPV (T. Doan et al., *J. Virol.*, 1999, **73**, 6166). A ce
15 titre, on peut remarquer que la réponse est souvent plus faible chez les patientes ayant éliminé le virus par rapport aux patientes infectées (T. Tsukui et al., 1996 précité). Dans ce contexte, les épitopes les plus intéressants pourraient avoir disparu de la réponse immunitaire qui se maintiendrait pour des déterminants moins stimulants mais qui ne parviendrait pas à éliminer le virus.

20 Ces tests de prolifération sont donc insuffisants pour définir des séquences adaptées à l'ensemble de la population.

Ainsi, il ressort de ces différentes études que les peptides que reconnaissent les lymphocytes T auxiliaires sont difficiles à définir en raison du polymorphisme des molécules HLA II.

25 En outre, jusqu'à présent, les essais de vaccination chez la femme pour induire une immunité anti-HPV n'ont pas permis d'obtenir de résultats cliniques satisfaisants. Huit patientes atteintes de cancer du col de l'utérus ont été vaccinées par une dose de virus de la vaccine recombiné avec les gènes codant pour les protéines E6 et E7 (L.K. Borysiewicz et al., *Lancet*, 1996, **347**, 1523). Une réponse cytotoxique n'a
30 été détectée que de manière transitoire et chez une seule patiente.

Les résultats obtenus avec des peptides n'ont également pas été très concluants avec une efficacité clinique nulle. M.E. Rensing et al. (*J. Immunother.*,

2000, 23, 255) et W.J. Van Driel et al. (*Eur. J. Cancer*, 1999, 35, 946) ont utilisé une combinaison de deux peptides de HPV et d'un peptide helper universel mais non spécifique du virus. Aucune réponse cytotoxique n'a été induite. Il est probable que l'absence de réponse soit due à l'incapacité des constructions à induire à la fois la stimulation des lymphocytes T CD4+ auxiliaires spécifiques de HPV et des lymphocytes CD8+.

En conséquence, l'ensemble des peptides proposés jusqu'à présent correspond à des épitopes T, qui ne sont spécifiques que pour des individus particuliers ; en effet, il existe une variabilité interindividuelle des épitopes T, qui rend difficile le choix de molécules adaptées à une vaccination de masse contre l'HPV16 ; en conséquence, les peptides décrits ci-dessus ne sont pas adaptés à la préparation d'une composition immunogène et vaccinale, apte à stimuler les lymphocytes T CD4+ anti-HPV16 et à générer une réponse immune protectrice, quel que soit l'individu à protéger, car ils ne stimulent pas une réponse T CD4+ protectrice chez l'ensemble des sujets à traiter.

C'est pourquoi les Inventeurs se sont donnés pour but de pourvoir à un ensemble de peptides aptes à être incorporés dans une composition immunogène et à stimuler des lymphocytes T CD4+ anti-HPV, chez la majorité des individus caucasiens européens ou d'Amérique du Nord, pour induire effectivement une réponse proliférative spécifique contre des composants du virus.

Un tel ensemble a pour propriété d'être efficace chez un grand nombre de sujets, alors que les peptides de l'art antérieur sont actifs chez quelques individus et sont inactifs chez la majorité des autres individus, parce que ces derniers ne reconnaissent pas les protéines E6 et E7 d'HPV16 par les mêmes déterminants.

Pour ce faire, les Inventeurs ont sélectionné des peptides issus des protéines E6 et E7 d'un des HPV précités, notamment d'HPV16, restreints aux molécules HLA II prépondérantes dans les populations caucasiennes et ont trouvé qu'en association, les peptides sélectionnés induisent effectivement une réponse immunogène et protectrice chez un grand nombre d'individus.

La présente invention a en conséquence pour objet un mélange de peptides, issus d'une protéine E6 et/ou d'une protéine E7 d'un HPV impliqué dans le cancer du col de l'utérus ou les lésions bénignes de la peau, caractérisé en ce que

chacun des peptides inclus dans ledit mélange se lie à au moins une molécule HLA-DRB1 (1^{er} gène) dont la fréquence est supérieure à 5 % dans la population caucasienne et éventuellement à au moins une molécule HLA-DRB3, HLA-DRB4 ou HLA-DRB5 (2^{ème} gène), avec une activité de liaison < 1000 nM, de préférence < 800 nM,

5 ledit mélange de peptides liant au moins huit molécules HLA de classe II dont la fréquence est supérieure à 5 % dans la population caucasienne, codées par les allèles sélectionnés dans le groupe constitué par les allèles HLA DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*1101, DRB1*1301 et DRB1*1501 (molécules DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR13 et DR15) (1^{er} gène) et les allèles DRB3*0101,

10 DRB4*0101 et DRB5*0101 (B3, B4 et B5) (2^{ème} gène).

Un tel mélange de peptides permet d'obtenir, de manière surprenante, une réponse proliférative T CD4+ (stimulation des lymphocytes T CD4+) ainsi qu'une stimulation de la réponse CTL et ce, chez la grande majorité de la population caucasienne à protéger et quel que soit l'HPV concerné ; on peut donc considérer

15 qu'un tel mélange constitue un premier pas vers une composition immunogène « universelle », apte à être utilisée dans un vaccin.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit mélange, les peptides issus d'une protéine E6 d'HPV, sont issus d'HPV16 et sont sélectionnés dans le groupe constitué par :

- 20 (a) un peptide compris entre les positions 14 et 46, sélectionné dans le groupe constitué par le peptide correspondant aux positions 14-34 et le peptide correspondant aux positions 14-46,
- (b) le peptide correspondant aux positions 30-50,
- (c) un peptide compris entre les positions 44 et 67, sélectionné dans
- 25 le groupe constitué par le peptide correspondant aux positions 45-67 et le peptide correspondant aux positions 44-67,
- (d) le peptide correspondant aux positions 61-80,
- (e) un peptide compris entre les positions 76 et 119, sélectionné dans le groupe constitué par le peptide correspondant aux positions 76-95 et le peptide
- 30 correspondant aux positions 91-119,

(f) un peptide compris entre les positions 118-140, sélectionné dans le groupe constitué par le peptide correspondant aux positions 118-140 et le peptide correspondant aux positions 121-140,

(g) le peptide correspondant aux positions 135-158, de la protéine
5 E6 d'HPV16 et

(h) les peptides présentant une séquence en acides aminés ayant au moins 60 % d'identité ou au moins 80 % de similarité et de préférence au moins 70 % d'identité ou au moins 99 % de similarité avec les peptides définis en (a)-(g).

L'identité d'une séquence par rapport à une séquence de référence
10 s'apprécie en fonction du pourcentage de résidus d'acides aminés qui sont identiques, lorsque les deux séquences sont alignées de manière à obtenir le maximum de correspondance entre elles.

Un peptide ayant une séquence en acides aminés ayant au moins X % d'identité avec une séquence de référence comprenant Y acides aminés est défini,
15 dans la présente invention comme un peptide dont la séquence peut inclure jusqu'à Y-X' altérations pour Y acides aminés de la séquence de référence et reformulé pour une séquence de 100 acides aminés.

