



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : G01N 33/566, 33/569, 33/571, 33/576	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/18569 (43) Date de publication internationale: 18 août 1994 (18.08.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00142 (22) Date de dépôt international: 9 février 1994 (09.02.94) (30) Données relatives à la priorité: 93/01400 9 février 1993 (09.02.93) FR (71)(72) Déposants et inventeurs: STEFAS, Elie [FR/FR]; 94, allée des Fauvettes, F-34280 La Grande-Motte (FR). RUCHETON, Marcel [FR/FR]; 10, rue de la Confrérie, F-34000 Montpellier (FR). GRAAFLAND, Hubert [FR/FR]; 10 A, avenue du Professeur-Grasset, F-34000 Montpellier (FR). (74) Mandataires: PEUSCET, Jacques etc.; Cabinet Peuscet et Autres, 68, rue d'Hauteville, F-75010 Paris (FR).		(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: METHOD FOR DETECTING VIRAL COMPOUNDS USING A GLYCOPROTEIN (54) Titre: PROCEDE DE DETECTION DE COMPOSES VIRAUX AU MOYEN D'UNE GLYCOPROTEINE (57) Abstract A method for detecting and/or assaying viral compounds, wherein the viral compounds are bound with $\beta 2'$-glycoprotein I which is a glycoprotein having a molecular weight of $50,000 \pm 3,000$ daltons from the method for producing albumin obtained as a blood plasma by-product according to FR-A 2 690 444. Viral compound separation may be simplified by binding the $\beta 2'$-glycoprotein I to a preferably solid support or by binding the viral compounds to a support and exposing same with the $\beta 2'$-glycoprotein I conjugated with a marker. A solid support to which at least the $\beta 2'$-glycoprotein I is bound, is also disclosed. (57) Abrégé Procédé de détection et/ou de dosage de composés viraux dans lequel on fixe les composés viraux à l'aide de la $\beta 2'$-glycoprotéine I qui est une glycoprotéine ayant un poids moléculaire de 50000 ± 3000 daltons du procédé de fabrication de l'albumine obtenue comme sous-produit de plasma sanguin selon FR-A 2 690 444. Pour faciliter la séparation des composés viraux, on fixe la $\beta 2'$-glycoprotéine I sur un support, de préférence solide, ou on fixe les composés viraux sur un support et on le révèle avec la $\beta 2'$-glycoprotéine I conjuguée à un marqueur. Support solide sur lequel est fixée au moins la $\beta 2'$-glycoprotéine I.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

PROCÉDE DE DETECTION DE COMPOSES VIRAUX AU MOYEN D'UNE GLYCOPROTEINE.

La présente invention concerne un procédé de détection
5 et/ou de dosage de composés viraux et un support portant au moins une glycoprotéine.

Selon la présente invention, on entend par composé viral
aussi bien les composés, en particulier protéiniques, constitutifs d'un
virus, que des particules de type viral. Les particules de type viral sont,
10 ou des virions, complets ou incomplets, ou des parties de virion, ou des
assemblages contenant des composés constitutifs de virus, qui
présentent certaines propriétés des virus ou des composés viraux ; en
particulier, ils sont détectés par certains anticorps spécifiques de
composés viraux ou pourraient être apparentés à ces composés viraux.

15 Selon la présente invention, on a trouvé que certains
composés viraux se fixaient de façon spécifique sur une glycoprotéine :
la $\beta 2'$ -glycoprotéine I ou une composition protéinique contenant la $\beta 2'$ -
glycoprotéine I. La $\beta 2'$ -glycoprotéine I est la glycoprotéine décrite dans
la demande de brevet français déposée sous le n° 93 01399 par les
20 mêmes demandeurs le 9 Février 1993. La $\beta 2'$ -glycoprotéine I se fixe
sur la membrane de particules virales, ainsi que sur certains composés
ou surfaces chimiques ou biologiques. Selon la présente invention, on
utilise cette propriété pour capter et isoler les composés viraux, ce qui
permet de les détecter et/ou de les doser.

25 La présente invention a donc pour objet un procédé de
détection et/ou de dosage de composés viraux, caractérisé par le fait
qu'on fixe les composés viraux à l'aide de la $\beta 2'$ -glycoprotéine I.

