

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-506283
(P2005-506283A)

(43) 公表日 平成17年3月3日(2005.3.3)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/155	C07K 14/155 ZNA	2G045
A61K 35/76	A61K 35/76	4B024
A61K 39/00	A61K 39/00 A	4B063
A61K 48/00	A61K 48/00	4C084
A61P 31/18	A61P 31/18	4C085
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 74 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-563186 (P2002-563186)
 (86) (22) 出願日 平成14年2月7日 (2002.2.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年8月7日 (2003.8.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2002/000471
 (87) 国際公開番号 W02002/062834
 (87) 国際公開日 平成14年8月15日 (2002.8.15)
 (31) 優先権主張番号 01/01700
 (32) 優先日 平成13年2月8日 (2001.2.8)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)
 (81) 指定国 EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), CA, IL, JP, US

(71) 出願人 500539103
 コミッサリア ア レネルジ アトミック
 COMMISSARIAT A L' EN
 ERGIE ATOMIQUE
 フランス、エフ-75015 パリ、リュ
 ド ラ フェデラシオン 31-33
 31-33, rue de la Fed
 eration, F-75015 Par
 is FRANCE

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 NE Fタンパク質起源のペプチド混合物、およびその応用

(57) 【要約】

本発明は、Nefタンパク質から生じるペプチド混合物、および（抗HIV CD4+ Tリンパ球のインビボでの生産を刺激し、その結果AIDSに対するワクチン処置に有用な免疫原組成物での）その薬剤、またはHIVに特異的なTリンパ球用の応答診断薬、特にHIV陽性患者または抗レトロウイルス治療を受けている患者の免疫状態を評価するための応用に関する。混合物中の各々の前記ペプチドは、対立遺伝子HLA DRB1*0101、DRB1*0301、DRB1*0401、DRB1*0701、DRB1*1101、DRB1*1301およびDRB1*1501(DR1、DR3、DR4、DR7、DR11、DR13およびDR15分子)からなる群から選択される対立遺伝子にてエンコードされる少なくとも3つのHLA-DR分子、ならびに対立遺伝子HLA DRB3*0101、DRB4*0101およびDRB5*0101 (B3、B4およびB5)からなる群から選択される対立遺伝子にてエンコードされる少なくとも1つのHLA-DR分子に、1000nM未満の結合能で結合し、ペプチドの該混合物は前記の全ての対立遺伝子に結合する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ペプチドの各々が、HLA対立遺伝子DRB1*0101、DRB1*0301、DRB1*0401、DRB1*0701、DRB1*1101、DRB1*1301およびDRB1*1501 (DR1、DR3、DR4、DR7、DR11、DR13およびDR15分子)からなる群から選択される対立遺伝子にてエンコードされる少なくとも3つのHLA-DR分子、ならびにHLA対立遺伝子DRB3*0101、DRB4*0101およびDRB5*0101 (B3、B4およびB5)からなる群から選択される対立遺伝子にてエンコードされる少なくとも1つのHLA-DR分子に、100 nM以下の結合活性で結合し、ペプチドの混合物が全ての前記対立遺伝子に結合していることを特徴とするHIV Nefタンパク質由来のペプチドの混合物。

【請求項2】

前記ペプチドが、何れかのHIV-1株のNefタンパク質を起源とすることを特徴とする請求項1で請求したペプチドの混合物。

【請求項3】

前記ペプチドが、Bru株(13)に関して、Nefタンパク質の1~36位に対応するペプチド、(Nef1ペプチド)、66~94位に対応するペプチド(Nef4ペプチド)、74~88位に対応するペプチド(Nef4.4ペプチド)、77~91位に対応するペプチド(Nef4.5ペプチド)、137~168位に対応するペプチド(Nef10ペプチド)、139~153位に対応するペプチド(Nef10.2ペプチド)、175~190位に対応するペプチド(Nef12ペプチド)、182~198位に対応するペプチド(Nef13ペプチド)、178~192位に対応するペプチド(Nef13.1ペプチド)、181~195位に対応するペプチド(Nef13.2ペプチド)、183~197位に対応するペプチド(Nef13.3ペプチド)、187~201位に対応するペプチド(Nef13.4ペプチド)、および189~203位に対応するペプチド(Nef13.5ペプチド)からなる群から選択されることを特徴とする請求項1または請求項2で請求したペプチドの混合物。

【請求項4】

次の混合物：

- * 66~94位に対応するペプチド(Nef4)、182~198位に対応するペプチド(Nef13)からなる混合物；
- * 66~94位に対応するペプチド(Nef4)、178~192位に対応するペプチド(Nef13.1)からなる混合物；
- * 66~94位に対応するペプチド(Nef4)、181~195位に対応するペプチド(Nef13.2)からなる混合物；
- * 74~88位に対応するペプチド(Nef4.4)、182~198位に対応するペプチド(Nef13)からなる混合物；
- * 74~88位に対応するペプチド(Nef4.4)、178~192位に対応するペプチド(Nef13.1)からなる混合物；
- * 74~88位に対応するペプチド(Nef4.4)、181~195位に対応するペプチド(Nef13.2)からなる混合物；
- * 1~36位に対応するペプチド(Nef1)、66~94位に対応するペプチド(Nef4)、および182~198位に対応するペプチド(Nef13)からなる混合物；
- * 1~36位に対応するペプチド(Nef1)、74~88位に対応するペプチド(Nef4.4)、および182~198位に対応するペプチド(Nef13)からなる混合物；
- * 1~36位に対応するペプチド(Nef1)、77~91位に対応するペプチド(Nef4.5)、および182~198位に対応するペプチド(Nef13)からなる混合物；
- * 1~36位に対応するペプチド(Nef1)、66~94位に対応するペプチド(Nef4)、および178~192位に対応するペプチド(Nef13.1)からなる混合物；
- * 1~36位に対応するペプチド(Nef1)、74~88位に対応するペプチド(Nef4.4)、および178~192位に対応するペプチド(Nef13.1)からなる混合物；
- * 1~36位に対応するペプチド(Nef1)、77~91位に対応するペプチド(Nef4.5)、および178~192位に対応するペプチド(Nef13.1)からなる混合物；
- * 1~36位に対応するペプチド(Nef1)、66~94位に対応するペプチド(Nef4)、および181~

10

20

30

40

50

び182～198位に対応するペプチド(Nef13)からなる混合物；

* 74～88位に対応するペプチド(Nef4.4)、137～168位に対応するペプチド(Nef10)、および178～192位に対応するペプチド(Nef13.1)からなる混合物；

* 74～88位に対応するペプチド(Nef4.4)、137～168位に対応するペプチド(Nef10)、および181～195位に対応するペプチド(Nef13.2)からなる混合物；

* 74～88位に対応するペプチド(Nef4.4)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および182～198位に対応するペプチド(Nef13)からなる混合物；

* 74～88位に対応するペプチド(Nef4.4)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および178～192位に対応するペプチド(Nef13.1)からなる混合物；

* 74～88位に対応するペプチド(Nef4.4)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および181～195位に対応するペプチド(Nef13.2)からなる混合物； 10

* 74～88位に対応するペプチド(Nef4.4)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および183～197位に対応するペプチド(Nef13.3)からなる混合物；

* 77～91位に対応するペプチド(Nef4.5)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および182～198位に対応するペプチド(Nef13)からなる混合物；

* 77～91位に対応するペプチド(Nef4.5)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および178～192位に対応するペプチド(Nef13.1)からなる混合物；

* 77～91位に対応するペプチド(Nef4.5)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および181～195位に対応するペプチド(Nef13.2)からなる混合物；

* 77～91位に対応するペプチド(Nef4.5)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および183～197位に対応するペプチド(Nef13.3)からなる混合物； 20

* 137～168位に対応するペプチド(Nef10)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および182～198位に対応するペプチド(Nef13)からなる混合物；

* 137～168位に対応するペプチド(Nef10)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および178～192位に対応するペプチド(Nef13.1)からなる混合物；

* 137～168位に対応するペプチド(Nef10)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および181～195位に対応するペプチド(Nef13.2)からなる混合物；

* 137～168位に対応するペプチド(Nef10)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および183～197位に対応するペプチド(Nef13.3)からなる混合物；

* 137～168位に対応するペプチド(Nef10)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および187～201位に対応するペプチド(Nef13.4)からなる混合物； 30

* 137～168位に対応するペプチド(Nef10)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および189～203位に対応するペプチド(Nef13.5)からなる混合物

からなる群から選択されることを特徴とする請求項3で請求のペプチドの混合物。

【請求項5】

少なくとも1つの医薬的に容認されうる賦形剤、および任意に少なくとも1つのアジュバントと組み合わせた請求項1～4のいずれか1つで請求した少なくとも1つのペプチドの混合物を含むことを特徴とする免疫原組成物。

【請求項6】

前記ペプチドが、リポペプチドの形態であるか、あるいは組換えウイルス、遺伝子治療のためのウイルスベクターに組み込まれているか、またはタンパク質に含まれているか、あるいは化学的に修飾されていることを特徴とする請求項5で請求の免疫原組成物。 40

【請求項7】

前記ペプチドの混合物を、：

- 1つ以上のCD8+エピトープを含む1つ以上のペプチドまたはリポペプチドと、および/または

- ペプチドが、HLA対立遺伝子DRB1*0101、DRB1*0301、DRB1*0401、DRB1*0701、DRB1*1101、DRB1*1301およびDRB1*1501 (DR1、DR3、DR4、DR7、DR11、DR13およびDR15分子)からなる群から選択される対立遺伝子にてエンコードされる少なくとも1つのHLA-DR分子に対して、あるいはHLA対立遺伝子DRB3*0101、DRB4*0101およびDRB5*0101 (B3、B4およびB5)か 50

らなる群から選択される対立遺伝子にてエンコードされる少なくとも1つのHLA-DR分子に対して、1000 nM未満の結合活性で結合するCD4+エピトープを含むその他のペプチドと、および/または、

- 複合CD4+エピトープからなるその他のペプチドと、および/または
 - 前記エピトープに対して示される抗体によって特異的に認識される1つ以上のBエピトープを含む1つ以上のペプチドを含む1つ以上のペプチドまたはリポペプチドと
- 組み合わせられることを特徴とする請求項5または請求項6で請求の免疫原組成物。

【請求項8】

CD4+エピトープを含むペプチドが、

HIV-1 Nefタンパク質の37-71位(Nef3)、113-128位(Nef7)、117-132位(Nef8)、132-147位(Nef9)および155-185位(Nef11)に対応するペプチドからなる群から選択されることを特徴とする請求項7で請求の免疫原組成物。 10

【請求項9】

有利には、請求項1~4に規定したようなペプチドをエンコードする配列を含むことを特徴とする免疫原組成物。

【請求項10】

請求項5~9のいずれか1つで請求の免疫原組成物を含むことを特徴とする抗HIVワクチン。

【請求項11】

- 白人集団で支配的である少なくとも1つのHLA II分子(HLA-DR)に関して(第一および/または第二遺伝子)、1000 nM未満の結合活性を有し、前記ペプチドに特異的なCD4+Tリンパ球にて認識されうるCD4+エピトープを含み、ならびに 20

- Bru株に関して、Nefタンパク質の次のフラグメント：

フラグメントは、Nefタンパク質の1~36位に対応するフラグメント(Nef1)、3~17位に対応するフラグメント(Nef1.1)、8~22位に対応するフラグメント(Nef1.2)、11~25位に対応するフラグメント(Nef1.3)、14~28位に対応するフラグメント(Nef1.4)、Nefタンパク質の37~71位に対応するフラグメント(Nef3)、66~94位に対応するフラグメント(Nef4)、68~82位に対応するフラグメント(Nef4.1)、74~88位に対応するフラグメント(Nef4.4)、77~91位に対応するフラグメント(Nef4.5)、79~93位に対応するフラグメント(Nef4.6)、83~97位に対応するフラグメント(Nef4.7)、113~128位に対応するフラグメント(Nef7)、117~132位に対応するフラグメント(Nef8)、132~147位に対応するフラグメント(Nef9)、137~168位に対応するフラグメント(Nef10)、137~151位に対応するフラグメント(Nef10.1)、139~153位に対応するフラグメント(Nef10.2)、141~155位に対応するフラグメント(Nef10.3)、146~160位に対応するフラグメント(Nef10.5)、155~185位に対応するフラグメント(Nef11)、175~190位に対応するフラグメント(Nef12)、182~198位に対応するフラグメント(Nef13)、178~192位に対応するフラグメント(Nef13.1)、181~195位に対応するフラグメント(Nef13.2)、183~197位に対応するフラグメント(Nef13.3)、187~201位に対応するフラグメント(Nef13.4)、189~203位に対応するフラグメント(Nef13.5)、および191~205位に対応するフラグメント(Nef13.6)である 30

からなる群から選択される

ことを特徴とするHIV Nefタンパク質由来のペプチド。 40

【請求項12】

請求項1~4のいずれか1つで請求のペプチドの混合物からなる群から選択されるか、または請求項11で請求のペプチドの1つであり、前記ペプチドが任意にラベルされるか、またはマルチマーの複合体の形態で複合化されていることを特徴とする診断薬。

【請求項13】

請求項1~4または請求項11で規定したようなNefペプチドに特異的なCD4+ T細胞の存在を、ELISPOTアッセイ、T細胞増殖アッセイまたはマルチマーの複合体を用いるアッセイを使って検出する工程を含むことを特徴とする個体の免疫状態を評価する方法。

【請求項14】

少なくとも次の工程：

- 分類すべき細胞の懸濁液を、請求項1～4または請求項11で規定したようなNefペプチド/溶解性であるビオチン化されたHLAII分子の複合体から形成され、そして蛍光色素を使ってラベルされたストレプトタビジンに共役した1つ以上の四量体に1～3時間培養または接触させ、

- フローサイトメトリーにて解析し、そして
- 四量体を使ってラベルされた細胞を分類する
を含むことを特徴とするHIV特異的Tリンパ球を分類する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、Nefタンパク質起源のペプチド混合物、および（インビボで抗HIV CD4+ Tリンパ球の生産を刺激することができ、その結果AIDSに対するワクチンとして有用な免疫原組成物での）その薬剤、またはHIV特異的Tリンパ球を診断、特に血液反応陽性の患者または抗レトロウイルス治療を受けている患者の免疫状態を評価するための試薬としての応用に関する。

CD4+ Tリンパ球は、提示細胞による抗原の分解由来であり、クラスII主要組織適合性複合体（MHCII）の分子にて提示されるペプチドフラグメントを選択的に認識させる再編成されたTレセプターを有する。これらペプチドフラグメントを持ち、Tリンパ球にて効果的に認識される決定因子を、TEピトープと称する。

【0002】

CD4+ Tリンパ球は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）の好ましい標的であると知られており、血液循環からの完全に消失するまでひどくつづくことがありうる。

結果として、HIVに感染した患者は、不幸な感染に罹り、そしてそれらと戦うための力強い免疫応答を誘導することができない。

事実、CD4+ Tリンパ球は、免疫応答を確立する上で主要な役割を有している。それらは、エフェクター細胞、いわゆる細胞毒性のCD8+ Tリンパ球および抗体-生産性Bリンパ球の補充が要求されるほとんどのサイトカインを分泌する。それらは、また、細胞接触にて細胞を活性化することを必要とし、そして、例えばCD40を介して、抗原提示樹状細胞の活性化を誘導する。