La similarité d'une séquence par rapport à une séquence de référence s'apprécie en fonction du pourcentage de résidus d'acides aminés qui sont identiques ou qui diffèrent par des substitutions conservatives, lorsque ces deux séquences
20 sont alignées de manière à obtenir le maximum de correspondance entre elles. Au sens de la présente invention on entend par substitution conservative, la substitution d'un acide aminé par un autre qui présente des propriétés chimiques similaires (taille, charge ou polarité), qui généralement ne modifie pas les propriétés fonctionnelles du
25 peptide.

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit mélange, les peptides issus d'une protéine E7, sont issus d'HPV16 et sont sélectionnés dans le groupe constitué par le peptide correspondant aux positions 1-20, le peptide correspondant aux positions 7-27, le peptide correspondant aux positions 65-87 et le peptide
30 correspondant aux positions 78-98 de ladite protéine E7 d'HPV16 et les peptides présentant une séquence en acides aminés ayant au moins 60 % d'identité ou au moins

80 % de similarité et de préférence au moins 70 % d'identité ou au moins 99 % de similarité avec les peptides tels que définis ci-dessus.

De manière particulièrement avantageuse, ledit mélange de peptides selon l'invention est sélectionné dans le groupe constitué par les mélanges suivants :

5 * un mélange de peptides issus de la protéine E6 d'HPV16, comprenant : le peptide correspondant aux positions 14-34 ou aux positions 14-46, le peptide correspondant aux positions 30-50 et le peptide correspondant aux positions 44-67 ou aux positions 45-67.

10 * un mélange de peptides issus de la protéine E6 d'HPV16, comprenant : le peptide correspondant aux positions 61-80, le peptide correspondant aux positions 76-95 et le peptide correspondant aux positions 91-119.

 * un mélange de peptides issus de la protéine E7 d'HPV16, comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-20 et le peptide correspondant aux positions 7-27.

15 * un mélange de peptides issus de la protéine E7 d'HPV16, comprenant : le peptide correspondant aux positions 65-87 et le peptide correspondant aux positions 78-98,

20 * et les mélanges comprenant l'un des mélanges de peptides issus de la protéine E6 d'HPV16 et l'un des mélanges issus de la protéine E7 d'HPV16, tels que définis ci-dessus.

En effet :

- le peptide E6 (14-34) se lie avec une bonne affinité aux molécules DRB1*0301, 0701 et 1501,

25 - le peptide E6 (30-50) se lie avec une bonne affinité aux molécules DRB1*0101, 0301, 0401, 1101, 1301, 1501, DRB5*0101 et DRB4*0101,

- le peptide E6 (61-80) se lie avec une bonne affinité aux molécules DRB1*0301, 1101, 1501, DRB3*0101 et DRB5*0101,

- le peptide E6 (76-95) se lie avec une bonne affinité aux molécules DRB1*0101, 1101, 1301, 1501, DRB5*0101 et DRB4*0101,

30 - le peptide E6 (91-119) se lie avec une bonne affinité aux molécules DRB1*0101, 0301, 0401, 0701, 1501 et DRB5*0101,

- le peptide E7 (1-20) se lie avec une bonne affinité aux molécules DRB1*0101, 0301, 0401, 1101, 1301, 1501, DRB5*0101 et DRB4*0101,
- le peptide E7 (7-27) se lie avec une bonne affinité aux molécules DRB1*0101, 0301, 0401, 1101, 1301, DRB3*0101, DRB5*0101 et DRB4*0101,
- 5 - le peptide E7 (60-74) se lie avec une bonne affinité aux molécules DRB1*0701 et DRB5*0101,
- le peptide E7 (65-87) se lie avec une bonne affinité aux molécules DRB1*0101, 0301, 0401, 701, 1501 et DRB3*0101,
- le peptide E7 (78-98) se lie avec une bonne affinité aux molécules
- 10 DRB1*0101, 0701, 1101, 1501, DRB5*0101 et DRB4*0101.

Les séquences de ces différents peptides sont illustrées au Tableau III ci-après.

TABLEAU III

Séquences

E6 (1-22)	MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQL
E6 (14-34)	ERPRKLPQLCTELQTTIHDI I
E6 (30-50)	IHDI ILECVYCKQQLLRREVY
E6 (45-67)	LRREVYDFAFRDLCIVYRDGNPY
E6 (61-80)	YRDGNPYAVCDKCLKFYSKI
E6 (76-95)	FYSKISEYRHYCYSLYGTTL
E6 (91-110)	YGTTLQYQYKPLCDLLIRC
E6(105-126)	DLLIRCINCQKPLCPPEEKQRHL
E6 (121-140)	EKQRHLDKKQRFHNI RGRWT
E6 (135-158)	IRGRWTGRCMSCCRSSRTRRETQL
E7 (1-20)	MHGDTPTLHEYMLDLQPETT
E7 (7-27)	TLHEYMLDLQPETTDLYCYEQ
E7 (21-40)	DLYCYEQLNDSSEEEDEIDG
E7 (35-55)	EDEIDGPAGQAEPDRAHYNIV
E7 (43-57)	GQAEPDRAHYNIVTF
E7 (60-74)	KCDSTLRRCVQSTHV
E7 (65-87)	LRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTL
E7 (78-98)	TLEDLLMGTLGIVCPICSQKP

- 15 D'autres peptides présentent des activités de liaison mais sur un nombre restreint de molécules.

La présente invention a également pour objet une composition immunogène anti-HPV, caractérisée en ce qu'elle comprend un mélange de peptides

issus d'une protéine E6 d'HPV et/ou un mélange de peptides issus d'une protéine E7 d'HPV, tels que définis ci-dessus, associés à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable et éventuellement à au moins un adjuvant.

Les adjuvants utilisés sont des adjuvants classiquement utilisés dans
5 les compositions vaccinales, tels que l'hydroxyde d'alumine et le squalène.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite composition immunogène, lesdits peptides sont soit sous forme de lipopeptides, soit incorporés dans un virus recombinant, un vecteur viral de thérapie génique (adénovirus...), soit inclus dans une protéine et notamment une protéine recombinante (Leclerc C. et al.,
10 Int. Rev. Immunol., 1994, 11, 2, 123-132 ; Janssen R. et al., Int. Rev. Immunol., 1994, 11, 2, 113-121), soit modifiés chimiquement. Dans ce dernier cas, ils comportent par exemple des modifications non naturelles comme des acides aminés D, des liaisons pseudo-peptidiques ou des modifications des extrémités C- ou N-terminales.

La partie lipidique du lipopeptide est notamment obtenue par addi-
15 tion d'un motif lipidique sur une fonction α -aminée desdits peptides ou sur une fonction réactive de la chaîne latérale d'un acide aminé de la partie peptidique ; elle peut comprendre une ou plusieurs chaînes dérivées d'acides gras en C₄₋₂₀, éventuellement ramifiées ou insaturées (acide palmitique, acide oléique, acide linoléique, acide linoléique, acide 2-amino hexadécanoïque, pimélaute, trimétauxide) ou un dérivé d'un
20 stéroïde. Le procédé de préparation de tels lipopeptides est notamment décrit dans les Demandes internationales WO 99/40113 ou WO 99/51630. La partie lipidique préférée est notamment représentée par un groupe N ^{α} -acétyl-lysine N ^{ϵ} (palmitoyl), également dénommé Ac-K(Pam).