Selon l'invention, la $\beta 2'$ -glycoprotéine I peut être utilisée
pure ou sous forme de composition protéinique contenant en particulier
30 d'autres glycoprotéines, éventuellement d'autres $\beta 2$ -glycoprotéines.
Cette composition peut, en particulier, être celle obtenue par élution
d'une colonne d'affinité sur un gel portant des groupes sulfates comme
décrit dans la demande de brevet français 93 01399.

Selon un premier mode de mise en oeuvre du procédé, on
35 fixe la $\beta 2'$ -glycoprotéine I sur un support, on fixe ensuite sur la $\beta 2'$ -
glycoprotéine I un composé viral, contenu dans un fluide biologique ou

extrait d'un tissu biologique, de façon à séparer ledit composé viral des composés qui ne sont pas susceptibles de se fixer sur la $\beta 2'$ -glycoprotéine I, et on détecte et/ou on dose le composé viral fixé sur la $\beta 2'$ -glycoprotéine I par tout procédé de détection et/ou de dosage de ce composé viral.

Selon un second mode de mise en oeuvre du procédé, on fixe le composé viral sur un support et on le révèle avec la $\beta 2'$ -glycoprotéine I conjuguée à un marqueur. Le composé viral peut être fixé, soit directement sur le support, soit indirectement, par exemple par l'intermédiaire d'un anticorps. Le marqueur peut, avantageusement, être une enzyme ou un produit radioactif.

La $\beta 2'$ -glycoprotéine I est la glycoprotéine isolée à partir du résidu fixé sur la (les) colonne(s) de chromatographie d'affinité utilisée(s) dans le procédé de purification de l'albumine du plasma sanguin décrit dans FR-A 2 690 444. Selon ce document, on sépare l'albumine des autres protéines par un procédé chromatographique en phase liquide, dans lequel on fait passer la solution aqueuse contenant l'albumine dans au moins une colonne de chromatographie dite "hydrophobe" remplie d'un matériau particulière apte à retenir une partie des protéines autres que l'albumine ; pour compléter la séparation, on propose également de faire passer la solution aqueuse d'albumine dans au moins une colonne de chromatographie d'affinité contenant un support particulière neutre ou voisin de la neutralité chargé d'un composé polysulfaté. L'effluent obtenu par ce procédé est constitué par une solution d'albumine purifiée, la majeure partie des protéines autres que l'albumine étant fixée, soit sur la (les) colonne(s) de chromatographie hydrophobe, soit sur la (les) colonne(s) de chromatographie d'affinité.

En soumettant le support de la (des) colonne(s) de chromatographie d'affinité précitée(s) à une élution, de préférence à une élution par augmentation de la force ionique, on obtient une composition protéinique dont le contenu protéinique comporte de 5 à 100 % en poids de $\beta 2'$ -glycoprotéine I.

La $\beta 2'$ -glycoprotéine I a un poids moléculaire de 50 000 $\pm$ 3 000 daltons, les 20 premiers acides aminés de la région N-terminale de la $\beta 2'$ -glycoprotéine I sont les suivants :

Gly-Arg-Thr-Cys-Pro-Lys-Pro-Asp-Asp-Leu-Pro-Phe-Ser-Thre-Val-Val-Pro-Leu-Lys-Thre et la séquence des acides aminés 315 à 321 est Phe-Trp-Lys-Ser-Asp-Ala-Ser.

Les composés viraux susceptibles d'être reconnus par la $\beta 2'$ -glycoprotéine I peuvent plus particulièrement provenir des virus suivants : de préférence virus de l'hépatite virale B (HBV), virus de l'immunodéficience humaine (HIV₁ et HIV₂), également virus de l'immunodéficience du singe (SIV) ou virus de l'herpès simplex (HSV) ou peuvent être des particules ou des protéines d'origine virale, ou apparentées, présentes dans certaines leucémies ou myélomes ou dans le syndrome de Gougerot-Sjögren.