それらの主要な役割によって、その結果、CD4+ Tリンパ球の消失は、免疫系の著しい弱体化を引き起こす：特に、CD4+ Tリンパ球の消失は、HIVに対する特異的な免疫を低下させる。事実、最近の研究では、HIV成分特異的CD4+細胞（HIV-component-specific CD4+ cell）に対して特異的な増殖応答を示す人々が、あらゆる治療なしで、ウイルス感染を制御することができることを示した（1、2）。

【0003】

逆の相関関係は、P24タンパク質に関するCD4+ Tリンパ球の増殖と、ウイルス負荷との間でまさに認められる。この相関関係を、TH1型のCD4+ Tリンパ球の γ -IFNのような抗ウイルスサイトカインを分泌し、そして細胞毒性となる能力から直接得ることができる。それは、また、体液免疫、より好ましくは細胞免疫性を維持するそれらの能力から、直接得られるであろう。事実、細胞毒性CD8+ T細胞が、血液反応陽性の患者を非症候状態で維持するのにかなり寄与していることが知られている。

【0004】

抗HIV化学的療法で築かれた近年の進歩は、このウイルスに感染した患者で、正常な保護免疫を確立することができるであろうことを望ませる。事実、高活性抗レトロウイルス治療（HAART）を受けている患者で、CD4+細胞のレベルがかなり低下することが観察される（3）。CD4+ Tリンパ球の数を減少させるこのことは、CD4+ Tリンパ球の補充にとって必要な条件であるが、それは、まれに、ウイルス成分に対する増殖応答を獲得させる。事実、この応答の誘導は、ワクチンのような特殊な治療を必要とする。

CD4+ Tリンパ球の活性化は、抗原提示細胞（APC）を持つHLAII分子によるウイルスペプチドの提示の効果の下で起こる。TEピトープと称されるこれらのペプチドは、APCによるウ

10

20

30

40

50

イルス抗原のタンパク質分解様分解の結果である。それらは、一般に13~25アミノ酸の長さに変化することができ、そして、それらをHLAII分子に結合させえる配列を有する。

【0005】

ペプチド、Tエピトープが、インピトロで、天然の抗原と同様な程度に、それに対して特異的であるCD4+ Tリンパ球を刺激、またはインピボでそれらを新規補充することができることが、現在確立されている。

それゆえ、Tエピトープは、CD4+応答を誘導するに十分である。しかし、これらエピトープの使用を制限する主要な問題の1つは、それらの配列が、抗原提示細胞(APC)で発現されるヘテロダイマーであり、そしてCD4+ Tリンパ球に対して該抗原のTエピトープを提示するHLAII分子の多形現象のために、1個体からその他まで多様であることである。

10

これらの分子は、それらをT細胞に対して、抗原あたり幾つかのペプチドを提示させる大変異なった配列を有するペプチドの大きなレパートリーに結合することができる。

HLAII分子の4つの異なる型が固体あたりに存在する：2つのHLA-DR、1つのHLA-DQおよび1つのHLA-DP；鎖がDRB1遺伝子(第一遺伝子)によってエンコードされるHLA-DR分子が、最も一般的に発現される。現在、200以上の異なる対立遺伝子が、DRB1について挙げられており、その対立遺伝子は、以下の表1で要約したように様々な抗原またはタイプを定義付けている。

【0006】

【表1】

表1

20

様々なHLA-DRB1対立遺伝子にて発現される分子

抗原	対立遺伝子	Alias (界)
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

30

【0007】

各々の対立遺伝子は、それ自身の結合特性を有する；HLAII分子の幅広い特異性ならびに幾つかのイソ型および多形の存在は、各々の固体が、抗原中、一組のペプチドで、それを特徴付けるHLAII分子に依存する性質を認識することを意味する。多数のHLAII対立遺伝子が存在するため、各々の対立遺伝子に特異的な多数のTエピトープは、その結果、所定の抗原に対して存在する。

所定の集団内の対立遺伝子の分布は、同質ではない；例えば、主に白人集団に対応するフランス人集団で、DRB1遺伝子座のたった7つの対立遺伝子が、5%を超える；これらは、集団の64%を示す対立遺伝子：DRB1*0101、DRB1*0301、DRB1*0401、DRB1*0701、DRB1*101、DRB1*1301およびDRB1*1501である(4)。これら同一な対立遺伝子は、また、それ

40

50

らの頻度が、53% (スペイン) ~ 82% (デンマーク) に及ぶフランス人以外の集団、および北アメリカ (55 ~ 58%) で多数派である。

【0008】

鎖がDRB1 遺伝子にてエンコードされていないHLA-DRB3、-DRB4および-DRB5分子 (第二遺伝子) は、また、様々な白人集団で、かなりの対立遺伝子頻度 (allelic frequency) で存在する: DRB3*0101 (B3) について9.2%、DRB4*0101 (B4) について28.4%、およびDRB5*0101 (B5) について7.9%。それゆえ、それらは、それら自身で、白人集団の対立遺伝子頻度の45%をカバーする。

ペプチドは、白人集団の大多数のTエピトープを含むこれら対立遺伝子の全てに結合するペプチド配列で存在する。

10

HIVに関して:

- すでに記載したエピトープのほとんどは、HLA I 分子-制限されているものである [(5)、(6)、国際特許W0 98/50423、国際特許W0 99/27954、国際特許W0 99/40113、国際特許W0 99/51630、国際特許W0 00/75181]。それゆえ、それらはCD8+ Tリンパ球にて認識されるペプチドである。HLA I 分子 (HLA-A、-B、または-C) は、クラスII分子とは全く異なる結合特性を有する。それらは、原則的に、9アミノ酸の短いペプチドに結合し、結合モチーフは、各々の対立遺伝子に対して特異的である。HIVにとって、HLA I 分子-制限された配列は、Env、Pol、Gag、およびNefタンパク質で発現され、最後の2つは、最も一般に認識されている (7)。

【0009】

例えば、Gahery-Segardら [(11) および国際特許W0 99/27954] は、HLA I 分子-制限されたTリンパ球を含むNefタンパク質由来のペプチド (Nefタンパク質のアミノ酸66 ~ 97 (N1)、117 ~ 147 (N2)、および182 ~ 205 (N3) に各々対応するペプチド) を記載している; より正確には、前記N1、N2、およびN3のペプチドで説明したTエピトープは、次のようである。

20

【0010】

【表2】

表2

Nef タンパク質の位置	HLA I 制限
121-128、137-145、184-191 および 195-202	HLA-A1
136-145、190-198	HLA-A2
73-82、84-92	HLA-A11
90-97、182-189	HLA-B8
134-141	HLA-B27
135-143	HLA-B18

30

【0011】

抗HIVワクチンを生産するために、Gahery-Segardら (11) は、Gagタンパク質 (G1 およびG2) 由来の2つのペプチド、およびEnvタンパク質 (E) 由来のペプチドを有する前記N1、N2、およびN3のペプチドを組み合わせることを推奨している; これらペプチドの全てを、パルミトイル リシルアミド基 [(11) の表1] の付加によって、それらのC末端で修飾する。このリポペプチドワクチンの免疫原性および耐性を、血清反応陰性の有志で評価した。特異的なT応答を、T細胞増殖アッセイを用いて評価する。N1のペプチドは、ワクチン処理したドナーの5/10で、T細胞増殖を誘導し、N2ペプチドは、単一のワクチン処理したドナーでのみ増殖を誘導し、そしてN3のペプチドは、4/10のドナーで増殖を誘導する。たとえCD4+ T応答が観察されたとしても、それは、大変ランダムであり、N1、N2、

40

50

およびN3のペプチドではらついている。

- また、HLAII分子-制限されたペプチドを、記載している；これらは、Nefタンパク質に対して特異的なTクローンを使って、同定されるNefタンパク質(10)由来のペプチド配列(Tエピトープ)、より好ましくはNefペプチド13~23、46~53、44~81、69~82、180~193、および194~210((10)の表4)である；ペプチドでのばらつきは、T細胞がNefタンパク質に対して応答する基本的な方法に影響を与える。次のHLAII分子[(10)の表7]について、上記のペプチドは制限されない：

【0012】

【表3】

表3

Tクローン	認識されたペプチド	前記クローンに対するペプチドの提示を制限するHLAII
MM Nef 95.12	13-23	DRw6
MM Nef 33.6	13-23	DRw6
JB Nef 1.13	46-53	DQw7
SP Nef 29.16	69-82	DR1, DRw15(2) (=DRB1*1501)
GK Nef 6.38	180-193	DP5
JB Nef 3.2	194-210	DR1
DS Nef 59.25	44-81	DRw15(2) (=DRB1*1501)

10

20

【0013】

今まで提唱されている全てのペプチドは、Tエピトープに対応し、様々な単離物の中で保存される能力に対して選択された；しかし、それらは、特定の個体に対してのみ特異的である；事実、AIDSに対する集団ワクチンに適した分子の選抜を困難にさせるTエピトープの個体間のばらつきが存在する；結局、上記のペプチドは、保護される個体に関係なく、それらは、処理される全ての個体で、保護CD4+ T応答を刺激しないため、抗HIVCD4+ Tリンパ球を刺激および保護免疫応答を発生させることができる免疫原およびワクチン組成物を調製するのに適していない。

30

この理由のため、本発明者らは、それ自体に、免疫原組成物に組み込まれ、そしてほとんどのヨーロッパ人または北アメリカの白人個体で、抗HIV CD4+ Tリンパ球を刺激することができ、ウイルス成分に対する特異的な増殖応答を効果的に誘導するように、高活性抗レトロウイルス治療(例えばトリセラピー)との組み合わせで特に有利である一組のペプチドを提供することを目的とした。

【0014】

そのようなセットは、大多数の個体で、効果的である特性を有し、対して先行技術のペプチドは、同一の決定因子を介してNefタンパク質を認識しないために幾つかの個体で活性であり、大部分のその他の個体で不活性である。

40

これを調査するため、発明者らは、白人集団で支配的なHLAII分子に関して、制限されるHIV Nefタンパク質由来のペプチドを選択し、かつ一緒に、選択されたペプチドが、多数の個体で、免疫原および保護応答を効果的に誘導することを見出した。

【0015】

結局、本発明の対象は、前記ペプチドの各々が、HLA対立遺伝子DRB1*0101、DRB1*0301、DRB1*0401、DRB1*0701、DRB1*1101、DRB1*1301およびDRB1*1501(DR1、DR3、DR4、DR7、DR11、DR13およびDR15分子)からなる群から選択される対立遺伝子にてエンコードされる少なくとも3つのHLA-DR分子、ならびにHLA対立遺伝子DRB3*0101、DRB4*0101およびDRB5*0101(B3、B4およびB5)からなる群から選択される対立遺伝子にてエンコードされる少なくとも1つのHLA-DR分子に、1000 nM未満の結合活性で結合し、ペプチド混合物が全ての前

50

記対立遺伝子に結合していることを特徴とするHIV Nefタンパク質由来のペプチド混合物である。

そのようなペプチド混合物は、驚くことに、保護すべき白人集団の極めて大多数で、増殖型CD4+ T応答 (CD4+ Tリンパ球の刺激) および、CTL応答の刺激も得ることができる; それゆえ、そのような混合物がワクチンで使用できる「普遍的な」免疫原組成物に対する第一歩を構成すると考えることができる。

【0016】

前記混合物の有利な実施例に関して、前記ペプチドは、HIV-1株のNefタンパク質起源とする。

前記混合物のその他の有利な実施例に関して、前記ペプチドを、Bru株(13)に関して、Nefタンパク質の1~36位に対応するペプチド、(Nef1ペプチド)、66~94位に対応するペプチド(Nef4ペプチド)、74~88位に対応するペプチド(Nef4.4ペプチド)、77~91位に対応するペプチド(Nef4.5ペプチド)、137~168位に対応するペプチド(Nef10ペプチド)、139~153位に対応するペプチド(Nef10.2ペプチド)、175~190位に対応するペプチド(Nef12ペプチド)、182~198位に対応するペプチド(Nef13ペプチド)、178~192位に対応するペプチド(Nef13.1ペプチド)、181~195位に対応するペプチド(Nef13.2ペプチド)、183~197位に対応するペプチド(Nef13.3ペプチド)、187~201位に対応するペプチド(Nef13.4ペプチド)、および189~203位に対応するペプチド(Nef13.5ペプチド)からなる群から選択する。

【0017】

特に有利には、本発明による前記ペプチド混合物を、ペプチドの位置を、また、Bru株(13)のNefタンパク質の位置に関して特定される次の混合物:

- * 66~94位に対応するペプチド(Nef4)、182~198位に対応するペプチド(Nef13)からなる混合物;
- * 66~94位に対応するペプチド(Nef4)、178~192位に対応するペプチド(Nef13.1)からなる混合物;
- * 66~94位に対応するペプチド(Nef4)、181~195位に対応するペプチド(Nef13.2)からなる混合物;
- * 74~88位に対応するペプチド(Nef4.4)、182~198位に対応するペプチド(Nef13)からなる混合物;
- * 74~88位に対応するペプチド(Nef4.4)、178~192位に対応するペプチド(Nef13.1)からなる混合物;
- * 74~88位に対応するペプチド(Nef4.4)、181~195位に対応するペプチド(Nef13.2)からなる混合物;
- * 1~36位に対応するペプチド(Nef1)、66~94位に対応するペプチド(Nef4)、および182~198位に対応するペプチド(Nef13)からなる混合物;
- * 1~36位に対応するペプチド(Nef1)、74~88位に対応するペプチド(Nef4.4)、および182~198位に対応するペプチド(Nef13)からなる混合物;
- * 1~36位に対応するペプチド(Nef1)、77~91位に対応するペプチド(Nef4.5)、および182~198位に対応するペプチド(Nef13)からなる混合物;
- * 1~36位に対応するペプチド(Nef1)、66~94位に対応するペプチド(Nef4)、および178~192位に対応するペプチド(Nef13.1)からなる混合物;
- * 1~36位に対応するペプチド(Nef1)、74~88位に対応するペプチド(Nef4.4)、および178~192位に対応するペプチド(Nef13.1)からなる混合物;
- * 1~36位に対応するペプチド(Nef1)、77~91位に対応するペプチド(Nef4.5)、および178~192位に対応するペプチド(Nef13.1)からなる混合物;
- * 1~36位に対応するペプチド(Nef1)、66~94位に対応するペプチド(Nef4)、および181~195位に対応するペプチド(Nef13.2)からなる混合物;
- * 1~36位に対応するペプチド(Nef1)、74~88位に対応するペプチド(Nef4.4)、および181~195位に対応するペプチド(Nef13.2)からなる混合物;
- * 1~36位に対応するペプチド(Nef1)、77~91位に対応するペプチド(Nef4.5)、および181