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition
25 immunogène, ledit mélange de peptides est associé :

- à un ou plusieurs peptides ou lipopeptides contenant un ou plusieurs épitopes CD8⁺ (reconnus spécifiquement par les lymphocytes T cytotoxiques et présentés par les molécules HLA I) et plus particulièrement les épitopes CD8⁺ issus d'une protéine d'HPV, notamment d'une protéine HPV16 (Ressing et al ; van Driel et
30 al.) et/ou

- à d'autres peptides comprenant des épitopes CD4⁺ multiples, tels que le peptide de la toxine tétanique TT (positions 830-846), le peptide de

l'hémagglutinine d'*Influenza* HA (positions 307-319), PADRE (Pan DR Epitope, Alexandre J. et al., *Immunity*, 1994, 1, 9, 751-761) et le peptide LSA3 de *Plasmodium falciparum* et/ou

5 - à un ou plusieurs peptides ou lipopeptides contenant un ou plusieurs épitopes B, plus particulièrement des épitopes B issus d'une protéine d'HPV16 (Tindle et al.), reconnus spécifiquement par des anticorps dirigés contre ces derniers.

Les peptides E6 et E7 selon l'invention, inclus dans les mélanges, tels que définis ci-dessus ont été avantageusement sélectionnés à l'aide d'un test de liaison HLA-DR/peptides comprenant :

10 - la purification des molécules HLA-DR d'intérêt, c'est-à-dire celles concernant plus de 5 % d'une population donnée et notamment les molécules HLA DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR13 et DR15,

15 - l'incubation des molécules HLA-DR ainsi purifiées, avec différentes concentrations de fragments chevauchants et couvrant entièrement la séquence de la protéine E6 ou de la protéine E7 et avec un réactif R1 ou traceur constitué d'un fragment peptidique associé à un marqueur non radioactif, tel que la biotine et dont la séquence est différente desdits peptides ; le réactif R1 ou traceur est choisi de manière à ce qu'il présente une affinité vis-à-vis de l'une des molécules HLA-DR d'intérêt, telle qu'il puisse être utilisé à une concentration < 200 nM,

20 - le transfert des complexes obtenus sur une plaque de type ELISA, préalablement sensibilisée avec un anticorps spécifique de tous les HLA-DR,

25 - la révélation des complexes molécules HLA-DR/réactif R1, fixés au fond de la plaque au moyen de conjugués convenables, tels que streptavidine-phosphatase et d'un substrat fluorescent,

- la sélection des peptides comprenant des épitopes différents, c'est-à-dire les plus représentatifs des différentes zones d'interaction entre la protéine E6 ou la protéine E7 et les molécules HLA-DR et

30 - le choix des peptides les plus adaptés, en fonction de la fréquence des allèles vis-à-vis desquels ils présentent une activité de liaison < 1000 nM, de préférence < 800 nM, correspondant à la concentration de ces peptides, qui inhibe 50 % de la liaison du réactif R1 (IC₅₀).

Ces tests permettent, de manière non ambiguë, d'associer à chaque allèle du 1^{er} gène ou du 2^{ème} gène, les séquences des fragments capables de s'y lier ou au contraire qui ne s'y lient pas.

Cette démarche permet de définir des compositions immunogènes
 5 incluant des peptides qui se lient au plus grand nombre de molécules HLA-DR différentes et qui peuvent être ainsi avantageusement protectrices pour la majorité des patients, même si l'on ne connaît pas leurs molécules HLA.

Cette démarche a en outre l'avantage de permettre la sélection de peptides significativement plus spécifiques vis-à-vis de l'HPV16 que les démarches
 10 cherchant à sélectionner des peptides sur la base de leur capacité à stimuler les lymphocytes T CD4+ (tests de prolifération).

Les conditions d'incubation sont propres à chaque molécule HLA-DR (temps d'incubation, pH, réactif R1, concentration en HLA-DR ou en peptide).

Le réactif R1 est sélectionné dans le groupe constitué par les
 15 séquences suivantes :

- PKYVKQNTLKLAT (HA 306-318) (SEQ ID NO:1), spécifique des allèles DRB1*0101, DRB1*0401, DRB1*1101,
- EAEQLRAYLDGTGVE (A3 152-166) (SEQ ID NO:2), spécifique de l'allèle DRB1*1501,
- 20 • AKTIAYDEEARGLE (MT 2-16) (SEQ ID NO:3), spécifique de l'allèle DRB1*0301,
- AAYAAAKAAALAA (YKL) (SEQ ID NO:4), spécifique de l'allèle DRB1*0701,
- TERVRLVTRHIYNREE (B1 21-36) (SEQ ID NO:5), spécifique de l'allèle DRB1*1301,
- 25 • ESWGAVWRIDTPDKLTGPFT (LOL 191-210) (SEQ ID NO:6), spécifique de l'allèle DRB3*0101, et
- AGDLLAIETDKATI (E2/E168) (SEQ ID NO:7), spécifique de l'allèle DRB4*0101.

D'autres réactifs R1 peuvent être utilisés, notamment ceux décrits
 30 dans Southwood et al. (24).

En variante, ladite composition immunogène comprend avantageusement les séquences codant pour les peptides tels que définis ci-dessus.

En effet, l'utilisation d'ADN nu pour l'immunisation constitue une approche vaccinale efficace : elle consiste à injecter dans l'organisme hôte à vacciner, un ADN nu codant pour un antigène protéique ; cet ADN permet une synthèse prolongée de l'antigène par les cellules de l'hôte ainsi qu'une présentation durable de cet
5 antigène au système immunitaire.

La présente invention a également pour objet un vaccin, caractérisé en ce qu'il inclut une composition immunogène telle que définie ci-dessus.

La présente invention a également pour objet des peptides issus d'une protéine E6 d'HPV, notamment d'HPV16 et/ou d'une protéine E7 d'HPV,
10 notamment d'HPV16, caractérisés :

- en ce qu'ils contiennent un épitope CD4+, apte à avoir une activité de liaison < 1000 nm, de préférence < 800 nM vis-à-vis d'au moins une molécule HLA II (HLA-DR) prépondérante dans les populations caucasiennes (1^{er} gène et/ou 2^{ème} gène), telle que définie ci-dessus, à être reconnus par des lymphocytes T CD4+
15 spécifiques desdits peptides et à stimuler des lymphocytes T CD4+ spécifiques desdits peptides et

- en ce qu'ils sont sélectionnés dans le groupe constitué par les fragments suivants de la protéine E6 d'HPV16 : le peptide E6 (14-34 ou 14-45), le peptide E6 (30-50), le peptide E6 (61-80), le peptide E6 (76-95) et le peptide E6 (91-119) ou
20 les fragments suivants de la protéine E7 d'HPV16 : le peptide E7 (1-20), le peptide E7 (7-27), le peptide E7 (60-74), le peptide E7 (65-87) et le peptide E7 (78-98).

La présente invention a, pour objet un réactif de diagnostic, caractérisé en ce qu'il est sélectionné parmi l'un des peptides E6 et E7, tels que définis ci-dessus, lesdits peptides étant éventuellement marqués ou complexés, sous la forme de
25 complexes multimériques.

