

(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  
5 décembre 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 02/096941 A2

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
C07K 14/18, 16/10,  
G01N 33/68, A61K 39/29, A61P 31/14

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR02/01797

(22) Date de dépôt international : 28 mai 2002 (28.05.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
01/06935 28 mai 2001 (28.05.2001) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
BIOMÉRIEUX [FR/FR]; F-69280 Marcy-l'Etoile (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : JOLIVET  
REYNAUD, Colette [FR/FR]; "Les Cèdres", 29 route Na-  
tionale, F-69720 Saint Bonnet de Mure (FR).

(74) Mandataire : CABINET GERMAIN & MAUREAU;  
12, rue Boileau, F-69006 Lyon (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,  
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ,  
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: POLYPEPTIDE WHICH REACTS WITH THE ANTIBODIES OF PATIENTS INFECTED BY HCV AND USES THEREOF

(54) Titre : POLYPEPTIDE REAGISSANT AVEC LES ANTICOPRS DE PATIENTS INFECTES PAR LE VHC ET UTILISA-  
TIONS

(57) Abstract: The invention relates to a polypeptide which is able to specifically react with the antibodies of patients infected with HCV, the peptide sequence of said polypeptide comprising at least one sequence chosen from among SEQ IDL NO: 1 or SEQ IDL NO:2, chosen from the sequences having the immunoreactive properties of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 2, and exhibiting, when compared to SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 2, at least one substitution of an amino acid by an equivalent amino acid, the equivalent amino acids being chosen from the following groups: Group 1: alanine, proline, glycine. Group 2: aspartic acid, glutamic acid. Group 3: histidine, lysine, arginine. Group 4: asparagine, glutamine, serine, threonine. Group 5: phenylalanine, tyrosine, tryptophane. Group 6: isoleucine, leucine, valine, methionine, and/or structurally modified. The invention also relates to the use of the said polypeptide for the detection and quantification of anti-HCV antibodies or of NS3 proteins, in a biological sample, or to obtain anti-bodies.

(57) Abrégé : L'invention concerne un polypeptide capable de réagir spécifiquement avec les anticorps de patients infectés par le virus VHC et dont la séquence peptidique comprend au moins une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, et les séquences équivalentes de SEQ ID NO: 1 ou SEQ NO:2 sélectionnées parmi les séquences conservant les propriétés immunoréactives de SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2, et présentant, par rapport à SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2, au moins une substitution d'un acide aminé par un acide aminé équivalent, les acides aminés équivalents étant choisis dans les groupes suivants: Groupe 1 : alanine, proline, glycine. Groupe 2 : acide aspartique, acide glutamique. Groupe 3 : histidine, lysine, arginine. Groupe 4 : asparagine, glutamine, sérine, thréonine. Groupe 5 : phénylalanine, tyrosine, tryptophane. Groupe 6 : isoleucine, leucine, valine, méthionine, et/ou structurellement modifiées. L'invention concerne aussi l'utilisation de ce polypeptide pour la détection et la quantification d'anticorps anti-VHC ou de protéine NS3, dans un échantillon biologique, et pour l'obtention d'anticorps.

WO 02/096941 A2

POLYPEPTIDE REAGISSANT AVEC LES ANTICORPS DE PATIENTS  
INFECTES PAR LE VHC ET UTILISATIONS

L'hépatite C est la cause principale des hépatites acquises par transfusion.  
5 L'hépatite C peut également être transmise par d'autres voies percutanées, par exemple  
par injection de drogues par voie intraveineuse. Le risque de contamination des  
professionnels de la santé n'est par ailleurs pas négligeable.

L'hépatite C se distingue des autres formes de maladies du foie associées à  
des virus, telles que les hépatites A, B ou D. Les infections par le virus de l'hépatite C  
10 (VHC ou HCV) sont souvent chroniques avec pour résultante des maladies du foie,  
telles que hépatite, cirrhose et carcinome dans un grand nombre de cas (5 à 20%).

Bien que le risque de transmission du virus par transfusion ait diminué du  
fait de la mise en place de tests de criblage dans les années 1990, la fréquence des  
hépatites C reste élevée. A titre d'exemple, une étude récente indique qu'il y aurait  
15 encore aujourd'hui 15 000 nouveaux cas d'infection par an en France (S. Deuffic et al.,  
Hepatology 1999 ; 29 : 1596-1601). Actuellement, environ 170 millions de personnes à  
travers le monde sont infectées de manière chronique par le VHC. Les populations à  
risque élevé sont principalement le personnel hospitalier et les utilisateurs de drogues  
intraveineuses, mais il existe des donneurs de sang asymptomatiques qui  
20 n'appartiennent pas à ces groupes à risque élevé et chez lesquels des anticorps anti-  
VHC circulants ont été retrouvés. Pour ces derniers, la voie de l'infection n'a encore  
pas été identifiée.

Le VHC a été le premier virus hépatotrope isolé au moyen des techniques  
de biologie moléculaire. Les séquences du génome viral ont été clonées avant que la  
25 particule virale ait été visualisée.

Du fait de son organisation génomique et de son mode présumé de  
réplication, le VHC a été classifié récemment dans un nouveau genre de la famille des  
*Flaviviridae*, les hepacivirus. Le genre hepacivirus regroupe actuellement les virus de  
l'hépatite C et de l'hépatite G (GBV-C et les virus GBV-A et GBV-B).

30 Le VHC est un virus à ARN simple brin positif, de 9,5 kb, qui se réplique  
par une copie d'ARN complémentaire et dont le produit de la traduction est un  
précurseur d'une polyprotéine unique d'environ 3 000 acides aminés. L'extrémité 5' du  
génomme du VHC correspond à une région non traduite adjacente aux gènes qui codent  
pour les protéines structurales, la protéine core de la nucléocapside et les deux  
35 glycoprotéines d'enveloppe, E1 et E2. La région non traduite 5' et le gène core sont  
relativement bien conservés dans les différents génotypes. Les protéines d'enveloppe

E1 et E2 sont codées par des régions plus variables d'un isolat à un autre. L'extrémité 3' du génome du VHC contient les gènes qui codent pour les protéines non structurales (NS2, NS3, NS4, NS5) et pour une région 3' non codante possédant un domaine bien conservé. La protéine NS2 est une protéine liée à la membrane virale. La protéine NS3  
5 comporte deux domaines, l'un dans la partie NH<sub>2</sub> terminale correspondant à une sérine protéase et l'autre dans la partie COOH-terminale correspondant à l'hélicase. La protéine NS5 contient la ARN polymérase ARN dépendante dans la partie NS5B. La fonction de NS4 est encore mal connue.

Des études cliniques ont montré que des anticorps spécifiquement dirigés  
10 contre les régions conservées de la nucléocapside et contre NS3 apparaissent précocement après infection par le VHC. Ces deux protéines constituent donc de bons marqueurs pour la réalisation de tests diagnostiques des infections à VHC. D'autres études ont par ailleurs mis en évidence l'existence de plusieurs antigènes immunodominants, notamment l'antigène C33 de la région NS3 et plus particulièrement  
15 l'antigène dénommé C33c correspondant à une fraction de C33 (voir WO 9115771). Toutefois, l'obtention de ces peptides, de 266 et 93 acides aminés respectivement, sous une forme isolée, par recombinaison génétique ou par synthèse chimique, présente un certain nombre d'inconvénients liés notamment aux modifications post-traductionnelles nécessaires pour obtenir des peptides suffisamment immunoréactifs, ou à des difficultés  
20 de synthèse chimique desdits peptides, en particulier en raison de leur taille.

Dans une précédente demande de brevet (EP-A-0 755 943) la Demanderesse avait décrit et revendiqué un polypeptide capable de se substituer à l'antigène C33 du virus de l'hépatite C. La séquence de ce polypeptide avait été déduite d'un clone phagique renfermant un hexapeptide (Lys-Phe-Ser-Ser-Arg-Leu)  
25 sélectionné par criblage d'une banque d'hexapeptides portés par des phages, à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-C33 commercial (Anogen). Il avait par ailleurs été montré que le polypeptide (Lys-Phe-Ser-Ser-Arg-Leu) identifié en SEQ ID NO : 10 dans cette demande de brevet antérieure et porté par ce clone phagique était aussi reconnu par plusieurs anticorps monoclonaux qui entraient en compétition les uns avec  
30 les autres pour la reconnaissance, sur la protéine C33, d'un site immunodominant aussi reconnu par des sérums humains VHC positifs. Ainsi la forte réactivité de l'anticorps monoclonal 12A1H2 vis à vis du clone phagique avait été inhibée par pré-incubation d'un pool de 5 sérums humains VHC positifs.

