(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
12 juillet 2001 (12.07.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/49720 A2

(51) Classification internationale des brevets[7]:
C07K 14/155

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/03690

(22) Date de dépôt international:
27 décembre 2000 (27.12.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
00/00059 4 janvier 2000 (04.01.2000) FR

(71) Déposant *(pour tous les États désignés sauf US)*: **AVENTIS PASTEUR** [FR/FR]; 2, avenue pont Pasteur, F-69007 Lyon (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants *(pour US seulement)*: **BOUDET, Florence** [FR/FR]; 36bis, rue Franklin Roosevelt, F-69006 Lyon (FR). **CHEVALIER, Michel** [FR/FR]; 19, rue de la Guillotière, F-38270 Beaurepaire (FR). **DUBAYLE, Jean** [FR/FR]; Lieu dit l'Henriette, F-69120 Theize (FR). **EL HABIB, Raphaëlle** [FR/FR]; 11, rue des Erables, F-69630 Chaponost (FR).

(74) Mandataires: **SCHAEFFER, Nathalie** etc.; Aventis Pasteur, Direction de la Propriété Intellectuelle, 2, avenue pont Pasteur, F-69007 Lyon (FR).

(81) États désignés *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés *(régional)*: brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, 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, 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 abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: CHEMICALLY MODIFIED HIV ENVELOPE GLYCOPROTEIN

(54) Titre: GLYCOPROTEINE D'ENVELOPPE DU VIH MODIFIEE CHIMIQUEMENT

(57) Abstract: The invention relates to an HIV envelope glycoprotein in a purified form which can be obtained using a method comprising the following steps: (1) obtaining an envelope glycoprotein in a purified form; (2) reducing at least one disulphide bond of the protein from step (1); (3) alkylating at least two free sulfhydryl groups; (4) optionally, oxidizing the remaining sulfhydryl group; (5) denaturing and (6) renaturing. The invention also relates to the use of the inventive modified HIV envelope glycoprotein in a vaccine against HIV which can be used to induce HIV-neutralising antibodies in a human subject for therapeutic or prophylactic purposes.

(57) Abrégé: La présente invention a pour objet une glycoprotéine d'enveloppe du VIH sous forme purifiée susceptible d'être obtenue par un procédé comprenant les étapes suivants: (1) obtention d'une glycoprotéine d'enveloppe sous forme purifiée, (2) réduction d'au moins un pont disulfure de la protéine de l'étape (1), (3) alkylation d'au moins deux groupes sulfhydryls libres, (4) éventuellement oxydation des groupes sulfhydryls libres restants, (5) dénaturation et (6) renaturation et son utilisation dans un vaccin contre le VIH utilisable pour induire des anticorps neutralisants le VIH chez un sujet humain à titre thérapeutique ou prophylactique.

WO 01/49720 A2

Glycoprotéine d'enveloppe du VIH modifiée chimiquement

La présente invention a pour objet un nouvel antigène et son utilisation dans un vaccin contre le VIH et concerne plus particulièrement une glycoprotéine d'enveloppe du VIH modifiée chimiquement capable d'induire des anticorps neutralisant les isolats primaires du VIH.

Ces travaux ont été co-financés par l'ANRS.

Au cours des dix dernières années plusieurs vaccins contre le VIH ont été proposés et testés chez le singe ou chez l'homme. Aucun des vaccins proposés à ce jour n'a apporté de solution totalement satisfaisante. Les obstacles majeurs que sont la grande variabilité génétique du virus (Saragosti S., 1997, Virologie, 1 : 313-320) et la faible exposition au système immunitaire d'épitopes viraux susceptibles d'être neutralisés, freinent considérablement l'élaboration d'un vaccin permettant l'induction d'une immunité neutralisante.

La glycoprotéine d'enveloppe du VIH qui est requise pour conférer au virus son caractère infectieux représente la cible des anticorps neutralisants. Ces caractéristiques ont fait de cette dernière un sujet d'investigations intenses. Il a été montré que la glycoprotéine d'enveloppe du VIH est un oligomère composé d'un domaine extracellulaire, la gp120, et d'un domaine transmembranaire la gp41 (Gallaher et al AIDS Research & Human Retroviruses 11(2): 191-202, 1995). Leonard et al ont montré que la gp160 comprenait 20 résidus cystéine formant 10 ponts disulfures.