Selon le premier mode de mise en oeuvre du procédé selon l'invention, on fixe d'abord la $\beta 2'$ -glycoprotéine I sur un support. Il faut noter que lorsque l'on utilise une composition protéinique contenant la $\beta 2'$ -glycoprotéine I et d'autres glycoprotéines, ces autres glycoprotéines peuvent également se fixer sur le support. On utilise, de préférence, un support solide, plus particulièrement constitué par une microplaque de titration, par exemple une microplaque ELISA.

La fixation de la $\beta 2'$ -glycoprotéine I (et éventuellement d'autres glycoprotéines) sur le support se fait par réaction de groupes réactifs de la glycoprotéine avec des sites réactifs du support. Cette réaction est, de préférence, effectuée à une température de 0 à 40°C, la $\beta 2'$ -glycoprotéine I étant, de préférence, mise dans un tampon ayant un pH compris entre 4,5 et 10,5, de préférence entre 5,5 et 6,5. Le tampon peut être du type phosphate ou acétate. La solution obtenue a avantageusement une concentration comprise entre 0,01 à 100 mg/l de $\beta 2'$ -glycoprotéine I. Le support est avantageusement maintenu en contact avec le tampon contenant la $\beta 2'$ -glycoprotéine I à une température de 0 à 40°C et pendant un temps d'incubation compris entre 30 minutes et 24 heures.

Après incubation, on sépare du support le tampon contenant la $\beta 2'$ -glycoprotéine I (et éventuellement les autres glycoprotéines) n'ayant pas réagi et on effectue un lavage du support, de préférence, avec le même tampon que celui qui contenait la $\beta 2'$ -glycoprotéine I. Il peut être nécessaire de saturer les sites actifs du support qui n'ont pas réagi avec la $\beta 2'$ -glycoprotéine I (ou d'autres

glycoprotéines). Dans ce cas, on fait réagir sur ces sites actifs d'autres groupes actifs. On utilise avantageusement, dans ce but, une solution d'albumine sérique bovine ou de caséine, en particulier une solution à 2 % dans le tampon utilisé pour la $\beta 2'$ -glycoprotéine I. Après réaction, le support est, également, de préférence, rincé et séché.

Le support sur lequel est fixée au moins la $\beta 2'$ -glycoprotéine I (et éventuellement d'autres glycoprotéines) est ensuite mis en contact avec un fluide biologique susceptible de contenir des composés viraux. Ce fluide est, soit préparé à partir d'organes ou de liquides biologiques d'un malade atteint d'une pathologie virale, soit, provient de surnageants de cultures virales "in vitro". Le liquide biologique peut être un sérum, de l'urine, du liquide céphalorachidien, du liquide synovial, du liquide péritonéal, du liquide pleural, du liquide séminal ou du liquide ascitique. On utilise, de préférence, un plasma sanguin ou sérum. On dilue, de préférence, le fluide biologique à l'aide d'un tampon donnant un pH compris entre 4,5 et 10, avantageusement 5,6. La réaction est, de préférence, effectuée à une température de 0°C à 42°C, avantageusement voisine de 37°C, pendant une période de 30 minutes à 24 heures. On sépare ensuite le fluide biologique et le support portant la $\beta 2'$ -glycoprotéine I (et éventuellement d'autres glycoprotéines), qui a éventuellement fixé un composé viral. On effectue éventuellement ensuite un lavage avec une solution, tamponnée de préférence.

La détection et/ou le dosage du composé viral fixé sur la $\beta 2'$ -glycoprotéine I peuvent se faire par tout moyen connu, tel l'infectiosité ou la détection d'acides nucléiques spécifiques par la technique dite "Polymerase Chain Reaction (PCR)". Cette technique est, par exemple, décrite dans l'article de MULLIS K.B. et FALOONA F.A. dans *Methods Enzymol.* 1987 155 pages 335-350. La détection et/ou le dosage se font, de préférence, à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement des protéines des composés viraux à détecter. De façon connue, cet anticorps peut être conjugué à un marqueur enzymatique, par exemple de la peroxydase. L'excès d'anticorps est éliminé par lavage. On ajoute ensuite, de façon connue, un substrat spécifique de l'enzyme conjuguée à l'anticorps, substrat qui se transforme, dans des conditions fixées, en un produit coloré. La

formation dudit composé coloré indique la présence du composé viral recherché et permet un dosage de ce composé viral.