Cependant, testées sous forme de polypeptides synthétiques et avec des  
35 sérums individuels, la séquence Lys-Phe-Ser-Ser-Arg-Leu ainsi que les séquences qui en découlent se sont avérées trop faiblement immunoréactives pour être utilisées de

façon courante dans un test diagnostique. De plus le motif Lys-Phe-Ser-Ser-Arg-Leu n'était pas reconnu par tous les anticorps monoclonaux qui entraient en compétition avec la réponse humaine dirigée vers l'épitope immunodominant de la protéine recombinante C33.

5           Aussi, la présente invention concerne la détermination de polypeptides suffisamment immunoréactifs pour être utilisés de manière courante dans des tests de diagnostic, lesdits polypeptides étant capables de réagir spécifiquement avec les anticorps de patients infectés par le virus VHC, et l'utilisation de ces polypeptides. En effet, la Demanderesse a montré de manière surprenante que les polypeptides de  
10 l'invention étaient capables d'être reconnus à la fois par la majorité des anticorps monoclonaux anti-NS3, mais surtout par des sérums humains individuels VHC positifs. Les polypeptides de l'invention permettent donc de pallier les inconvénients précités qui avaient été mis en évidence avec le polypeptide Lys-Phe-Ser-Ser-Arg-Leu de la demande EP-A-0 755 943.

15           Les polypeptides de l'invention sont des mimotopes, c'est à dire des polypeptides qui sont capables de mimer fonctionnellement un site de liaison pour un anticorps monoclonal. Les séquences de ces mimotopes sont par définition des séquences qui ne s'identifient pas à une séquence native linéaire continue ou qui n'apparaissent pas de quelle que manière que ce soit dans la protéine naturelle.

20           Le polypeptide de l'invention, capable de réagir spécifiquement avec les anticorps de patients infectés par le virus VHC, doit en outre répondre à au moins une des définitions suivantes :

                  - sa séquence peptidique comprend au moins une séquence choisie parmi SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, et les séquences équivalentes de SEQ ID NO :1 ou  
25 SEQ ID NO :2, ou

                  - sa séquence peptidique consiste en une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, et les séquences équivalentes de SEQ ID NO :1 ou SEQ ID NO :2.

                  Les séquences équivalentes de SEQ ID NO :1 ou SEQ ID NO :2 sont des  
30 séquences sélectionnées parmi les séquences qui conservent les propriétés immunoréactives de SEQ ID NO: 1 et SEQ ID NO: 2 et qui (a) présentent, par rapport à SEQ ID NO :1 ou SEQ ID NO :2, au moins une substitution d'un acide aminé par un acide aminé équivalent et/ou (b) sont structurellement modifiées.

                  Sont considérés comme équivalents, des acides aminés appartenant au  
35 même groupe, parmi les six groupes suivants :

                  Groupe 1 : alanine, proline, glycine.

Groupe 2 : acide aspartique, acide glutamique.

Groupe 3 : histidine, lysine, arginine.

Groupe 4 : asparagine, glutamine, sérine, thréonine.

Groupe 5 : phénylalanine, tyrosine, tryptophane.

5 Groupe 6 : isoleucine, leucine, valine, méthionine.

Cette équivalence a été déterminée à partir des informations contenues dans l'article de Kramer A. et al. (Molecular Immunology, Vol. 32, N°7, pp. 459-465 (1995)). Ces auteurs ont constitué des banques dans lesquelles pour réduire le problème de l'explosion combinatoire du nombre de molécules, ils ont utilisé des groupes  
10 d'acides aminés constitués d'acides aminés ayant des propriétés physico-chimiques similaires et les acides aminés regroupés dans chacun de ces six groupes, listés ci-dessus, sont considérés comme équivalents dans la présente invention.

Une séquence peptidique est aussi considérée comme équivalente de SEQ ID NO :1 ou SEQ ID NO :2 si, dans la mesure où elle conserve les propriétés  
15 immunoréactives de SEQ ID NO :1 ou SEQ ID NO :2, elle présente, par rapport à celle-ci, au moins l'une quelconque des modifications suivantes :

Remplacement d'un ou plusieurs acides aminés de la série L par un acide aminé de la série D, et vice-versa,

20 Introduction d'une modification des chaînes latérales des acides aminés, telle qu'une acétylation des fonctions amines, une carboxylation des fonctions thiols, une estérification des fonctions carboxyliques,

Modification des liaisons peptidiques telles que par exemple des liaisons carba, rétro, inverso, retro-inverso, réduites et méthylène-oxy.

Il est aussi possible de définir l'équivalence d'une séquence peptidique par  
25 rapport à une séquence peptidique de référence par son identité ou son homologie, exprimée en pourcentage, avec ladite séquence de référence. Ce pourcentage est déterminé, pour une suite d'un nombre donné d'acides aminés contigus, par alignement des deux séquences, déplacement de l'une par rapport à l'autre, et comparaison des acides aminés dans les deux séquences. Le pourcentage d'identité est déterminé à partir  
30 du nombre d'acides aminés qui sont identiques à des acides aminés de la séquence de référence, dans la même position. Le pourcentage d'homologie est déterminé à partir du nombre d'acides aminés qui sont équivalents à des acides aminés de la séquence de référence, dans la même position.

35 Avant d'exposer l'invention plus en détails, on définit ci-après différents termes employés dans la description et les revendications.

Par "polypeptide", on désigne un peptide, à l'état isolé, présentant un enchaînement d'un nombre variable d'acides aminés, tel qu'un oligopeptide, une protéine, une protéine de fusion, un peptide de fusion, un peptide de synthèse. Un polypeptide peut être obtenu par différentes techniques bien connues de l'homme du métier, et notamment par synthèse chimique ou par des techniques de recombinaison génétique. Les polypeptides selon l'invention peuvent être obtenus par des méthodes de synthèse classique, par exemple avec un synthétiseur automatique de peptides, ou par les techniques de génie génétique comprenant l'insertion d'une séquence d'ADN codant pour ledit polypeptide dans un vecteur d'expression tel qu'un plasmide ou un virus, et la transformation de cellules avec ce vecteur d'expression et culture de ces cellules.

Un polypeptide de l'invention comporte avantageusement au plus 50 acides aminés, préférentiellement au plus 30 acides aminés, ou mieux encore au plus 21 acides aminés, voire au plus 15 acides aminés.

Par « échantillon biologique », on entend notamment le sang, le sérum, le plasma, les cellules d'hépatocytes primaires, les lymphocytes T, les lymphocytes B, des extraits tissulaires, en particulier de foie. En effet, il est connu que le VHC est hépatotrope et il a été plus récemment montré qu'il était également lymphotrope.

Outre les polypeptides définis ci-dessus la présente invention concerne également un réactif pour la détection et/ou la quantification d'anticorps anti-VHC dans un échantillon biologique prélevé chez un patient infecté par le VHC qui comprend :

- au moins un polypeptide dont la séquence peptidique comprend ou consiste en SEQ ID NO : 1 ou SEQ ID NO : 2 ou en des séquences équivalentes aux dites SEQ ID NO :1 ou SEQ ID NO :2 qui conservent les mêmes propriétés immunoréactives que SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO :2, telles que définies ci-dessus.

- au moins deux polypeptides dont les séquences peptidiques comprennent ou consistent en SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 2 ou en des séquences équivalentes aux dites SEQ ID NO : 1 ou SEQ ID NO : 2 qui conservent les mêmes propriétés immunoréactives que SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 2, telles que définies ci-dessus ;  
et

un kit pour la détection et/ou la quantification d'anticorps anti-VHC dans un échantillon biologique prélevé chez un patient infecté ou suspecté avoir été infecté par le virus VHC qui comprend un réactif tel que défini ci-dessus.

L'invention se rapporte également à plusieurs procédés pour la détection et/ou la quantification d'anticorps anti-VHC dans un échantillon biologique prélevé chez un patient infecté ou susceptible d'avoir été infecté par le virus VHC qui sont décrits plus en détail ci-dessous.

