

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



PCT



(43) Date de la publication internationale
5 janvier 2006 (05.01.2006)

(10) Numéro de publication internationale
WO 2006/000693 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
G01N 33/569, C12Q 1/37

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/001356

(22) Date de dépôt international : 2 juin 2005 (02.06.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0405945 2 juin 2004 (02.06.2004) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE [FR/FR];
Etablissement Public d'Enseignement Supérieur et d, e
Recherche, 58, boulevard Charles Livon, F-13284 Mar-
seille Cedex 07 (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR]; Etablis-
sement Public à Caractère Scientifique et T, Technologique,
3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :

GLUSCHANKOF, Pablo [FR/FR]; 44, chemin de
la Mure, F-13015 Marseille (FR). **RAOULT, Didier**
[FR/FR]; 1, rue de Lorraine, F-13008 Marseille (FR).
BEN M'BAREK, Najoua [FR/FR]; 16, boulevard Grac,
F-13015 Marseille (FR). **AUDOLY, Gilles** [FR/FR]; 26,
boulevard Pèbre, F-13008 Marseille (FR).

(74) Mandataire : **MAREK, Pierre**; 28, rue de la Loge, B.P.
42413, F-13215 Marseille Cedex 02 (FR).

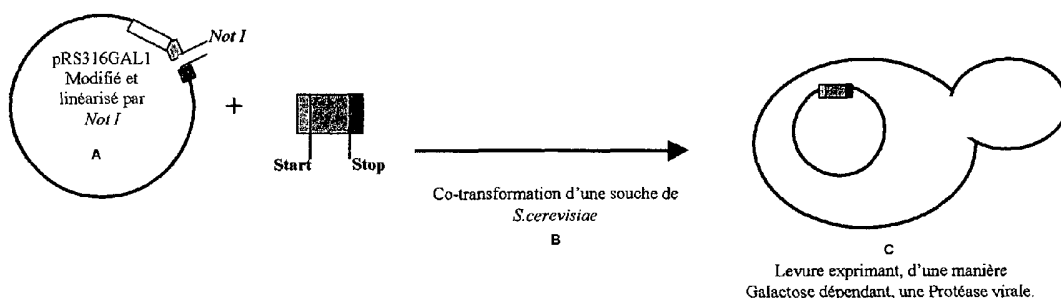
(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KM, KP, KR, KZ, LC, LK,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

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING SENSITIVITY OR RESISTANCE OF RETROVIRUS ISOLATES TO THERAPEUTIC RETROVIRAL TREATMENTS BASED ON VIRAL PROTEASE INHIBITORS, AND DIAGNOSTIC KIT DERIVED FROM IMPLEMENTING SAID METHOD

(54) Titre : PROCEDE POUR DETERMINER LA SENSIBILITE OU LA RESISTANCE D'ISOLATS DE RETROVIRUS AUX TRAITEMENTS THERAPEUTIQUES RETROVIRAUX A BASE D'INHIBITEURS DE LA PROTEASE VIRALE, ET KIT DE DIAGNOSTIC ISSU DE LA MISE EN OEUVRE DE CE PROCEDE



A PRS316GAL1 MODIFIED AND LINEARIZED BY NOT I
B CO-TRANSFORMATION OF AN *S.CEREVISIAE* STRAIN
C YEAST GALACTOSE-DEPENDENT EXPRESSION OF A VIRAL PROTEASE

(57) Abstract: The invention concerns a method for determining sensitivity or resistance of retroviruses such HIV to therapeutic treatments based on viral protease inhibitors, using yeast's. In other words, the invention concerns the use of yeast for determining resistance of sensitivity of viral protease to chemical molecules used in the context of therapeutic protocols. The invention also concerns a diagnostic kit comprising elements required for implementing said method.

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé pour déterminer la sensibilité ou la résistance de rétrovirus tel que le VIH aux traitements thérapeutiques à base d'inhibiteurs de la protéase virale, par l'utilisation de levures. Autrement dit, l'invention vise l'utilisation de la levure pour déterminer la résistance ou la sensibilité de la protéase virale aux molécules chimiques utilisées dans le cadre des protocoles thérapeutiques. L'invention est également relative à un kit de diagnostic comprenant les éléments nécessaires à la mise en oeuvre dudit procédé.

WO 2006/000693 A1



GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

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.

Procédé pour déterminer la sensibilité ou la résistance d'isolats de rétrovirus aux traitements thérapeutiques rétroviraux à base d'inhibiteurs de la protéase virale, et kit de diagnostic issu de la mise en œuvre de ce procédé.

L'invention concerne un procédé pour déterminer la sensibilité ou la résistance de rétrovirus tel que le VIH aux traitements thérapeutiques à base d'inhibiteurs de la protéase virale, par l'utilisation de levures. Autrement dit, l'invention vise l'utilisation de la levure pour déterminer la résistance ou la sensibilité de la protéase virale aux molécules chimiques utilisées dans le cadre des protocoles thérapeutiques. L'invention est également relative à un kit de diagnostic comprenant les éléments nécessaires à la mise en œuvre dudit procédé.

Plus particulièrement, le procédé selon l'invention permet de déterminer rapidement et à bas coût, le phénotype de résistance de la protéase du VIH-2 chez des patients infectés.

Le procédé selon l'invention permet également une recherche à "haut débit" de nouvelles molécules chimiques ayant une activité inhibitrice de la protéase virale, en vue de la mise au point de nouveaux traitements thérapeutiques.

Les agents étiologiques du SIDA sont les virus de l'immunodéficience humaine du type 1 et 2. Ces virus, qui partagent certaines caractéristiques cliniques et biologiques, présentent des différences majeures, notamment en ce qui concerne les modalités de l'infection de l'hôte. Ainsi, l'infection par le VIH-2 est plus difficile que celle par le VIH-1 (**Ancelle, R., O. Bletry, A. C. Baglin, F. Brun-Vezinet, M. A. Rey, and P. Godeau, 1987, Long incubation period for HIV-2 infection. Lancet. 1:688-9 ; Marlink, R., P. Kanki, I. Thior, K. Travers, G. Eisen, T. Siby, I. Traore, C. C. Hsieh, M. C. Dia, and E. H. Gueye. 1994. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. Science. 265:1587-90 ; Adjorlolo-Johnson, G., K. M. De Cock, E. Ekpini, K. M. Vetter,**