Différentes approches visant à l'obtention d'anticorps neutralisant les isolats primaires du VIH ont été proposées mais aucune n'a apporté de solution réellement satisfaisante.

Parren *et al.* ont mis en évidence une corrélation entre l'obtention d'anticorps pouvant neutraliser *in vitro* l'infection de cellules par le VIH et la nature oligomérique de la gp120 (J. of Virology, 72, 3512-3519, 1998). D'autre part, Earl et al ont montré que des anticorps spécifiques de la structure oligomérique de la gp160 peuvent être générés et participent de fait à un effet neutralisant contre l'infection *in vitro* de cellules par le VIH (PNAS 87, 648-652, 1990).

Plusieurs auteurs ont proposé de modifier la structure de la gp160 dans le but d'obtenir une protéine plus proche de celle présente à la surface du virus durant l'étape

de liaison du VIH et de fusion des membranes cellulaires et/ou d'exposer des épitopes initialement cachés.

A. Benjouad et al (J. Virology, p 2473-2483, 1992) ont proposé l'utilisation d'une gp160 déglycosylée par voie enzymatique pour induire des anticorps neutralisants. Les résultats obtenus montrent que les anticorps issus d'antisérums produits contre une gp160 désialylée neutralisent le pouvoir infectieux du VIH-1 (TCLA) et inhibent la formation de syncytium entre les cellules infectées par le VIH-1 et les cellules CD4+ non-infectées.

R.A.LaCasse et al (Science, 283 : 357-362, 15/01/1999) ont décrit la préparation d'un vaccin comprenant des cellules entières fixées au formaldéhyde qui reproduirait la structure transitoire protéine d'enveloppe/CD4/co-récepteur présente au cours de l'infection par le HIV. L'utilisation d'une telle préparation conduirait dans un modèle de souris transgénique à la neutralisation de nombreux isolats primaires du VIH. La reproduction de cette expérience n'a pas pu être réalisée.

Les réponses en anticorps neutralisants, telles que décrites dans l'art antérieur mentionné ci-dessus, ont pour inconvénient d'être soit spécifiques d'un sérotype donné, soit d'être incapables de conduire à la neutralisation des isolats primaires du VIH. Du fait de la très grande variabilité génétique du virus du SIDA de telles réponses immunitaires présentent donc peu, voire pas d'intérêt d'un point de vue vaccinal.

Il existe donc un besoin pour un vaccin capable d'induire une immunité neutralisante contre les isolats primaires du VIH.

La demanderesse a mis en évidence de façon surprenante qu'une glycoprotéine d'enveloppe du VIH modifiée chimiquement permettait d'atteindre cet objectif.

La présente invention concerne donc une glycoprotéine d'enveloppe du VIH sous forme purifiée susceptible d'être obtenue par un procédé comprenant les étapes suivantes :

(1) obtention d'une glycoprotéine d'enveloppe sous forme purifiée,

(2) réduction d'au moins un pont disulfure de la glycoprotéine de l'étape (1),

(3) alkylation d'au moins deux groupes sulfhydryls libres,

(4) éventuellement oxydation des groupes sulfhydryls libres restants

(5) dénaturation et

(6) renaturation.

Selon un mode de réalisation particulier la glycoprotéine (1) est sous forme dimérique et correspond de préférence à une gp160MN/LAI. Selon un mode de réalisation particulier l'étape (2) est mise en œuvre par addition d'un agent réducteur selon un rapport molaire (moles d'agent réducteur) /(moles de groupes sulfhydryls) de 1 à 500 fois.

Selon un autre mode de réalisation particulier l'étape (3) est mise en œuvre par addition d'un agent alkylant selon un rapport molaire (moles d'agent alkylant) /(moles de groupes sulfhydryls) de 1 à 1000. Selon un mode de réalisation particulier on utilise comme agent alkylant le NEM selon un rapport molaire (moles de NEM) /(moles de groupes sulfhydryls) de 1 à 100, de préférence 10.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne une composition comprenant un mélange de protéines modifiées chimiquement telles que définies ci-dessus.

Selon un autre aspect, la présente invention est relative à un anticorps dirigé contre une glycoprotéine d'enveloppe modifiée chimiquement telle que définie ci-dessus ; cet anticorps étant de préférence monoclonal.