Le premier procédé est un procédé dénommé « sandwich » qui peut être réalisé en une ou plusieurs étapes et qui comprend au moins les étapes suivantes :

- un mélange est préparé comprenant :

5 (i) un réactif tel que défini précédemment, qui est ou qui sera immobilisé sur une phase solide,

(ii) l'échantillon devant être testé et comprenant s'ils sont présents des anticorps anti-VHC,

(iii) un ligand marqué qui sera capable de réagir avec les anticorps anti-VHC de l'échantillon ;

10 - le mélange est incubé pendant un temps prédéterminé ;

- la phase solide est séparée de la phase liquide ; et

- la présence potentielle d'anticorps anti-VHC dans l'échantillon est révélée en mesurant le degré de marquage dans la phase solide.

15 Le ligand est alors soit la protéine NS3 ou un fragment de ladite protéine marqué, soit un polypeptide de synthèse marqué dont la séquence peptidique comprend ou consiste en la séquence de ladite protéine NS3 ou en un fragment de ladite protéine, soit un des deux polypeptides de l'invention marqué dans le cas où le réactif ne comprenait qu'un seul polypeptide de l'invention immobilisé sur la phase solide, soit une anti-immunoglobuline marquée.

20 Le deuxième procédé est dénommé « test par compétition » et comprend au moins les étapes suivantes :

- un mélange est préparé comprenant :

25 (i) un réactif tel que défini précédemment, qui est ou qui sera immobilisé sur une phase solide,

(ii) l'échantillon devant être testé et comprenant s'ils sont présents des anticorps anti-VHC,

(iii) des anticorps anti-VHC marqués qui seront capables de réagir avec le réactif ;

30 - le mélange est incubé pendant un temps prédéterminé ;

- la phase solide est séparée de la phase liquide ; et

- la présence potentielle d'anticorps anti-VHC dans l'échantillon est révélée en mesurant le degré de marquage dans la phase solide.

35 Les polypeptides de l'invention sont immunogènes et sont donc utilisés pour la production d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux ou de fragments desdits anticorps par réaction immunologique avec un organisme animal, de préférence une souris un rat ou un lapin à un agent immunogène qui consiste en un polypeptide dont la

séquence polypeptidique comprend ou consiste en SEQ ID NO : 1 ou SEQ ID NO : 2 ou en leurs séquences équivalentes qui conservent les propriétés immunogènes de SEQ ID NO : 1 ou SEQ ID NO : 2, telles que définies précédemment.

- Par anticorps, on entend les anticorps polyclonaux, les anticorps monoclonaux, les anticorps transmembranaires et les anticorps humanisés ou des fragments desdits anticorps. La production d'anticorps polyclonaux et monoclonaux fait partie des connaissances générales de l'homme du métier. On peut citer à titre de référence Köhler G. et Milstein C. (1975) : Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature 256 :495-497 et Galfre G. et al. (1977) Nature, 266 : 522-550 pour la production d'anticorps monoclonaux et Roda A., Bolelli G.F. : Production of high-titer antibody to bile acids, Journal of Steroid Biochemistry, Vol. 13, pp. 449-454 (1980) pour la production d'anticorps polyclonaux. Pour la production d'anticorps monoclonaux, l'immunogène peut être couplé à de l'hémocyanine de Lymphet Keyhole (peptide KLH) comme support pour l'immunisation ou à de l'albumine sérique (peptide SA). Les animaux sont soumis à une injection d'immunogène en utilisant de l'adjuvant complet de Freund. Les sérums et les surnageants de culture d'hybridome issus des animaux immunisés sont analysés pour leur spécificité et leur sélectivité en utilisant des techniques classiques, telles que par exemple des tests ELISA ou de Western Blot. Les hybridomes produisant les anticorps les plus spécifiques et les plus sensibles sont sélectionnés. Des anticorps monoclonaux peuvent également être produits *in vitro* par culture cellulaire des hybridomes produits ou par récupération de liquide d'ascite, après injection intrapéritonéale des hybridomes chez la souris. Quel que soit le mode de production, en surnageant ou en ascite, les anticorps sont ensuite purifiés. Les méthodes de purification utilisées sont essentiellement la filtration sur gel échangeur d'ions et la chromatographie d'exclusion ou la chromatographie d'affinité (protéine A ou G). Un nombre suffisant d'anticorps sont criblés dans des tests fonctionnels pour identifier les anticorps les plus performants. La production *in vitro* d'anticorps, de fragments d'anticorps ou de dérivés d'anticorps, tels que des anticorps chimères produits par génie génétique est bien connue de l'homme du métier.

- Par anticorps transmembranaire, on entend un anticorps dont au moins la région fonctionnelle capable de reconnaître et de se fixer à son antigène spécifique est exprimée à la surface des cellules cibles pour permettre lesdites reconnaissance et fixation. Plus particulièrement, les anticorps selon la présente invention consistent en des polypeptides de fusion comprenant les amino acides définissant ladite région fonctionnelle et une séquence d'acides aminés (polypeptide transmembranaire)

permettant l'ancrage au sein de la double couche lipidique membranaire de la cellule cible ou à la surface externe de cette bi-couche. Les séquences nucléiques codant pour de nombreux polypeptides transmembranaires sont décrites dans la littérature.

- Les formes "humanisées" d'anticorps non humains, par exemple  
5 murins, sont des anticorps chimères qui comprennent une séquence minimale dérivée d'une immunoglobuline non humaine. Pour la plupart, les anticorps humanisés sont des immunoglobulines humaines (anticorps récepteur) dans lesquelles des résidus d'une région hypervariable du récepteur sont remplacés par des résidus d'une région hypervariable d'une espèce donneur (anticorps donneur) non humaine, telle que souris,  
10 rat, lapin ou primate non humain, ayant la spécificité, l'affinité et la capacité souhaitées. Dans certains cas, les résidus (FR) de la région Fv de l'immunoglobuline humaine sont remplacés par des résidus correspondants non humains. De plus, les anticorps humanisés peuvent comprendre des résidus qui ne sont pas trouvés dans l'anticorps receveur ou dans l'anticorps donneur. Ces modifications sont effectuées  
15 pour améliorer les performances de l'anticorps. En général, l'anticorps humanisé comprendra au moins et de préférence deux domaines variables, dans lesquels tout ou à peu près tout des boucles hypervariables correspondent à une immunoglobuline non humaine et tout ou à peu près tout des régions FR seront celles d'une immunoglobuline humaine. Les anticorps humanisés facultativement pourront aussi comprendre au moins  
20 une partie d'une région constante (Fc) d'une immunoglobuline, telle qu'une immunoglobuline humaine (Jones et al., Nature 321 : 522-525 (1986) ; Reichmann et al., Nature 332 : 323-329 (1988) ; et Presta et al., Curr. Op. Struct. Biol. 2 : 593-596 (1992).

- Par fragment d'anticorps on entend les fragments F(ab)<sub>2</sub>, Fab, Fab', scFv  
25 (Blazar et al., 1997, Journal of Immunology 159 : 5821-5833 et Bird et al., 1988, Science 242 : 423-426) d'un anticorps natif et par dérivé on entend, entre autres, un dérivé chimérique d'un anticorps natif (voir par exemple Arakawa et al., 1996, J. Biochem 120 : 657-662 et Chaudray et al., 1989, Nature 339 : 394-397).

L'invention se rapporte donc aussi à un réactif pour la détection d'une  
30 infection par le virus VHC qui comprend au moins un anticorps monoclonal ou un anticorps polyclonal ou leurs fragments tel(s) que défini(s) ci-dessus et un kit comprenant au moins un tel réactif, ainsi que l'utilisation desdits anticorps monoclonaux ou polyclonaux dans plusieurs procédés pour la détection et/ou la quantification de la protéine NS3 dans un échantillon biologique prélevé chez un  
35 patient infecté ou susceptible d'avoir été infecté par le VHC.

Les deux premiers procédés sont dénommés « sandwich » et sont décrit plus en détail ci-dessous. Il convient par ailleurs de noter que dans certains cas dans lesquels la protéine NS3 circulante dans le plasma ou le sérum n'est pas en quantité suffisante pour permettre un test de détection suffisamment sensible il est possible de  
5 prétraiter un échantillon biologique pour lyser les cellules ou dissocier les complexes et libérer la protéine.