- び181～195位に対応するペプチド(Nef13.2)からなる混合物；
- * 74～88位に対応するペプチド(Nef4.4)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および182～198位に対応するペプチド(Nef13)からなる混合物；
- * 74～88位に対応するペプチド(Nef4.4)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および178～192位に対応するペプチド(Nef13.1)からなる混合物；
- * 74～88位に対応するペプチド(Nef4.4)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および181～195位に対応するペプチド(Nef13.2)からなる混合物；
- * 74～88位に対応するペプチド(Nef4.4)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および183～197位に対応するペプチド(Nef13.3)からなる混合物；
- * 77～91位に対応するペプチド(Nef4.5)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および182～198位に対応するペプチド(Nef13)からなる混合物；
- * 77～91位に対応するペプチド(Nef4.5)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および178～192位に対応するペプチド(Nef13.1)からなる混合物；
- * 77～91位に対応するペプチド(Nef4.5)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および181～195位に対応するペプチド(Nef13.2)からなる混合物；
- * 77～91位に対応するペプチド(Nef4.5)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および183～197位に対応するペプチド(Nef13.3)からなる混合物；
- * 137～168位に対応するペプチド(Nef10)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および182～198位に対応するペプチド(Nef13)からなる混合物；
- * 137～168位に対応するペプチド(Nef10)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および178～192位に対応するペプチド(Nef13.1)からなる混合物；
- * 137～168位に対応するペプチド(Nef10)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および181～195位に対応するペプチド(Nef13.2)からなる混合物；
- * 137～168位に対応するペプチド(Nef10)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および183～197位に対応するペプチド(Nef13.3)からなる混合物；
- * 137～168位に対応するペプチド(Nef10)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および187～201位に対応するペプチド(Nef13.4)からなる混合物；
- * 137～168位に対応するペプチド(Nef10)、175～190位に対応するペプチド(Nef12)、および189～203位に対応するペプチド(Nef13.5)からなる混合物
- からなる群から選択することが有利である
- 特に：
- DRB1*0101、0401、0701、1101、1301および1501分子ならびにDRB5*0101分子に優れた親和性で結合するNef1、
- DRB1*0101、0401、1101および1501分子、DRB5*0101ならびにDRB4*0101分子に優れた親和性で結合するNef4、
- DRB1*0101、0401、1101および1501、DRB5*0101ならびにDRB4*0101分子に優れた親和性で結合するNef4.1、
- DRB1*0101、0401、1101および1501分子、DRB5*0101ならびにDRB4*0101分子に優れた親和性で結合するNef4.2、
- DRB1*0101、0301、0401、0701および1101、DRB5*0101ならびにDRB4*0101分子に優れた親和性で結合するNef10、
- DRB1*0101、0301、0401、0701 および1101、DRB5*0101ならびにDRB4*0101分子に優れた親和性で結合するNef10.1、
- DRB1*0701、1101および1501、DRB3*0101ならびにDRB4*0101分子に優れた親和性で結合するNef12、
- DRB1*0301、0701、1101および1301、DRB3*0101ならびにDRB5*0101分子に優れた親和性で結合するNef13、
- DRB1*0301、0701、1101および1301、DRB3*0101ならびにDRB5*0101分子に優れた親和性で結合するNef13.1、
- DRB1*0301、0701、1101および1301、DRB3*0101ならびにDRB5*0101分子に優れた親和性で

結合するNef13.2、

-DRB1*0301、0701、1101および1301、ならびにDRB5*0101分子に優れた親和性で結合するNef13.3、

-DRB1*0701、1101および1301、ならびにDRB5*0101分子に優れた親和性で結合するNef13.4

、

-DRB1*0701、1101および1301、ならびにDRB5*0101分子に優れた親和性で結合するNef13.5

。

【0018】

また、本発明の対象は、少なくとも1つの医薬的に容認されうる賦形剤、および任意に少なくとも1つのアジュバントと組み合わせた先に規定したような少なくとも1つのペプチド混合物を含むことを特徴とする抗-HIV免疫原組成物である。

使用されるアジュバントは、水酸化アルミニウムまたはスクアレンのようなワクチン組成物で従来使用されている賦形剤である。

前記免疫原組成物の有利な実施例に関して、前記ペプチドは、リポペプチドの形態であるか、あるいは組換えウイルス、遺伝子治療のためのウイルスベクター（アデノウイルス（adenovirus）など）に組み込まれているか、またはタンパク質、および特に組換えタンパク質（Leclerc C.ら、Int. Rev. Immunol., 1994, 11, 2, 123-132、Janssen R.ら、Int. Rev. Immunol., 1994, 11, 2, 113-121）に含まれているか、あるいは化学的に修飾されている。後者の場合、それらは、例えばDアミノ酸、擬似タンパク質結合物、もしくはCまたはN末端の修飾物のような非自然の修飾物を含む。

【0019】

リポペプチドの脂質成分は、特に、前記ペプチドの -アミノ酸基上に、またはペプチド成分のアミノ酸の側鎖の反応基上に脂質モチーフを付加することで得られる：それは、任意に分枝または分枝していない1つ以上のC₄₋₂₀の脂肪酸由来の鎖（パルミチン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、2-アミノヘキサデカン酸、ピメラウチド、トリメクサウチド）、またはステロイドの誘導体を含んでもよい。そのようなリポペプチドを調製する方法は、特に、国際特許W0 99/40113またはW0 99/51630で記載する。好ましい脂質成分は、N アセチル-リジンN（パルミトイル）基で表され、特に、Ac-K(Pam)とも称される。

【0020】

前記免疫原組成物のその他の有利な実施例に関して、前記ペプチド混合物を、

-（細胞毒性Tリンパ球にて特異的に認識され、そしてHLA I分子にて提示される）1つ以上のCD8+エピトープ、およびより詳しくは、HIV-1タンパク質由来のCD8+エピトープ（表2参照）を含有する1つ以上のペプチドまたはリポペプチドと、および/または

- ペプチドが、HLA対立遺伝子DRB1*0101、DRB1*0301、DRB1*0401、DRB1*0701、DRB1*1101、DRB1*1301およびDRB1*1501（DR1、DR3、DR4、DR7、DR11、DR13およびDR15分子）からなる群から選択される対立遺伝子にてエンコードされる少なくとも1つのHLA-DR分子に対して、あるいはHLA対立遺伝子DRB3*0101、DRB4*0101およびDRB5*0101（B3、B4およびB5）からなる群から選択される対立遺伝子にてエンコードされる少なくとも1つのHLA-DR分子に対して、1000nM未満の結合活性で結合するCD4+エピトープを含むHIV-1 Nefタンパク質の37-71位（Nef3）、113-128位（Nef7）、117-132位（Nef8）、132-147位（Nef9）、または155-185

40
位（Nef11）に対応するペプチドのようなその他のペプチドと、および/または、
- 破傷風毒素TT（830-846位）のペプチド、インフルエンザヘマグルチニンHAのペプチド（307-319位）、PADRE（Pan DR Epitope, Alexandre J.ら、Immunity, 1994, 1, 9, 751-761）、HIV-1 Nefペプチド45-69、およびシュードモナス熱帯マラリア（Plasmodium falciparum）のLSA3ペプチドのような複合CD4+エピトープからなるその他のペプチドと、および/または

- 1つ以上のBエピトープ、より好ましくは前記エピトープに対する抗体によって特異的に認識されるHIV-1タンパク質由来のBエピトープを含む1つ以上のペプチドまたはリポペプチドと、
組み合わせられる。

10

20

30

40

50

【0021】

前記混合物に含まれる本発明によるNefペプチドは、有利には、：

- 興味深いHLA-DR分子、つまりこれらは、所定の集団、および特にHLA、DR1、DR3、DR4、DR7、DR11、DR13およびDR15分子の5%以上を含む、を精製し、
 - そして、Nefタンパク質の配列を完全にカバーする重複するフラグメントの様々な濃度で、およびビオチンのような非放射能ラベルと結合され、配列が前記ペプチドとは異なるペプチドフラグメントからなる試薬R1またはトレーサーを使って、精製されたHLA-DR分子を培養し、そこで試薬R1またはトレーサーは、興味深いHLA-DR分子の1つに関して、親和性を発揮するように、200nM未満の濃度で使用できるように選択される、
 - 得られた複合体を、全てのHLA-DRに特異的な抗体を使ってプレコートされるELISA型プレート上に移送し、
 - ストレプトアビジン - ホスファターゼのような適切な共役体、および蛍光基質を使って、プレートの底に付着されるHLA-DR分子/試薬R1複合体を明らかにし、
 - 様々なエピトープ、すなわちNefタンパク質とHLA-DR分子との相互作用の様々な領域の最も代表的なものからなるエピトープを選択し、そして
 - それらが、試薬R1 (IC₅₀) の結合の50%を抑制するこれらペプチドの濃度に相当する1000nM未満の結合活性を発揮するのに関して、対立遺伝子の頻度の作用として最も適したペプチドを選択する
- からなるHLA-DR/ペプチド結合アッセイを用いて選択される

10

【0022】

これらアッセイは、結合できるかまたは反対に結合しないフラグメントの配列を、第1遺伝子または第2遺伝子の各々の対立遺伝子と明確に関連付けることができる。

この手法は、多数の様々なHLA-DR分子に結合し、そして有利には、例えそれらHLA分子が公知でなくとも、患者の大多数に対して保護できるペプチドを含む免疫原組成物を規定することができる。

また、この手法は、CD4+Tリンパ球を刺激するそれらの能力を基にしてペプチドを選択しようとする手法よりもHIV-1に対して著しくより特異的なペプチドを選択することができるようにする利点を有する。

培養条件は、各々のHLA-DR分子に対して特異的である（培養時間、pH、試薬R1、HLA-DRまたはペプチドの濃度）。

20

30

【0023】

試薬R1は、次の配列からなる群から選択される：

- ・ 対立遺伝子DRB1*0101、DRB1*0401およびDRB1*1101に対して特異的なPKYVKQNTLKLAT (HA 306-318) (SEQ ID NO. 1)、
 - ・ 対立遺伝子DRB1*1501に対して特異的なEAEQLRAYLDGTGVE (A3 152-166) (SEQ ID NO. 2)
 - 、
 - ・ 対立遺伝子DRB1*0301に対して特異的なAKTIAYDEEARGLE (MT 2-16) (SEQ ID NO. 3)、
 - ・ 対立遺伝子DRB1*0701に対して特異的なAAYAAKAAALAA (YKL) (SEQ ID NO. 4)、
 - ・ 対立遺伝子DRB1*1301に対して特異的なTERVRLVTRHIYNREE (B1 21-36) (SEQ ID NO. 5)
 - 、
 - ・ 対立遺伝子DRB3*0101に対して特異的なESWGAVWRIDTPDKLTGPFT (LOL 191-210) (SEQ ID NO. 6)、および
 - ・ 対立遺伝子DRB4*0101に対して特異的なAGDLLAIETDKATI (E2/E168) (SEQ ID NO. 7)。
- その他の試薬R1、特に、Southwoodら(14)で記載しているそれらを使用することができる。

40

変形として、前記免疫原組成物は、有利には、先に規定したようなペプチドをエンコードする配列を含む。

【0024】

事実、免疫化のための裸のDNAの使用は、効果的なワクチン手法を構成する；それは、タンパク質抗原をエンコードする裸のDNAをワクチン化される宿主生物に注入することから

50

なる；このDNAは、宿主細胞にて抗原の遅延合成および、免疫系に対するこの抗原の持続的提示をさせる。

また、本発明の対象は、先に規定したような免疫原組成物を含むことを特徴とするワクチンである。

また、本発明の対象は、

- 先に規定したような白人集団で支配的である少なくとも1つのHLA II分子（HLA-DR）に関して、1000 nM未満の結合活性を有し、前記ペプチドに特異的なCD4+Tリンパ球にて認識され、そして前記ペプチドに特異的なCD4+Tリンパ球を刺激しうるCD4+エプトープを含み、ならびに

- Bru株に関するNefタンパク質の次のフラグメント：

フラグメントは、Nefタンパク質の1～36位に対応するフラグメント(Nef1)、3～17位に対応するフラグメント(Nef1.1)、8～22位に対応するフラグメント(Nef1.2)、11～25位に対応するフラグメント(Nef1.3)、14～28位に対応するフラグメント(Nef1.4)、Nefタンパク質の37～71位に対応するフラグメント(Nef3)、66～94位に対応するフラグメント(Nef4)、68～82位に対応するフラグメント(Nef4.1)、74～88位に対応するフラグメント(Nef4.4)、77～91位に対応するフラグメント(Nef4.5)、79～93位に対応するフラグメント(Nef4.6)、83～97位に対応するフラグメント(Nef4.7)、113～128位に対応するフラグメント(Nef7)、117～132位に対応するフラグメント(Nef8)、132～147位に対応するフラグメント(Nef9)、137～168位に対応するフラグメント(Nef10)、137～151位に対応するフラグメント(Nef10.1)、139～153位に対応するフラグメント(Nef10.2)、141～155位に対応するフラグメント(Nef10.3)、146～160位に対応するフラグメント(Nef10.5)、155～185位に対応するフラグメント(Nef11)、175～190位に対応するフラグメント(Nef12)、182～198位に対応するフラグメント(Nef13)、178～192位に対応するフラグメント(Nef13.1)、181～195位に対応するフラグメント(Nef13.2)、183～197位に対応するフラグメント(Nef13.3)、187～201位に対応するフラグメント(Nef13.4)、189～203位に対応するフラグメント(Nef13.5)、および191～205位に対応するフラグメント(Nef13.6)である

からなる群から選択される

ことを特徴とするHIV Nefタンパク質由来のペプチドである。

【0025】

その様なペプチドは、HLA対立遺伝子DRB1*0101、DRB1*0301、DRB1*0401、DRB1*0701、DRB1*1101、DRB1*1301およびDRB1*1501(DR1、DR3、DR4、DR7、DR11、DR13およびDR15分子)にてエンコードされる少なくとも1つのHLA-DR分子、および/またはHLA対立遺伝子DRB3*0101、DRB4*0101およびDRB5*0101(B3、B4およびB5)にてエンコードされる少なくとも1つのHLA-DR分子に、1000 nM未満の結合活性で結合する利点を有している。

【0026】

より正確に、以下の表7に従って、

- Nef1.2、Nef1.3、Nef1.4、Nef3、Nef4.2、Nef4.6、Nef4.7、Nef9、Nef10.5、Nef11およびNef13.6ペプチドは、1000nM未満の結合活性で、3つ以下のHLA-DRB1分子に結合する、そして

- Nef1、Nef4、Nef4.4、Nef4.5、Nef10、Nef10.2、Nef12、Nef13、Nef13.1、Nef13.2、Nef13.3、Nef13.4およびNef13.5ペプチドは、1000nM未満の結合活性で、DRB3、DRB4またはDRB5対立遺伝子にてエンコードされる少なくとも3つのHLA-DRB1分子および少なくとも1つのHLA-DR分子に結合する。

【0027】

その様な結合活性は、前記ペプチドを使用することを可能にする：

- それらがCD4+T細胞の増殖応答を誘導し、それによって大多数の白人集団で細胞毒または体液応答を誘導するのを助ける限りにおいて、先に規定した条件下で、免疫原組成物中の混合物として。それゆえ、それらを、有利には、ワクチン組成物に組み込むことができる；

- または特に、診断薬として、好ましくは四量体の形態で、健全な個体、あるいはHIVに

10

20

30

40

50

またはAIDSに罹っている血清陽性反応の患者の免疫状態を評価するために。例えば、これら様々なペプチドによって、増殖またはELISPOTアッセイ(質的な評価)を使って、Nef特異的CD4+ T細胞の存在を検出するか、あるいは選択される(量的な評価)し、ラベルされるペプチドを使って、フローサイトメトリーによって細胞を分類することを行うことを可能にする:例えば、フローサイトメトリーによって、血球集団に関するNefタンパク質特異細胞のレベルを評価することを可能にする。

【0028】

結局、また、本発明の対象は、先に規定したようなペプチド混合物からなる群から選択されるか、または先に規定したようなペプチドの1つであり、前記ペプチドが任意にラベルされるか、またはマルチマーの複合体の形態で複合化されていることを特徴とする診断薬である。

10

好ましくは、前記診断薬は、Nef1、Nef4、Nef10、Nef12およびNef13ペプチドから得られるペプチド混合物からなる。

【0029】

また、本発明の対象は、先に規定したようなNefペプチドに特異的なCD4+ T細胞の存在を検出する工程を含むことを特徴とする個体の免疫状態を評価する方法である;有利には、前記検出を次のアッセイの1つを使って行う:増殖アッセイ、ELISPOTアッセイ[例えば、国際出願WO 99/51630またはGahery-Segardら(11)を参照]、または前記Nefペプチドから構成されるマルチマーの複合体の存在での、フローサイトメトリー。