Selon un quatrième aspect, la présente invention a pour objet un vaccin contre le VIH comprenant :

(a) Une glycoprotéine d'enveloppe modifiée chimiquement telle que définie ci-dessus ou une composition telle que définie ci-dessus, ou un anticorps tel que défini ci-dessus ou un mélange de ces anticorps,

(b) un support ou diluant pharmaceutiquement acceptable et

(c) éventuellement un adjuvant ou mélange d'adjuvants.

Selon un mode de réalisation particulier, le vaccin selon l'invention est utilisé pour induire des anticorps neutralisants le VIH chez un sujet humain à titre thérapeutique ou prophylactique.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne une méthode de diagnostic comprenant la mise en contact d'un fluide biologique avec un anticorps tel que défini ci-dessus et la détermination des complexes immuns ainsi formés.

Les autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront dans la description détaillée qui suit.

Par « glycoprotéine d'enveloppe » on entend dans le cadre de la présente invention une protéine glycosylée gp160, gp 120 ou gp 140. La protéine d'enveloppe est sous forme monomérique, dimérique ou multimérique, elle sera de préférence sous forme dimérique. Cette protéine d'enveloppe pouvant être une protéine recombinante ou non et peut également être constituée d'une protéine hybride ; le terme hybride étant utilisé ici dans son acceptation classique à savoir une protéine comprenant des séquences provenant de protéines d'enveloppe de différentes souches de virus adaptées en laboratoire ou d' isolats primaires du VIH. Les protéines d'enveloppe dont la séquence en acides aminés diffère de celle de la protéine native par des mutation(s), délétion(s), insertion(s), ou substitution(s) d'acide(s) aminé(s) sont également inclues dans la définition ci-dessus pour autant que ces modifications n'abolissent pas la formation d'anticorps susceptibles de neutraliser des isolats primaires du VIH. Cette caractéristique est aisément déterminable à l'aide des tests fournis dans la présente demande. On utilise de préférence dans le cadre de la présente invention la gp160MN/LAI telle que décrite dans l'exemple 1 ci-dessous ;

La glycoprotéine d'enveloppe de l'étape (1) est utilisée sous une forme isolée substantiellement purifiée. On entend par protéine isolée et substantiellement purifiée, une protéine présentant un taux de pureté d'au moins 75% , de préférence d'au moins 80% , tel que déterminé par la méthode d'électrophorèse sur gel d'acrylamide (SDS PAGE) (LAEMMLI U.K. 1970. *Nature* 27 : 680-685.) et analyse par densitométrie. Il est fait référence dans la présente demande à une telle protéine sous le terme de « protéine sous forme purifiée ». Divers procédés de purification de la protéine d'enveloppe du VIH, naturelle ou recombinante, ont été décrits dans la littérature. On peut se reporter par exemple aux articles de Pialoux et al (Aids Res. Hum. Retr., 11, 373-381, 1995) et de Sakmon-Ceron et al (Aids Res. Hum. Retr., 12, 1479-1486, 1995) ou encore au texte WO91/13906.

En ce qui concerne les protéines recombinantes, il faut noter que les glycoprotéines ainsi purifiées présentent des ponts disulfures inter-chaînes, quel que soit la nature de l'hôte ou du vecteur utilisé. Les glycoprotéines s'associent ainsi en partie en dimères covalents visibles sur gel SDS PAGE. (Owens RJ. Compans RW. Virology, 179 (2) : 827-833, DEC. 1990)

La glycoprotéine d'enveloppe sous forme purifiée est soumise dans un premier temps à une étape de réduction partielle ou totale des ponts disulfures intra-chaînes et/ou inter-chaînes dans laquelle au moins un pont disulfure est réduit.

L'étape de réduction est réalisée par réaction de la glycoprotéine d'enveloppe de l'étape (1) avec un agent réducteur, à température ambiante et sous agitation douce. L'agent réducteur peut être choisi parmi les molécules de dithiothréitol (DTT), beta-mercaptoéthanol, glutathion réduit et borohydrure de sodium, par exemple. La quantité d'agent réducteur, exprimée par le rapport molaire (moles d'agent réducteur)/ (moles de groupes sulfhydryls)varie entre 1 et $0,5.10^4$ et correspond de préférence à un rapport molaire de 50. La réduction est mise en œuvre à un pH basique de 7 à 10, de préférence à un pH de 7,8. Le contrôle de la valeur du pH est obtenu par l'addition d'un tampon; tout tampon approprié pour ce faire peut être utilisé. On utilise de préférence un tampon phosphate de sodium. A titre indicatif, dans le cas du DTT, la réaction est mise en œuvre pendant environ 15 minutes, le rapport molaire moles de DTT/moles de SH utilisé est de 1 à $0,510^4$ et de préférence de 50 fois.