Le premier procédé « sandwich » de l'invention comprend au moins les étapes suivantes :

- un mélange est préparé comprenant :  
10 (i) un réactif qui consiste en au moins un anticorps monoclonal ou un fragment d'anticorps monoclonal tel que défini précédemment, qui est ou qui sera immobilisé sur une phase solide,  
(ii) l'échantillon devant être testé et comprenant si elle est présente la protéine NS3,  
15 (iii) un ligand marqué qui sera capable de réagir avec la protéine NS3 de l'échantillon ;
  - le mélange est incubé pendant un temps prédéterminé ;
  - la phase solide est séparée de la phase liquide ; et
  - la présence potentielle de la protéine NS3 dans l'échantillon est révélée  
20 en mesurant le degré de marquage dans la phase solide.

Le ligand marqué est un anticorps monoclonal ou un anticorps polyclonal ou un fragments desdits anticorps.

Le deuxième procédé « sandwich » comprend au moins les étapes suivantes :

- un mélange est préparé comprenant :  
25 (i) un réactif qui consiste en au moins un anticorps polyclonal ou un fragment dudit anticorps tel que défini précédemment, qui est ou qui sera immobilisé sur une phase solide,  
(ii) l'échantillon devant être testé et comprenant si elle est présente la  
30 protéine NS3,  
(iii) un ligand marqué qui sera capable de réagir avec la protéine NS3 de l'échantillon ;
  - le mélange est incubé pendant un temps prédéterminé ;
  - la phase solide est séparée de la phase liquide ; et  
35 - la présence potentielle de la protéine NS3 dans l'échantillon est révélée en mesurant le degré de marquage dans la phase solide.

Le ligand marqué est un anticorps monoclonal ou un anticorps polyclonal ou leurs fragments.

Le troisième procédé est un procédé par compétition qui comprend au moins les étapes suivantes :

5 - un mélange est préparé comprenant :

(i) un réactif qui comprend au moins un anticorps monoclonal ou un anticorps polyclonal ou des fragments desdits anticorps de l'invention , qui est ou qui sera immobilisé sur une phase solide,

10 (ii) l'échantillon devant être testé et comprenant si elle est présente la protéine NS3,

(iii) un ligand marqué qui sera capable de réagir avec le réactif (i) et qui consiste en un polypeptide de l'invention tel que défini précédemment ;

- le mélange est incubé pendant un temps prédéterminé ;

- la phase solide est séparée de la phase liquide ; et

15 - la présence potentielle de la protéine NS3 dans l'échantillon est révélée en mesurant le degré de marquage dans la phase solide.

Un autre procédé pour la mise en évidence de la protéine NS3 dans un échantillon biologique comprend au moins les étapes suivantes :

20 - on prélève chez un individu suspecté avoir été infecté par le VHC un extrait tissulaire, par exemple de foie, par biopsie, et

- on met en contact ledit extrait tissulaire avec au moins un anticorps monoclonal ou polyclonal marqué de l'invention. Généralement, la présence du VHC est mise en évidence par immunofluorescence directe sur l'extrait à tester.

25 En raison du pouvoir immunogène des polypeptides de l'invention qui induisent une forte réponse immune ces derniers sont utilisables individuellement ou en combinaison comme composant(s) actif(s) de la réponse immune. Donc un objet de l'invention est également une composition immunothérapeutiquement active, notamment une préparation vaccinale, qui comprend au moins un polypeptide de l'invention comme ingrédient actif et dont la séquence polypeptidique comprend ou  
30 consiste en une séquence choisie parmi SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 2, et leurs séquences équivalentes qui conservent les propriétés immunogènes de SEQ ID NO : 1 et de SEQ ID NO : 2, telles que définies précédemment, et éventuellement un support pour le ou lesdits polypeptide(s) et/ou un excipient et/ou un adjuvant et/ou un diluant pharmaceutiquement acceptable.

35 Une telle composition immunothérapeutiquement active et en particulier une composition vaccinale préparée est injectable, c'est-à-dire en solution liquide ou en

suspension. En option, la préparation peut aussi être émulsifiée. La molécule antigénique, c'est à dire le ou les polypeptides de l'invention, peut être mélangée avec des excipients qui sont pharmaceutiquement acceptables et compatibles avec l'ingrédient ou principe actif. Des exemples d'excipients favorables sont l'eau, une solution saline, le dextrose, le glycérol, l'éthanol ou des équivalents et leurs combinaisons. Si désiré, le vaccin peut contenir des quantités mineures de substances auxiliaires comme des agents mouillants ou émulsifiants, des agents qui tamponnent le pH ou des adjuvants comme l'hydroxide d'aluminium, le dipeptide muramyl ou leurs variations. Le vaccin est administré conventionnellement par injection, par exemple intramusculaire.

Par « véhicule pharmaceutiquement acceptable » on entend les supports et véhicules administrables à l'être humain ou à un animal, tels que décrits par exemple dans Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Co. Le véhicule pharmaceutiquement acceptable est de préférence isotonique, hypotonique ou présente une faible hypertonicité et a une force ionique relativement basse. Les définitions des excipients et adjuvants pharmaceutiquement acceptables sont également données dans Remington's Pharmaceutical Sciences précité.

La quantité d'ingrédient actif est fonction du fait qu'un adjuvant ou non est ajouté à la composition. Généralement, elle est comprise entre 10 et 50 µg/ml d'ingrédient actif et usuellement de 20µg/0,5 ml chez les adultes et de 10µg/0,5 ml chez les enfants sont administrés par dose. La composition vaccinale peut de plus comprendre des protéines qui favorisent la réponse immunitaire.

L'invention se rapporte donc également à un procédé pour la vaccination d'un individu selon lequel une composition vaccinale qui répond aux définitions ci-dessus est administrée à l'individu, de préférence par injection, et à un procédé pour le traitement ou pour la prévention d'une infection par le VHC dans lequel une composition immunothérapeutiquement active répondant aux définitions ci-dessus est administrée à un individu.

Enfin, l'invention concerne l'utilisation d'un polypeptide de l'invention, pour fixer dans un échantillon biologique des anticorps caractéristiques et/ou spécifiques de l'infection par le VHC.

Dans la description qui suit, SEQ ID NO :1 est aussi dénommée motif du clone 6 et SEQ ID NO :2 est aussi appelée motif du clone 16.

La figure 1 représente l'immunoréactivité des clones sélectionnés. En abscisse est représenté les numéros des clones sélectionnés parmi les clones listés dans le tableau 1 de l'exemple 1. En ordonnée est représentée à 492 nm la DO du clone - DO

contrôle x 100. Les histogrammes représentent les résultats obtenus avec chaque clone sélectionné.

La figure 2 représente la reconnaissance des clones 6 et 16 par des anticorps anti-NS3. Les numéros des anticorps monoclonaux anti-NS3 sont donnés en abscisse et la DO x 1000 à 492 nm est représentée en ordonnée. Les histogrammes en gris foncé correspondent aux résultats obtenus avec le motif du clone 16 et les histogrammes en gris clair correspondent aux résultats obtenus avec le motif du clone 6.

La figure 3 représente la reconnaissance du motif du clone 6 par des sérums VHC positifs. Les sérums sont identifiés en abscisse et la DO à 492 nm (DO(clone)-DO(TBS T) x 1000 est représentée en ordonnée.

La figure 4 représente la reconnaissance du motif du clone 6 par des sérums VHC positifs. Les sérums sont identifiés en abscisse et la DO à 492 nm [DO(clone)-DO(TBS T)] x 1000 est représentée en ordonnée.

La figure 5 représente la comparaison de la séquence de la protéine recombinante NS3 tronquée et les séquences des motifs des clones 6 et 16.

La figure 6 représente des expériences d'inhibition de la fixation de l'anticorps monoclonal 3B1C4 sur les clones 6 et 16 par des peptides synthétiques reproduisant la protéine tronquée NS3 de 93 acides aminés. Les peptides sont identifiés en abscisse et l'activité résiduelle (en pourcentage) est représentée en ordonnée. Les histogrammes en gris foncé représentent les résultats obtenus avec le motif du clone 6 et les résultats en gris clair représentent les résultats obtenus avec le motif du clone 16.

La figure 7 représente la reconnaissance des motifs des clones 6 et 16 sous forme MAP4 par des sérums humains VHC positifs. Les sérums humains sont identifiés en abscisse et la DO x 1000 à 492 nm est représentée en ordonnée. Les histogrammes en gris foncé représentent les résultats obtenus avec le motif du clone 6 et les résultats en gris clair représentent les résultats obtenus avec le motif du clone 16.