- T. Sibailly, K. Brattegaard, D. Yavo, R. Doorly, J. P. Whitaker, and L. Kestens.** 1994. Prospective comparison of mother-to-child transmission of HIV-1 and HIV-2 in Abidjan, Ivory Coast. *JAMA*. **272**:462-6 ; **Marlink, R.** 1996. Lessons from the second AIDS virus, HIV-2. *AIDS*. **10**:689-99.), la charge virale plasmatique des individus infectés par le VIH-2 est moins élevée que celle des individus infectés par le VIH-1 (**Andersson, S., H. Norrgren, Z. da Silva, A. Biague, S. Bamba, S. Kwok, C. Christopherson, G. Biberfeld, and J. Albert.** 2000. Plasma viral load in HIV-1 and HIV-2 singly and dually infected individuals in Guinea-Bissau, West Africa: significantly lower plasma virus set point in HIV-2 infection than in HIV-1 infection. *Arch. Intern. Med.* **160**:3286-93 ; **Popper, S. J., A. D. Sarr, K. U. Travers, A. Gueye-Ndiaye, S. Mboup, M. E. Essex, and P. J. Kanki.** 1999. Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. *J. Infect. Dis.* **180**:1116-21.), et les individus infectés par le VIH-2 présentent une évolution vers la maladie plus lente (**Vittinghoff, E., S. Scheer, P. O'Malley, G. Colfax, S. D. Holmberg, and S. P. Buchbinder.** 1999. Combination antiretroviral therapy and recent declines in AIDS incidence and mortality. *J. Infect. Dis.* **179**:717-20 ; **Blanco, R., Carrasco, L., and Ventoso, I.** 2003. Cell killing by HIV-1 protease. *J. Biol. Chem.* **278**:1086-93 ; **Liu, H., Krizek, J. and Bretscher, A.** 1992. Construction of a GAL1-regulated yeast cDNA expression library and its application to the identification of genes whose overexpression causes lethality in yeast. *Genetics* **132**:665-673).

Le VIH-2 a été identifié pour la première fois en Afrique de l'Ouest en 1986 (**Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos-Ferreira, A. G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, and C. Rouzioux.** 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*. **233**:343-6). Dans cette région, la prévalence d'infections à VIH-2 varie entre 1% et 10% (**Langley, C. L., E. Benga-De, C. W. Critchlow, I. Ndoye, M. D. Mbengue-Ly, J. Kuypers, G. Woto-Gaye, S. Mboup, C. Bergeron, K. K. Holmes, and N. B. Kiviat.** 1996. HIV-1, HIV-2, human papillomavirus infection

and cervical neoplasia in high-risk African women. *AIDS*. **10**:413-7 ; **Poulsen, A. G., B. Kvinesdal, P. Aaby, K. Molbak, K. Frederiksen, F. Dias, and E. Lauritzen.** 1989. Prevalence of and mortality from human immunodeficiency virus type 2 in Bissau, West Africa. *Lancet*. **1**:827-31 ; **Wilkins, A., D. Ricard, J. Todd,**
5 **H. Whittle, F. Dias, and A. Paulo Da Silva.** 1993. The epidemiology of HIV infection in a rural area of Guinea-Bissau. *AIDS*. **7**:1119-22). La majorité des cas d'infections par le VIH-2, en dehors de l'Afrique occidentale, se trouve dans les pays européens et plus particulièrement au Portugal où les individus infectés par le VIH-2 représentent 13% de la population infectée par les virus de
10 l'immunodéficience humaine (**Soriano, V., P. Gomes, W. Heneine, A. Holguin, M. Doruana, R. Antunes, K. Mansinho, W. M. Switzer, C. Araujo, V. Shanmugam, H. Lourenco, J. Gonzalez-Lahoz, and F. Antunes.** 2000. Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in Portugal: clinical spectrum, circulating subtypes, virus isolation, and plasma viral load. *J. Med. Virol.* **61**:111-6). En
15 France il a été estimé que 1% de la population infectée par le VIH l'est par le virus du type 2.

Dans les pays développés, les individus infectés par le VIH-1 et/ou par le VIH-2 sont traités par une thérapie chimique, composées de molécules ayant une
20 activité inhibitrice pour l'une ou l'autres des deux enzymes virales : la Transcriptase Inverse et la Protéase.

Bien que ce traitement ait contribué significativement à réduire la morbidité et la mortalité causée par l'infection à VIH (**Palella, F. J., Jr., K. M. Delaney, A. C.**
25 **Moorman, M. O. Loveless, J. Fuhrer, G. A. Satten, D. J. Aschman, and S. D. Holmberg.** 1998. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *HIV Outpatient Study Investigators. N. Engl. J. Med.* **338**:853-60 ; **Vittinghoff, E., S. Scheer, P. O'Malley, G. Colfax, S. D. Holmberg, and S. P. Buchbinder.** 1999. Combination antiretroviral therapy

and recent declines in AIDS incidence and mortality. J. Infect. Dis. **179**:717-20), certains cas d'échec thérapeutique ont été observés.

La possibilité d'amplifier, à partir de l'ARN plasmatique ou de l'ADN cellulaire
5 des individus infectés par le VIH-1 et en échec thérapeutique, a permis de
comprendre au niveau moléculaire, l'inefficacité spontanée ou progressive des
traitements thérapeutiques. La détermination notamment de la séquence
nucléique des deux enzymes virales Transcriptase Inverse et Protéase, a montré
l'apparition d'un certain nombre de mutations. Les résultats obtenus lors des
10 études in vitro, dans lesquelles une souche virale sauvage (donc sensible aux
traitements) portait lesdites mutations, ont clairement démontré l'implication de
ces mutations dans la résistance du virus aux traitements.

Les chercheurs ont donc mené un certain nombre de travaux sur ces
15 mutations ainsi que sur les résistances qu'elles génèrent, afin d'orienter et guider
le choix du traitement thérapeutique et d'optimiser son efficacité.

Malheureusement, les stratégies économiques des laboratoires ont conduit la
plupart du temps au désintéressement général de la communauté scientifique
20 quant au traitement des patients infectés par le VIH-2 (les populations les plus
touchées par le VIH-2 étant principalement celles des pays en voie de
développement), ou ont conduit à des solutions inadaptées : traitements, tests et
analyses trop coûteux, diagnostics trop longs ou impossibles à mettre en œuvre
sur place, absence de structures compétentes dans le pays concerné, etc.

25

Ainsi, les résultats obtenus lors des différentes études menées sur le VIH-2,
ne sont pas suffisamment consistants pour permettre de formuler une corrélation
entre une mutation particulière de la protéase du VIH-2, et un phénotype de
résistance.

30

Par ailleurs, la progression de la maladie étant plus lente chez les individus infectés par le VIH-2 que chez ceux infectés par le VIH-1, le décomptage de cellules T CD4, ainsi que la détermination de la charge virale plasmatique ne rendent pas compte d'une manière rapide de l'émergence de souches résistantes
5 chez les patients sous traitement.