La présente invention a également pour objet un procédé d'évaluation de l'état immunitaire d'un individu, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de détection de la présence de cellules T CD4+ spécifiques des peptides E6 et/ou E7, tels que définis ci-dessus ; ladite détection est réalisée, de manière avantageuse
30 par l'un des tests suivants : test de prolifération, test ELISPOT [voir par exemple la Demande Internationale WO 99/51630 ou Gahéry-Ségard et al. (27)] ou cytométrie de

flux en présence de complexes multimériques constitués à partir desdits peptides E6 et/ou E7.

De manière plus précise :

* pour ce qui concerne le test de prolifération :

5 Une suspension de cellules (PBMC, PBMC déplétées en cellules CD8+, lymphocytes T préalablement enrichis par une étape de culture *in vitro* avec les peptides sélectionnés selon l'invention ou des lymphocytes T clonés) est cultivée pendant 3 à 5 jours en présence des peptides sélectionnés et au besoin de cellules présentatrices appropriées telles que des cellules dendritiques, des PBMC autologues
10 ou hétérologues, des cellules lymphoblastoïdes telles que celles obtenues après infection par le virus EBV ou des cellules génétiquement modifiées. La prolifération des cellules est mesurée par incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN des cellules. Les peptides sélectionnés conformément à l'invention, permettent de révéler dans la suspension initiale la présence de cellules spécifiques de ces peptides.

15 * pour ce qui concerne le test ELISPOT :

Le test ELISPOT permet de révéler la présence de cellules T spécifiques d'un peptide sélectionné conformément à l'invention et sécrétant de l'IFN- γ .

De manière plus précise, les cellules T sont révélées par mesure de la sécrétion d'IFN- γ après incubation des PMBC des patients avec les peptides sélectionnés selon l'invention, conformément à la méthode décrite dans Gahéry-Ségard et al., 2000 (27).
20

* pour ce qui concerne la mise en œuvre de complexes multimériques et notamment de complexes tétramériques :

- on met en contact un échantillon biologique, de préférence des
25 cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) avec des complexes tétramériques produits à partir de complexes multimériques constitués à partir des peptides E6 ou E7, tels que définis ci-dessus-molécule HLA de classe II, soluble et biotinylée et

- analyse des cellules marquées par cytométrie de flux.

30 De manière avantageuse, préalablement à la mise en contact de l'échantillon biologique avec ledit complexe, on l'enrichit en cellules T CD4+, en le mettant en contact avec des anticorps anti-CD4, pour enrichir ledit échantillon.

Les tétramères sont préparés, comme précisé, par exemple dans E.J. Novak et al. (J. Clin. Investig., 1999, 104, R63-R67) ou dans M.J. Kuroda et al. (J. Virol., 2000, 74, 18, 8751-8756).

Brièvement, les tétramères sont fabriqués en incubant, pendant 72
5 heures à 37°C et dans un tampon phosphate citrate 10 mM, NaCl 0,15 M à un pH compris entre 4,5 et 7, des molécules HLA II solubles et biotinylées avec un excès de 10 de peptides E6 ou E7, identifiés et sélectionnés conformément à l'invention.

La forme tétramérisée est obtenue en ajoutant à la préparation de la streptavidine marquée par un fluorochrome en quantité quatre fois moindre (mole à
10 mode) que de molécules HLA II. L'ensemble est incubé une nuit à température ambiante.

Pour utiliser ces tétramères, on met en contact une suspension de cellules (PBMC, PBMC déplétées en cellules CD8+, lymphocytes T préalablement enrichis par une étape de culture *in vitro* avec les peptides E6 ou E7 sélectionnés
15 conformément à la présente invention ou des lymphocytes T clonés) avec un ou plusieurs tétramères (10 à 20 mg/ml) pendant 1 à 3 heures. Après lavage, la suspension est analysée par cytométrie de flux : on visualise le marquage des cellules par les tétramères grâce au fait que ces constructions sont fluorescentes.

La cytométrie de flux permet de séparer les cellules marquées par les
20 tétramères des cellules non marquées et d'effectuer ainsi un tri cellulaire.

La présente invention a ainsi, en outre, pour objet une méthode de tri de lymphocytes T spécifiques de l'HPV16, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- incubation ou mise en contact, pendant 1 à 3 heures d'une suspen-
25 sion de cellules à trier avec un ou plusieurs tétramères formés à partir de complexes peptide E6et/ou E7 tel que défini ci-dessus/molécule HLA II soluble et biotinylée, et conjugués à de la streptavidine marquée par un fluorochrome,

- analyse par cytométrie de flux et

- tri des cellules marquées par les tétramères.

30 Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à

des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'au dessin annexé, dans lequel :

- la figure 1 représente la prolifération et la sécrétion d'IFN- γ des cellules d'une patiente atteinte de papulose bowénoïde et qui a résolu spontanément son infection. La patiente est DRB1*1601/1501 DRB5*0101. Le peptide E6 (45-67) est un bon ligand de DRB1*1501, le peptide E7 (7-27) est un bon ligand de DRB5*0101 (voir également Tableau VIII).

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Différentes souches d'HPV et leur pourcentage d'identité avec HPV16.

Souches	Pathologie	E6	E7
HPV18	Cancer du col	63	40
HPV31	idem	72	81
HPV33	idem	71	70
HPV45	idem	63	44
HPV58	idem	71	69
HPV30	idem	59	50
HPV34	idem	67	56
HPV35	idem	79	83
HPV39	idem	61	41
HPV40	idem	44	40
HPV42	idem	50	53
HPV43	idem	48	
HPV44	idem	47	52
HPV51	idem	67	45
HPV52	idem	69	68
HPV56	idem	63	44
HPV57	idem	48	44
HPV10	verrues	47	84
HPV3	idem	46	56
HPV4	idem	38	69

EXEMPLE 2 : Principe des tests de liaison.

- Synthèse des peptides

15

Les peptides choisis couvrent la séquence de la protéine E6 ou de la

protéine E7. Tous les peptides ont été synthétisés selon la stratégie Fmoc en synthèse parallèle sur phase solide, purifiés par HPLC et contrôlés par spectrométrie de masse (ES-MS).

. Purification des molécules HLA-DR

5 Les molécules HLA-DR sont purifiées à partir de différentes lignées EBV homozygotes par immunoaffinité. On peut notamment utiliser la méthode décrite dans Southwood et al. (24). Leur origine et les différents allèles qui les caractérisent sont décrits dans le Tableau IV.

TABLEAU IV

Lignées	Spécificités	Allèles DRB1	Autres allèles DRB
LG2 (14) HOM2	HLA-DR1	DRB1*0101	-
SCHU	HLA-DR2	DRB1*1501	DRB5*0101
MAT (14) STEILIN	HLA-DR3	DRB1*0301	DRB3*0101
BOLETH PREISS (14)	HLA-DR4	DRB1*0401	DRB4*0101
PITOUT (14)	HLA-DR7	DRB1*0701	DRB4*0101
SWEIG (14)	HLA-DR11	DRB1*1101	DRB3*0202
HHKB (17)	HLA-DR13	DRB1*1301	DRB3*0101

10

L'anticorps monomorphe spécifique des molécules HLA-DR est notamment celui décrit dans Southwood et al. (24) ou celui décrit dans Posch et al. (25). Les anticorps sont purifiés à partir de surnageants de culture sur des colonnes de Protéine A-Sépharose. Ces anticorps sont couplés sur des colonnes Sépharose 4B ou

15 Protéine A-Sépharose pour la purification des molécules HLA-DR.

. Tests de liaison HLA-DR/peptides

Les tests de liaison des peptides aux molécules HLA-DR sont des tests en compétition avec une révélation immuno-enzymatique, initialement mis au point par Hill sur la molécule HLA-DR (26). Ils sont effectués en plaques 96 puits, ce

20 qui permet d'étudier dans la même expérience de nombreux échantillons. Brièvement, les molécules HLA-DR purifiées sont incubées avec un peptide biotinylé qui sert de traceur et différentes concentrations du peptide à tester.