La durée de la réaction de réduction est variable et dépend du rapport molaire et de l'agent réducteur choisis.

Les conditions de la réaction de réduction permettant la réduction d'au moins un pont disulfure sont aisément déterminables par l'homme du métier à partir de l'enseignement fourni ici. La réduction peut être contrôlée par analyse SDS PAGE dans la mesure où la réduction des ponts disulfures interchaînes transforme les dimères en monomères. Des contrôles plus fins de cette réduction sont possibles par utilisation de N-éthyl-maléimide (NEM) marqué au ^{14}C ou plus simplement par l'utilisation d'un dosage colorimétrique basé sur l'acide dithio-nitro-benzoique (DTNB).

Les groupes sulfhydryls libres ainsi obtenus sont ensuite soumis à une réaction d'alkylation dans laquelle le produit de l'étape (2) réagit avec un agent alkylant.

On entend par agent alkylant dans le cadre de la présente invention tout réactif capable de réagir spécifiquement avec les groupes –SH pour donner une liaison covalente. A titre illustratif, on peut citer : N-éthyl-maléimide, iodo-acétamide. La quantité d'agent alkylant utilisée, exprimée par le rapport molaire (moles d'agent alkylant)/(moles de groupes sulfydryls) est de 1 à 100 fois, de préférence de 10 à

100 fois. Il est nécessaire de veiller à avoir un excès d'agent alkylant par rapport à l'agent réducteur pour neutraliser l'action de ce dernier.

La réaction d'alkylation est mise en œuvre à un pH de 6 à 8, de préférence à un pH de 7, à température ambiante. Le contrôle de la valeur du pH est obtenu par l'addition d'un tampon ; tout tampon approprié pour ce faire peut être utilisé. On utilise de préférence un tampon phosphate de sodium.

Les conditions de la réaction d'alkylation permettant l'alkylation d'au moins deux groupes -SH sont aisément déterminables par l'homme du métier à partir de l'enseignement fourni ici. L'alkylation peut être contrôlée par l'utilisation de ^{14}C-NEM comme cela est décrit ci-dessous dans les exemples.

Le produit issu de l'étape (3) peut être soumis à une étape d'oxydation au cours de laquelle les groupes sulfhydryls libres restants sont oxydés en présence d'un agent oxydant. Si des groupes sulfhydryls libres sont encore présents à l'issue de l'étape (3), on réalise de préférence une étape d'oxydation avant l'étape de dénaturation.

On entend dans le cadre de la présente invention par agent oxydant toute molécule liée par ponts disulfures comme le glutathion oxydé ou la cystine mais il peut s'agir également d'autres molécules comme les quinones, l'oxygène, etc. A titre illustratif on peut citer le mélange glutathion réduit/glutathion oxydé. Dans ce mélange, le glutathion réduit permet aux ponts disulfures de se dissocier pour se réassocier dans un état thermodynamique plus stable.

La réaction d'oxydation est mise en œuvre à un pH de 7 à 9 de préférence à pH7,8, à une température de 4 à 25°C. L'agent oxydant est utilisé selon un rapport molaire (moles d'agent oxydant)/(moles de groupes sulfhydryls) de 50 à 5000, de préférence de 500. A titre illustratif, dans le cas de l'utilisation du mélange glutathion réduit/glutathion oxydé, la réaction est mise en œuvre avec un taux de glutathion oxydé de 1 à 1000 fois supérieur au taux de glutathion réduit. Par exemple un rapport de 500 molécules de glutathion oxydé par mole de gp160MN/LAI peut être avantageusement utilisé.

La durée de l'étape d'oxydation peut varier entre 5 minutes et 24 heures et correspond de préférence à 30 minutes. Les conditions de la réaction d'oxydation permettant l'oxydation des groupes sulfhydryls libres sont aisément déterminables par l'homme du métier à partir de l'enseignement fourni ici. L'oxydation peut être contrôlée

par un procédé similaire à celui utilisé pour le contrôle de l'étape de réduction en veillant bien aux contrôles positifs du test.