より正確には:

20

増殖アッセイに関して:

細胞の懸濁液(PBMC、CD8+細胞を欠いたPBMC、本発明によって選択されたペプチドを使ってインビトロで培養する工程を通して前もって富化されたTリンパ球、またはクローンしたTリンパ球)を、選択されたペプチドの存在下で、樹状細胞、オートロガスまたはヘテロガスなPBMCのような適切な提示細胞、EBVウイルスを使った感染後に得られるようなリンパ芽球状の細胞、あるいは遺伝学的に修飾された細胞の要求として、3~5日間培養する。細胞の増殖を、トリチウム化されたチミジンを細胞のDNAに取り込むことで測定する。本発明に従って選択されたペプチドは、初期懸濁液中で、これらペプチドに特異的な細胞の存在を明らかにさせることができる。

【0030】

30

ELISPOTアッセイに関して:

ELISPOTアッセイは、本発明に従って選択され、 γ -IFNを分泌するペプチドに特異的なT細胞の存在を明らかにさせることができる。

さらに正確には、Gahery-Segardら、2000(11)に記載の方法に従って、T細胞を、患者からのPBMCの培養後、本発明に従って選択されるペプチドを使って γ -IFNの分泌を測定することで明らかにする。

【0031】

マルチマーの複合体および特に四量体の複合体の使用に関して:

- 生物学的なサンプル、好ましくは抹消血単核細胞(PBMC)を、先に規定したようなNefペプチドの複合体から生産された四量体の複合体 - 先に規定したような可溶性でビオチン化されたクラスIIHLA分子と接触させるようにする、そして
- ラベルされた細胞を、フローサイトメトリーにて解析する。

40

【0032】

有利には、生物学的なサンプルを前記複合体に接触させる前に、前記サンプルを富化させるために、抗CD4抗体と接触させることで、CD4+ T細胞で富化される。

四量体を、例えばE.J. Novakら(J. Clin. Investig., 1999, 104, R63-R67)またはM.J. Kurodaら(J. Virol., 2000, 74, 18, 8751-8756)で明記したように調製する。

要約すると、四量体を、溶解性でビオチン化されたHLAII分子を、10倍を越す本発明に従って同定され、そして選択されたNefペプチドと共に、0.15MのNaClを含む10mMのクエン酸リン酸塩緩衝液中で、pH4.5~7の間で、37°Cで72時間培養することで生産する。

50

【0033】

四量体化形態を、HLAII分子よりも4倍未満の量(モルに対するモル)で、蛍光色素を使ってラベルされたストレプトタビジン調製物に加えることで得る。混合物を、周温で、一晚培養する。

これらの四量体を使用するため、細胞(PBMC、CD8+細胞を欠いたPBMC、本発明によって選択されたペプチドを使ってインビトロで培養する工程を通して前もって富化されたTリンパ球、またはクローンしたTリンパ球)の上清を、1つ以上の四量体(10~20mg/ml)と1~3時間接触させる。洗浄後、上清をフローサイトメーターにて解析する：四量体を使った細胞のラベル化を、これら構築物が蛍光性であることから目視する。

【0034】

フローサイトメーターは、ラベルされていない細胞からの四量体を使ってラベルされた細胞を分離させ、そして細胞分類を行うことを可能にする。

そして、また本発明の対象は、少なくとも次の工程：

- 分類すべき細胞の懸濁液を、先に規定したようなNefペプチド/溶解性であるビオチン化されたHLAII分子の複合体から形成され、そして蛍光色素を使ってラベルされたストレプトタビジンに共役した1つ以上の四量体に1~3時間培養または接触させ、

- フローサイトメーターにて解析し、そして

- 四量体を使ってラベルされた細胞を分類する

を含むことを特徴とするHIV特異的Tリンパ球を分類する方法である。

【0035】

実施例1：結合アッセイの原理

- ペプチド合成

選択したペプチドは、Wain-Hobsonらによって公表されたBru株のNefタンパク質の配列をカバーしている。全てのペプチドを、固層上でFmocストラテジに従って平行合成で合成し、HPLCによって精製し、そしてマススペクトロメーター(ES-MS)にて検査した。

- HLA-DR分子の精製

HLA-DR分子を、様々な相同性のEBV系統(14)から免疫親和性によって精製した。使用は、特に、Southwoodら(14)で記載された方法であってもよい。それらを特徴付けるこれらの起源と、様々な対立遺伝子を、表4に記載する。

【0036】

【表4】

表4

系統	特異性	DRB1 対立遺伝子	その他のDRB対 立遺伝子
LG2 (14) HOM2	HLA-DR1	DRB1*0101	-
SCHU MAT (14) STEILIN	HLA-DR2	DRB1*1501	DRB5*0101
BOLETH PREISS (14)	HLA-DR3	DRB1*0301	DRB3*0101
PITOUT (14)	HLA-DR4	DRB1*0401	DRB4*0101
SWEIG (14)	HLA-DR7	DRB1*0701	DRB4*0101
HHKB (17)	HLA-DR11	DRB1*1101	DRB3*0202
	HLA-DR13	DRB1*1301	DRB3*0101

【0037】

HLA-DR分子に特異的な単一形態の抗体は、特に、Southwoodら(14)で記載されているか、またはPoschら(15)で記載されているものである。抗体を、タンパク質A-セファロースカラムで、培養物の上清から精製する。これらの抗体を、HLA-DR分子を精製するため、セファロース4Bまたはタンパク質A-セファロースカラムに結合させる。

【0038】

- HLA-DR/ペプチド結合アッセイ

HLA-DR分子に対するペプチドの結合についてのアッセイは、最初にHLA-DR分子上でHill(16)によって開発された免疫酵素法の新事実を使った競合アッセイである。それらを、多くのサンプルを同じ実験で研究することを可能にする96穴プレート上で行った。つまり、精製されたHLA-DR分子を、トレーサーとなるビオチン化されたペプチド、および様々な濃度の試験ペプチドを使って培養する。

10

培養24~27時間後、サンプルを中和し、そして各々100 μ lのサンプルを、HLA-DR分子に特異的な単一形態の抗体を使って保護されるELISAプレート上にトランスファーする。HLA-DR分子に特異的な単一形態の抗体を介して、プレートの底に付着されるHLA-DR分子/ビオチン化されたペプチド共役体を、ストレプトタビジン-フォスファターゼ複合体と蛍光基質によって明らかにする。各々のペプチドの活性を、ビオチン化されたペプチドの結合の50%(IC₅₀)を抑制するこのペプチドの濃度で特徴付ける。

【0039】

- 結合アッセイの選択および最適化

対立遺伝子の選択(第一遺伝子)

20

研究した対立遺伝子は、全てフランス人集団の人口の5%を超える頻度の対立遺伝子である。

それらは、対立遺伝子DRB1*0101、DRB1*0301、DRB1*0401、DRB1*0701、DRB1*1101、DRB1*1301およびDRB1*1501である(表1)。それらは、それら自身で、白人集団の対立遺伝子の53~82%を表し、HLA-DR系列の多様な特異性の部分である。

【0040】

対立遺伝子の選択(第二遺伝子)

研究した対立遺伝子は、最も一般的に出くわす対立遺伝子である。それらは、対立遺伝子HLA-DRB3*0101、HLA-DRB4*0101およびHLA-DRB5*0101である。

【0041】

30

アッセイ特異性

ビオチン化されたペプチドの選択は、アッセイの特異性を決定する因子である。使用した細胞のほとんどは、2つの異なるHLA-DR分子(2つの対立遺伝子にてエンコードされる)を有しており、両者は、HLA-DR分子に特異的な単一形態の抗体によって精製され、そして同一の抗体で認識される。DRB1対立遺伝子に対するペプチドの結合を明確に研究するため、ビオチン化されたペプチドが、この対立遺伝子に結合し、そしてその他の対立遺伝子の産物に結合しないことを確かめることが必要である。

この目的のため、先の試薬R1として規定したようなペプチドを使用した。

【0042】

アッセイ条件および感受性

40

各々のHLA-DRB1分子について、MHCII分子の濃度、ビオチン化されたペプチドの濃度、培養pHおよび培養時間を、以下の表5で明記したように最適化した。

【0043】

【表5】

表 5

対立遺伝子	タンパク質 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	トレーサー	トレーサー 濃度(nM)	最適 pH	培養時間 (時間)
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

10

【 0 0 4 4 】

【 表 6 】

表 6

対立遺伝子	頻度	ビオチン化 ペプチド	配列	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

20

30

【 0 0 4 5 】

示した頻度は、フランス人での対立遺伝子頻度であり、白人集団の人々を代表する。それらは、Colonbani (4) 由来である。

以下の表 7 は、先に明記した条件下で測定した本発明によるペプチドに対する結合活性を説明する。

40

【 0 0 4 6 】

【 表 7 】

表7

白人集団で支配的な HLA-DR 分子に関して、選択された NEF ペプチドに対する結合活性

	DR1	DR3	DR4	DR7	DR11	DR13	DR15	B3	B5	B4
Nef1 (1-36)	700	>10000	250	40	550	325	40	>10000	400	2500
Nef1.1 (3-17)	1250	>10000	700	48	1750	3000	150	>10000	>10000	>10000
Nef1.2 (8-22)	>10000	>10000	>10000	>10000	7500	700	200	>10000	>10000	>10000
Nef1.3 (11-25)	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	700	>10000	>10000	>10000	>10000
Nef1.4 (14-28)	1400	>10000	>10000	>10000	1250	750	>10000	>10000	>10000	>10000
Nef1.5 (18-32)	2750	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
Nef2 (25-39)	>10000	4250	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
Nef3 (37-71)	2500	>10000	70	3000	2000	>10000	>10000	>10000	>10000	8000
Nef4 (66-94)	55	>10000	45	5000	850	>10000	750	>10000	12	225
Nef4.1 (66-80)	1500	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
Nef4.2 (68-82)	250	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	7000	>10000	>10000	>10000
Nef4.3 (72-86)	2000	>10000	2000	>10000	4000	>10000	1930	>10000	1500	2430
Nef4.4 (74-88)	350	>10000	225	>10000	850	>10000	667	>10000	700	550
Nef4.5 (77-91)	12	>10000	60	>10000	700	>10000	1330	>10000	28	300
Nef4.6 (79-93)	55	>10000	150	>10000	2750	>10000	>10000	>10000	45	>10000
Nef4.7 (83-97)	500	>10000	>10000	>10000	7500	>10000	>10000	>10000	3250	>10000
Nef5 (86-100)	6000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	8000	>10000
Nef6 (100-114)	>10000	>10000	>10000	>10000	3000	>10000	1750	>10000	>10000	1750
Nef7 (113-128)	>10000	>10000	>10000	4000	>10000	>10000	9000	75	>10000	>10000
Nef8 (117-132)	>10000	>10000	8000	>10000	>10000	>10000	>10000	120	>10000	>10000
Nef9 (132-147)	8.5	>10000	>10000	5500	500	>10000	1500	>10000	5000	500
Nef10 (137-151)	650	175	150	65	45	>10000	1250	3500	250	55
Nef10.1 (137-151)	150	>10000	2000	650	95	>10000	>10000	>10000	4500	2200
Nef10.2 (139-153)	85	>10000	250	120	250	>10000	>10000	>10000	900	605
Nef10.3 (141-155)	850	>10000	250	250	350	>10000	>10000	>10000	1500	1030
Nef10.4 (143-157)	9000	1470	2750	2250	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	1730
Nef10.5 (146-160)	550	2500	2000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
Nef10.6 (151-165)	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	1500	>10000
Nef11 (155-185)	2000	>10000	>10000	3750	3000	>10000	50	>10000	3000	450
Nef12 (175-190)	>10000	3500	2500	700	125	>10000	13	145	>10000	275
Nef13 (182-198)	5000	55	3250	150	48	750	>10000	250	10	6330
Nef13.1 (178-192)	>10000	325	>10000	350	8	867	>10000	28	550	>10000
Nef13.2 (181-195)	>10000	73	>10000	933	18	350	>10000	60	6	>10000
Nef13.3 (183-197)	>10000	567	>10000	900	11	250	>10000	5000	15	>10000
Nef13.4 (187-201)	>10000	>10000	>10000	225	6	350	>10000	>10000	300	>10000
Nef13.5 (189-203)	>10000	1470	>10000	250	8	600	>10000	>10000	600	>10000
Nef13.6 (191-205)	>10000	700	>10000	2500	550	3000	>10000	>10000	8000	>10000

10

20

30

40

【0047】

結果を、最大結合の50%の抑制をさせる濃度の形態で表す。

単位は、nMである。

【0048】

実施例2：増殖アッセイ

本発明による免疫原組成物を使って、CD4+ T細胞増殖の刺激を変化させるため、増殖アッセイをインビトロで行う。

50

末梢血から抽出した細胞 (PBMC) を、 5×10^5 個の細胞/ウエルの割合で、最終容量 $200 \mu\text{l}$ の完全培地で、96ウエルマイクロプレートで培養した。細胞を、本発明による $20 \mu\text{g/ml}$ のペプチド混合物で刺激、または刺激しなかった。37 °C で72時間培養後、細胞を、 $0.25 \mu\text{Ci}$ の [^3H] チミジン (Amersham、Life technologie) で一晩培養した。細胞を回収し、そして [^3H] チミジンの取り込みを細胞内DNAで測定した。

CD4+ T細胞の刺激を、事実上、観察した。

その他の細胞を使用することができる：CD8+細胞が除去されたPBMC、先に規定したようなペプチドを使って、インビトロでの培養工程を介して前もって富化されたTリンパ球、またはクローンしたリンパ球。

要するに、富化工程は、次のようなである：

フィコール勾配上で分離されたPBSを、 $0.1 \sim 10\text{mg/ml}$ のペプチドの存在で、10%のヒトの血清で補充されたRPMI培地で、37 °C で培養する。培養7日目および11日目に、50ユニットの組換えヒトIL-2を培養物に加える。細胞を14日目に採取する。

10

【0049】

実施例3：ELISPOT

ELISPOTは、ペプチドに特異的な細胞を検出し、そして与えられるサイトカインをスクリーニングすることを可能にする。

PBS緩衝液で $4 \mu\text{g/ml}$ の濃度に希釈される $50 \mu\text{l}$ /ウエルのマウス抗ヒト γ -IFN抗体を、湿潤なチャンバー内で、ニトロセルロース-底を付けた96ウエルプレート中で、37 °C で一晩培養する。

20

ウエルを、PBSを使って洗浄し、そして10% n仔牛血清を含むRPMI培地に37 °C で2時間浸す。

必要であれば、オートログまたはヘテログなPBMC、EBVウイルスを使った感染後に得られるようなリンパ芽球状の細胞、あるいは遺伝学的に修飾された細胞のような適切な提示細胞を使い、ウエル内に散布する。そして、本発明で規定したようなNefペプチドを、様々な濃度 (10、5、および $1 \mu\text{g/ml}$) で加える。

エフェクター細胞 (PBMC、CD8+細胞を欠いたPBMC、本発明によって選択されたペプチドを使ってインビトロで培養する工程を介して前もって富化されたTリンパ球、またはクローンしたTリンパ球) を、20 000細胞/ウエルの割合で、96ウエルプレートに加える。

30

【0050】

培養物を、5% CO_2 を含む雰囲気内で、37 °C で24時間培養する。

そして、プレートを洗浄し、ヒト γ -IFNに特異的な $100 \mu\text{l}$ のウサギ抗血清を使って2時間培養する。

洗浄後、ビオチンに共役した抗ウサギIgG抗体と、アルカリリン酸塩に共役したストレプトタビジンを、連続して1時間加える。

最後に、スポットを、アルカリリン酸塩に対する色素基質を使って明らかにする。ネガティブコントロールを、ペプチドを含まないウエルで得る。ポジティブコントロールを、イオノマイシン (500ng/ml) およびフィトヘマグルチニン (PHA) ($10 \mu\text{g/ml}$) のような有糸分裂促進剤、例えばを含むウエルで供給する。

40

【0051】

引用文献参照

1. E.S. Rosenbergら、Science、1997、278、1447.
2. S.A. Kalamsら、J. Virol.、1999、73、6715.
3. B. Autranら、Science、1997、277、112.
4. J. Colombani, HLA: fonctions immunitaires et applications medicales [Immune functions and medical applications], John Libbey Eurotext版、1993.
5. J. Choppinら、J. Immunol.、1991、147、569.
6. J. Choppinら、J. Immunol.、1991、147、575.
7. M. Dalodら、J. Clin. Invest.、1999、104、1431.
8. J. Estaquierら、Mol. Immunol.、1992、29、489.