Après 24 à 72 heures d'incubation, les échantillons sont neutralisés, puis 100 µl de chaque échantillon sont transférés sur une plaque ELISA préalablement sensibilisée par l'anticorps monomorphique spécifique des molécules HLA-DR. Les complexes molécules HLA-DR/peptides biotinylés, fixés au fond de la plaque par l'intermédiaire de l'anticorps monomorphique spécifique des molécules HLA-DR sont révélés au moyen de conjugué streptavidine-phosphatase et d'un substrat fluorescent. L'activité de chaque peptide est caractérisée par la concentration de ce peptide qui inhibe 50% de la liaison du peptide biotinylé (IC_{50}).

Choix et optimisation des tests de liaison

10 *Choix des allèles (1^{er} gène)*

Les allèles étudiés sont tous les allèles de la population française dont la fréquence dépasse les 5% de la population.

Il s'agit des allèles DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*1101, DRB1*1301 et DRB1*1501 (Tableau I). Ils représentent à eux seuls 53 à 82% des allèles des populations caucasiennes et font partie de différentes spécificités des séries HLA-DR.

Choix des allèles (2^{ème} gène)

Les allèles étudiés sont les allèles rencontrés les plus fréquemment. Il s'agit des allèles HLA-DRB3*0101, HLA-DRB4*0101 et HLA-DRB5*0101.

20 *Spécificité des tests*

Le choix des peptides biotinylés est l'élément déterminant de la spécificité du test. La plupart des cellules utilisées possèdent deux molécules HLA-DR différentes (codées par deux allèles) qui sont toutes les deux purifiées par un anticorps monomorphique spécifique des molécules HLA-DR et toutes les deux reconnues par le même anticorps. De manière à étudier sans ambiguïté la liaison d'un peptide à l'allèle DRB1, il est nécessaire de s'assurer que le peptide biotinylé lie cet allèle et ne lie pas le produit de l'autre allèle.

Dans ce but, les peptides tels que définis comme réactifs R1 ci-dessus ont été utilisés.

30 *Conditions et sensibilité des tests*

Pour chaque molécule HLA-DRB1, la concentration en molécules du CMH II, la concentration du peptide biotinylé, le pH d'incubation et le temps

d'incubation ont été optimisés comme précisé dans le Tableau V ci-après.

TABLEAU V

Allèles	Concentration protéine (µg/ml)	Traceurs	Concentration traceur (nM)	pH optimal	Temps d'incubation (h)
DRB1*0101	0,6	HA 306-318	10	6	24
DRB1*0301	2,3	MT 2-16	50	4,5	72
DRB1*0401	1,6	HA 306-318	30	6	24
DRB1*0701	0,4	YKL	10	5	24
DRB1*1101	1,3	HA 306-318	20	5	24
DRB1*1301	0,7	B1 21-36	200	4,5	72
DRB1*1501	0,5	A3 152-166	10	4,5	24

La sensibilité de chaque test est reflétée par les IC₅₀ observées avec

- 5 les peptides non-biotinylés qui correspondent aux traceurs et les résultats obtenus sont illustrés au Tableau VI ci-après.

TABLEAU VI

Allèles	Fréquence	Peptides biotinylés	Séquences	IC ₅₀ (nM)
DRB1*0101	9,3	HA 306-318	PKYVKQNTLKLAT	31
DRB1*0401	5,6	HA 306-318	PKYVKQNTLKLAT	44
DRB1*1101	9,2	HA 306-318	PKYVKQNTLKLAT	38
DRB1*0701	14,0	YKL	AAAYAAKAAALAA	34
DRB1*0301	10,9	MT 2-16	AKTIAYDEEARRGLE	100
DRB1*1301	6,0	B1 21-36	TERVRLVTRHIYNREE	330
DRB1*1501	8,0	A3 152-166	EAEQLRRAYLDGTGVE	14
DRB5*0101	7,9	HA 306-318	PKYVKQNTLKLAT	6,5
DRB3*0101	9,2	Lol 191-210	ESWGAVWRIDTPDKLTGPFT	5
DRB4*0101	28,4	E2/E168	AGDLLAIETDKATI	2

Les fréquences indiquées sont les fréquences alléliques en France et sont représentatives de celles de la population caucasienne. Elles sont issues de Colombani (22).

Le Tableau VII ci-après illustre l'activité de liaison des peptides
5 selon l'invention, mesurée dans les conditions précisées ci-dessus.

TABLEAU VII

Activités de liaison des peptides E6 et E7 sélectionnés vis-à-vis des molécules HLA-DR prépondérantes dans la population caucasienne.

	DR1	DR3	DR4	DR7	DR11	DR13	DR15	B3	B5	B4
E6/I (1-22)	>10000	3500	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	10000	>10000	>10000
E6/2 (14-34)	3500	550	>10000	225	10000	>10000	800	1450	>10000	>10000
E6/3 (30-50)	400	1000	450	1400	800	250	75	1500	3,5	700
E6/4 (45-67)	50	>10000	2000	2330	125	>10000	225	2500	65	>10000
E6/5 (61-80)	1750	100	2500	10000	60	>10000	400	200	9,5	6500
E6/6 (76-95)	3,5	>10000	5000	3500	150	300	24	>10000	120	27
E6/7 (91-110)	30	200	90	500	2000	>10000	5,5	9500	50	6500
E6/8 (105-126)	1750	>10000	3750	>10000	5000	5000	4000	>10000	30	70
E6/9 (121-140)	125	>10000	>10000	200	350	1130	>10000	>10000	85	>10000
E6/10 (135-158)	200	>10000	17,5	10000	700	>10000	1600	>10000	10	4250
E7/I (1-20)	2500	>10000	300	>10000	1750	>10000	125	35	>10000	4
E7/II (7-27)	300	560	60	>10000	600	7500	1770	8,5	70	375
E7/III (21-40)	>10000	4600	1750	>10000	>10000	>10000	5300	>10000	>10000	>10000
E7/IV (35-55)	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
E7/V (43-57)	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	2000	>10000	2250	>10000
E7/VI (60-74)	5000	>10000	2000	900	7000	>10000	>10000	>10000	200	1950
E7/VII (65-87)	650	450	650	900	2000	>10000	470	850	2000	2000
E7/VIII (78-98)	800	>10000	2250	500	900	>10000	35	>10000	350	500

10

Les résultats sont exprimés sous forme de concentrations donnant 50 % d'inhibition du maximum de liaison. L'unité est le nM.

EXEMPLE 3 : Test de prolifération.

Pour vérifier la stimulation de la prolifération des cellules T CD4+, à l'aide d'une composition immunogène selon l'invention, un test de prolifération est réalisé *in vitro*.