Il existe aujourd'hui trois compagnies qui fournissent le profil de résistance d'une souche de VIH isolée d'un patient infecté. Conceptuellement les trois tests se ressemblent et sont basés sur la capacité de chaque inhibiteur de protéase à
10 inhiber la libération de virus recombinant infectieux comportant la protéase du virus infectant le patient. Les compagnies sont : Viralliance (France), qui produit Phenoscript™, Virco (Belgique) qui produit Antiviogram™, et Virologic (Etats Unis) qui produit PhenoSense™. Dans les trois cas, la réalisation de ces tests requiert une organisation logistique importante, du personnel spécialisé en biologie
15 moléculaire et en virologie, et des infrastructures lourdes du type laboratoire sécurisé P3 (il semblerait qu'un profil complet coûterait actuellement entre 800 et 1000 euros par échantillon). Le délai existant entre le moment où le matériel biologique arrive aux Laboratoires et le moment où le profil de résistance est établi, varie, pour chaque souche de VIH-1, entre deux et trois semaines.

20 Les informations sur ces tests se trouvent aux adresses internet suivantes :
<http://www.vircolab.com>
<http://www.phenosense.com/professional/213a.html>
<http://www.viralliance.com/html/phenoscript1.html>

25 Dans ces conditions, la mise sur le marché d'un test fidèle, rapide, simple à mettre en œuvre et peu onéreux est devenue impérative. Un tel test permettrait d'aider les médecins traitant à suivre l'apparition de souches résistantes chez les patients infectés par des rétrovirus, notamment le VIH 1 ou 2, en particulier pour les populations démunies. Par ailleurs, ce test pourrait également être utilisé pour

une recherche à "haut débit" de nouvelles molécules ayant une activité inhibitrice de la protéase du rétrovirus.

5 L'invention propose de répondre à cette exigence en permettant la définition rapide et à bas coût du phénotype de résistance de la protéase du VIH-2 chez les patients infectés, grâce à l'utilisation de la levure.

10 Le procédé mis au point dans cette invention peut aussi être mis en œuvre pour définir le phénotype de résistance de la protéase du VIH-1, ou de la protéase de tout autre rétrovirus.

15 Un article scientifique apparu en 2003 avait démontré que l'expression de la protéase du VIH-1 par la levure *Saccharomyces cerevisiae* induisait la mort de celle-ci par un mécanisme encore méconnu, ayant pour conséquence la lyse cellulaire de la levure en question (**Blanco, R., Carrasco, L., and Ventoso, I.** 2003. Cell killing by HIV-1 protease. J. Biol. Chem. **278**:1086-93).

20 Nous avons démontré dans notre laboratoire, que le même phénomène se produisait quand les levures exprimaient la protéase du VIH-2.

En conséquence, en inhibant l'activité enzymatique virale par modification de son site catalytique, nous avons réussi à empêcher l'apparition de cet événement cellulaire.

25 De plus, Blanco et collaborateurs (Blanco, R., Carrasco, L., and Ventoso, I. 2003. Cell killing by HIV-1 protease. J. Biol. Chem. 278:1086-93) ont montré aussi que l'inhibition de la protéase du VIH-1 par un des inhibiteurs utilisés en thérapie anti-VIH inhibait la mort cellulaire de la levure, induite par l'expression de la protéase virale. De ce fait, il est possible de mesurer d'une manière quantitative la

sensibilité et la résistance de la protéase d'individus infectés aux différentes molécules inhibitrices.

Le procédé selon l'invention permet donc de déterminer, dans le contexte
5 cellulaire de la levure, le phénotype de sensibilité de la protéase virale de rétrovirus tel que le VIH-2, aux drogues à activité inhibitrice.

Autrement dit, il permet de déterminer la sensibilité ou la résistance d'isolats de rétrovirus tel que le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), aux molécules
10 chimiques ayant une activité inhibitrice sur la protéase virale ou aux traitements thérapeutiques à base d'inhibiteurs de la protéase virale, caractérisé par l'utilisation à cette fin, d'au moins une levure dont la lyse cellulaire est induite par l'expression de la protéase du rétrovirus.

15 Les buts, caractéristiques et avantages ci-dessus du procédé selon l'invention ressortiront mieux encore de la description qui suit.

De façon schématique, le procédé selon l'invention comporte un vecteur d'expression, le choix du système cellulaire, le mode d'expression de protéases
20 d'individus infectés et le test de susceptibilité aux drogues.

Il comprend les étapes suivantes :

- extraction des acides nucléiques (ADN ou ARN) à partir de cellules (sanguines ou autres) prélevées sur l'individu ou l'animal infecté par le
25 rétrovirus, par tout moyen approprié
- amplification des séquences codant pour la protéase du rétrovirus à étudier
- recombinaison du fragment d'ADN, produit final de l'amplification, et d'un vecteur d'expression permettant l'expression de la séquence codant pour la protéase du rétrovirus à étudier sous contrôle d'un promoteur inductible
30 connu, et co-transformation du vecteur recombiné avec au moins une cellule

de levure dont la lyse cellulaire est induite par l'expression de la protéase du rétrovirus

- culture de la ou des cellules de levure co-transformées afin d'obtenir un nombre de transformants suffisant pour effectuer les tests de sensibilité ou de résistance, et récupération des transformants issus de la cellule co-transformée, sur tout support approprié
- incubation des transformants en présence de concentration croissante de chaque inhibiteur de protéase virale à tester
- comptage des cellules vivantes
- déduction du phénotype de résistance

Les séquences codant les cibles thérapeutiques (transcriptase inverse et protéase), ainsi que les protéines dites de structure (la matrice, la capside, la nucléocapside), et l'activité enzymatique Intégrase, se situent à l'intérieur d'un précurseur polypeptidique commun appelé Gag-Pol, codé par le gène viral *gag-pol* (Clavel F, Guyader M, Guetard D, Salle M, Montagnier L, Alizon M. 1986. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. Nature, **324**: 691-5). C'est l'action de la Protéase virale qui, par l'hydrolyse de liaisons peptidiques spécifiques, appelées sites de clivage, encadrant les séquences primaires des différents constituants du précurseur, est responsable de la libération de ces protéines (Oroszlan S, and Luftig RB. 1990. Retroviral proteinases. Curr Top Microbiol Immunol. **157**:153-85). Il a été montré que pour la Protéase du VIH-1, les séquences en acides aminés se situant en amont et en aval du site de clivage jouent un rôle important dans l'événement de reconnaissance de l'enzyme pour son substrat, donc déterminant pour son activité protéolytique (Pettit SC, Simsic J, Loeb DD, Everitt L, Hutchison CA 3rd, Swanstrom R. 1991. Analysis of retroviral protease cleavage sites reveals two types of cleavage sites and the structural requirements of the P1 amino acid. J.Biol.Chem. **266**:14539-47, Pettit SC, Moody MD, Wehbie RS, Kaplan AH, Nantermet PV, Klein CA, Swanstrom R. 1994. The p2 domain of human

immunodeficiency virus type 1 Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions. J Virol. **68**:8017-27, **Moody MD, Pettit SC, Shao W, Everitt L, Loeb DD, Hutchison CA 3rd, Swanstrom R.** 1995. A side chain at position 48 of the human immunodeficiency virus type-1 protease flap provides an additional specificity determinant. Virology. **207**:475-85, **Boross P, Bagossi P, Copeland TD, Oroszlan S, Louis JM, Tozser J.** 1999. Effect of substrate residues on the P2' preference of retroviral proteinases. Eur J Biochem. **264**:921-9.).