Le produit issu de l'étape (3) ou (4) est ensuite dénaturé par l'action d'un ou de plusieurs agent(s) dénaturant(s).utilisé(s) à raison de 0,1 à 5% (poids/vol) de façon à modifier la conformation de la glycoprotéine. Pour ce faire un ou plusieurs détergent(s), de préférence ionique(s) ou un ou plusieurs agent(s) chaotropique(s) peuvent être utilisés par exemple. On peut citer à titre illustratif les détergents ioniques suivants : les sels de dodécyl sulfate, notamment le dodécyl sulfate de sodium (SDS) ou de lithium, les sels de dioctyl sulfosuccinate (de sodium, par exemple), les sels de cétryltriméthylammonium (de brome, par exemple), DTAB, les sels de cétylpyridinium (de chlore, par exemple), les N-dodécyl- ou N-tétradécyl-sulfobétaïne, les zwittergents 3-14, et le 3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylamino]-1-propane sulfonate (CHAPS), et les détergent(s) neutre(s) suivants : le tween20®, le tween80®, l'octylglucoside, le lauryl-maltoside, l'hecameg®, le lauryl-diméthylamine, le décanoyl-N-méthyl-glucamide, le polyéthylène-glycol-lauryl-éther, le triton X100®, le Lubrol PX®, par exemple. A titre illustratif on peut citer comme agent chaotropique utilisable dans le cadre de la présente invention l'urée, la guanidine, le thiocyanate de sodium.

On utilise de préférence dans le cadre de la présente invention le SDS, en particulier à une concentration de 0,1% (poids/vol.).

La réaction de dénaturation est mise en œuvre à pH neutre ou alcalin à la température ambiante.

Les conditions de la réaction de dénaturation permettant des modifications conformationnelles de la molécule sont aisément déterminables par l'homme du métier à partir de l'enseignement fourni ici. La dénaturation peut être contrôlée par mesure spectrophotométrique en mesurant l'absorbance des résidus tyrosine, phénylalanine et tryptophane de la molécule ou par dichroïsme circulaire.

La glycoprotéine ainsi dénaturée est ensuite soumise à une étape de renaturation qui peut être mise en œuvre par dialyse contre 1000 volumes d'un tampon exempt de détergent, de préférence un tampon phosphate contenant du chlorure de sodium (PBS). L'efficacité de l'étape de dialyse est facilement déterminable par analyse colorimétrique des agents oxydants résiduels ou par HPLC en montrant la disparition de certains réactifs

servant à la fabrication de l'antigène. A titre illustratif, la dialyse peut être effectuée en une nuit à température ambiante, sous agitation douce, contre un tampon PBS.

Selon un mode de réalisation préféré, la gp160MN/LAI sous forme purifiée (1) est modifiée chimiquement par un procédé comprenant les étapes de : (2) réduction par incubation avec du DTT selon un rapport molaire (moles de DTT) /(moles de groupes SH) de 50 à un pH de 7, pendant une durée d'environ 15 minutes à la température ambiante, (3) alkylation par incubation avec du NEM selon un rapport molaire (moles de NEM)/(moles de groupes SH) de10 à un pH de 7, pendant une durée d'environ 15 minutes, à la température ambiante, (4) oxydation par incubation du produit de l'étape (3) avec un mélange glutathion réduit/glutathion oxydé selon un rapport molaire(moles de glutathion oxydé)/(moles de groupes SH) de 500 avec un rapport glutathion réduit/glutathion oxydé de 10, à un pH de 7,8 pendant une durée d'environ 30 minutes, (5) dénaturation du produit de l'étape 4 par incubation avec 0,1% de SDS (poids/vol.) pendant une durée d'environ 15 minutes et à un pH de 7,8 , puis (6) renaturation par dialyse contre du tampon PBS pendant la durée d'une nuit à la température ambiante.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne une composition comprenant un mélange de glycoprotéines chimiquement modifiées telles que définies ci-dessus. Dans un tel cas de figure, ces glycoprotéines modifiées chimiquement peuvent se différentier par exemple par la nature de la glycoprotéine d'enveloppe constitutive (par ex. les glycoprotéines provenant de différentes souches ou isolats primaires, certaines pouvant correspondre également à des protéines hybrides) ou par leur procédé de préparation ; les paramètres de ce dernier pouvant varier, tels que la concentration et la nature des réactifs. Tout mélange envisageable comprenant une ou plusieurs glycoprotéine(s) d'enveloppe modifiée(s) chimiquement est inclus dans la portée de la présente invention.