5 Les cellules (PBMC), extraites du sang périphérique ont été cultivées dans des microplaques de 96 puits à raison de $2 \cdot 10^5$ cellules par puits dans un volume final de 200 μ l de milieu complet. Les cellules ont été stimulées ou non avec 10 μ g/ml d'un mélange de peptides selon l'invention. Après 5 jours de culture à 37°C, les cellules ont été incubées pendant la nuit avec 0,25 μ Ci de [3 H] thymidine
10 (Amersham, Life technology). Les cellules ont été récupérées et l'incorporation de [3 H] thymidine a été mesurée dans l'ADN cellulaire.

On observe effectivement une stimulation des cellules T CD4+.

D'autres cellules peuvent être utilisées : PBMC déplétées en cellules CD8+, lymphocytes T préalablement enrichis par une étape de culture *in vitro* avec les
15 peptides tels que définis ci-dessus ou lymphocytes clonés.

Brièvement, le protocole d'enrichissement est le suivant :

les PMBC séparées sur gradient de Ficoll sont cultivées à 37°C en présence de 0,1 à 10 mg/ml de peptides en milieu RPMI supplémenté par 10 % de sérum humain. Au 7^{ème} et 11^{ème} jour de culture, 50 unités d'IL-2 humaine recombinante sont ajoutés à la culture. Les cellules sont récoltées le 14^{ème} jour.
20

EXEMPLE 4 : ELISPOT.

L'ELISPOT permet de détecter les cellules spécifiques d'un peptide et sécrétant une cytokine donnée.

50 μ l/puits d'anticorps murin anti-IFN- γ humain dilué dans du
25 tampon PBS à une concentration de 4 μ g/ml sont incubés dans des plaques de 96 puits à fond de nitrocellulose pendant une nuit à 4°C en chambre humide.

Les puits sont lavés avec du PBS et saturés avec du milieu RPMI contenant 10 % de sérum de veau pendant 2 heures à 37°C.

Si besoin, des cellules présentatrices appropriées telles que des
30 PBMC autologues ou hétérologues, des cellules lymphoblastoïdes obtenues après infection par le virus EBV ou des cellules génétiquement modifiées sont utilisées et

sont distribuées dans les puits. Les peptides E6 ou E7, tels que définis dans l'invention sont alors ajoutés à différentes concentrations (10, 5 et 1 $\mu\text{g/ml}$).

Les cellules effectrices (PBMC, PBMC déplétées en cellules CD8+, lymphocytes T préalablement enrichis par une étape de culture *in vitro* avec les peptides E6 ou E7 ou les deux ou des lymphocytes clonés) sont ajoutées dans les plaques 96 puits à raison de 20.000 cellules/puits.

La culture est incubée pendant 24 heures à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂.

Les plaques sont ensuite lavées et incubées pendant 2 heures avec 100 μl d'un antisérum de lapin spécifique de l'IFN- γ humain.

Après lavage, un anticorps anti-IgG de lapin conjugué à de la biotine purs de la streptavidine conjuguées à de la phosphatase alcaline sont ajoutés successivement pendant 1 heure.

Finalement, la révélation des taches (spots) est effectuée grâce à un substrat chromogénique de la phosphatase alcaline. Le comptage des spots se fait au microscope. Des contrôles négatifs sont donnés par les puits ne contenant pas de peptides. Les contrôles positifs sont fournis par les puits contenant des agents mitogènes tels que l'ionomycine (500 ng/ml) et la phytohémagglutinine (PHA) (10 $\mu\text{g/ml}$).

EXEMPLE 5 : Test *in vivo*

Les mélanges de peptides tels que définis ci-dessus ont été testés *in vivo*, chez des malades ayant une papulose bowénoïde. La papulose bowénoïde est une infection cutanéomuqueuse due à HPV16, touchant les femmes jeunes ; il s'agit d'une maladie chronique et récidivante, malgré les traitements destructeurs utilisés. Cette maladie est une néoplasie vulvaire intraépithéliale de grade 3 d'emblée (VIN 3), qui a la particularité de ne pas évoluer vers un carcinome invasif.

L'infiltration importante de l'épithélium par de nombreux lymphocytes CD4+ suggère que ces cellules contribuent à contrôler le stade de la maladie et à empêcher l'invasion.

Les résultats observés sur une patiente qui a d'elle même résolu l'infection sont donnés à titre d'exemple, à la figure 1.

La réponse proliférative des cellules de 13 patientes ayant une papulose bowénoïde, vis-à-vis de ces peptides, a été étudiée.

Les peptides reconnus en prolifération par les lymphocytes T CD4+ ont été répertoriés, pour chaque malade.

Les résultats obtenus sont illustrés au Tableau VIII ci-après.

Ce Tableau montre l'intérêt des peptides sélectionnés conformément à la présente invention.

TABLEAU VIII

Patientes	1er DR	2eme DR	1er DR	2eme DR	Prolif	DR		Rappel IC50	ELISPOT	DR		Rappel IC50
						possible				possible		
GUI	1601	(?) DRB5	1501	(?) DRB5	E6/2	1501		800	E6/4	1501	225	800
						DRB5		>10000		DRB5	65	
						E6/4		225		1501	1770	
						DRB5		65		DRB5	70	
CAR	701 (?) DRB4				E6/2	701		225	E7/3	1501	5300	
						DRB4		>10000		DRB5	>10000	
						E7/2		>10000		1501	375	
						DRB4		375				
JOU	1501 (?) DRB5				E6/2	1501		800				
						DRB5		>10000				
						E6/4		225				
						DRB5		65				
						E6/5		400				
						DRB5		9,5				
						E6/10		1600				
RIZ	1501	(?) DRB5	0404 ou 0101 423		faible E6/5	1501		400				
						DRB5		9,5				
						faible E6/10		1600				
						DRB5		10				
ROU	411 (?) DRB4		701 (?) DRB4		faible							
ALB	1301 (?) DRB3		1101 (?)		ininterprétable							
LOK	1501 (?) DRB5		801		négative							
ALC	311 (?) DRB3		1501 (?)		E6/2	1501		800	E6/4	1501	800	800
						DRB5		>10000		DRB5	>10000	
						E6/4		225		1501	225	
						DRB5		65				
						E6/5		400				
						DRB5		9,5				
						E6/7		5,5				
						DRB5		50				
						E6/8		4000				
						DRB5		30				
						E7/2		1770				
						DRB5		70				
						E7/3		5300				
						DRB5		>10000				
E7/4		>10000										
DRB5		>10000										
E7/7		470										
DRB5		2000										
E7/8		35										
DRB5		350										
BRO	1101 (?) DRB3		1001		E6/2	1101		10000				
						DRB3		1450				
						E6/4		125				
BLAI	1101 (?) DRB3		701 (?) DRB4		E6/2	1101		10000				
						(?) DRB3		1450				
						701		225				
						(?) DRB4		>10000				
						E6/4		125				
						(?) DRB3		2500				
						701		2330				
(?) DRB4		>10000										

TABLEAU VIII

(suite)