Selon le second mode de mise en oeuvre du procédé selon l'invention, on fixe le composé viral sur un support solide qui peut être
5 une membrane, par exemple de nitrocellulose ou une microplaque de titration, par exemple une microplaque ELISA.

La fixation du composé viral sur le support se fait par réaction de groupes réactifs du composé viral sur les sites réactifs du support lorsque la fixation est directe, ou par fixation d'un composé,
10 par exemple un anticorps, sur les sites réactifs du support et fixation du composé viral sur ledit composé fixé sur le support. Cette réaction est, de préférence, effectuée à une température de 0 à 40°C, le composé viral étant de préférence mis dans un tampon ayant un pH compris entre 4,5 et 10,5, de préférence entre 6,5 et 7,5. Le tampon peut être
15 du type phosphate ou acétate. Le support est avantageusement maintenu en contact avec le tampon contenant le composé viral à une température de 0 à 40°C et pendant un temps d'incubation compris entre 30 minutes et 24 heures.

Après incubation, on sépare du support le tampon
20 contenant le composé viral n'ayant pas réagi et on effectue un lavage du support, de préférence avec le même tampon que celui qui contenait le composé viral. Il peut être nécessaire de saturer les sites actifs du support qui n'ont pas réagi avec le composé viral. Dans ce cas, on fait réagir sur ces sites actifs d'autres groupes actifs. On utilise
25 avantageusement, dans ce but, une solution d'albumine sérique bovine ou de caséine. Après réaction, le support est également, de préférence, rincé et séché.

Le support sur lequel est fixé le composé viral est ensuite mis en contact avec une solution de $\beta 2'$ -glycoprotéine I conjuguée à un
30 marqueur. On dilue, de préférence, la solution contenant la $\beta 2'$ -glycoprotéine I à l'aide d'un tampon donnant un pH compris entre 4,5 et 10, avantageusement 5,6. La réaction est, de préférence, effectuée à une température de 0°C à 42°C, avantageusement voisine de 37°C pendant une période 30 minutes à 24 heures. On sépare
35 ensuite la solution contenant la $\beta 2'$ -glycoprotéine I qui n'a pas réagi du support portant le composé viral qui a éventuellement fixé la

$\beta 2'$ -glycoprotéine I. On effectue éventuellement ensuite un lavage avec une solution, tamponnée de préférence.

La détection et/ou le dosage du composé viral reconnu par la $\beta 2'$ -glycoprotéine I est effectué en ajoutant un substrat spécifique du marqueur conjugué à la $\beta 2'$ -glycoprotéine I lorsque le marqueur est une enzyme ou par mesure de la radioactivité lorsque le marqueur est radioactif.

Les exemples ci-après, donnés à titre purement illustratif et non limitatif, permettront de mieux comprendre l'invention.

10 EXEMPLE 1 Détection du virus de l'hépatite B

A) Fixation de la $\beta 2'$ -glycoprotéine I sur un support

Le support utilisé est une plaque de microtitration de type micro-ELISA à 96 puits à fond plat, commercialisée par la société "DYNATECH". On prépare une solution de $\beta 2'$ -glycoprotéine I ayant une concentration de 10 microgrammes/ml ($\mu\text{g/ml}$) dans un tampon acétate contenant 0,05 mole/l d'acide acétique et d'acétate et ayant un pH de $5,6 \pm 0,05$.

On dépose 100 μl de cette solution au fond de chaque puits de la microplaque. Celle-ci est ensuite incubée à $+4^\circ\text{C}$ pendant 18 heures. Le liquide de chaque puits est ensuite aspiré. On introduit ensuite dans chaque puits 300 à 400 μl de tampon phosphate contenant 0,01 mole/l de phosphates monosodique et disodique et 0,15 mole/l de chlorure de sodium et ayant un pH de $7,00 \pm 0,05$. On laisse en contact avec le support pendant 3 minutes et on aspire le tampon ; cette opération de lavage est effectuée 3 fois.