10 Les séquences de la protéase amplifiées selon le procédé de l'invention s'entendent de celles codant pour la protéine isolée ou de celles codant pour la protéine et comprenant tout ou partie des séquences d'acides aminés situées en amont et en aval du site de clivage du précurseur protéique dans lequel elles se situent.

15

Les protocoles utilisés en laboratoire en vue d'obtenir des transformants de levure codant pour un gène exogène débutent généralement par une première étape permettant d'obtenir le fragment d'ADN codant pour le gène d'intérêt, soit par amplification génique (technique de PCR), soit par libération dudit gène grâce à l'action des enzymes de restrictions, lesquelles couperont l'ADN contenant la séquence d'intérêt. Cette première étape équivaut en temps, à une demi-journée de travail.

20

Le fragment d'ADN libéré est ensuite sous cloné dans un vecteur d'expression par l'action de l'enzyme ADN Ligase (opération durant une nuit), et le produit de la réaction est amplifié dans une bactérie, après sa transformation (1 jour pour obtenir des bactéries ayant incorporé l'ADN plasmidique, et 1 jour et demi pour obtenir et caractériser le transformant recherché, contenant le plasmide codant pour le gène d'intérêt).

25

30

D'autre part, afin de produire des quantités suffisantes du plasmide contenant le gène d'intérêt en vue de la transformation de la levure, le clone bactérien obtenu dans l'étape précédente a été amplifié (une nuit) et les plasmides ont été purifiés par des méthodes conventionnelles et connues (1 journée).

5

Le plasmide purifié obtenu est ensuite utilisé pour transformer la souche de levure sélectionnée (1/2 journée).

L'obtention de la souche de levure transformée intervient environ 4 jours après l'événement de transformation.

10

En conséquence, en utilisant les protocoles classiques et bien connus de l'homme de l'art permettant d'obtenir une quantité suffisante de transformants de levure pour une étude ultérieure d'un gène d'intérêt, par exemple pour la mise au point d'un test de sensibilité ou de résistance, le temps qui s'écoule entre la

15 préparation du fragment d'ADN codant pour le gène d'intérêt et l'obtention de la souche de levure l'exprimant est au minimum de 8 jours. D'autre part, comme exposé ci-dessus, plusieurs techniques doivent être mises en œuvre.

20 L'importance de ces délais et la multiplicité des techniques utilisées engendrent nécessairement des coûts de production importants, incompatibles avec la mise au point d'un test de sensibilité ou de résistance rapide, simple à mettre en œuvre et peu onéreux.

25 En d'autres termes, les protocoles proposés par l'état de l'art en ce qui concerne l'obtention de transformants de levure ne peuvent répondre à l'exigence posée par l'invention.

30 Les auteurs de la présente invention ont donc dû réfléchir à une technologie innovante, permettant une gestion facile d'un grand nombre d'échantillons, dans le

but notamment de tester rapidement, efficacement et à moindre coût, une grande quantité de protéases issues de différents patients sous traitement.

5 Considérant les études sur la capacité de la levure à réparer des « ADN cassés » (nicked DNA) par le mécanisme de la recombinaison homologue, il a été relevé que lors de cet événement cellulaire, une molécule d'ADN est réparée à un endroit précis de sa séquence, par la mise en place de séquences homologues au site de « cassure », et prises au sein d'une autre molécule d'ADN. En utilisant ce phénomène physiologique, il est possible d'introduire une séquence définie à
10 l'intérieur de l'ADN « cassé », à condition que la séquence définie soit encadrée de part et d'autre, par des séquences identiques à celles situées autour du site de « cassure ».

15 La taille minimale des séquences homologues devant être présentes dans les deux molécules d'ADN pour que l'événement de recombinaison puisse avoir lieu est d'environ 40 paires de bases.

20 Cette technique permet très avantageusement de simplifier l'obtention des transformants, en réduisant notamment le nombre de manipulations, ce qui implique une diminution significative du temps d'expérimentation nécessaire (environ de moitié par rapport aux protocoles connus) ainsi que des coûts de production. La mise en œuvre de cette technique permet également la manipulation d'un grand nombre d'échantillons à la fois.

25 Description détaillée d'un exemple préféré de mise en œuvre du procédé selon l'invention :

30 Cet exemple de mise en œuvre est utilisé de façon privilégiée lorsque la protéase exprimée est la protéine isolée. Lorsque la protéase est exprimée avec tout ou partie des séquences d'acides aminés situées en amont et en aval du site de

clivage du précurseur protéique qui la contient, les amorces et les fragments nucléotidiques exposés ci-dessous seront modifiés en conséquence.

1- Préparation et modification du vecteur d'expression :

5

Le but de la modification est de pouvoir sous-cloner le gène de la protéase de chaque individu étudié et de transformer la levure avec le plasmide obtenu par une procédure simple et rapide (« a single step procedure »).

10

Nous avons créé une version modifiée du vecteur pRS316-Gal1/10, qui comporte le promoteur inductible Gal1/10 en position 5' du site de clonage du gène à exprimer (*Liu,H., Krizek,J. and Bretscher,A. 1992. Construction of a GAL1-regulated yeast cDNA expression library and its application to the identification of genes whose overexpression causes lethality in yeast. Genetics*

15

132:665-673).

De ce fait, le gène est exprimé quand les cellules transformées avec ce vecteur sont en présence de Galactose, et le gène n'est pas exprimé lorsque les cellules transformées sont en présence de Glucose comme source de carbone.

20

Pour que le fragment d'ADN viral amplifié puisse être inséré par recombinaison homologue dans le vecteur d'expression, le vecteur doit être modifié en lui ajoutant, juste après la séquence du promoteur inductible, une amorce 5' d'environ 40 paires de bases, suivi par un site unique de restriction (afin

25 de pouvoir linéariser le vecteur), et une amorce 3' d'environ 40 paires de bases. Bien que ce vecteur modifié et linéarisé soit un bon substrat pour l'événement de recombinaison homologue, la séquence introduite en position 5' (entre le gène et le promoteur) ne doit pas inhiber la transcription du gène.