Patientes	1er DR	2eme DR	1er DR	2eme DR	Prolif	DR possible	Rappel IC50	ELISPOT	DR possible	Rappel IC50
LEG	1501 (?) DRB5		801 ?		E6/2	1501	800			
						DRB5	>10000			
					E6/7	1501	5,5			
						DRB5	50			
					E7/7	1501	470			
						DRB5	2000			
CAI	701 (?) DRB4		1501 (?) DRB5		E6/2	1501	800			
						DRB5	>10000			
						701	225			
						DRB4	>10000			
					E6/4	1501	225			
						DRB5	65			
DEL	701 (?) DRB4				E6/2	701	225	E6/2	701	225
						DRB4	>10000		DRB4	>10000
					E6/4	701	2330	E6/4	701	2330
						DRB4	>10000		DRB4	>10000

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Lowy D.R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, **91**, 2436.
2. Borysiewicz L.K. et al., *Lancet*, 1996, **347**, 1523.
3. Rensing M.E. et al., *J. Immunother.*, 2000, **23**, 255.
- 5 4. Van Driel W.J. et al., *Eur. J. Cancer*, 1999, **35**, 946.
5. Ridge J.P., *Nature*, 1998, **393**, 474.
6. Schoenberger S.P. et al., *Nature*, 1998, **393**, 480.
7. Bennett S.R. et al., *Nature*, 1998, **393**, 478.
8. Toes R.E.M. et al., *Semin. Immunol.*, 1998, **10**, 443.
- 10 9. Tindle R.W. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, **88**, 5887.
10. Azoury-Ziadeh R.K. et al., *Viral. Immunol.*, 1999, **12**, 297.
11. Hohn H. et al., *J. Immunol.*, 1999, **163**, 5715.
12. Hohn H. et al., *J. Virol.*, 2000, **74**, 6632.
13. Bontkes H.J. et al., *J. Gen. Virol.*, 1999, **80**, 409.
- 15 14. Strang G. et al., *J. Gen. Virol.*, 1990, **71**, 423.
15. Altmann A. et al., *Eur. J. Cancer*, 1992, **28**, 326.
16. Luxton J.C. et al., *J. Gen. Virol.*, 1996, **77**, 1585.
17. Tsukui T. et al., *Cancer Res.*, 1996, **56**, 3967.
18. Nakagawa M. et al., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1996, **3**, 205.
- 20 19. Kadish A.S. et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1997, **89**, 1285.
20. de Gruijl T.D. et al., *Cancer Res.*, 1998, **58**, 1700.
21. Doan T. et al., *J. Virol.*, 1999, **74**, 6166.
22. Colombani J., 1993, *HLA: fonctions immunitaires et applications médicales*, Eds. John Libbey Eurotext.
- 25 23. Rensing M.E. et al., *J. Immunol.*, 1995, **154**, 5934.
24. Southwood et al., *J. Immunol.*, 1998, **160**, 3363-3373.
25. Posch et al., *Eur. J. Immunol.*, 1996, **26**, 1884.
26. Hill et al., *J. Immunol.*, 1994, **152**, 2890.
27. Gahéry-Ségard et al., *J. Virol.*, 2000, **74**, 1694.

REVENDICATIONS

1°) Mélange de peptides, issus d'une protéine E6 et/ou d'une protéine E7 d'un HPV impliqué dans le cancer du col de l'utérus ou les lésions bénignes de la peau, caractérisé en ce que chacun des peptides inclus dans ledit
5 mélange se lie à au moins une molécule HLA-DRB1(1^{er} gène), dont la fréquence est supérieure à 5 % dans la population caucasienne et éventuellement à au moins une molécule HLA-DRB3, HLA-DRB4 ou HLA-DRB5 (2^{ème} gène), avec une activité de liaison < 1000 nM, de préférence < 800 nM, ledit mélange de peptides liant au moins huit molécules HLA de classe II dont la fréquence est supérieure à 5 % dans la popu-
10 lation caucasienne, codées par les allèles sélectionnés dans le groupe constitué par les allèles HLA DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*1101, DRB1*1301 et DRB1*1501 (molécules DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR13 et DR15) (1^{er} gène) et les allèles DRB3*0101, DRB4*0101 et DRB5*0101 (B3, B4 et B5) (2^{ème} gène).

15 2°) Mélange de peptides selon la revendication 1, caractérisé en ce que les peptides issus d'une protéine E6 d'HPV, sont issus d'HPV16 et sont sélectionnés dans le groupe constitué par :

(a) un peptide compris entre les positions 14 et 46, sélectionné dans le groupe constitué par le peptide correspondant aux positions 14-34 et le peptide
20 correspondant aux positions 14-46,

(b) le peptide correspondant aux positions 30-50,

(c) un peptide compris entre les positions 44 et 67, sélectionné dans le groupe constitué par le peptide correspondant aux positions 45-67 et le peptide correspondant aux positions 44-67,

25 (d) le peptide correspondant aux positions 61-80,

(e) un peptide compris entre les positions 76 et 119, sélectionné dans le groupe constitué par le peptide correspondant aux positions 76-95 et le peptide correspondant aux positions 91-119,

(f) un peptide compris entre les positions 118-140, sélectionné dans
30 le groupe constitué par le peptide correspondant aux positions 118-140 et le peptide correspondant aux positions 121-140,

(g) le peptide correspondant aux positions 135-158, de la protéine E6 d'HPV16 et

(h) les peptides présentant une séquence en acides aminés ayant au moins 60 % d'identité ou au moins 80 % de similarité et de préférence au moins 70 % d'identité ou au moins 99 % de similarité avec les peptides définis en (a)-(g).

3°) Mélange de peptides selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que les peptides issus d'une protéine E7 sont issus d'HPV16 et sont sélectionnés dans le groupe constitué par le peptide correspondant aux positions 1-20, le peptide correspondant aux positions 7-27, le peptide correspondant aux positions 65-87 et le peptide correspondant aux positions 78-98 de ladite protéine E7 d'HPV16 et les peptides présentant une séquence en acides aminés ayant au moins 60 % d'identité ou au moins 80 % de similarité et de préférence au moins 70 % d'identité ou au moins 99 % de similarité avec les peptides tels que définis à la revendication 1 ou à la revendication 2.

4°) Mélange de peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par les mélanges suivants :

* un mélange de peptides issus de la protéine E6 d'HPV16, comprenant : le peptide correspondant aux positions 14-34 ou aux positions 14-46, le peptide correspondant aux positions 30-50 et le peptide correspondant aux positions 44-67 ou aux positions 45-67.

* un mélange de peptides issus de la protéine E6 d'HPV16, comprenant : le peptide correspondant aux positions 61-80, le peptide correspondant aux positions 76-95 et le peptide correspondant aux positions 91-119.

* un mélange de peptides issus de la protéine E7 d'HPV16, comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-20 et le peptide correspondant aux positions 7-27.

* un mélange de peptides issus de la protéine E7 d'HPV16, comprenant : le peptide correspondant aux positions 65-87 et le peptide correspondant aux positions 78-98,

* et les mélanges comprenant l'un des mélanges de peptides issus de la protéine E6 d'HPV16 et l'un des mélanges issus de la protéine E7 d'HPV16.

5°) Composition immunogène anti-HPV16, caractérisée en ce qu'elle comprend un mélange de peptides issus d'une protéine E6 d'HPV et/ou un mélange de peptides issus d'une protéine E7 d'HPV, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, associés à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable et éventuellement à au moins un adjuvant.