Pour saturer les sites de la microplaque éventuellement encore actifs, on dispose dans chaque puits 200 μl d'une solution d'albumine bovine à 2 % en poids dans le tampon phosphate décrit ci-dessus. La microplaque est ensuite incubée à 37°C pendant 90 minutes. La solution contenue dans chaque puits est ensuite aspirée. On effectue ensuite un lavage en introduisant 300 à 400 μl de tampon phosphate par puits, puis en laissant en contact la solution pendant 3 minutes, et pour finir, en aspirant la solution ; cette opération de lavage est répétée 5 fois. On fait ensuite sécher la plaque.

La plaque sur laquelle est fixée la $\beta 2'$ -glycoprotéine I est ensuite stockée à $+4^\circ\text{C}$ ou à -20°C .

B) Fixation de composés viraux

On a utilisé 48 échantillons de sérum sanguin de malades atteints d'hépatite virale B contenant l'antigène du virus HBV (AgHB_s) et à titre comparatif 48 échantillons de sérum sanguin de donneurs
5 sains. Chaque échantillon sérique est dilué 100 fois. La dilution est effectuée à l'aide d'un tampon (acide acétique/acétate de sodium) ayant une concentration en acétate et acide acétique de 0,05 mole/l et un pH de $5,6 \pm 0,05$. On dépose 100 μ l de solution au fond de chaque puits de la plaque préparée et stockée selon A. La plaque est incubée à
10 $+37^{\circ}\text{C}$ pendant une période de 90 minutes. Après cette incubation, on effectue un lavage en introduisant 300 μ l de tampon phosphate dans chaque puits, on laisse en contact pendant 2 minutes et on aspire la solution de tampon ; on renouvelle cette opération de lavage 3 fois.

C) Détection de composés viraux

On ajoute par puits 100 μ l d'une solution d'anticorps
15 monoclonal spécifique contre AgHB_s du virus de l'hépatite B conjugué à la peroxydase. On laisse la plaque incuber à 37°C pendant 60 minutes. A la suite de cette incubation, le contenu des puits de la plaque est aspiré. On introduit 300 μ l de tampon phosphate dans chaque
20 puits et après un temps de contact de 2 minutes, on aspire le tampon : cette opération de lavage est renouvelée 3 fois.

On ajoute par puits 100 μ l d'une solution d'o-phénylène-
diamine, 2HCl dans un tampon de citrate de sodium. On laisse incuber
pendant 30 minutes à température ambiante, puis on arrête la réaction
25 en rajoutant à chaque puits 50 μ l de H₂SO₄,2N. On mesure l'absorbance à 492 nm obtenue en fin de réaction à l'aide d'un robot lecteur de plaque.

La moyenne des absorbances obtenue pour chaque malade ou donneur sont données dans le tableau I en UDO x 100. Les
30 échantillons A1 à D12 correspondent aux 48 sérums de malades et les échantillons E1 à H12 correspondent aux sérums des donneurs.

Ces résultats montrent que par le test selon la présente demande :

1) tous les sérums de donneurs sains ont effectivement été
35 reconnus comme négatifs,

2) 77,1 % des sérums de malades ont été reconnus positifs et seulement 22,9 % comme négatifs.

TABLEAU I

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	136	2500	71	1565	1993	304	50	82	2420	843	2500	48
B	42	230	95	157	95	65	850	1180	2485	56	89	555
C	44	59	51	115	1521	68	1016	44	171	57	58	1140
D	2489	2510	2498	114	658	2500	1289	1979	2495	48	911	1560
E	46	54	47	42	47	50	45	44	51	53	47	43
F	49	49	49	46	54	57	47	46	54	51	49	48
G	54	54	52	42	47	50	45	44	53	48	50	47
H	54	51	50	49	52	52	51	45	48	52	49	51

5

EXEMPLE 2 Détection du virus HIV₁

Le support utilisé est une plaque de microtitration de type micro-ELISA à 96 puits et à fond plat, commercialisée par la société "DYNATECH". On prépare une solution de $\beta 2'$ -glycoprotéine I ayant une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ dans un tampon acétate contenant 0,05 mole/l d'acide acétique et d'acétate de sodium et ayant un pH de $5,6 \pm 0,05$. On dépose 100 μl de cette solution au fond de chaque puits de la microplaque. Celle-ci est ensuite incubée à $+4^\circ\text{C}$ pendant 18 heures.