Pour réaliser la version modifiée du vecteur d'expression pRS316-Gal 1/10, nous avons échangé le fragment BamHI-SacI de ce site par un autre fragment d'ADN encadré lui aussi par les sites de restriction BamHI-SacI qui contient (de 5' à 3') :

- 5 • le site de restriction BamHI, unique dans le vecteur, suivi par
- les 35 à 45 nucléotides de la séquence du VIH-2 situés juste en amont de la protéase, suivis par
- un site de restriction NotI, unique dans le vecteur, suivi par
- les 35 à 45 nucléotides de la séquence du VIH-2 situés juste en aval de la
- 10 protéase, suivis par
- le site de restriction SacI, unique dans le vecteur.

Des modifications de la taille de ce fragment d'environ 80-90 paires de bases ont été effectuées afin d'optimiser le système expérimental de clonage, transformation, et expression. Un seul fragment modifié, parmi 10 différents qui ont été testés, a été suffisamment optimal pour la recombinaison homologe et pour l'expression de la protéase virale.

La séquence de ce fragment est la suivante :

20 5'GGATCCGGAGACACCATACAGGGAGCCACCAACAGCGGCCGCAGTAG
AGCCAATAAAAATAATGCTAAAGCGAGCTC 3'

Le vecteur d'expression pRS316-Gal1/10 ainsi modifié est nommé pRS316-Gal1/10M.

25

2- Choix du système cellulaire :

Toute souche de levures avec les marqueurs d'auxotrophie nécessaires afin de permettre la sélection du transformant exprimant la protéase virale, et de

30 préférence toute souche de *Saccharomyces cerevisiae*.

3- Sous-clonage des protéases d'individus infectés par le rétrovirus, et transformation de levures dans un seul « step ».

5 La séquence d'ADN codant la protéase du VIH-2 est amplifiée par la technique de PCR, deux fois.

La première a pour objet de produire une quantité suffisante d'ADN. Cette réaction se fait à partir d'ADN extraits de lymphocytes du sang périphérique
10 d'individus infectés. Les amorces nucléotidiques utilisées sont du type :

- Amorces sens: 5'GAAAGAAGCCCCGCAACTTC3'
- Amorces antisens : 5'GGGATCCATGTCACTTGCCA3'

La deuxième amplification a pour objet d'encadrer la protéase d'un codon
15 d'initialisation de la transcription (ATG) ainsi que d'un codon de terminaison de la transcription (TAA) et ajouter de part et d'autre les séquences d'environ quarante nucléotides que nous avons apportées au vecteur lors de sa modification. Cette réaction de PCR se fait sur le produit de la première PCR avec les amorces du type :

- 20 • Amorces sens:
- 5'CGAGGATCCGGAGACACCATACAGGGAGCCACCAACAGC
GGCCGCGCCATGCCTCAATTC3'
- Amorces antisens :
- 5'GCGGAGCTCGCTTTAGCATTATTTTATTGGCTCTACTG
25 CGGCCGCTTAA GATT3'

L'encadrement de la protéase par les codons d'initiation et de terminaison est celui de la protéase isolée ou de la protéine comprenant tout ou partie des séquences d'acides aminés situées en amont et en aval du site de clivage du
30 précurseur dans lequel elle se situe.

La co-transformation du vecteur pRS316-Gal1/10M clivé par l'enzyme de restriction NotI avec le produit de la deuxième PCR permet, par l'événement de recombinaison homologue qui a lieu dans la cellule, d'obtenir une cellule de levure transformée, portant la séquence de la protéase du VIH-2 sous contrôle du promoteur inductible Gal (figures 1 et 2)

4- Le test

On prélève un échantillon de sang périphérique de l'individu infecté par le VIH-2. Les lymphocytes issus de ce prélèvement sont purifiés ou non, et leur ADN extrait par les méthodes connues.

Cet ADN subi les deux réactions de PCR précitées afin de créer le fragment d'ADN, portant la séquence de la protéase avec ou non les ou une partie des séquences d'acides aminés situées en amont et en aval du site de clivage du précurseur dans lequel elle se situe, et compatible avec le vecteur d'expression pour induire le phénomène de recombinaison homologue dans la cellule transformée.

Après purification du produit de la deuxième PCR une souche de levure ayant un génotype *ura3* est co-transformée avec le vecteur pRS316Gal1/10M linéaire (par son site NotI).

Les transformants produisant potentiellement la protéase sont récupérés sur tout support approprié, tel que par exemple la gélose, composée d'agar, de glucose comme source de carbone, et d'un milieu synthétique carencé en uracile.

Environ 10^5 cellules, issues d'un seul transformant, sont déposées et réparties dans douze puits d'une plaque à 96 puits, et incubées en galactose en présence

de 11 concentrations croissantes de chaque inhibiteur à tester. Le douzième puits ne contient pas d'inhibiteur.

Après 36-48 heures à 30°C, les cellules vivantes sont dénombrées par une
5 lecture densitométrique à 600nm (figure 3).

La dose nécessaire pour inhiber de moitié la croissance cellulaire dans ces conditions, par rapport à la croissance cellulaire en absence de drogues et en présence de glucose (IC₅₀) définit la susceptibilité ou résistance de cette souche
10 spécifique.

L'intervalle de temps entre la prise de sang et la définition du profil de résistance est seulement d'une semaine.

15 Kit de diagnostic de résistance aux rétrovirus

Entre également dans le cadre de l'invention, un kit de diagnostic pour la mise en œuvre du procédé selon l'invention, pour déterminer la sensibilité ou la résistance d'isolats de rétrovirus aux traitements thérapeutiques rétroviraux à base
20 d'inhibiteurs de la protéase virale caractérisé en ce qu'il comprend :

- des amorces nucléotidiques, et par exemple des amorces nucléotidiques telles que précédemment exposées pour la mise en œuvre de l'amplification de l'ADN codant pour la protéase du rétrovirus par la technique de PCR, à
25 savoir :

- pour la première amplification, amorces du type :
Amorce sens: 5'GAAAGAAGCCCCGCAACTTC3'
Amorce antisens : 5'GGGATCCATGTCACTTGCCA3'
- pour la seconde amplification, amorces du type :
30 Amorce sens:

5'CGAGGATCCGGAGACACCATACAGGGAGCCACCAACAG
CGGCCGCGCCATGCCTCAATTC3'

Amorce antisens :

5'GCGGAGCTCGCTTTAGCATTATTTTATTGGCTCTACTG
5 CGGCCGCTTAA GATT3'

- au moins un vecteur d'expression et par exemple le plasmide modifié et linéarisé selon le procédé de l'invention et tel que précédemment décrit
- au moins une souche de levures avec les marqueurs d'auxotrophie
10 nécessaires afin de permettre la sélection du transformant exprimant la protéase virale, et de préférence une souche de *Saccharomyces cerevisiae*
- au moins une plaque multipuits ou tout autre support approprié.