6°) Composition selon la revendication 5, caractérisée en ce que lesdits peptides sont soit sous forme de lipopeptides, soit incorporés dans un virus recombinant ou un vecteur viral de thérapie génique, soit inclus dans une protéine, soit modifiés chimiquement.

7°) Composition selon la revendication 5 ou la revendication 6, caractérisée en ce que ledit mélange de peptides est associé :

- à un ou plusieurs peptides ou lipopeptides contenant un ou plusieurs épitopes CD8+ et plus particulièrement les épitopes CD8+ issus d'une protéine d'HPV, notamment d'une protéine HPV16 et/ou

- à d'autres peptides comprenant des épitopes CD4+ multiples, tels que le peptide de la toxine tétanique TT (positions 830-846), le peptide de l'hémagglutinine d'*Influenza* HA (positions 307-319), PADRE et le peptide LSA3 de *Plasmodium falciparum* et/ou

- à un ou plusieurs peptides ou lipopeptides contenant un ou plusieurs épitopes B, plus particulièrement des épitopes B issus d'une protéine d'HPV16.

8°) Composition immunogène, caractérisée en ce qu'elle comprend avantageusement les séquences codant pour les peptides tels que définis aux revendications 1 à 4.

9°) Vaccin, caractérisé en ce qu'il inclut une composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 5 à 8.

10°) Peptides issus d'une protéine E6 d'HPV, notamment d'HPV16 et/ou d'une protéine E7 d'HPV, notamment d'HPV16 caractérisés :

- en ce qu'ils contiennent un épitope CD4+ apte, à avoir une activité de liaison < 1000 nm, de préférence < 800 nM vis-à-vis d'au moins une molécule HLA II (HLA-DR) prépondérante dans les populations caucasiennes (1^{er} gène et/ou 2^{ème} gène), telle que définie à la revendication 1, à être reconnus par des lymphocytes T

CD4+ spécifiques desdits peptides et à stimuler des lymphocytes T CD4+ spécifiques desdits peptides et

- en ce qu'ils sont sélectionnés dans le groupe constitué par les fragments suivants de la protéine E6 d'HPV16 : le peptide E6 (14-34 ou 14-45), le peptide E6 (30-50), le peptide E6 (61-80), le peptide E6 (76-95) et le peptide E6 (91-119) ou les fragments suivants de la protéine E7 d'HPV16 : le peptide E7 (1-20), le peptide E7 (7-27), le peptide E7 (60-74), le peptide E7 (65-87) et le peptide E7 (78-98) correspondant respectivement aux séquences SEQ ID NO:8 à 18.

11°) Réactif de diagnostic, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par les peptides tels que définis aux revendications 1 à 4 ou les peptides selon la revendication 10, lesdits peptides étant éventuellement marqués ou complexés, sous la forme de complexes multimériques.

12°) Procédé d'évaluation de l'état immunitaire d'un individu, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de détection de la présence de cellules T CD4+ spécifiques des peptides E6 et/ou E7 tels que définis aux revendications 1 à 4, à l'aide d'un test ELISPOT, d'un test de prolifération des cellules T ou d'un test mettant en œuvre des complexes multimériques.

13°) Méthode de tri de lymphocytes T spécifiques de l'HPV16, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- incubation ou mise en contact, pendant 1 à 3 heures d'une suspension de cellules à trier avec un ou plusieurs tétramères formés à partir de complexes multimériques constitués à partir des peptides E6 et/ou E7 tels que définis aux revendications 1 à 4 et 10 /molécule HLA II soluble et biotinylée, et conjugués à de la streptavidine marquée par un fluorochrome,

- analyse par cytométrie de flux et

- tri des cellules marquées par les tétramères.

1/1

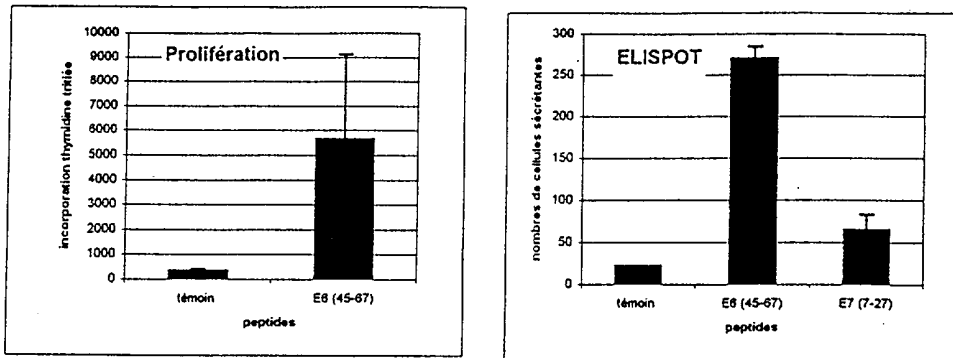


FIGURE 1

LISTE DE SEQUENCES

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
 INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE

<120> Mélange de peptides issus des protéines E6 et/ou E7 de
 papillomavirus et leurs applications

<130> 263FR68SEq

<140>

<141>

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: peptide
 HA 306-318

<400> 1

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
 1 5 10

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide A3
 152-166

<400> 2

Glu Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Asp Gly Thr Gly Val Glu
 1 5 10 15

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: peptide
 MT 2-16

<400> 3
 Ala Lys Thr Ile Ala Tyr Asp Glu Glu Ala Arg Gly Leu Glu
 1 5 10

<210> 4
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:peptide
 YKL

<400> 4
 Ala Ala Tyr Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Leu Ala Ala
 1 5 10

<210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:peptide B1
 21-36

<400> 5
 Thr Glu Arg Val Arg Leu Val Thr Arg His Ile Tyr Asn Arg Glu Glu
 1 5 10 15

<210> 6
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:peptide
 LOL 191-210

<400> 6
 Glu Ser Trp Gly Ala Val Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu Thr
 1 5 10 15

Gly Pro Phe Thr
 20

<210> 7
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide
E2/E168

<400> 7

Ala Gly Asp Leu Leu Ala Ile Glu Thr Asp Lys Ala Thr Ile
1 5 10

<210> 8

<211> 21

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide E6
14-34

<400> 8

Glu Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr
1 5 10 15

Ile His Asp Ile Ile
20

<210> 9

<211> 32

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: peptide
E6 14-45

<400> 9

Glu Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr
1 5 10 15

Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu
20 25 30

<210> 10

<211> 21

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide E6
30-50

<400> 10

Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu
 1 5 10 15

Arg Arg Glu Val Tyr
 20

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide E6
 61-80

<400> 11

Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys Phe
 1 5 10 15

Tyr Ser Lys Ile
 20

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide E6
 76-95

<400> 12

Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr
 1 5 10 15

Gly Thr Thr Leu
 20

<210> 13

<211> 29

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide E6
 91-119

<400> 13

Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu
 1 5 10 15

<210> 17
<211> 23
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide E7
65-87

<400> 17
Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
1 5 10 15

Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu
20

<210> 18
<211> 21
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide E7
78-98

<400> 18
Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile
1 5 10 15

Cys Ser Gln Lys Pro
20

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0105980 FA 606522**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 11-01-2002
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0075336 A	14-12-2000	FR 2794370 A1	08-12-2000
		AU 5229400 A	28-12-2000
		AU 5411000 A	28-12-2000
		WO 0075336 A2	14-12-2000
		WO 0075181 A1	14-12-2000