Le liquide de chaque puits est ensuite aspiré. On introduit ensuite dans chaque puits 300 à 400 μl de tampon phosphate contenant 0,01 mole/l de phosphates monosodique et disodique et 0,15 mole/l de chlorure de sodium et ayant un pH de $7,00 \pm 0,05$. On laisse en contact avec le support pendant 3 minutes et on aspire le tampon ; cette opération de lavage est effectuée 3 fois.

Pour saturer les sites de la microplaque éventuellement encore actifs, on dispose dans chaque puits 200 μl d'une solution

d'albumine bovine à 2 % en poids dans le tampon phosphate décrit ci-dessus. La microplaque est ensuite incubée à 37°C pendant 90 minutes. La solution contenue dans chaque puits est ensuite aspirée. On effectue ensuite un lavage en introduisant 300 à 400 µl de tampon phosphate par puits, puis en laissant en contact la solution pendant 3 minutes, et pour finir en aspirant la solution ; cette opération de lavage est répétée 5 fois. On fait ensuite sécher la plaque.

On a utilisé 17 échantillons de sérum de donneurs sains et 17 échantillons de sérum de malades infectés par le HIV₁.
10 L'échantillon sérique est dilué 100 fois dans le tampon acétate décrit ci-dessus. On dépose 100 µl de solution au fond de chaque puits de la plaque préparée comme ci-dessus. La plaque est incubée à +37°C pendant une période de 90 minutes. Après cette incubation, on effectue un lavage en introduisant 300 µl de tampon phosphate dans chaque puits, on laisse en contact pendant 2 minutes et on aspire la solution de tampon ; on renouvelle cette opération de lavage 5 fois.

On ajoute, ensuite, par puits 100 µl d'une solution d'anticorps polyclonaux humains spécifiques du HIV₁, conjugués à la peroxydase, commercialisés par l'Institut Pasteur-SANOFI. On laisse
20 la plaque incuber à +37°C pendant 60 minutes. A la suite de cette incubation, le contenu des puits de la plaque est aspiré. On introduit 300 µl de tampon phosphate dans chaque puits et après un temps de contact de 2 minutes, on aspire le tampon : cette opération de lavage est renouvelée 3 fois.

25 On ajoute par puits 100 µl d'une solution d'o-phénylène-diamine, 2 HCl dans un tampon citrate de sodium. On laisse incuber pendant 30 minutes à température ambiante, puis on arrête la réaction en rajoutant à chaque puits 50 µl de H₂SO₄,2N. On mesure en UDO l'absorbance à 492 nm obtenue en fin de réaction à l'aide d'un robot
30 lecteur de plaque.

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau II ci-dessous :

Echantillons	Donneurs sains	Malades
1	0,088	0,549
2	0,058	0,544
3	0,074	2,151
4	0,070	0,892
5	0,071	2,900
6	0,080	0,121
7	0,070	0,160
8	0,072	0,134
9	0,081	0,233
10	0,078	1,330
11	0,070	0,141
12	0,073	0,093
13	0,075	0,291
14	0,076	0,644
15	0,082	0,350
16	0,080	0,550
17	0,083	0,510

On voit que

- pour tous les sérums de donneurs sains, l'absorbance est inférieure à 0,1 ;
- parmi les sérums de malades,
 - 12 ont une absorbance supérieure à 0,2 UDO (soit 70 %)
 - 4 ont une absorbance comprise entre 0,1 et 0,2 UDO (soit 23,5 %)
 - (par conséquent 93,5 % peuvent être considérés comme positifs)
 - 1 est considéré comme négatif (6,5 %) ayant une absorbance inférieure à 0,1.

EXEMPLE 3

On filtre, à travers une membrane de nitrocellulose (BA 83, Schleicher et Schuell), par aspiration en différentes zones de quelques mm³ (1 à 3) différentes quantités 300 ng, 30 ng, 3 ng et 0 ng de protéine recombinante p26-HIV₂ ROD en solution dans un mélange aqueux d'éthanolamine (12 g/l) et de glycine (24 g/l), de façon à retenir

sur la membrane au moins une partie de la protéine recombinante. On sature ensuite la membrane par une incubation en présence de 1 % en poids de polyvinylpyrrolidone ayant un poids moléculaire voisin de 10 000 kdaltons en solution dans le même mélange d'éthanolamine et de glycine que ci-dessus. On rince ensuite avec une solution de tampon
5 contenant 5 mMoles de NaH_2PO_4 , 5 mM de Na_2HPO_4 , 125 mM de NaCl et 0,05 % en poids de "TWEEN 20".