15 Il est entendu que lorsque l'amplification est effectuée sur l'ADN codant pour la protéase du rétrovirus avec tout ou partie des séquences d'acides aminés situées en amont et en aval du site de clivage du précurseur protéique qui la contient, les amorces et les fragments nucléotidiques seront modifiés en conséquence.

20 Le principe du kit, également illustré en figure 4, est le suivant :

A partir du sang du patient, le gène codant pour la protéase virale est amplifié par une réaction de RT-PCR avec les amorces décrites dans le procédé selon l'invention et fournies dans le kit.

25

L'amplification du gène de la protéase virale à partir de l'ADN cellulaire est également possible.

Le produit amplifié et le vecteur modifié et linéarisé (également fourni dans le kit) sont utilisés pour transformer une souche de levure, aussi fourni dans le kit, dans une plaque multipuits.

- 5 De façon préférée quoique nullement limitative, après une incubation à 30°C en étuve sèche en milieu sélectif contenant du Glucose, 2 microlitres de la suspension cellulaire sont transférés à une nouvelle plaque, fourni dans le kit, contenant des concentrations croissantes de chaque principe actif utilisé en
10 thérapie. 300 microlitres du milieu sélectif contenant du galactose sont ajoutés à chaque puits, avant d'être incubé à 30°C en étuve sèche pendant 36-48 heures.

- A la fin de l'incubation, les cellules vivantes sont dénombrées par une lecture densitométrique à 600nm. La dose nécessaire pour inhiber de moitié la croissance cellulaire, par rapport à la croissance cellulaire de la souche de levure n'exprimant
15 pas la protéase virale, définira l'IC₅₀ pour chaque inhibiteur. La comparaison entre les IC₅₀ obtenus et ceux d'une protéase sauvage de référence permet de déterminer l'éventuel phénotype de résistance.

- L'intervalle de temps entre la prise de sang et la définition du profil de
20 résistance est d'une semaine seulement.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour déterminer la sensibilité ou la résistance d'isolats de rétrovirus tel que le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), aux molécules chimiques ayant une activité inhibitrice sur la protéase virale ou aux traitements thérapeutiques à base d'inhibiteurs de la protéase virale, caractérisé par l'utilisation à cette fin, d'au moins une levure dont la lyse cellulaire est induite par l'expression de la protéase du rétrovirus
2. Procédé pour déterminer la sensibilité ou la résistance d'isolats de rétrovirus tel que le VIH, aux molécules chimiques ayant une activité inhibitrice sur la protéase virale ou aux traitements thérapeutiques à base d'inhibiteurs de la protéase virale, selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- extraction des acides nucléiques (ADN ou ARN) à partir de cellules (sanguines ou autres) prélevées sur l'individu ou l'animal infecté par le rétrovirus, par tout moyen approprié
 - amplification des séquences codant pour la protéase du rétrovirus à étudier, avec ou non les ou une partie des séquences d'acides aminés situées en amont et en aval du site de clivage du précurseur dans lequel elles se situent
 - recombinaison du fragment d'ADN, produit final de l'amplification, et d'un vecteur d'expression permettant l'expression de la séquence codant pour la protéase du rétrovirus à étudier sous contrôle d'un promoteur inductible connu, et co-transformation du vecteur recombiné avec au moins une cellule de levure dont la lyse cellulaire est induite par l'expression de la protéase du rétrovirus
 - culture de la ou des cellules de levure co-transformées afin d'obtenir un nombre de transformants suffisant pour effectuer les tests de sensibilité ou

de résistance, et récupération des transformants issus de la cellule co-transformée sur tout support approprié

- incubation des transformants en présence de concentration croissante de chaque inhibiteur de protéase virale à tester
- 5 - comptage des cellules vivantes
- déduction du phénotype de résistance

3. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que l'amplification des séquences codant pour la protéase du rétrovirus à étudier consiste en :

- 10 a. une première amplification par la technique de PCR à partir d'ADN extraits de lymphocytes du sang périphériques d'individus infectés, en utilisant les amorces nucléiques du type :

- Amorce sens: 5'GAAAGAAGCCCCGCAACTTC3'
- Amorce antisens : 5'GGGATCCATGTCACTTGCCA3'

- 15 b. une seconde amplification par la technique de PCR à partir des produits de la première amplification, en utilisant les amorces nucléiques du type :

- Amorce sens:
5'CGAGGATCCGGAGACACCATACAGGGAGCCACCAACAGC
GGCCGCGCCATGCCTCAATTC3'

- 20 • Amorce antisens :
5'GCGGAGCTCGCTTTAGCATTATTTTATTGGCTCTACTG
CGGCCGCTTAA GATT3'

25 4. Procédé selon la revendication 2 ou 3 caractérisé en ce que le vecteur d'expression utilisé est le plasmide pRS316-Gal1/10

5. Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que le vecteur d'expression utilisé est le plasmide pRS316-Gal1/10, comportant le promoteur inductible Gal1/10 en position 5' du site de clonage du gène à exprimer, et dans lequel le

fragment BamHI-SacI est remplacé par un autre fragment d'ADN consistant en (de 5' à 3') :

- le site de restriction BamHI, unique dans le vecteur, suivi par
- les 35 à 45 nucléotides de la séquence du retrovirus situés juste en amont de la protéase, suivis par
- un site de restriction NotI, unique dans le vecteur, suivi par
- les 35 à 45 nucléotides de la séquence du rétrovirus situés juste en aval de la protéase, suivis par
- le site de restriction SacI, unique dans le vecteur.

6. Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que les 35 à 45 nucléotides de la séquence du retrovirus situés juste en amont de la protéase et inclus dans le vecteur d'expression modifié pRS316-Gal1/10M, sont du type :

5'GGATCCGGAGACACCATACAGGGAGCCACCAACAGCGGCC 3'

et les 35 à 45 nucléotides de la séquence du rétrovirus situés juste en aval de la protéase et inclus dans le vecteur d'expression modifié pRS316-Gal1/10M, sont du type : 5' GCAGTAGAGCCAATAAAAATAATGCTAAAGCGAGCTC 3'

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 caractérisé en ce que la levure utilisée est du genre *Saccharomyces cerevisiae*

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 7 caractérisé en ce que le milieu de culture des cellules de levure co-transformées est carencé en glucose

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 8 caractérisé en ce que l'incubation des transformants est en galactose

10. Kit de diagnostic pour la mise en œuvre du procédé selon les revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend :

- des amorces nucléotidiques, et par exemple des amorces nucléotidiques selon la revendication 3, à savoir :

- pour la première amplification, amorces du type :

5

Amorce sens: 5'GAAAGAAGCCCCGCAACTTC3'

Amorce antisens : 5'GGGATCCATGTCACTTGCCA3'

- pour la seconde amplification, amorces du type :

Amorce sens:

10

5'CGAGGATCCGGAGACACCATACAGGGAGCCACCAACAG
CGGCCGCGCCATGCCTCAATTC3'

Amorce antisens :

5'GCGGAGCTCGCTTTAGCATTATTTTATTGGCTCTACTG
CGGCCGCTTAA GATT3'

15

- au moins un vecteur d'expression et par exemple le plasmide modifié et linéarisé selon les revendications 4 à 6
- au moins une souche de levures avec les marqueurs d'auxotrophie nécessaires afin de permettre la sélection du transformant exprimant la protéase virale, et de préférence une souche de *Saccharomyces cerevisiae*
- au moins une plaque multipuits ou tout autre support approprié