La présente invention a également pour objet les anticorps dirigés contre les glycoprotéines d'enveloppe modifiées chimiquement telles que décrites ci-dessus. La préparation de tels anticorps est mise en œuvre par les techniques classiques d'obtention d'anticorps polyclonaux et monoclonaux (Kohler G et al *European Journal of Immunology. 6(7):511-9, 1976 Jul).*

Ces anticorps sont particulièrement appropriés pour être utilisés dans un schéma d'immunisation passive.

La présente invention a également pour objet des vaccins utiles à des fins thérapeutiques et prophylactiques. Les vaccins selon la présente invention comprennent une glycoprotéine d'enveloppe modifiée chimiquement telle que définie ci-dessus ou un mélange de telles glycoprotéines, un support ou diluant pharmaceutiquement acceptable et éventuellement un adjuvant.

Le vaccin selon la présente invention peut donc contenir un seul type de glycoprotéine d'enveloppe modifiée chimiquement ou un mélange de divers types de glycoprotéine d'enveloppe modifiée chimiquement tel que défini ci-dessus.

Selon un autre aspect, le vaccin selon la présente invention comprend des anticorps anti-glycoprotéine d'enveloppe modifiée chimiquement. Dans ce cas de figure également tout mélange d'anticorps, monoclonaux ou polyclonaux, dirigés contre différentes parties d'un même glycoprotéine d'enveloppe modifiée chimiquement ou contre différentes glycoprotéines d'enveloppe modifiées chimiquement fait partie de la présente invention.

La quantité de glycoprotéine d'enveloppe modifiée chimiquement dans le vaccin selon la présente invention dépend de nombreux paramètres comme le comprendra l'homme de l'art, tels que la nature de la glycoprotéine modifiée chimiquement, la voie d'administration et l'état de la personne à traiter (poids, age, état clinique, etc....). Une quantité appropriée est une quantité telle qu'une réponse immunitaire humorale capable de neutraliser des isolats primaires du VIH est induite après administration de cette dernière. Les vaccins selon la présente invention peuvent également contenir un adjuvant. Tout adjuvant ou mélange d'adjuvants pharmaceutiquement acceptable peut être utilisé à cette fin. On peut citer à titre d'exemple les sels d'aluminium tels que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate d'aluminium. Des agents auxiliaires classiques tels que agents mouillants, charges, émulsifiants, tampons etc. peuvent également être additionnés au vaccin selon l'invention.

Les vaccins selon la présente invention peuvent être préparés par tout procédé classique connu de l'homme de d'art. Classiquement les antigènes sont mélangés avec un support ou diluant pharmaceutiquement acceptable, tel que eau ou solution saline tamponnée au phosphate. Le support ou diluant va être sélectionné en fonction de la

forme galénique choisie, du mode et de la voie d'administration ainsi que de la pratique pharmaceutique. Les supports ou diluants appropriés ainsi que les exigences en matière de formulation pharmaceutique sont décrits en détails dans Remington's Pharmaceutical Sciences, représentant un ouvrage de référence dans ce domaine.

Les vaccins mentionnés ci-dessus peuvent être administrés par toute voie classique, habituellement utilisée dans le domaine des vaccins, telle que la voie parentérale (intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, etc..). L'administration peut être réalisée par l'injection d'une dose unique ou de doses répétées, par exemple à J0, à 1 mois, à 3 mois, à 6 mois et à 12 mois. On utilisera de préférence les injections à J0 , à 1 mois et à 3 mois.

La présente invention entend également couvrir une glycoprotéine d'enveloppe modifiée chimiquement telle que définie ci-dessus et le vaccin contenant une telle glycoprotéine ou mélange de telles glycoprotéines pour leur utilisation pour induire des anticorps neutralisant des isolats primaires du VIH.

La demanderesse a mis en évidence de façon surprenante que les glycoprotéines d'enveloppe modifiées chimiquement selon l'invention étaient capables après administration d'induire des anticorps susceptibles de neutraliser des isolats primaires du VIH. Ces antigènes représentent donc des candidats de valeur pour l'élaboration d'un vaccin utilisable pour la protection et/ou le traitement d'un grand nombre, voire la totalité des sujets à risques ou infectés par le VIH.

La présente invention va être décrite de façon plus détaillée dans les exemples qui suivent.

Les exemples décrits ci-dessous sont donnés à titre purement illustratif de l'invention et ne peuvent en aucun cas être considérés comme limitant la portée de cette dernière. A des fins de clarté, les exemples sont limités à des glycoprotéines d'enveloppe modifiées chimiquement constituées de gp160MN/LAI.