On fait réagir sur la membrane environ 40 ng de $\beta 2'$ -glycoprotéine I couplée à de la phosphatase alcaline en solution
10 dans 200 μl du tampon phosphaté décrit ci-dessus pendant 1 heure à 37°C . On rince ensuite 3 fois avec la solution d'éthanolamine et de glycine ci-dessus. On révèle l'activité de phosphatase alcaline en présence de nitro-blue-tétrazolium (NBT) et 4-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate (BCIP) dans une solution à 50 mM de
15 tris(hydroxyméthyl)aminométhane à pH 8 et à 0,1 M de NaCl . On voit sur la membrane que la $\beta 2'$ -glycoprotéine I permet de révéler la présence de la protéine recombinée p26-HIV₂ sur les zones où elle est présente, la membrane étant plus ou moins colorée dans ces zones. La zone de contrôle n'est pas modifiée.

20 Dans les mêmes conditions, il n'y a pas de réaction avec la phosphatase alcaline seule.

EXEMPLE 4

Dans des conditions identiques à celles de l'exemple 3, sauf que l'incubation a été faite en présence de sérum de veau foetal dilué 2 000 fois au lieu de polyvinylpyrrolidone, on a observé une
25 réaction avec la protéine recombinante gp 160-HIV₁, LAI sur les zones de la membrane imprégnées de protéine recombinante.

REVENDICATIONS

1 - Procédé de détection et/ou de dosage de composés viraux, caractérisé par le fait qu'on fixe les composés viraux à l'aide de la $\beta 2'$ -glycoprotéine I.

5 2 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'on utilise la $\beta 2'$ -glycoprotéine I sous forme pure ou sous forme de composition protéinique en mélange avec d'autres glycoprotéines.

3 - Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé par le fait qu'on fixe sur la $\beta 2'$ -glycoprotéine I un composé viral contenu dans un fluide biologique ou extrait d'un tissu biologique de façon à séparer ledit composé viral des composés qui ne sont pas susceptibles de se fixer sur la $\beta 2'$ -glycoprotéine I et que l'on détecte et/ou dose le composé viral fixé sur la $\beta 2'$ -glycoprotéine I par tout procédé connu de détection de ce composé viral.

15 4 - Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé par le fait qu'on fixe le composé viral sur un support et on le révèle avec la $\beta 2'$ -glycoprotéine I conjuguée à un marqueur.

5 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé par le fait que les composés viraux fixés par la $\beta 2'$ -glycoprotéine I proviennent du virus de l'hépatite virale B (HBV) et du virus de l'immunodéficience humaine (HIV₁ et HIV₂).

6 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé par le fait que les composés viraux fixés par la $\beta 2'$ -glycoprotéine I proviennent du virus de l'immunodéficience du singe (SIV) ou du virus de l'herpès simplex (HSV)

7 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé par le fait que les composés viraux fixés par la $\beta 2'$ -glycoprotéine I sont des particules, ou des protéines d'origine virale, ou apparentées, présentes dans des leucémies ou myélomes ou dans le syndrome de Gougerot-Shögren.

8 - Procédé selon l'une des revendications 3 à 7, caractérisé par le fait que le support sur lequel on fixe la $\beta 2'$ -glycoprotéine I ou le composé viral est un support solide.

9 - Procédé selon la revendication 8, caractérisé par le fait que le support solide est une microplaque ELISA.

10 - Procédé selon les revendications 3, 5 à 9, caractérisé par le fait qu'avant la réaction de fixation de la $\beta 2'$ -glycoprotéine I sur le support, la $\beta 2'$ -glycoprotéine I est mise en solution dans un tampon ayant un pH compris entre 4,5 et 10,5.

5 11 - Procédé selon la revendication 10, caractérisé par le fait que le tampon est du type phosphate ou acétate.