20

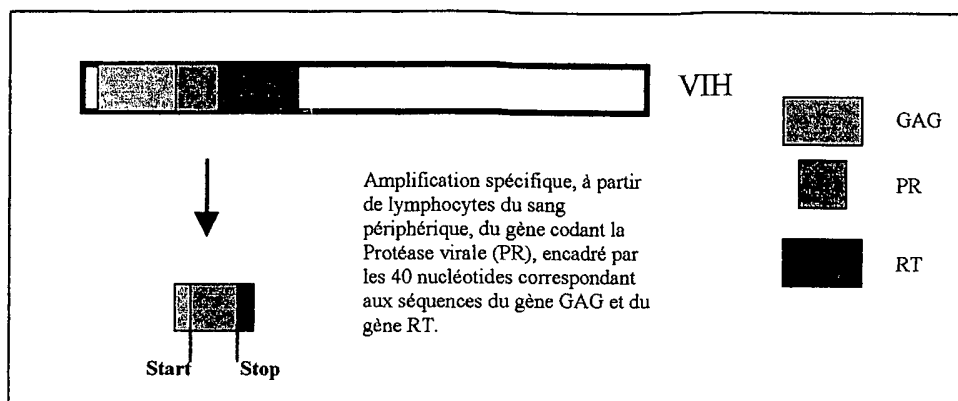


Figure 1

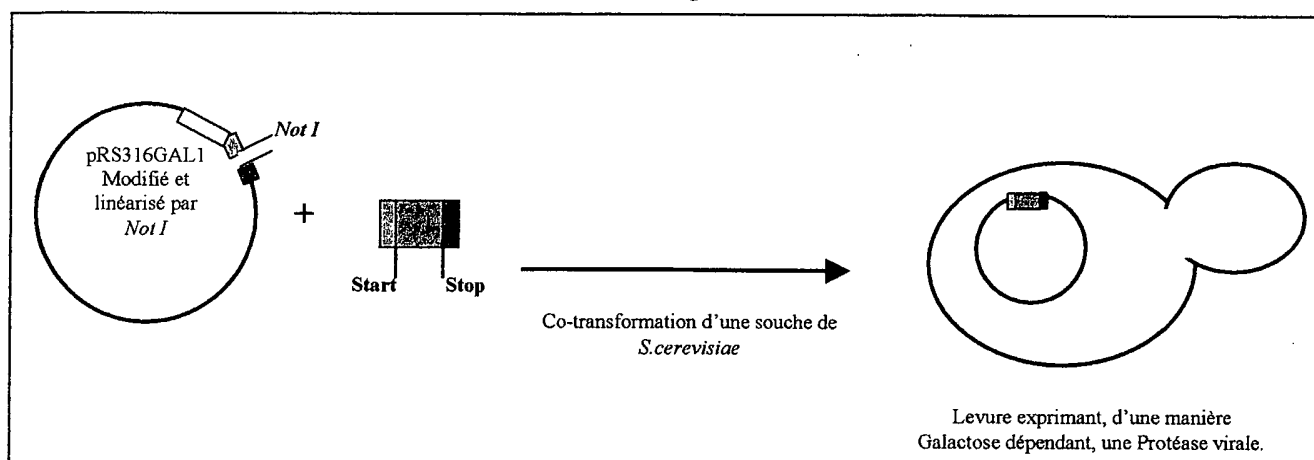


Figure 2

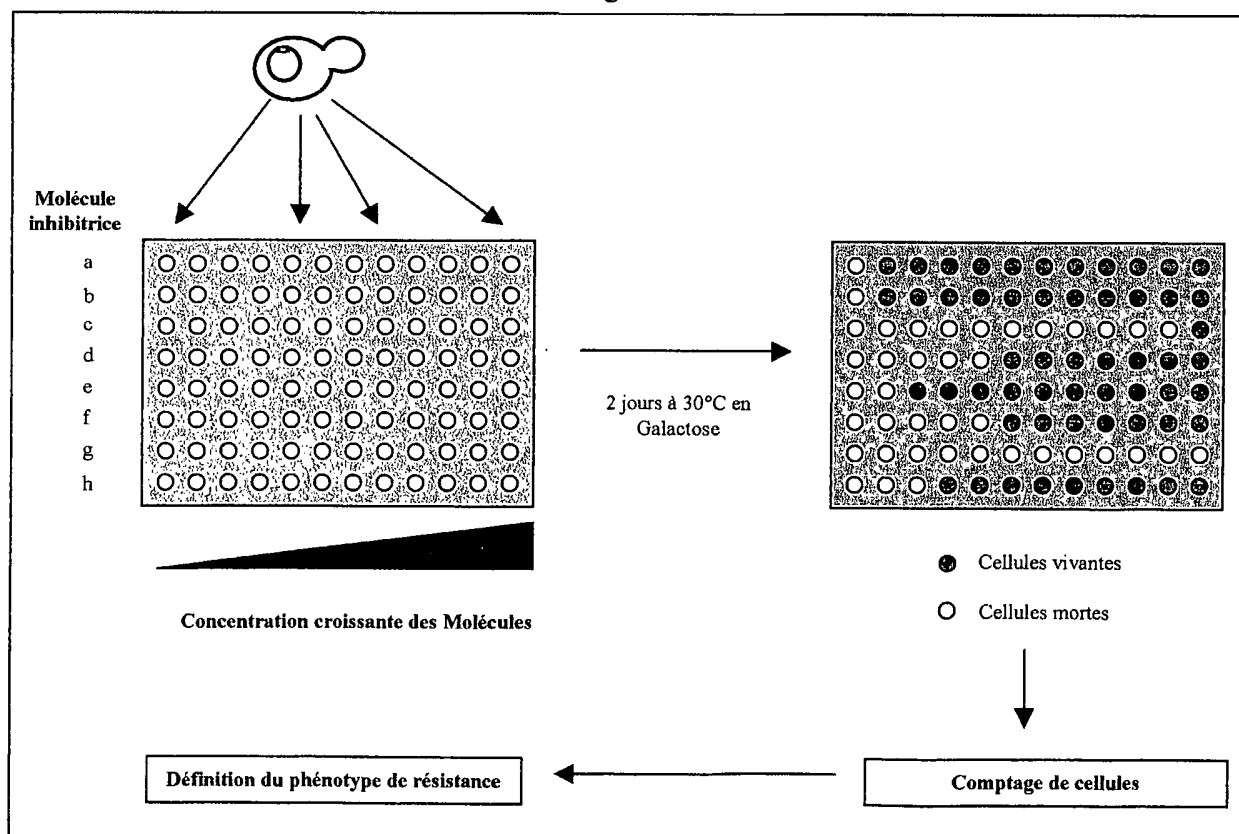


Figure 3

2/2

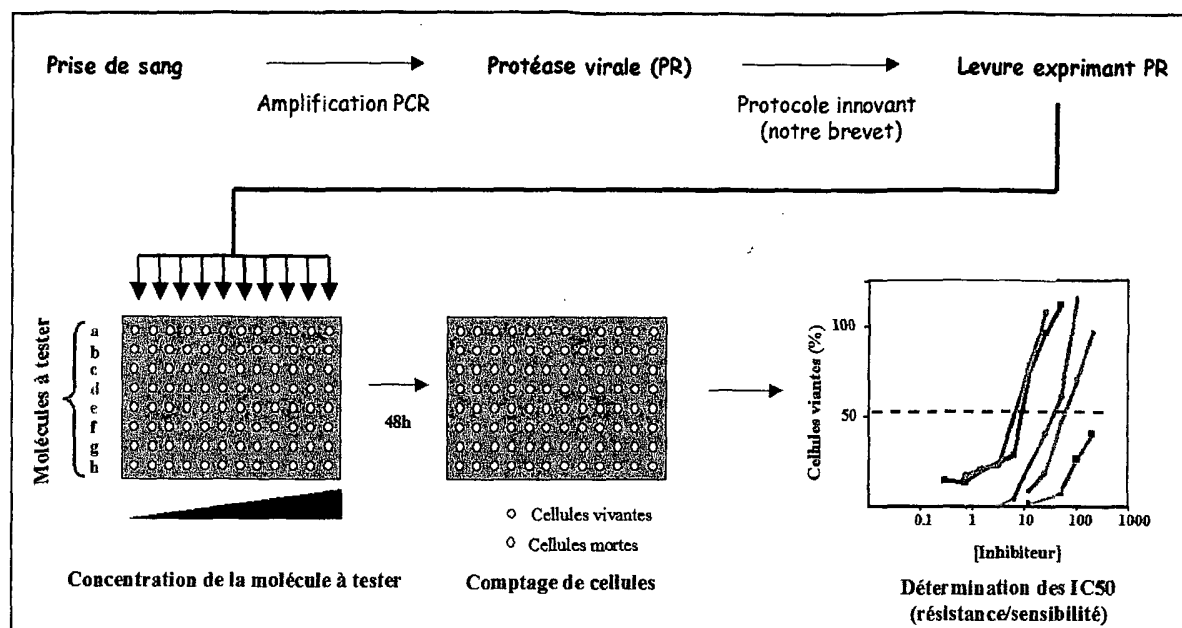


figure 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/001356

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/569 C12Q1/37

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 G01N C12Q

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, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FR 2 729 973 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS) 2 August 1996 (1996-08-02) claims 1-11	1-10
Y	BLANCO RAQUEL ET AL: "Cell killing by HIV-1 protease." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 278, no. 2, 10 January 2003 (2003-01-10), pages 1086-1093, XP002321982 ISSN: 0021-9258 abstract	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ 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 or 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

Y 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.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 October 2005

Date of mailing of the international search report

24/10/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Jacques, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2005/001356

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIU HAOPING ET AL: "Construction of a GAL1-regulated yeast cDNA expression library and its application to the identification of genes whose overexpression causes lethality in yeast" GENETICS, vol. 132, no. 3, 1992, pages 665-673, XP002348754 ISSN: 0016-6731 the whole document	4-6,10
A	----- BARCO ANGEL ET AL: "Poliovirus 2A-pro expression inhibits growth of yeast cells" FEBS LETTERS, vol. 371, no. 1, 1995, pages 4-8, XP002321983 ISSN: 0014-5793 the whole document	1-10
A	----- MURRAY M G ET AL: "INACTIVATION OF A YEAST TRANSACTIVATOR BY THE FUSED HIV-1 PROTEINASE: A SIMPLE ASSAY FOR INHIBITORS OF THE VIRAL ENZYME ACTIVITY" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM, NL, vol. 134, no. 1, 1993, pages 123-128, XP002926686 ISSN: 0378-1119 abstract -----	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR2005/001356

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2729973	A	02-08-1996	NONE

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR2005/001356

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 G01N33/569 C12Q1/37

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 G01N C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	FR 2 729 973 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS) 2 août 1996 (1996-08-02) revendications 1-11	1-10
Y	BLANCO RAQUEL ET AL: "Cell killing by HIV-1 protease." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 278, no. 2, 10 janvier 2003 (2003-01-10), pages 1086-1093, XP002321982 ISSN: 0021-9258 abrégé	1-10

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ 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
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *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)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

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

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention 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

& document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 octobre 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

24/10/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Jacques, P

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	LIU HAOPING ET AL: "Construction of a GAL1-regulated yeast cDNA expression library and its application to the identification of genes whose overexpression causes lethality in yeast" GENETICS, vol. 132, no. 3, 1992, pages 665-673, XP002348754 ISSN: 0016-6731 le document en entier -----	4-6,10
A	BARCO ANGEL ET AL: "Poliovirus 2A-pro expression inhibits growth of yeast cells" FEBS LETTERS, vol. 371, no. 1, 1995, pages 4-8, XP002321983 ISSN: 0014-5793 le document en entier -----	1-10
A	MURRAY M G ET AL: "INACTIVATION OF A YEAST TRANSACTIVATOR BY THE FUSED HIV-1 PROTEINASE: A SIMPLE ASSAY FOR INHIBITORS OF THE VIRAL ENZYME ACTIVITY" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM, NL, vol. 134, no. 1, 1993, pages 123-128, XP002926686 ISSN: 0378-1119 abrégé -----	1-10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs à : Membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR2005/001356

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2729973	A	02-08-1996	AUCUN