### **Exemple 1 : Sélection de clones de phage codant pour un dodecapeptide réagissant spécifiquement avec un anticorps monoclonal anti-NS3.**

Une banque de dodécapeptides exprimés à la surface d'un phage M13 (Ph.D.-12TM Phage display Peptide Library Kit , New England BioLabs Inc) a été criblée par l'anticorps monoclonal anti-NS3 3B1C4 (bioMérieux). Quatre sélections successives ont été effectuées avec des quantités décroissantes d'anticorps suivant les instructions du manuel d'utilisation de la banque fourni par New England BioLabs. Les phages de la quatrième sélection sont ensuite clonés et 35 clones choisis de façon

aléatoire sont amplifiés et leur ADN séquencé. Les séquences protéiques déduites des séquences nucléotidiques des inserts ont permis d'identifier 26 motifs différents dont certains représentés plusieurs fois (voir tableau 1 ci-dessous). L'immunoréactivité des différents motifs exprimés à la surface des phages a été ensuite analysée par ELISA, selon le manuel de protocole, avec l'anticorps de sélection 3B1C4 et un anticorps monoclonal non pertinent anti-Borrelia burgdorferi OSPA utilisé comme contrôle négatif. Cent µl d'anticorps monoclonal 3B1C4 ou de l'anticorps anti-OSPA utilisé comme contrôle négatif sont fixés à 100µg/ml dans du NaHCO<sub>3</sub> 0,1M pendant une nuit à 4°C au fond de puits de plaques d'ELISA. La plaque est ensuite saturée pendant 2 heures à 4°C avec une solution de saturation selon les indications du fournisseur. Après 4 lavages en tampon TBS-Tween 0,5%, 100µl de TBS-Tween 0,5% contenant 10<sup>11</sup> phages sont incubés pendant 2 heures à température ambiante sous agitation. Après 4 nouveaux lavages en TBS-Tween, 100µl d'anticorps anti M13 biotinylé (5 Prime 3 Prime Inc.) dilué au 1/500 sont ajoutés pendant 2 heures à température ambiante sous agitation. Quatre nouveaux lavages sont effectués avant d'ajouter 100µl /puits de streptavidine conjuguée à la peroxydase diluée au 1/10000 en solution de saturation. Après une heure d'incubation à 37°C la plaque est lavée quatre fois. La réaction colorimétrique est effectuée par ajout d'une solution d'ortho-phénylènediamine et de peroxyde d'hydrogène (kit colorEIA bioMérieux) pendant 10 min. à l'obscurité avant d'être stoppée avec 50µl d'acide sulfurique 1,8N. La densité optique est lue à 492 nm. Pour chaque clone les résultats sont exprimées par la moyenne des valeurs de triplicate obtenues avec 3B1C4 moins la moyenne des valeurs de triplicate obtenues avec l'anticorps contrôle anti-OSPA. Les résultats sont présentés à la figure 1. 17 motifs donnent un signal positif spécifique de 3B1C4 (figure 1). Cependant trois motifs (clones 6, 16 et 17) apparaissent beaucoup plus immunoréactifs que les autres. De plus ces motifs sont aussi reconnus par différents anticorps monoclonaux anti-NS3 (figure 2). Dans les résultats présentés dans la figure 2, chaque anticorps monoclonal anti-NS3 ainsi que l'anticorps contrôle négatif anti-OSPA ont été ajoutés au fond des puits de la plaque d'ELISA à la concentration finale de 100µg/ml. La suite de l'immunoanalyse a été effectuée comme celle décrite pour la figure 1.

Ces anticorps ont été précédemment caractérisés pour entrer en compétition avec l'anticorps 3B1C4 et avec un pool de sérums humains pour sa fixation sur la protéine recombinante NS3 (acides aminés 1372-1464 de la polyprotéine). Les motifs des clones 6 et 16 étant plus fortement reconnus que le motif 17, les résultats obtenus suggèrent fortement que ces deux motifs miment un épitope immunodominant sur NS3.

Tableau 1

Clone	Séquence	Biop. 4
1	H K M H S H P <u>R</u> L T S P	6 / 35
3	W H K A V P R W L A S P	3 / 35
5	F H G H L K K P H W <u>R</u> N	2 / 35
4	F H K H K S P A L S P V	2 / 35
2	F H K H S P R S P I F I	1 / 35
10	A T A K H L Y W W <u>R</u> N Q	1 / 35
6	W H R H W P S H P T Q K	1 / 35
18	A K L H W H K H H P L T	1 / 35
8	D L N Y F T L S S K <u>R</u> E	1 / 35
7	G L L H H K <u>H</u> <u>H</u> R S P Y	1 / 35
19	F H K H N Y K S P P I I	1 / 35
13	F H S P K <u>K</u> N H H Y Y R	1 / 35
20	W H K V P <u>R</u> <u>S</u> D R M P P	1 / 35
12	W H S <u>H</u> M K T R T W Q P	1 / 35
15	F H K <u>H</u> <u>H</u> K S P R L F P	1 / 35
14	H H K H S N R S P I F S	1 / 35
16	A H K W Y S Q W L P H R	1 / 35
21	F H K Y S P P Q K P V T	1 / 35
17	W H H R H Q P A P G G R	1 / 35
22	W P H F H R P P H R E L	1 / 35
23	H L Y H K N R N H I A Y	1 / 35
24	I Q R H H K P L R L R V	1 / 35
25	F H K H D R G R L S P P	1 / 35
11	W H K G N N V A W T K R	1 / 35
9	F H K H R I S P S P S T	1 / 35
26	S W R S R Q L P E T G E	1 / 35

Biop.4 signifie : 4<sup>ème</sup> sélection

**Exemple 2 : Immunoréactivité des motifs phagiques vis à vis de sérums de patients VHC positifs.**

Les clones de phage 6 et 16 ont été testés en ELISA avec des sérums humains en fixant au fond des puits de plaques Nunc Maxisorb 100µl d'une dilution au 1/50<sup>ème</sup> de sérum dans du tampon NaHCO<sub>3</sub> 0,1M. Cent µl de sérum dilué au 1/50<sup>ème</sup> en NaHCO<sub>3</sub> 0,1M sont ajoutés au fond des puits de plaque d'ELISA et incubés pendant une nuit à 4°C, en chambre humide. La plaque est ensuite vidée et saturée pendant 2h à 4°C en solution de saturation. Après 4 lavages en TBS-Tween 0,5%, 3,3 x 10<sup>11</sup> phages dilués dans 100µl de TBS-Tween sont ajoutés et incubés pendant 2 heures à température ambiante, sous agitation. La plaque est à nouveau lavée en TBS-Tween et 100µl d'anticorps anti M13 biotinylé (5 Prime 3 Prime Inc.) dilué au 1/500 sont ajoutés pendant 2 heures à température ambiante sous agitation. Quatre nouveaux lavages sont effectués avant d'ajouter 100µl /puits de streptavidine conjuguée à la peroxydase diluée au 1/10000 en solution de saturation. Après une heure d'incubation à 37°C la plaque est lavée quatre fois . La réaction colorimétrique est effectuée par ajout d'une solution d'ortho-phénylènediamine et de peroxyde d'hydrogène (kit colorEIA bioMérieux) pendant 10 min à l'obscurité avant d'être stoppée avec 50µl d'acide sulfurique 1,8N. La densité optique est lue à 492 nm. Les résultats sont exprimés par la moyenne des valeurs de triplicate obtenues avec chaque sérum moins la moyenne de triplicate obtenues avec le tampon de dilution seul.

Les résultats obtenus avec 12 sérums de patients VHC positifs et 12 sérums d'individus sains montrent qu'avec le clone 6 tous les sérums VHC+ donnent un signal positif significativement supérieur à une valeur seuil correspondant à la moyenne des valeurs obtenues par les 12 sérums d'individus sains augmentée de 3 déviations standard (figure 3). L'immunoréactivité du clone 16 a été testée avec des sérums dilués au 1/50<sup>ème</sup> comme décrit ci-dessus. Avec le clone 16, 11 sérums sur 12 sérums VHC+ donnent une valeur supérieure à une valeur seuil calculée de la même façon (figure 4).