50

9. J.D. Ahlers⁵、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、 1997、 94、 10856.
10. P.A. Wentworth⁵、Vaccine、 1994、 12、 117.
11. H. Gahery-Segard⁵、J. Virol.、 2000、 74、 1694.
12. A. Takahashi⁵、Vaccine、 1998、 16、 1537.
13. S. Wain-Hobson⁵、Cell、 1985、 40、 9.
14. S. Southwood⁵、J. Immunol.、 1998、 160、 3363-3373.
15. P.E. Posch⁵、Eur. J. Immunol.、 1996、 26、 1884.
16. C.M. Hill⁵、J. Immunol.、 1994、 152、 2890.
17. M.P. Davenport⁵、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、 USA、 1995、 92、 6567.

【国際公開パンフレット】

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
15 août 2002 (15.08.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/062834 A2

- (51) Classification internationale des brevets² : C07K 14/16
 (21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR02/00471
 (22) Date de dépôt international : 7 février 2002 (07.02.2002)
 (25) Langue de dépôt : français
 (26) Langue de publication : français
 (30) Données relatives à la priorité : 01/01700 8 février 2001 (08.02.2001) FR
- MAILLERE, Bernard [FR/FR]; 1 Promenade Vénéria, F-78000 Versailles (FR). POUVELLE-MORATILLE, Sandra [FR/FR]; 49 rue Marcel l'Herbier, F-91700 Sainte Geneviève des Bois (FR). GUILLET, Jean-Gérard [FR/FR]; 9 bis rue Gasfray Marie, F-75009 Paris (FR). GAHERY-SEGARD, Hanne [FR/FR]; 14 rue Sarrette, F-75014 Paris (FR).
- (74) Mandataires : ORES, Béatrice etc.; CABINET ORES, 6 avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).
- (81) États désignés (national) : CA, IL, JP, US.
- (84) États désignés (régional) : brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33 rue de la Fédération, F-75015 Paris (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE-INSERM [FR/FR]; 101 rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR).
- Publiée : sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.
- (72) Inventeurs; et
 (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :

(54) Title: MIXTURE OF PEPTIDES ORIGINATING FROM A NEF PROTEIN AND APPLICATIONS THEREOF

(54) Titre : MELANGE DE PEPTIDES ISSUS D'UNE PROTEINE NEF ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention relates to a mixture of peptides originating from a Nef protein and the applications thereof as a medicine (in immunogenic compositions which stimulate the production *in vivo* of anti-HIV T CD4+ lymphocytes and are therefore useful for vaccinating against AIDS) or as a reactive diagnosis agent for T lymphocytes particular to HIV, particularly to assess the immune status of HIV-positive patients or patients undergoing anti-retroviral therapy. Each of said peptides in the mixture is linked to at least three HLA-DR molecules encoded by the alleles selected from the group comprising alleles HLA DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*1101, DRB1*1301 and DRB1*1501 (molecules DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR13 and DR15) and to at least one HLA-DR molecule encoded by the alleles selected from the group comprising alleles HLA DRB3*0101, DRB4*0101 and DRB5*0101 (B3, B4 and B5), with a binding capacity of <1000 nM, said mixture of peptides linking all of the aforementioned alleles.

(57) Abrégé : Mélange de peptides issus d'une protéine Nef ainsi que ses applications en tant que médicament (dans des compositions immunogènes, aptes à stimuler la production de lymphocytes T CD4+ anti-VIH *in vivo* et donc utiles pour la vaccination contre le SIDA) ou en tant que réactif de diagnostic de lymphocytes T spécifiques du VIH, notamment pour évaluer l'état immunitaire de patients séropositifs ou sous thérapie anti-rétrovirale. Chacun des peptides du mélange se lie à au moins trois molécules HLA-DR 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), et à au moins une molécule HLA-DR codée par les allèles sélectionnés dans le groupe constitué par les allèles HLA DRB3*0101, DRB4*0101 et DRB5*0101 (B3, B4 et B5), avec une activité de liaison <1000 nM, ledit mélange de peptides liant l'ensemble des allèles précités.

WO 02/062834 A2

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

**MELANGE DE PEPTIDES ISSUS D'UNE PROTEINE NEF ET LEURS
APPLICATIONS.**

La présente invention est relative à un mélange de peptides issus d'une protéine Nef ainsi qu'à ses applications en tant que médicament (dans des compositions immunogènes, aptes à stimuler la production de lymphocytes T CD4+ anti-VIH *in vivo* et donc utiles pour la vaccination contre le SIDA) ou en tant que réactif de diagnostic de lymphocytes T spécifiques du VIH, notamment pour évaluer l'état immunitaire de patients séropositifs ou sous thérapie anti-rétrovirale.

Les lymphocytes T CD4+ possèdent un récepteur T réarrangé qui leur permet de reconnaître sélectivement les fragments peptidiques issus de la dégradation de l'antigène par les cellules présentatrices et présentées par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II). Les déterminants que portent ces fragments peptidiques et que reconnaissent effectivement les lymphocytes T sont appelés épitopes T.

Les lymphocytes T CD4+ sont connus pour être une cible privilégiée du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et peuvent jusqu'à disparaître complètement de la circulation sanguine.

De ce fait, les patients infectés par le VIH sont victimes d'infections opportunistes et ne peuvent induire de réponses immunitaires vigoureuses pour les combattre.

Les lymphocytes T CD4+ ont en effet un rôle majeur dans l'établissement des réponses immunitaires. Ils sécrètent la plupart des cytokines nécessaires au recrutement de cellules effectrices que sont les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques et les lymphocytes B producteurs d'anticorps. Ils interviennent également dans l'activation des cellules par des contacts cellulaires et par exemple induisent l'activation par le CD40 des cellules dendritiques présentatrices de l'antigène.

De par leur rôle majeur, la disparition des lymphocytes T CD4+ entraîne donc un affaiblissement significatif du système immunitaire : en particulier, la disparition des lymphocytes T CD4+ diminue l'immunité spécifique contre le VIH. En effet, des travaux récents ont montré que des individus présentant une réponse proliférative spécifique des cellules CD4+ spécifiques de composants du VIH peuvent contrôler l'infection virale en l'absence de tout traitement (1, 2).

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

On constate même une corrélation inverse entre la prolifération de lymphocytes T CD4+ vis-à-vis de la protéine P24 et la charge virale. Il est possible que cette corrélation résulte directement de la capacité des lymphocytes T CD4+ de type TH1 à sécréter des cytokines anti-virales comme l'IFN- γ et à être cytotoxiques. Elle peut également résulter indirectement de leur capacité à maintenir une immunité humorale et plus probablement une immunité cellulaire. On sait en effet que les cellules T CD8+ cytotoxiques contribuent de manière importante au maintien des patients séropositifs dans un état non symptomatique.

Les récents progrès faits par la chimiothérapie anti-VIH permettent d'espérer qu'on pourra rétablir une immunité normale et protectrice chez les patients infectés par ce virus. On observe en effet que chez les patients sous thérapie antirétrovirale à haute efficacité (HAART ou *Highly Active Antiretroviral Therapy*), le taux de cellules CD4+ remonte considérablement (3). Cette remontée du nombre de lymphocytes T CD4+ est une condition nécessaire au recrutement de lymphocytes T CD4+ mais elle permet rarement d'obtenir une réponse proliférative contre des composants du virus. L'induction de cette réponse nécessite en effet un traitement spécifique, tel qu'un vaccin.

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

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

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

10

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.

15

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 :

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*1101, DRB1*1301 et DRB1*1501, qui représentent 64 % de la population (4). 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 %).

5 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
10 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.

Pour ce qui concerne le VIH :

15 - la plupart des épitopes déjà décrits sont restreints aux molécules HLA I [(5), (6), Demande internationale WO 98/50423, Demande internationale WO 99/27954, Demande internationale WO 99/40113, Demande internationale WO99/51630), Demande internationale WO 00/75181]. Il s'agit donc de peptides reconnus par des lymphocytes T CD8+. Les molécules HLA I (HLA-A, -B ou -C) ont
20 des caractéristiques de liaison totalement différentes des molécules de classe II. Elles lient des peptides plus courts, en principe de 9 acides aminés et les motifs de liaison sont propres à chaque allèle. Pour le VIH, les séquences restreintes aux molécules HLA I ont été trouvées dans les protéines Env, Pol, Gag et Nef, les deux dernières étant les plus fréquemment reconnues (7).

25 Par exemple, Gahéry-Ségard et al. [(11) et Demande internationale WO 99/27954] ont décrit des peptides dérivés de la protéine Nef (peptides correspondant respectivement aux acides aminés 66-97 (N1), 117-147 (N2) et 182-205 (N3) de la protéine Nef), qui comprennent des épitopes T restreints aux molécules HLA I ; de manière plus précise, les épitopes T mis en évidence dans lesdits peptides N1, N2 et N3
30 sont les suivants :

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

TABLEAU II

Positions protéine Nef	Restriction HLA I
121-128, 137-145, 184-191 et 195-202	HLA-A1
136-145,190-198	HLA-A2
73-82, 84-92	HLA-A11
90-97, 182-189	HLA-B8
134-141	HLA-B27
135-143	HLA-B18

Pour produire un vaccin anti-VIH, Gahéry-Ségard et al. (11) préconisent d'associer lesdits peptides N1, N2 et N3 à deux peptides issus de la protéine Gag (G1 et G2) et à un peptide issu de la protéine Env (E) ; tous ces peptides sont modifiés à leur extrémité C-terminale par addition d'un groupe palmitoyle-lysylamide [Tableau 1 de (11)]. L'immunogénicité et la tolérance de ce vaccin lipopeptidique ont été évaluées chez des volontaires séronégatifs. La réponse spécifique T est évaluée à l'aide d'un test de prolifération des cellules T. Le peptide N1 induit une prolifération des cellules T chez 5/10 des donneurs vaccinés, le peptide N2 induit une prolifération seulement chez un seul donneur vacciné et le peptide N3 induit une prolifération chez 4/10 donneurs. Bien que l'on observe une réponse T CD4+, elle est très aléatoire et variable avec les peptides N1, N2 et N3.

- des peptides restreints aux molécules HLA II ont également été décrits ; il s'agit de séquences peptidiques (épitopes T) issues de la protéine Nef (10) ; et plus particulièrement des peptides Nef 13-23, 46-53, 44-81, 69-82, 180-193, 194-210 (tableau 4 de 10), qui ont été identifiés à l'aide de clones T spécifiques de la protéine Nef ; la variation des peptides affecte de manière cruciale la réponse des cellules T à la protéine Nef. Les peptides précités sont restreints aux molécules HLA II suivantes [Tableau 7 de (10)] :

TABLEAU III

Clones T	Peptides reconnus	HLA II qui restreignent la présentation des peptides auxdits clones
MM Nef 95.12	13-23	DRw6
MM Nef 33.6	13-23	DRw6
JB Nef 1.13	46-53	DQw7
SP Nef 29.16	69-82	DR1, DRw15(2) (=DRB1*1501)
GK Nef 6.38	180-193	DP5
JB Nef 3.2	194-210	DR1
DS Nef 59.25	44-81	DRw15(2) (=DRB1*1501)

L'ensemble des peptides proposés jusqu'à présent correspond à des épitopes T, sélectionnés pour leur aptitude à être conservés parmi les différents isolats ; toutefois, ils 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 le SIDA ; 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-VIH et à générer une réponse immunitaire 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-VIH, chez la majorité des individus caucasiens européens ou d'Amérique du Nord, particulièrement intéressant en combinaison avec une thérapie anti-rétrovirale à haute efficacité (trithérapie, par exemple), 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 la protéine Nef par les mêmes déterminants.

Pour ce faire, les Inventeurs ont sélectionné des peptides issus de la protéine Nef de VIH, 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

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

d'individus.

La présente invention a en conséquence pour objet un mélange de peptides issus d'une protéine Nef de VIH, caractérisé en ce que chacun desdits peptides se lie à au moins trois molécules HLA-DR 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) et à au moins une molécule HLA-DR codée par les allèles sélectionnés dans le groupe constitué par les allèles HLA DRB3*0101, DRB4*0101 et DRB5*0101 (B3, B4 et B5), avec une activité de liaison < 1000 nM, ledit mélange de peptides liant l'ensemble des allèles précités.

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 ; on peut donc considérer 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, lesdits peptides sont issus de la protéine Nef de n'importe quelle souche de VIH-1.

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit mélange, lesdits peptides sont sélectionnés dans le groupe constitué par le peptide correspondant aux positions 1-36 (peptide Nef1), le peptide correspondant aux positions 66-94 (peptide Nef4), le peptide correspondant aux positions 74-88 (peptide Nef4.4), le peptide correspondant aux positions 77-91 (peptide Nef4.5), le peptide correspondant aux positions 137-168 (peptide Nef10), le peptide correspondant aux positions 139-153 (peptide Nef10.2), le peptide correspondant aux positions 175-190 (peptide Nef12), le peptide correspondant aux positions 182-198 (peptide Nef13), le peptide correspondant aux positions 178-192 (peptide Nef13.1), le peptide correspondant aux positions 181-195 (peptide Nef13.2), le peptide correspondant aux positions 183-197 (peptide Nef13.3), le peptide correspondant aux positions 187-201 (peptide Nef13.4) et le peptide correspondant aux positions 189-203 (peptide Nef13.5) de la protéine Nef, en référence à la souche Bru (13).

De manière particulièrement avantageuse, ledit mélange de peptides

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

selon l'invention est sélectionné dans le groupe constitué par les mélanges suivants, dans lesquels les positions des peptides sont également précisées en référence aux positions de la protéine Nef de la souche Bru (13) :

- 5 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).
- * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).
- * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).
- 10 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4), le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).
- * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4), le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).
- * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4), le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).
- 15 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 66-94 (Nef4) et le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).
- * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4) et le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).
- * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 77-91 (Nef4.5) et le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).
- 25 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 66-94 (Nef4) et le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).
- * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4) et le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).
- 30 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 77-91 (Nef4.5) et le peptide

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 66-94 (Nef4) et le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).

5 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4) et le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 77-91 (Nef4.5) et le peptide
10 correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10) et le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10) et le peptide
15 correspondant aux positions 182-198 (Nef13).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10) et le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).