12 - Procédé selon l'une des revendications 10 ou 11, caractérisé par le fait que la $\beta 2'$ -glycoprotéine I est à une concentration comprise entre 0,01 et 100 mg/l dans le tampon.

10 13 - Procédé selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisé par le fait que l'on réalise la réaction de fixation de la $\beta 2'$ -glycoprotéine I sur le support en mettant le tampon contenant la $\beta 2'$ -glycoprotéine I en contact avec le support à une température de 0 à 40°C pendant un temps d'incubation compris entre 30 minutes et 24
15 heures.

14 - Procédé selon l'une des revendications 10 à 13, caractérisé par le fait que l'on sépare du support la quantité de solution contenant la $\beta 2'$ -glycoprotéine I, qui n'a pas réagi avec ledit support, et on lave le support.

20 15 - Procédé selon la revendication 14, caractérisé par le fait qu'on lave le support avec le même tampon que celui utilisé pour mettre en solution la $\beta 2'$ -glycoprotéine I.

16 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, 5 à 15, caractérisé par le fait qu'après la fixation de la $\beta 2'$ -glycoprotéine I, on
25 sature les sites actifs du support qui n'ont pas réagi avec la $\beta 2'$ -glycoprotéine I.

17 - Procédé selon la revendication 16, caractérisé par le fait qu'on sature les sites à l'aide d'une solution d'albumine sérique bovine, ou de caséine.

30 18 - Procédé selon l'une des revendications 3, 5 à 17, caractérisé par le fait que le support sur lequel est fixée au moins la $\beta 2'$ -glycoprotéine I est stocké.

19 - Procédé selon l'une des revendications 3, 5 à 18, caractérisé par le fait que le fluide biologique est un sérum, un plasma,
35 de l'urine, du liquide céphalorachidien, du liquide synovial, du liquide

péritonéal, du liquide pleural, du liquide séminal, du liquide ascitique ou du surnageant de culture virale "in vitro" ou un extrait cellulaire.

20 - Procédé selon l'une des revendications 3, 5 à 19, caractérisé par le fait que le fluide biologique est dilué à l'aide d'un tampon donnant un pH compris entre 4,5 et 10,0.

21 - Procédé selon l'une des revendications 3, 5 à 20, caractérisé par le fait que la réaction de fixation virale est effectuée à une température comprise entre 0 et 42°C, pendant une période de 30 minutes à 24 heures.

22 - Procédé selon la revendication 21, caractérisé par le fait qu'après la fixation virale, on sépare du support le fluide biologique et on lave ledit support.

23 - Procédé selon l'une des revendications 3, 5 à 22, caractérisé par le fait qu'on réalise, à l'aide d'un anticorps, la détection et/ou le dosage du composé viral fixé sur le support par l'intermédiaire de la $\beta 2'$ -glycoprotéine I.

24 - Procédé selon la revendication 23, caractérisé par le fait que l'anticorps est conjugué à un marqueur enzymatique.

25 - Procédé selon la revendication 29, caractérisé par le fait qu'on ajoute un substrat spécifique de l'enzyme conjuguée à l'anticorps.

26 - Support sur lequel est fixée au moins la $\beta 2'$ -glycoprotéine I obtenu par le procédé selon la revendication 18.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int .onal Application No
PCT/FR 94/00142

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 5 G01N33/566 G01N33/569 G01N33/571 G01N33/576

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 5 G01N C12N

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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 124 896 (R. SEELIG ET AL.) 14 November 1984 see the whole document -----	1-26

☐ 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.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 April 1994

Date of mailing of the international search report

- 6-05- 1994

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

Ryckebosch, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter. Appl. Application No

PCT/FR 94/00142

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0124896	14-11-84	DE-A- 3316464	08-11-84
		AU-A- 2865084	19-11-84
		WO-A- 8404326	08-11-84
		JP-T- 60501241	08-08-85

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema internationale No
PCT/FR 94/00142

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 5 G01N33/566 G01N33/569 G01N33/571 G01N33/576

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 5 G01N C12N

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 cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP,A,0 124 896 (R. SEELIG ET AL.) 14 Novembre 1984 voir le document en entier -----	1-26

☐ 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

29 Avril 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

- 6 -05- 1994

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

Ryckebosch, A

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

PCT/FR 94/00142

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)