**Exemple 3 : Localisation sur la protéine NS3 de l'épitope mimé par les motifs des clones phagiques 6 et 16**

Les séquences d'acides aminés des motifs des clones 6 (WHRHWP SHPTQK) et 16 (AHKWYSQWLP HR) ont été comparées à la séquence de la protéine NS3 tronquée recombinante de 93 acides aminés (positionnement 1373-1464 par rapport à la polyprotéine) en utilisant le logiciel Mac Vector, Ver. 4.5 (Kodack). Les régions présentant les meilleures similarités ont été détectées par

alignement avec le programme Clustal. La figure 5 représente la localisation des similarités de séquences entre les motifs 6 (WHRHWPSHPTQK), 16 (AHKWYSQWLPHR) et les 40 premiers acides aminés de la protéine C33 tronquée de 93 acides aminés (1372-1464). La localisation des peptides G19L et I18G sur la  
5 séquence de C33 est indiquée par des flèches.

Ainsi que le montre la figure 5, 3 acides aminés du clone 6 sont identiques avec la séquence de NS3 (RH, 1389-1390 ; K1398) et 2 similaires avec SK1396-1397. Pour le clone 16, 2 acides aminés sont identiques avec Y1276 ; P1381 et 2 acides aminés sont similaires avec K1378 ; I1380.

10 Des expériences d'inhibition de fixation de l'anticorps monoclonal 3B1C4 sur les clones 6 et 16 par des peptides synthétiques reproduisant la séquence de la protéine tronquée NS3 de 93 acides aminés montrent ont été réalisées. Cent µl d'anticorps monoclonal 3B1C4 à 100µg/ml sont fixés pendant une nuit à 4°C au fond de puits de plaques d'ELISA. La plaque est ensuite saturée pendant 2 heures à 4°C avec  
15 une solution de saturation selon les indications du fournisseur. Après 4 lavages en tampon TBS-Tween 0,5%, 50µl d'une solution de peptides à 100µg/ml en TBS sont incubés 30min. à 37°C avant d'ajouter 50µl de TBS-Tween 0,5% contenant  $2,5 \times 10^{10}$  phages pendant 2 heures supplémentaires à température ambiante sous agitation. Après 4 nouveaux lavages en TBS-Tween , 100µl d'anticorps anti M13 biotinylé (5 Prime 3  
20 Prime Inc.) dilué au 1/500 sont ajoutés pendant 2 heures à température ambiante sous agitation. Quatre nouveaux lavages sont effectués avant d'ajouter 100µl /puits de streptavidine conjuguée à la peroxydase diluée au 1/10000 en solution de saturation. Après une heure d'incubation à 37°C la plaque est lavée quatre fois . La réaction colorimétrique est effectuée par ajout d'une solution d'ortho-phénylènediamine et de peroxyde d'hydrogène (kit colorEIA bioMérieux) pendant 10 min. à l'obscurité avant  
25 d'être stoppée avec 50µl d'acide sulfurique 1,8N. La densité optique est lue à 492 nm.

Les résultats de la figure 6 montrent que seul le peptide de 20 acides aminés I18G (séquence 1392-1411) était capable d'inhiber la reconnaissance des clones 6 et 16 par l'anticorps 3B1C4. Le peptide de 21 acides aminés G19L (1371-1391) qui  
30 contient cependant entièrement la zone de similarité avec le clone 16 et 2 n'a aucun pouvoir inhibiteur sur la fixation de l'anticorps 3B1C4 sur les clones 6 et 16. Ces résultats confirment donc la localisation d'au moins une partie de l'épitope reconnu par l'anticorps 3B1C4 ainsi que les autres anticorps anti-NS3 et les sérums humains NS3 positifs se situe entre les acides aminés 1389 et 1399 de la séquence de la protéine NS3  
35 et que le motif du clone 16 est un vrai mimotope puisqu'il ne contient aucun acide aminé identique ou similaire à cette région .

**Exemple 4 : Modélisation moléculaire de l'épitope.**

La structure du domaine hélicase de la protéine NS3 du VHC a été déterminée par cristallographie par N Yao et al., 1997, Nature Struc. Biol. 4 : 463-467.

5 La région 1393-1402 de NS3 correspond à une boucle parfaitement accessible pour une interaction avec un anticorps. De plus des acides aminés identifiés sur le mimotope 6 comme étant identiques ou similaires à ceux de la séquence 1389-1398 (R1389; S1396 ; K1397 ; K1398) sont contigus sur la structure 3-D de l'hélicase. Par ailleurs, R1389; K1397 ; K1398 font parties des acides aminés décrits par Yao et al. comme

10 candidats pour favoriser une interaction électrostatique RNA-hélicase sur le second domaine de l'hélicase. La localisation de l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal 3B1C4 sur la structure tridimensionnelle de la partie hélicase de la protéine NS3 correspond aux acides aminés suivants référencés également par leur positionnement par rapport à la protéine NS3 : Arg 18 : R1389 ; Ser25 : S 1396 ; Lys 26 : K 1397 ; Lys

15 27 : K1398 ; Lys28 : K 1399.

**Exemple 5 : Immunoréactivité des peptides synthétiques reproduisant les mimotopes 6 et 16 vis à vis de sérums de patients VHC positifs.**

Des sérums humains VHC positifs ainsi que les sérums d'individus sains dilués au 1/50<sup>ème</sup> ont été testés avec les motifs 6 et 16 reproduits sous forme de peptides synthétiques branchés (MAP4) et fixés au fonds des puits de plaques d'ELISA à la concentration finale de 10µg/ml dans du NaHCO<sub>3</sub> 0,1M.

20

Reproduits sous forme de peptides synthétiques branchés (multiple antigen peptide MAP4), les mimotopes 6 et 16 sont significativement reconnus par tous sérums VHC positifs testés (figure 7).

25

Sur une série étendue à 52 sérums testés par RIBA (Recombinant ImmunoBlot Assay Chiron Corporation, Emeryville, CA) pour leur positivité par rapport à NS3, les motifs 6 et 16 sous forme de MAP4 (appelés MAP4-6 et MAP4-16 respectivement), sont détectés respectivement par 35 et 32 sérums. De plus la

30 combinaison des réponses des sérums à ces 2 peptides permet de détecter une réponse positive dans 40 sérums sur les 52 testés.

Les peptides MAP4-6 et MAP4-16 ont été aussi testés avec un panel de seroconversion (Boston Biomedica, Inc. Bridgewater, MA). Ainsi que le montre le tableau 2 suivant, ces peptides sont reconnus respectivement par 14 et 8 serums sur les

35 18 serums testés. L'addition des deux réponses n'a pas d'effet cumulatif, cependant des

réponses positives sont obtenues dans des sérums pour lesquels la quantité d'anticorps anti-NS3 n'est pas ou peu détectée par RIBA.

Les peptides sont testés par ELISA avec des sérums dilués au 1/50. Les réponses contre MAP4-6 et MAP4-16 sont indiquées par + ou - selon que les valeurs  
5 obtenues sont supérieures ou inférieures à un seuil de reconnaissance défini par la moyenne des valeurs obtenues avec 12 sérums négatifs + 3 écarts-types.

Tableau 2

Sera	RIBA NS3 <sup>a</sup>	MAP4-6	MAP4-16
SC1	+/-	+	-
SC2	1+	+	-
SC3	2+	+	-
SC4	2+	+	+
SC5	4+	+	+
SC6	3+	+	+
SC7	4+	+	+
SC8	-	+	+
SC9	+/-	+	-
SC10	-	+	+
SC11	-	+	+
SC12	4+	+	-
SC13	4+	+	+
SC14	4+	-	-
SC15	4+	-	-
SC16	4+	-	-
SC17	4+	+	-
SC18	-	-	-
<b>18</b>		<b>14</b>	<b>8</b>

10

<sup>a</sup> La présence d'anticorps anti-NS3 est évaluée par RIBA selon les indications du fournisseur.

## REVENDICATIONS

1. Polypeptide capable de réagir spécifiquement avec les anticorps de patients infectés par le virus VHC et dont la séquence peptidique comprend au moins une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, les séquences équivalentes de SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2 sélectionnées parmi les séquences conservant les propriétés immunoréactives de SEQ ID NO :1 ou SEQ ID NO :2, et :

présentant, par rapport à SEQ ID NO :1 ou SEQ ID NO :2, au moins une substitution d'un acide aminé par un acide aminé équivalent, étant considérés comme équivalents les acides aminés retenus au sein d'un même groupe parmi les groupes suivants :

Groupe 1 : alanine, proline, glycine.