20 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10) et le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 139-153 (Nef10.2) et le peptide
25 correspondant aux positions 182-198 (Nef13).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 139-153 (Nef10.2) et le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 139-153 (Nef10.2) et le peptide
30 correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10) et le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10) et le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10) et le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 139-153 (Nef10.2) et le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 139-153 (Nef10.2) et le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 139-153 (Nef10.2) et le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).

5 94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 183-197 (Nef13.3).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 187-201 (Nef13.4).

10 94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 189-203 (Nef13.5).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4), le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10), le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).

15 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4), le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10), le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).

20 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4), le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10), le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12), le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).

25 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12), le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).

30 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12), le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12), le peptide

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

correspondant aux positions 183-197 (Nef13.3).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 77-91 (Nef4.5), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12), le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).

5 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 77-91 (Nef4.5), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12), le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 77-91 (Nef4.5), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12), le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).

10 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 77-91 (Nef4.5), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12), le peptide correspondant aux positions 183-197 (Nef13.3).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 15 137-168 (Nef10), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).

20 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 183-197 (Nef13.3).

25 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 187-201 (Nef13.4).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 30 137-168 (Nef10), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 189-203 (Nef13.5).

En effet :

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

- Nef1 se lie avec une bonne affinité aux molécules DRB1*0101, 0401, 0701, 1101, 1301, 1501 et DRB5*0101.
- Nef4 se lie avec une bonne affinité aux molécules DRB1*0101, 0401, 1101, 1501, DRB5*0101 et DRB4*0101
- 5 - Nef 4.1 se lie avec une bonne affinité aux molécules DRB1*0101, 0401, 1101, 1501 et DRB5*0101 et DRB4*0101.
- Nef 4.2 se lie avec une bonne affinité aux molécules DRB1*0101, 0401, 1101, 1501 et DRB5*0101 et DRB4*0101
- Nef10 se lie avec une bonne affinité aux molécules DRB1*0101, 10 0301, 0401, 0701, 1101, DRB5*0101 et DRB4*0101.
- Nef 10.1 se lie avec une bonne affinité aux molécules DRB1*0101, 0301, 0401, 0701, 1101, DRB5*0101 et DRB4*0101.
- Nef12 se lie avec une bonne affinité aux molécules DRB1*0701, 1101, 1501, DRB3*0101 et DRB4*0101.
- 15 - Nef13 se lie avec une bonne affinité aux molécules DRB1*0301, 0701, 1101, 1301 et DRB3*0101 et DRB5*0101.
- Nef 13.1 se lie avec une bonne affinité aux molécules DRB1*0301, 0701, 1101, 1301 et DRB3*0101 et DRB5*0101.
- Nef 13.2 se lie avec une bonne affinité aux molécules DRB1*0301, 20 0701, 1101, 1301 et DRB3*0101 et DRB5*0101.
- Nef 13.3 se lie avec une bonne affinité aux molécules DRB1*0301, 0701, 1101, 1301 et DRB5*0101.
- Nef 13.4 se lie avec une bonne affinité aux molécules DRB1*0701, 1101, 1301 et DRB5*0101.
- 25 - Nef 13.5 se lie avec une bonne affinité aux molécules DRB1*0701, 1101, 1301 et DRB5*0101.

La présente invention a également pour objet une composition immunogène anti-VIH, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un mélange de peptides tel que défini ci-dessus, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable et éventuellement à au moins un adjuvant.

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

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

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., 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 addition 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 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^c-acétyl-lysine N^c(palmitoyl), également dénommé Ac-K(Pam).

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition 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 du VIH-1 (voir Tableau II) et/ou

- à d'autres peptides contenant un épitope CD4⁺, lesquels peptides se lient au moins à une molécule HLA-DR codée 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) ou à au moins une molécule HLA-DR codée par les allèles sélectionnés dans le groupe constitué par les allèles HLA DRB3*0101, DRB4*0101 et DRB5*0101 (B3, B4 et B5), avec une activité de liaison < 1000 nM, tels que les peptides correspondant aux positions 37-71 (Nef3), aux positions 113-128 (Nef7), aux positions 117-

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

132 (Nef8), aux positions 132-147 (Nef9), aux positions 155-185 (Nef 11) de la protéine Nef de VIH-1 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), le peptide 45-69 Nef VIH-1 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 du VIH-1, reconnus spécifiquement par des anticorps dirigés contre ces derniers.

Les peptides Nef selon l'invention, inclus dans ledit mélange ont été avantageusement sélectionnés à l'aide d'un test de liaison HLA-DR/peptides comprenant :

- 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,

- l'incubation des molécules HLA-DR ainsi purifiées, avec différentes concentrations de fragments chevauchants et couvrant entièrement la séquence de la protéine Nef 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,

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

- 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 Nef et les molécules HLA-DR et

- le choix des peptides les plus adaptés, en fonction de la fréquence des

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

allèles vis-à-vis desquels ils présentent une activité de liaison < 1000 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 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 du VIH-1 que les démarches cherchant à sélectionner des peptides sur la base de leur capacité à stimuler les lymphocytes T CD4+.

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 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,
- AKTIAYDEEARGLE (MT 2-16) (SEQ ID NO:3), spécifique de l'allèle DRB1*0301,
- AAYAAKAAALAA (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,
- 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 dans Southwood et al. (14).

En variante, ladite composition immunogène comprend avantageu-

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

sement 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 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 Nef de VIH, caractérisés :

- en ce qu'ils contiennent un épitope CD4+, apte à avoir une activité de liaison < 1000 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+ 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 Nef, en référence à la souche Bru : le fragment correspondant aux positions 1-36 de la protéine Nef (Nef1), le fragment correspondant aux positions 3-17 (Nef1.1), le fragment correspondant aux positions 8-22 (Nef1.2), le fragment correspondant aux positions 11-25 (Nef1.3), le fragment correspondant aux positions 14-28 (Nef1.4), le fragment correspondant aux positions 37-71 de la protéine Nef (Nef3), le fragment correspondant aux positions 66-94 (Nef4), le fragment correspondant aux positions 68-82 (Nef4.1), le fragment correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4), le fragment correspondant aux positions 77-91 (Nef4.5), le fragment correspondant aux positions 79-93 (Nef4.6), le fragment correspondant aux positions 83-97 (Nef4.7), le fragment correspondant aux positions 113-128 (Nef7), le fragment correspondant aux positions 117-132 (Nef8), le fragment correspondant aux positions 132-147 (Nef9), le fragment correspondant aux positions 137-168 (Nef10), le fragment correspondant aux positions 137-151 (Nef10.1), le fragment correspondant aux positions 139-153 (Nef10.2), le fragment correspondant aux positions 141-155 (Nef10.3), le fragment correspondant aux positions 146-160 (Nef10.5), le fragment correspondant aux positions 155-185 (Nef11), le fragment correspondant aux positions 175-190 (Nef12), le

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

fragment correspondant aux positions 182-198 (Nef13), le fragment correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1), le fragment correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2), le fragment correspondant aux positions 183-197 (Nef13.3), le fragment correspondant aux positions 187-201 (Nef13.4), le fragment correspondant aux positions 189-203 (Nef13.5), le fragment correspondant aux positions 191-205 (Nef13.6).

De tels peptides présentent l'avantage de se lier à au moins une molécule HLA-DR codée 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), et/ou à au moins une molécule HLA-DR codée par les allèles HLA DRB3*0101, DRB4*0101 et DRB5*0101 (B3, B4 et B5), avec une activité de liaison < 1000 nM.

De manière plus précise et conformément au Tableau VII ci-après :

- les peptides Nef1.2, Nef1.3, Nef1.4, Nef 3, Nef4.2, Nef4.6, Nef4.7, Nef 9, Nef10.5, Nef11 et Nef13.6 se lient à moins de trois molécules HLA-DRB1, avec une activité de liaison < 1000 nM et

- les peptides Nef1, Nef4, Nef4.4, Nef4.5, Nef10, Nef10.2, Nef12, Nef13, Nef13.1, Nef13.2, Nef13.3, Nef13.4, et Nef13.5, se lient à au moins trois molécules HLA-DRB1 et à au moins une molécule HLA-DR codée par un allèle DRB3, DRB4 ou DRB5, avec une activité de liaison < 1000 nM.

De telles activités de liaison permettent d'utiliser lesdits peptides :

- soit en mélange, dans les conditions définies ci-dessus, dans des compositions immunogènes, dans la mesure où ils sont aptes à induire une réponse proliférative des cellules T CD4+ et donc d'aider à induire une réponse cytotoxique ou humorale dans la majorité des populations caucasiennes. Ils peuvent donc avantageusement être incorporés dans une composition vaccinale.

- soit, séparément, en tant que réactif de diagnostic, de préférence sous la forme de tétramères, pour évaluer l'état immunitaire d'un individu sain ou de patients séropositifs pour le VIH ou atteints par le SIDA. Par exemple, grâce à ces différents peptides, il est possible de détecter la présence de cellules T CD4+ spécifiques de Nef par des tests de prolifération ou d'ELISPOT (évaluation qualitative) ou d'effectuer un tri cellulaire par cytométrie de flux, mettant en œuvre les peptides sélectionnés (évaluation quantitative) et marqués ; par exemple, par cytométrie de flux, il est possible d'évaluer le

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

taux de cellules spécifiques de la protéine Nef par rapport à la population de cellules du sang.

La présente invention a, en conséquence, également pour objet un réactif de diagnostic, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par un mélange de peptides tel que défini ci-dessus ou l'un des peptides également tels que définis ci-dessus, lesdits peptides étant éventuellement marqués ou complexés, sous la forme de complexes multimériques.

De préférence, ledit réactif de diagnostic est constitué par les mélanges de peptides obtenus à partir des peptides Nef1, Nef4, Nef10, Nef12 et Nef13.

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 Nef tels que définis ci-dessus ; ladite détection est réalisée, de manière avantageuse 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. (11)] ou cytométrie de flux en présence de complexes multimériques constitués à partir desdits peptides Nef.

De manière plus précise :

* pour ce qui concerne le test de prolifération :

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 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.

* 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

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

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 (11).

5 * 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 cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) avec des complexes tétramériques produits à partir de complexes peptide Nef tel qu défini ci-dessus-molécule HLA de classe II, telle que définie ci-dessus, soluble et biotinylée et

10 - analyse des cellules marquées par cytométrie de flux.

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 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 Nef 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 mode) que de molécules HLA II. L'ensemble est incubé une nuit à température ambiante.

25 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 Nef sélectionnés 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 30 grâce au fait que ces constructions sont fluorescentes.

La cytométrie de flux permet de séparer les cellules marquées par les

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

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 du VIH, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- 5 - 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 peptide Nef 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
- 10 - tri des cellules marquées par les tétramères.

EXEMPLE 1 : Principe des tests de liaison.

Synthèse des peptides

Les peptides choisis couvrent la séquence de la protéine Nef de la souche Bru publiée par Wain-Hobson et al. (13). Tous les peptides ont été synthétisés selon la stratégie Fmoc en synthèse parallèle sur phase solide, purifiés par HPLC et

15 contrôlés par spectrométrie de masse (ES-MS).

Purification des molécules HLA-DR

Les molécules HLA-DR sont purifiées à partir de différentes lignées EBV homozygotes (14) par immunoaffinité. On peut notamment utiliser la méthode

20 décrite dans Southwood et al. (14). 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

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

L'anticorps monomorphique spécifique des molécules HLA-DR est notamment celui décrit dans Southwood et al. (14) ou celui décrit dans Posch et al. (15). 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

5 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 (16). Ils sont effectués en plaques 96 puits, ce qui permet

10 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

15 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

20 50% de la liaison du peptide biotinylé (IC_{50}).

Choix et optimisation des tests de liaison

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

25 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.

30

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

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 monomorphe 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.

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.

15

Tableau V

Allèles	Concentration protéine ($\mu\text{g/ml}$)	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 IC_{50} observées avec les peptides non-biotinylés qui correspondent aux traceurs et les résultats obtenus sont illustrés au Tableau VI ci-après.

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

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	LoI 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

5 Colombani (4)

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

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

Tableau VII

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

	DR1	DR3	DR4	DR7	DR11	DR13	DR15	B3	B5	B4
Nef1 (1-36)	700	>10000	250	40	530	325	40	>10000	400	2500
Nef1.1 (3-17)	1250	>10000	700	48	1750	3000	150	>10000	>10000	>10000
Nef1.2 (8-22)	>10000	>10000	>10000	>10000	7500	700	200	>10000	>10000	>10000
Nef1.3 (11-25)	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	700	>10000	>10000	>10000	>10000
Nef1.4 (14-28)	1400	>10000	>10000	>10000	1250	750	>10000	>10000	>10000	>10000
Nef1.5 (18-32)	2750	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
Nef2 (25-39)	>10000	4250	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
Nef3 (37-71)	2500	>10000	70	3000	2000	>10000	>10000	>10000	>10000	8000
Nef4 (66-94)	55	>10000	45	5000	850	>10000	750	>10000	12	225
Nef4.1 (66-80)	1500	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
Nef4.2 (66-82)	250	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	7000	>10000	>10000	>10000
Nef4.3 (72-86)	2000	>10000	2000	>10000	4000	>10000	1930	>10000	1500	2430
Nef4.4 (74-88)	350	>10000	225	>10000	850	>10000	667	>10000	700	550
Nef4.5 (77-91)	12	>10000	60	>10000	700	>10000	1330	>10000	28	300
Nef4.6 (79-93)	55	>10000	150	>10000	2750	>10000	>10000	>10000	45	>10000
Nef4.7 (83-97)	500	>10000	>10000	>10000	7500	>10000	>10000	>10000	3250	>10000
Nef5 (86-100)	6000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	8000	>10000
Nef6 (100-114)	>10000	>10000	>10000	>10000	3000	>10000	1750	>10000	>10000	1750
Nef7 (113-128)	>10000	>10000	>10000	4000	>10000	>10000	9000	75	>10000	>10000
Nef8 (117-132)	>10000	>10000	8000	>10000	>10000	>10000	>10000	120	>10000	>10000
Nef9 (132-147)	8,5	>10000	>10000	5500	500	>10000	1500	>10000	8000	500
Nef10 (137-168)	650	175	150	65	45	>10000	1250	3500	250	55
Nef10.1 (137-151)	150	>10000	2000	650	95	>10000	>10000	>10000	4500	2200
Nef10.2 (139-153)	85	>10000	250	120	250	>10000	>10000	>10000	900	605
Nef10.3 (141-155)	850	>10000	250	250	350	>10000	>10000	>10000	1500	1030
Nef10.4 (143-157)	9000	1470	2750	2250	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	1730
Nef10.5 (146-160)	550	2500	2000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
Nef10.6 (151-165)	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	1500	>10000
Nef11 (155-185)	2000	>10000	>10000	3750	3000	>10000	50	>10000	3000	450
Nef12 (175-190)	>10000	3500	2500	700	125	>10000	13	145	>10000	275
Nef13 (182-198)	5000	55	3250	150	48	750	>10000	250	10	6330
Nef13.1 (178-192)	>10000	125	>10000	350	8	867	>10000	28	550	>10000
Nef13.2 (181-195)	>10000	73	>10000	913	18	350	>10000	60	6	>10000
Nef13.3 (183-197)	>10000	567	>10000	900	11	250	>10000	5000	15	>10000
Nef13.4 (187-201)	>10000	>10000	>10000	225	6	350	>10000	>10000	300	>10000
Nef13.5 (189-203)	>10000	1470	>10000	250	8	600	>10000	>10000	600	>10000
Nef13.6 (191-205)	>10000	700	>10000	2500	550	3000	>10000	>10000	8000	>10000

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

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

EXEMPLE 2 : 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*.

Les cellules (PBMC), extraites du sang périphérique ont été cultivées dans des microplaques de 96 puits à raison de 5.10^5 cellules par puits dans un volume final de 200 µl de milieu complet. Les cellules ont été stimulées ou non avec 20 µg/ml d'un mélange de peptides selon l'invention. Après 72 heures de culture à 37°C, les cellules ont été incubées pendant la nuit avec 0,25 µCi de [³H] thymidine (Amersham, Life technologie). Les cellules ont été récupérées et l'incorporation de [³H] 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 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.

EXEMPLE 3 : ELISPOT.

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

50 µl/puits d'anticorps murin anti-IFN-γ humain dilué dans du tampon PBS à une concentration de 4 µg/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 PBMC autologues ou hétérologues, des cellules lymphoblastoïdes obtenues après infection par

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

le virus EBV ou des cellules génétiquement modifiées sont utilisées et sont distribuées dans les puits. Les peptides Nef tels que définis dans l'invention sont alors ajoutés à différentes concentrations (10, 5 et 1 µg/ml).

- Les cellules effectrices (PBMC, PBMC déplétées en cellules CD8+, lymphocytes T préalablement enrichis par une étape de culture *in vitro* avec les peptides Nef 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 µg/ml).

20

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. E.S. Rosenberg et al., *Science*, 1997, 278, 1447.
2. S.A. Kalams et al., *J. Virol.*, 1999, 73, 6715.
3. B. Autran et al., *Science*, 1997, 277, 112.
4. J. Colombani, *HLA : fonctions immunitaires et applications médicales*. Eds. John Libbey Eurotext, 1993.
5. J. Choppin et al., *J. Immunol.*, 1991, 147, 569.
6. J. Choppin et al., *J. Immunol.*, 1991, 147, 575.
7. M. Dalod et al., *J. Clin. Invest.*, 1999, 104, 1431.
8. J. Estaquier et al., *Mol. Immunol.*, 1992, 29, 489.
9. J.D. Ahlers et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 10856.
10. P.A. Wentworth et al., *Vaccine*, 1994, 12, 117.
11. H. Gahéry-Segard et al., *J. Virol.*, 2000, 74, 1694.
12. A. Takahashi et al., *Vaccine*, 1998, 16, 1537.

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

13. S. Wain-Hobson et al., *Cell*, 1985, 40, 9.
14. S. Southwood et al., *J. Immunol.*, 1998, 160, 3363-3373.
15. P.E. Posch et al., *Eur. J. Immunol.*, 1996, 26, 1884.
16. C.M. HILL et al., *J. Immunol.*, 1994, 152, 2890.
- 5 17. M.P. Davenport et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, USA, 1995, 92, 6567.

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

REVENDEICATIONS

- 1°) Mélange de peptides issus d'une protéine Nef de VIH, caractérisé en ce que chacun desdits peptides se lie à au moins trois molécules HLA-DR 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), et à au moins une molécule HLA-DR codée par les allèles sélectionnés dans le groupe constitué par les allèles HLA DRB3*0101, DRB4*0101 et DRB5*0101 (B3, B4 et B5), avec une activité de liaison < 1000 nM, ledit mélange de peptides liant l'ensemble des allèles précités.
- 2°) Mélange de peptides selon la revendication 1, caractérisé en ce que lesdits peptides sont issus de la protéine Nef de n'importe quelle souche de VIH-1.
- 3°) Mélange de peptides selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que lesdits peptides sont sélectionnés dans le groupe constitué par le peptide correspondant aux positions 1-36 (peptide Nef1), le peptide correspondant aux positions 66-94 (peptide Nef4), le peptide correspondant aux positions 74-88 (peptide Nef4.4), le peptide correspondant aux positions 77-91 (peptide Nef4.5), le peptide correspondant aux positions 137-168 (peptide Nef10), le peptide correspondant aux positions 139-153 (peptide Nef10.2), le peptide correspondant aux positions 175-190 (peptide Nef12), le peptide correspondant aux positions 182-198 (peptide Nef13), le peptide correspondant aux positions 178-192 (peptide Nef13.1), le peptide correspondant aux positions 181-195 (peptide Nef13.2), le peptide correspondant aux positions 183-197 (peptide Nef13.3), le peptide correspondant aux positions 187-201 (peptide Nef13.4) et le peptide correspondant aux positions 189-203 (peptide Nef13.5) de la protéine Nef, en référence à la souche Bru (13).
- 4°) Mélange de peptides selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par les mélanges suivants :
- * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).
 - * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).
 - * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

- * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4), le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).
- * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4), le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).
- 5 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4), le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).
- * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 66-94 (Nef4) et le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).
- 10 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4) et le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).
- * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 77-91 (Nef4.5) et le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).
- 15 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 66-94 (Nef4) et le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).
- * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4) et le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).
- 20 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 77-91 (Nef4.5) et le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).
- 25 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 66-94 (Nef4) et le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).
- * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4) et le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).
- 30 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 77-91 (Nef4.5) et le peptide

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10) et le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12).

5 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10) et le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).

10 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10) et le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10) et le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).

15 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 139-153 (Nef10.2) et le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 139-153 (Nef10.2) et le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).

20 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 139-153 (Nef10.2) et le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).

25 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).

30 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 1-36 (Nef1), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10) et le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-

5 94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10) et le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-

94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10) et le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-

10 94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 139-153 (Nef10.2) et le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-

94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 139-153 (Nef10.2) et le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-

15 94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 139-153 (Nef10.2) et le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-

20 94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-

94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-

25 94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-

94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 183-197 (Nef13.3).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-

30 94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 187-201 (Nef13.4).

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 66-94 (Nef4), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 189-203 (Nef13.5).

5 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4), le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10), le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4), le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10), le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).

10 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4), le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10), le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12), le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).

15 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12), le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12), le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12), le peptide correspondant aux positions 183-197 (Nef13.3).

25 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 77-91 (Nef4.5), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12), le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 77-91 (Nef4.5), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12), le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).

30 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 77-91 (Nef4.5), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12), le peptide

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 77-91 (Nef4.5), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12), le peptide correspondant aux positions 183-197 (Nef13.3).

5 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 182-198 (Nef13).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1).

10 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2).

15 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 183-197 (Nef13.3).

* un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 187-201 (Nef13.4).

20 * un mélange comprenant : le peptide correspondant aux positions 137-168 (Nef10), le peptide correspondant aux positions 175-190 (Nef12) et le peptide correspondant aux positions 189-203 (Nef13.5).

5^o) Composition immunogène, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un mélange de peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable et éventuellement à au moins un adjuvant.

25 6^o) Composition immunogène 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.

30 7^o) Composition immunogène selon la revendication 5 ou la revendication 6, caractérisée en ce que ledit mélange de peptides est associé :

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

- à un ou plusieurs peptides ou lipopeptides contenant un ou plusieurs épitopes CD8+ et/ou
- à d'autres peptides contenant un épitope CD4+, lesquels peptides se lient au moins à une molécule HLA-DR codée 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) ou à au moins une molécule HLA-DR codée par les allèles sélectionnés dans le groupe constitué par les allèles HLA DRB3*0101, DRB4*0101 et DRB5*0101 (B3, B4 et B5), avec une activité de liaison < 1000 nM et/ou
- 5
- 10 - à d'autres peptides comprenant des épitopes CD4+ multiples et/ou
- à un ou plusieurs peptides ou lipopeptides contenant un ou plusieurs épitopes B reconnus spécifiquement par des anticorps dirigés contre ces derniers.
- 8°) Composition immunogène selon la revendication 7, caractérisée en ce que les peptides contenant un épitope CD4+ sont sélectionnés dans le groupe constitué par les peptides correspondant aux positions 37-71 (Nef3), aux positions 113-128 (Nef7), aux positions 117-132 (Nef8), aux positions 132-147 (Nef9), aux positions 155-185 (Nef 11) de la protéine Nef de VIH-1.
- 15
- 9°) Composition immunogène, caractérisée en ce qu'elle comprend avantageusement les séquences codant pour les peptides tels que définis aux revendications 1 à 4.
- 20
- 10°) Vaccin anti-VIH, caractérisé en ce qu'il inclut une composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 5 à 9.
- 11°) Peptides issus d'une protéine Nef de VIH, caractérisés :
- en ce qu'ils contiennent un épitope CD4+, apte à avoir une activité de liaison < 1000 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) et à être reconnus par des lymphocytes T CD4+ spécifiques desdits peptides et
- 25
- en ce qu'ils sont sélectionnés dans le groupe constitué par les fragments suivants de la protéine Nef, en référence à la souche Bru : le fragment correspondant aux positions 1-36 de la protéine Nef (Nef1), le fragment correspondant aux positions 3-17 (Nef1.1), le fragment correspondant aux positions 8-22 (Nef1.2), le fragment correspondant aux positions 11-25 (Nef1.3), le fragment correspondant aux
- 30

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

positions 14-28 (Nef1.4), le fragment correspondant aux positions 37-71 de la protéine Nef (Nef3), le fragment correspondant aux positions 66-94 (Nef4), le fragment correspondant aux positions 68-82 (Nef4.1), le fragment correspondant aux positions 74-88 (Nef4.4), le fragment correspondant aux positions 77-91 (Nef4.5), le fragment correspondant aux positions 79-93 (Nef4.6), le fragment correspondant aux positions 83-97 (Nef4.7), le fragment correspondant aux positions 113-128 (Nef7), le fragment correspondant aux positions 117-132 (Nef8), le fragment correspondant aux positions 132-147 (Nef9), le fragment correspondant aux positions 137-168 (Nef10), le fragment correspondant aux positions 137-151 (Nef10.1), le fragment correspondant aux positions 139-153 (Nef10.2), le fragment correspondant aux positions 141-155 (Nef10.3), le fragment correspondant aux positions 146-160 (Nef10.5), le fragment correspondant aux positions 155-185 (Nef11), le fragment correspondant aux positions 175-190 (Nef12), le fragment correspondant aux positions 182-198 (Nef13), le fragment correspondant aux positions 178-192 (Nef13.1), le fragment correspondant aux positions 181-195 (Nef13.2), le fragment correspondant aux positions 183-197 (Nef13.3), le fragment correspondant aux positions 187-201 (Nef13.4), le fragment correspondant aux positions 189-203 (Nef13.5), le fragment correspondant aux positions 191-205 (Nef13.6).

12°) Réactif de diagnostic, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par un mélange de peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou l'un des peptides selon la revendication 11, lesdits peptides étant éventuellement marqués ou complexés, sous la forme de complexes multimériques.

13°) 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 Nef tels que définis aux revendications 1 à 4 ou à la revendication 11, 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.

14°) Méthode de tri de lymphocytes T spécifiques du VIH, 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 peptide Nef tel que défini aux revendications 1 à 4 ou à la revendication 11/molécule HLA II soluble et biotinylée, conjugués à de la streptavidine marquée par un fluorochrome.

WO 02/062834

PCT/FR02/00471

- analyse par cytométrie de flux et
- tri des cellules marquées par les tétramères.

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
15 août 2002 (15.08.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2002/062834 A3

- (51) Classification internationale des brevets⁷ : C07K 14/16, G01N 33/68, A61K 39/21
Geneviève des Bois (FR), GUILLET, Jean-Gérard [FR/FR], 9 bis rue Geoffroy Marie, F-75009 Paris (FR), GAHERY-SEGARD, Hanne [FR/FR], 14 rue Sarrette, F-75014 Paris (FR).
- (21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR2002/000471
(74) Mandataires : ORES, Béatrice etc., Cabinet Ores, 36, rue de St Pétersbourg, F-75008 Paris (FR).
- (22) Date de dépôt international : 7 février 2002 (07.02.2002)
(25) Langue de dépôt : français
(81) États désignés (national) : CA, IL, JP, US.
- (26) Langue de publication : français
(84) États désignés (régional) : brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (30) Données relatives à la priorité : 01/01700 8 février 2001 (08.02.2001) FR
Publiée :
— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues
- (71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR], 31-33 rue de la Fédération, F-75015 Paris (FR), INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE-INSERM [FR/FR], 101 rue de Tolbiac, F-75054 Paris Cedex 13 (FR).
(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 1 juillet 2004
- (72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MAILLERE, Bernard [FR/FR], 1 Promenade Vénèzia, F-78000 Versailles (FR), POUVELLE-MORATILLE, Sandra [FR/FR], 49 rue Marcel l'Herbier, F-91700 Sainte
En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: MIXTURE OF PEPTIDES ORIGINATING FROM A NEF PROTEIN AND APPLICATIONS THEREOF

(54) Titre : MELANGE DE PEPTIDES ISSUS D'UNE PROTEINE NEF ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention relates to a mixture of peptides originating from a Nef protein and the applications thereof as a medicine (in immunogenic compositions which stimulate the production *in vivo* of anti-HIV T CD4+ lymphocytes and are therefore useful for vaccinating against AIDS) or as a reactive diagnosis agent for T lymphocytes particular to HIV, particularly to assess the immune status of HIV-positive patients or patients undergoing anti-retroviral therapy. Each of said peptides in the mixture is linked to at least three HLA-DR molecules encoded by the alleles selected from the group comprising alleles HLA DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*1101, DRB1*1301 and DRB1*1501 (molecules DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR13 and DR15) and to at least one HLA-DR molecule encoded by the alleles selected from the group comprising alleles HLA DRB3*0101, DRB4*0101 and DRB5*0101 (B3, B4 and B5), with a binding capacity of <1000 nM, said mixture of peptides linking all of the aforementioned alleles.

(57) Abrégé : Mélange de peptides issus d'une protéine Nef ainsi que ses applications en tant que médicament (dans des compositions immunogènes, aptes à stimuler la production de lymphocytes T CD4+ anti-VIH *in vivo* et donc utiles pour la vaccination contre le SIDA) ou en tant que réactif de diagnostic de lymphocytes T spécifiques du VIH, notamment pour évaluer l'état immunitaire de patients séropositifs ou sous thérapie anti-rétrovirale. Chacun des peptides du mélange se lie à au moins trois molécules HLA-DR 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), et à au moins une molécule HLA-DR codée par les allèles sélectionnés dans le groupe constitué par les allèles HLA DRB3*0101, DRB4*0101 et DRB5*0101 (B3, B4 et B5), avec une activité de liaison <1000 nM, ledit mélange de peptides liant l'ensemble des allèles précités.

WO 2002/062834 A3

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/FR 02/00471
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/16 G01N33/68 A61K39/21		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K A61K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/27954 A (GRAS MASSE HELENE ;GUILLET JEAN GERARD (FR); INST NAT SANTE RECH M) 10 June 1999 (1999-06-10) claims; example 3	1-10
A	WO 00/75181 A (GUILLET JEAN GERARD ;INST NAT SANTE RECH MED (FR); CONNAN FRANCINE) 14 December 2000 (2000-12-14) claims; examples -/-	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date of priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone ** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *F* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 April 2004		Date of mailing of the international search report 26/05/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 PH The Hague Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Fuhr, C

Form PCT/ISA/E10 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/FR 02/00471
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MICHEL F ET AL: "HIV-1 ENV, NEF, AND GAG-SPECIFIC T-CELL IMMUNITY IN MICE: CONSERVED EPITOPES IN NEF P27 AND GAG P25 PROTEINS" AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, NEW YORK, NY, US, vol. 8, no. 4, April 1992 (1992-04), pages 469-478, XP008023996 ISSN: 0889-2229 table 3	11-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/FR 02/00471
--

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: -- because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
see supplementary sheet	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. <input checked="" type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. <input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 02/00471

Continuation of Box I.2

Claim nos.: -

The present claims 1 and 2 relate to a product defined by reference to a desirable characteristic or property, namely a mixture of peptides that bind to at least three HLA-DR molecules encoded by alleles selected from the group which consists of alleles DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR14 and DR15 and to at least one HLA-DR molecule encoded by alleles selected from the group which consists of alleles B3, B4 and B5.