Groupe 2 : acide aspartique, acide glutamique.

Groupe 3 : histidine, lysine, arginine.

Groupe 4 : asparagine, glutamine, sérine, thréonine.

Groupe 5 : phénylalanine, tyrosine, tryptophane.

Groupe 6 : isoleucine, leucine, valine, méthionine, et/ou structurellement modifiées.

2. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que sa séquence peptidique consiste en une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 et les séquences équivalentes de SEQ ID NO: 1 et SEQ ID NO: 2.

3. Réactif pour la détection et/ou la quantification d'anticorps anti-VHC dans un échantillon biologique prélevé chez un patient infecté par le virus VHC, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un polypeptide tel que défini à la revendication 1 ou 2.

4. Réactif pour la détection et/ou la quantification d'anticorps anti-VHC dans un échantillon biologique prélevé chez un patient infecté par le virus VHC, caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux polypeptides tels que définis à la revendication 1 ou 2.

5. Kit pour la détection et/ou la quantification d'anticorps anti-VHC dans un échantillon biologique prélevé chez un patient infecté par le virus VHC, caractérisé en ce qu'il comprend un réactif selon la revendication 3 ou 4.

6. Procédé pour la détection et/ou la quantification d'anticorps anti-VHC dans un échantillon biologique prélevé chez un patient infecté ou supposé être infecté par le virus VHC qui comprend au moins les étapes suivantes :

- un mélange est préparé comprenant :

(i) un réactif tel que défini à la revendication 3 ou 4, qui est ou qui sera immobilisé sur une phase solide,

(ii) l'échantillon devant être testé et comprenant s'ils sont présents des anticorps anti-VHC,

5 (iii) un ligand marqué qui sera capable de réagir avec les anticorps anti-VHC de l'échantillon ;

- le mélange est incubé pendant un temps prédéterminé ;

- la phase solide est séparée de la phase liquide ; et

10 - la présence potentielle d'anticorps anti-VHC dans l'échantillon est révélée en mesurant le degré de marquage dans la phase solide.

7. Procédé selon la revendication 6, dans lequel le ligand marqué est choisi parmi la protéine NS3 ou un fragment de ladite protéine, un polypeptide de synthèse dont la séquence peptidique comprend ou consiste en la séquence de ladite protéine NS3 ou en un fragment de ladite protéine, un des polypeptides de la revendication 1 ou 2 et une anti-immunoglobuline.

8. Procédé pour la détection et/ou la quantification d'anticorps anti-VHC dans un échantillon biologique prélevé chez un patient infecté ou supposé être infecté par le virus VHC qui comprend au moins les étapes suivantes :

- un mélange est préparé comprenant :

20 (i) un réactif tel que défini à la revendication 3 ou 4 qui est ou qui sera immobilisé sur une phase solide,

(ii) l'échantillon devant être testé et comprenant si ils sont présents des anticorps anti-VHC,

25 (iii) des anticorps anti-VHC marqués qui seront capables de réagir avec le réactif ;

- le mélange est incubé pendant un temps prédéterminé ;

- la phase solide est séparée de la phase liquide ; et

30 - la présence potentielle d'anticorps anti-VHC dans l'échantillon est révélée en mesurant le degré de marquage dans la phase solide.

9. Procédé pour la production d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux ou de fragments desdits anticorps, selon lequel on injecte un agent immunogène consistant en au moins un polypeptide tel que défini à la revendication 1 ou 2, à un organisme mammifère choisi parmi une souris, un rat et un lapin, et

35 on obtient les anticorps monoclonaux à partir de cultures d'hybridome obtenues à partir de l'animal ainsi immunisé, ou

on prélève les anticorps polyclonaux dans le sérum de l'animal ainsi immunisé.

10. Anticorps monoclonal ou polyclonal ou leurs fragments susceptible(s) d'être obtenu(s) par le procédé de la revendication 9.

5 11. Réactif pour la détection d'une infection par le virus VHC qui comprend au moins un anticorps monoclonal ou un anticorps polyclonal ou leurs fragments tel(s) que défini(s) dans la revendication 10.

12. Kit pour la détection d'une infection par le virus VHC qui comprend au moins un réactif tel que défini dans la revendication 11.

10 13. Procédé pour la détection et/ou la quantification de protéine NS3 dans un échantillon biologique prélevé chez un patient infecté ou supposé être infecté par le virus VHC qui comprend au moins les étapes suivantes :

- un mélange est préparé comprenant :

15 (i) un réactif qui consiste en au moins un anticorps monoclonal ou un fragment d'anticorps monoclonal tel que défini dans la revendication 10, qui est ou qui sera immobilisé sur une phase solide,

(ii) l'échantillon devant être testé et comprenant si elle est présente la protéine NS3,

20 (iii) un ligand marqué qui sera capable de réagir avec la protéine NS3 de l'échantillon ;

- le mélange est incubé pendant un temps prédéterminé ;

- la phase solide est séparée de la phase liquide ; et

- la présence potentielle de la protéine NS3 dans l'échantillon est révélée en mesurant le degré de marquage dans la phase solide.

25 14. Procédé selon la revendication 13, dans lequel le ligand marqué est un anticorps monoclonal ou un anticorps polyclonal ou un fragments desdits anticorps.

15. Procédé pour la détection et/ou la quantification de protéine NS3 dans un échantillon biologique prélevé chez un patient infecté ou supposé être infecté par le virus VHC qui comprend au moins les étapes suivantes :

30 - un mélange est préparé comprenant :

(i) un réactif qui consiste an au moins un anticorps polyclonal ou un fragment dudit anticorps tel que défini dans la revendication 10, qui est ou qui sera immobilisé sur une phase solide,

35 (ii) l'échantillon devant être testé et comprenant si elle est présente la protéine NS3,

(iii) un ligand marqué qui sera capable de réagir avec la protéine NS3 de l'échantillon ;

- le mélange est incubé pendant un temps prédéterminé ;
- la phase solide est séparée de la phase liquide ; et
- 5 - la présence potentielle de la protéine NS3 dans l'échantillon est révélée en mesurant le degré de marquage dans la phase solide.

16. Procédé selon la revendication 15, dans lequel le ligand marqué est un anticorps monoclonal ou un anticorps polyclonal ou leurs fragments.

17. Procédé pour la détection et/ou la quantification de protéine NS3 dans un échantillon biologique prélevé chez un patient infecté ou supposé être infecté par le virus VHC qui comprend au moins les étapes suivantes :

- un mélange est préparé comprenant :
  - (i) un réactif qui consiste tel que défini dans la revendication 11 , qui est ou qui sera immobilisé sur une phase solide,

15 (ii) l'échantillon devant être testé et comprenant si elle est présente la protéine NS3,

(iii) un ligand marqué qui sera capable de réagir avec le réactif (i) et qui consiste en un polypeptide tel que défini à la revendication 1 ou 2 ;

- le mélange est incubé pendant un temps prédéterminé ;
- 20 - la phase solide est séparée de la phase liquide ; et
- la présence potentielle de la protéine NS3 dans l'échantillon est révélée en mesurant le degré de marquage dans la phase solide.

18. Procédé pour la détection de la protéine NS3 dans un échantillon biologique comprenant au moins l'étape selon laquelle on met en contact ledit échantillon avec au moins un anticorps monoclonal ou polyclonal marqué selon la revendication 10.

19. Composition immunothérapeutiquement active, notamment préparation vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend comme ingrédient actif au moins un polypeptide selon la revendication 1 ou 2, et éventuellement un support pour ledit polypeptide et/ou un excipient et/ou un adjuvant et/ou un diluent pharmaceutiquement acceptable.

20. Utilisation d'un polypeptide selon la revendication 1 ou 2, pour fixer dans un échantillon biologique des anticorps caractéristiques et/ou spécifiques de l'infection par le VHC.