The claims cover all of the products that have this characteristic or property, yet the application provides support (PCT Article 6) and/or disclosure (PCT Article 5) for only a very limited number of such products. In the present case, the claims lack support and the application lacks disclosure to such an extent that it is impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Independently of the reasons given above, the claims also lack clarity. Indeed, an attempt has been made to define the product in terms of the aim to be achieved. In the present case, this lack of clarity is, again, such that it is impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Therefore, the search was directed to the parts of the claims of which the subject matter appears to be clear, supported and sufficiently disclosed, namely the parts relating to the peptide mixtures selected by peptide fragments of protein NEF of HIV strain Bru having sequences 1-36, 66-94, 74-88, 77-91, 137-168, 139-153, 175-190, 182-198, 187-192, 181-195, 183-197, 187-201 and 189-203. To the extent that the subject matter of claims 5, 6, 8 to 10 and 12 to 14 refers to claims 1 and 2, no search has been carried out.

The present claim 6 relates to a very wide variety of products. In fact, the claims contain so many options and the resulting lack of clarity (and/or conciseness) (PCT Article 6) is so great that a meaningful search of the subject matter of the claims is impossible. Therefore, the subject matter of claim 6 has not been searched. To the extent that the subject matter of claims 7 to 10 refers to claim 6, no search has been carried out.

The present claim 7 relates to a product defined by reference to a desirable characteristic or property, namely a composition containing 'one or more peptides ... containing one or more CD8+ epitopes'.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 02/00471

The claim covers all of the compounds that have this characteristic or property, yet the application provides support (PCT Article 6) and/or disclosure (PCT Article 5) for only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims lack support and the application lacks disclosure to such an extent that it is impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Independently of the reasons given above, the claims also lack clarity. Indeed, an attempt has been made to define the compound in terms of the aim to be achieved. In the present case, this lack of clarity is, again, such that it is impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Therefore, the search was directed to the parts of the claims of which the subject matter appears to be clear, supported and sufficiently disclosed, namely the parts relating to the compounds that contain a compound as defined in claims 5 and 6 in combination with a peptide selected from the list in claim 8. To the extent that the subject matter of claims 9 and 10 refers to claim 7, no search has been carried out.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. In the event of the application being pursued in the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search could be carried out during the examination procedure before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), with the proviso that the problems that led to the statement under PCT Article 17(2) are resolved.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 02/00471

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9927954 A	10-06-1999	FR 2771640 A1	04-06-1999
		AU 1440099 A	16-06-1999
		CA 2312043 A1	10-06-1999
		EP 1035866 A2	20-09-2000
		WO 9927954 A2	10-06-1999
		JP 2002506001 T	26-02-2002
		WO 0075181 A	14-12-2000
WO 0075181 A	14-12-2000	AU 5229400 A	28-12-2000
		AU 5411000 A	28-12-2000
		CA 2375602 A1	14-12-2000
		CA 2375627 A1	14-12-2000
		EP 1181314 A1	27-02-2002
		EP 1183368 A2	06-03-2002
		WO 0075336 A2	14-12-2000
		WO 0075181 A1	14-12-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		de Internationale No PCT/FR 02/00471
A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C07K14/16 G01N33/68 A61K39/21		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C07K A61K G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale: dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Basé sur données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	NO 99/27954 A (GRAS MASSE HELENE ;GUILLET JEAN GERARD (FR); INST NAT SANTE RECH M) 10 juin 1999 (1999-06-10) revendications; exemple 3	1-10
A	NO 00/75181 A (GUILLET JEAN GERARD ;INST NAT SANTE RECH MED (FR); CONNAN FRANCINE) 14 décembre 2000 (2000-12-14) revendications; exemples -/-	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent		*T* document ultérieur publié après la date de dépôt International ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
E document antérieur, mais publié à la date de dépôt International ou après cette date		*X* document particulièrement pertinent; l'inven tion revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)		*Y* document particulièrement pertinent; l'inven tion revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens		*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets
P document publié avant la date de dépôt International, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 29 avril 2004		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 26/05/2004
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Palatinlaan 2 NL - 2220 HV The Hague Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 657 apo nl Fac. (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Fuhr, C

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (Janvier 2004)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		D Date Internationale No PCT/FR 02/00471
C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	MICHEL F ET AL: "HIV-1 ENV, NEF, AND GAG-SPECIFIC T-CELL IMMUNITY IN MICE: CONSERVED EPITOPES IN NEF P27 AND GAG P25 PROTEINS" AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, NEW YORK, NY, US, vol. 8, no. 4, avril 1992 (1992-04), pages 469-478, XP008023996 ISSN: 0889-2229 tableau 3	11-14

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE	mandat internationale n° PCT/FR 02/00471
Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)	
Conformément à l'article 17.2(a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:	
1. <input type="checkbox"/> Les revendications n° ^{es} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:	
2. <input checked="" type="checkbox"/> Les revendications n° ^{es} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3. <input type="checkbox"/> Les revendications n° ^{es} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).	
Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)	
L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:	
voir feuille supplémentaire	
1. <input type="checkbox"/> Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.	
2. <input checked="" type="checkbox"/> Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtent ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.	
3. <input type="checkbox"/> Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n° ^{es} .	
4. <input type="checkbox"/> Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n° ^{es} .	
Remarque quant à la réserve	
<input type="checkbox"/> Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.	
<input type="checkbox"/> Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No. PCT/ FR 02 /00471

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCTISA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: -

Les revendications 1 et 2 présentes ont trait à un produit défini en faisant référence à une caractéristique ou propriété souhaitable, à savoir un mélange de peptides qui se lient à au moins trois molécules HLA-DR codées par les allèles sélectionnés dans le groupe constitué par les allèles DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR14 et DR15 et à au moins 1 molécule HLA-DR codées par les allèles sélectionnés dans le groupe constitué par les allèles B3, B4 et B5.

Les revendications couvrent tous les produits présentant cette caractéristique ou propriété, alors que la demande ne fournit un fondement au sens de l'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT que pour un nombre très limité de tels produits. Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d'exposé à un point tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. Indépendamment des raisons évoquées ci-dessus, les revendications manquent aussi de clarté. En effet, on a cherché à définir le produit au moyen du résultat à atteindre. Ce manque de clarté est, dans le cas présent, de nouveau tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. En conséquence, la recherche n'a été effectuée que pour les parties des revendications dont l'objet apparaît être clair, fondé et suffisamment exposé, à savoir les parties concernant les mélanges de peptides, qui sont sélectionnés par des fragments peptidiques de la protéine NEF du VIH du souche Bru ayant les séquences 1-36, 66-94, 74-88, 77-91, 137-168, 139-153, 175-190, 182-198, 178-192, 181-195, 183-197, 187-201 et 189-203. Autant que l'objet des revendications 5, 6, 8-10 et 12-14 se rapportent aux revendications 1 et 2 aucune recherche n'est pas effectuée.

Le revendication 6 présente a trait à une très grande variété de produits. En fait, les revendications contiennent tant d'options que le manque de clarté (et/ou de concision) au sens de l'Article 6 PCT qui s'en suit, est d'une importance telle qu'une recherche significative de l'objet des revendications devient impossible. Par conséquent, aucune recherche n'a pas été effectuée pour l'objet de la revendication 6. Autant que l'objet des revendications 7-10 se rapportent à la revendication 6 aucune recherche n'est pas effectuée.

Le revendication 7 présent ont trait à un composé défini en faisant référence à une caractéristique ou propriété souhaitable, à savoir un composition qui contient 'un ou plusieurs peptides contenant un ou plusieurs epitopes CD8+'.

Le revendication couvre tous les composés présentant cette caractéristique ou propriété, alors que la demande ne fournit un fondement au sens de l'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT que pour un nombre très limité de tels composés. Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d'exposé à un point tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. Indépendamment des raisons évoquées ci-dessus, les revendications manquent aussi de clarté. En effet, on a cherché à définir le composé au moyen du résultat

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No. PCT/ FR 02 /00471

SUIITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

à atteindre. Ce manque de clarté est, dans le cas présent, de nouveau tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. En conséquence, la recherche n'a été effectuée que pour les parties des revendications dont l'objet apparaît être clair, fondé et suffisamment exposé, à savoir les parties concernant les composés qui contiennent un composé comme défini dans les revendications 5 et 6 associées à un peptide sélectionné de la liste de revendication 8 conformément.

Autant que l'objet des revendications 9-10 se rapportent à la revendication 7 la recherche est limitée pas effectuée.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II. Si la demande devait être poursuivie dans la phase régionale devant l'OEB, il est rappelé au déposant qu'une recherche pourrait être effectuée durant la procédure d'examen devant l'OEB (voir Directive OEB C-VI, 8.5) à condition que les problèmes ayant conduit à la déclaration conformément à l'Article 17(2) PCT aient été résolus.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De la Internationale No

PCT/FR 02/00471

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9927954	A	10-06-1999	FR 2771640 A1	04-06-1999
			AU 1440099 A	16-06-1999
			CA 2312043 A1	10-06-1999
			EP 1035866 A2	20-09-2000
			WO 9927954 A2	10-06-1999
			JP 2002506001 T	26-02-2002
WO 0075181	A	14-12-2000	FR 2794370 A1	08-12-2000
			AU 5229400 A	28-12-2000
			AU 5411000 A	28-12-2000
			CA 2375602 A1	14-12-2000
			CA 2375627 A1	14-12-2000
			EP 1181314 A1	27-02-2002
			EP 1183368 A2	06-03-2002
			WO 0075336 A2	14-12-2000
			WO 0075181 A1	14-12-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	4 C 0 8 7
G 0 1 N 33/49	G 0 1 N 33/49	E 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	Y
G 0 1 N 33/543	G 0 1 N 33/543	5 9 7
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A

(71)出願人 500488225

アンスティテュ ナショナル ド ラ サント エ ド ラ ルシュルシェ メディカル(アンセルム)

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)

フランス、エフ - 7 5 6 5 4 パリ セデックス 13、リュ ド トルビアク、1 0 1

1 0 1 , r u e d e T o l b i a c , F - 7 5 6 5 4 P a r i s C e d e x 1 3 F r a n c e

(74)代理人 100065248

弁理士 野河 信太郎

(72)発明者 マイレア, ベルナルド

フランス、エフ - 7 8 0 0 0 ヴェルサイユ、プロムナード ヴェネツィア 1

(72)発明者 ポウヴェレ - モラティレ, サンドラ

フランス、エフ - 9 1 7 0 0 セント ジェネヴィーヴ デ ボイス、リュ マーセル ハーバー 4 9

(72)発明者 グイレット, ジャン - ジェラード

フランス、エフ - 7 5 0 0 9 パリ、ビス リュ ジェオフロイ マリー 9

(72)発明者 ギャヘリー - セガード, ハンネ

フランス、エフ - 7 5 0 1 4 パリ、リュ サーレット 1 4

F ターム(参考) 2G045 AA02 BB20 CA17 CB01 DA36 FA37 FB03 FB07 FB12

4B024 AA01 AA11 CA02 HA01

4B063 QA18 QQ02 QR48 QR58 QS24 QX01

4C084 AA13 MA02 NA14 ZB07 ZC55

4C085 AA03 AA32 BB11 EE01

4C087 AA01 AA02 BC83 NA14 ZC55

4H045 AA10 AA30 BA16 BA17 CA05 DA86 EA22 EA31 EA50 FA33

专利名称(译)	来自NEF蛋白的肽混合物及其应用		
公开(公告)号	JP2005506283A	公开(公告)日	2005-03-03
申请号	JP2002563186	申请日	2002-02-07
[标]申请(专利权)人(译)	提交SARRIA阵列内尔双原子 原子能委员会 国立研究所多拉城主Edora雅倩鲁沙医疗安瑟伦 法国国家健康医学研究院		
申请(专利权)人(译)	Komissaria一个Reneruji原子 国立研究所德拉城主等德拉Rushurushe医疗 (安瑟伦)		
[标]发明人	マイレアベルナルド ポウヴェレモラティレサンドラ グイレットジャンジェラード ギャハリーセガードハンネ		
发明人	マイレア,ベルナルド ポウヴェレ-モラティレ,サンドラ グイレット,ジャン-ジェラード ギャハリー-セガード,ハンネ		
IPC分类号	G01N33/49 A61K35/76 A61K39/00 A61K48/00 A61P31/18 A61P37/04 C07K14/155 C07K14/16 C12N15/09 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	A61K39/00 A61P31/18 A61P37/04 C07K14/005 C12N2740/16322		
FI分类号	C07K14/155.ZNA A61K35/76 A61K39/00.A A61K48/00 A61P31/18 C12Q1/02 G01N33/49.E G01N33 /53.Y G01N33/543.597 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA02 2G045/BB20 2G045/CA17 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FA37 2G045/FB03 2G045 /FB07 2G045/FB12 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA02 4B024/HA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QR48 4B063/QR58 4B063/QS24 4B063/QX01 4C084/AA13 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084 /ZB07 4C084/ZC55 4C085/AA03 4C085/AA32 4C085/BB11 4C085/EE01 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/NA14 4C087/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045 /CA05 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/FA33		
优先权	2001001700 2001-02-08 FR		
其他公开文献	JP2005506283A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种源自Nef蛋白的肽的混合物，及其作为药物的应用（在刺激体内抗HIV T CD4 +淋巴细胞体内产生并因此可用于抗艾滋病疫苗的免疫原性组合中）或作为反应性 HIV特有的T淋巴细胞诊断试剂，尤其用于评估HIV阳性患者或接受抗逆转录病毒治疗的患者的免疫状况。混合物中的每个所述肽与至少三个由等位基因编码的HLA-DR分子连接，所述等位基因选自等位基因HLA DRB1 * 0101，DRB1 * 0301，DRB1 * 0401，DRB1 * 0701，DRB1 * 1101，DRB1 * 1301和DRB1 * 1501（分子DR1，DR3，DR4，DR7，DR11，DR13和DR15）以及至少一个由等位基因编码的HLA-DR分子选自等位基因HLA DRB3 * 0101，DRB4 * 0101和DRB5 * 0101（B3，B4和B5；）的结合能力 < 1000nM，所述肽混合物连接所有上述等位基因。

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/155	C07K 14/155	ZNA 2G045
A61K 35/76	A61K 35/76	4B024
A61K 39/00	A61K 39/00	A 4B063
A61K 48/00	A61K 48/00	4C084
A61P 31/18	A61P 31/18	4C085
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 74 頁) 最終頁に続	

(21) 出願番号	特願2002-563186 (P2002-563186)	(71) 出願人	500539103
(66) (22) 出願日	平成14年2月7日 (2002.2.7)		コミッサリア ア レネルジ アトミック
(65) 翻訳文提出日	平成15年8月7日 (2003.8.7)		COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
(66) 国際出願番号	PCT/FR2002/000471		フランス、エフ-75015 パリ、リ:
(67) 国際公開番号	W02002/062834		ド ラ フェダラシオン 31-33
(67) 国際公開日	平成14年8月16日 (2002.8.16)		31-33, rue de la F
(31) 優先権主張番号	01/01700		ederation, F-75015 Pa
(32) 優先日	平成13年2月8日 (2001.2.8)		is FRANCE
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), CA, IL, JP, US		

最終頁に続く