FIGURE 1

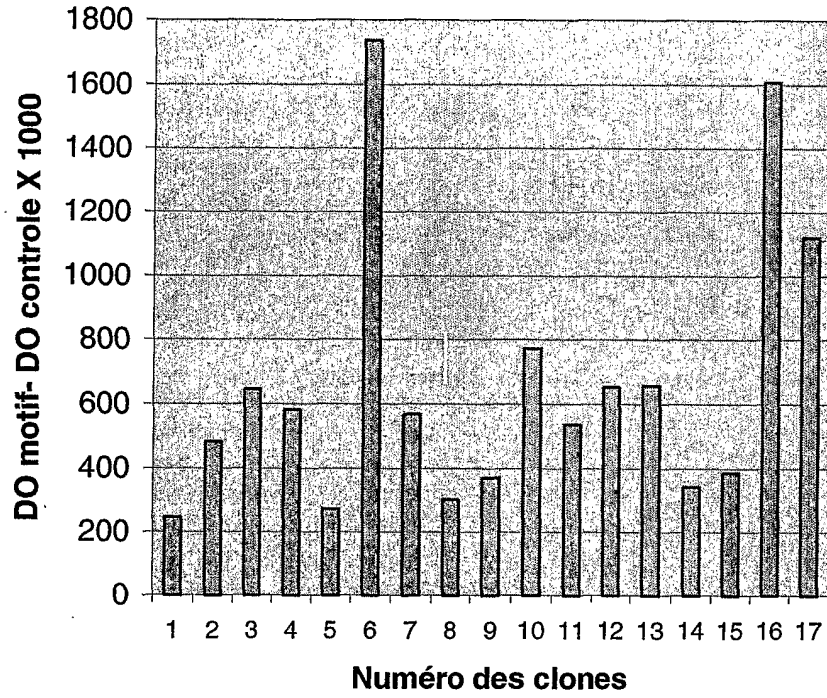


FIGURE 2

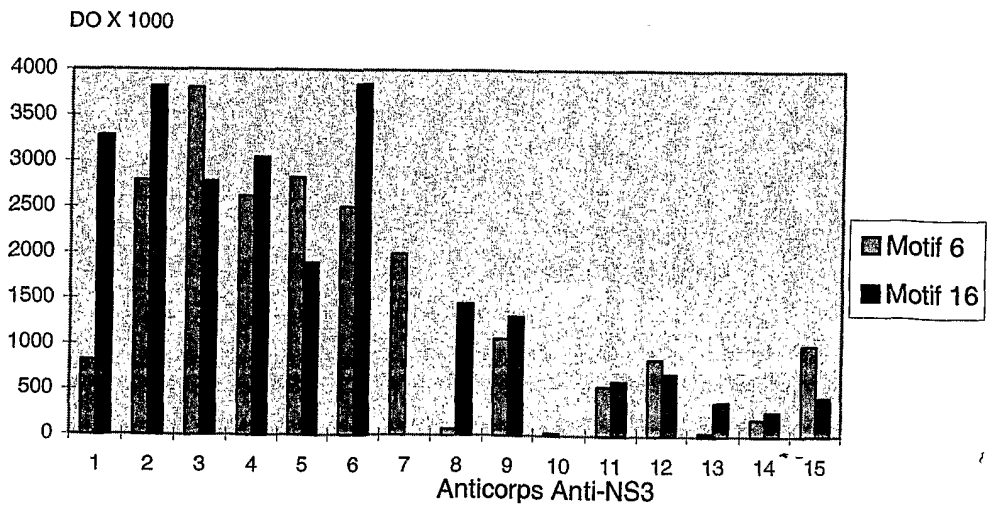


FIGURE 3

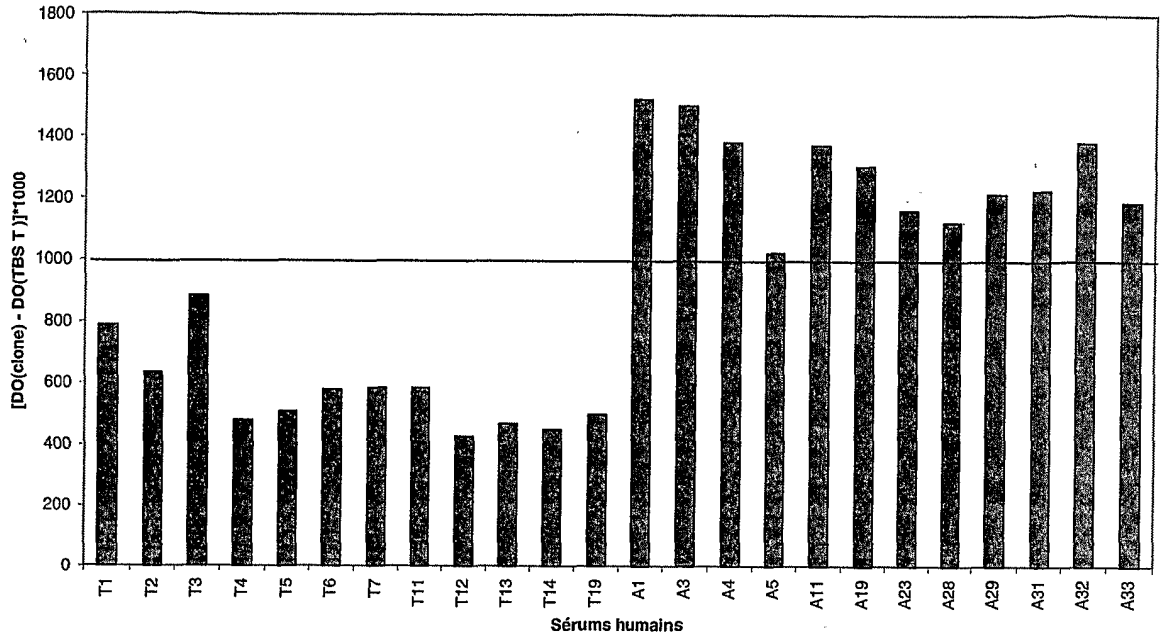
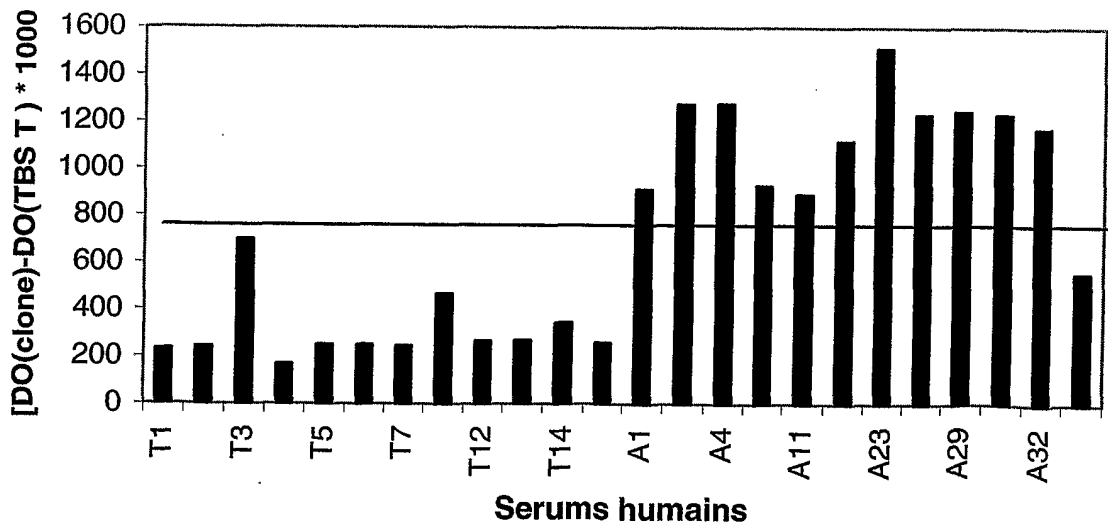


FIGURE 4





## LISTE DE SEQUENCES

<110> bioMérieux

<120> POLYPEPTIDE REAGISSANT AVEC LES ANTICORPS DE PATIENTS NFECTES PAR LE VHC ET UTILISATIONS

<130> Mimotopes SN3

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Organisme Inconnu

<220>

<223> Origine de la séquence : mimotope de la protéine SN3 du VHC

<400> 1

Trp His Arg His Trp Pro Ser His Pro Thr Gln Lys

1

5

10

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Organisme Inconnu

<220>

<223> Origine de la séquence : mimotope de la protéine SN3 du VHC

<400> 2

Ala His Lys Trp Tyr Ser Gln Trp Leu Pro His Arg

1

5

10