Exemple 1 Préparation de la glycoprotéine gp160MN/LAI

La glycoprotéine gp160MN/LAI est une glycoprotéine soluble hybride dans laquelle la sous-unité gp120 dérive du VIH-1 MN et la sous-unité gp41 dérive de l'isolat LAI. Les séquences d'ADN correspondant à ces deux composants sont fusionnés à l'aide

d'un site de restriction SmaI qui ne modifie ni la séquence en acides aminés de la gp120 ni celle de la gp41. La préparation de cette protéine est décrite ci-dessous.

La séquence codant pour la gp120MN est amplifiée par PCR à partir des cellules SupT1 infectées par le VIH-MN, à l'aide d'oligonucléotides introduisant les sites de restrictions SphI et SmaI respectivement immédiatement en aval de la séquence codant pour le peptide leader et en amont des sites de clivage localisés entre la gp120 et la gp41. La séquence codant pour la sous-unité gp41 est produite de la façon suivante : la séquence complète codant pour la protéine env du VIH1-LAI est placée sous le contrôle du promoteur pH5R du virus de la vaccine. Plusieurs modifications sont introduites dans cette région codante. Un site de restriction SphI est créé immédiatement en aval de la séquence codant pour le peptide leader, sans altération de la séquence des acides aminés. Un site de restriction SmaI est créé immédiatement en amont de la séquence codant pour les sites de clivage situées entre gp120 et gp41, sans altération de la séquence en acides aminés. Les deux sites de clivage en position 507-516 (acides aminés numérotés selon la méthode de Myers et al, décrite dans Human retroviruses and AIDS (1994) Los Alamos National Lab. (USA)) ont été mutés (i.e. la séquence d'origine KRR ... REKR a été mutée en QNH ... QEHN). La séquence codant pour le peptide hydrophobe transmembranaire IFIMIVGGLVGLRIVFAVLSIV (i.e. acides aminés 689-710 selon Myers et al supra) a été délété. Enfin, le second codon E de la séquence codant pour PEGIEE a été remplacé par un codon stop (i.e. acides aminés 735-740 selon Myers et al (supra)), correspondant au 29ème acide aminé du domaine intracytoplasmique.

Le plasmide dans lequel la séquence LAI est insérée entre les régions homologues du gène TK du virus de la vaccine est coupé par SphI et SmaI puis ligaturé avec la séquence de la gp120MN. Le virus VVTG9150 est ensuite construit par une recombinaison homologue classique.

Le vecteur recombinant du virus de la vaccine, VVTG9150, ainsi produit est utilisé pour la production de la gp160MN/LAI. Pour ce faire, le vecteur est propagé sur des cellules BHK21. La gp160 MN/LAI est produite sur cellules BHK21 infectées pendant 72 heures par le virus de la vaccine recombinante VVTG9150. Après culture en biogénérateur, le surnageant est récolté, filtré et ultrafiltré pour donner la récolte concentrée. La purification se déroule en trois étapes. Certains contaminants de la gp160 MN/LAI sont fixés sur une colonne échangeuse d'anions. La fraction non fixée est

chromatographiée sur colonne d'immunoaffinité à l'aide d'un anticorps monoclonal. Après élution, la gp160 MN/LAI est dessalée par chromatographie de filtration sur gel en tampon PBS. Pour inactiver la vaccine résiduelle, la glycoprotéine est chauffée à 60°C pendant 1 heure avant d'être filtrée pour donner l'antigène purifié.

La concentration de la gp160 MN/LAI utilisée pour la préparation des protéines modifiées chimiquement est de 1 mg/ml de protéines (déterminée par dosage colorimétrique kit BCA, Pierce™) et sa pureté de 77% (déterminée par électrophorèse SDS PAGE et analyse par densitométrie optique à l'aide du ScannerGS700 de Biorad™). La glycoprotéine est dans un tampon phosphate de composition suivante : NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM ; Na_2HPO_4 6,5 mM ; KH_2PO_4 1,5 mM ; pH 7,4 (PBS). La gp160MN/LAI ainsi obtenue, présente un poids moléculaire de 140kD en SDS-PAGE.

Exemple 2 : Préparation de glycoprotéines modifiées chimiquement selon l'invention

A partir de 172 µl de gp160 purifiée (1mg/ml) on ajoute 21 µl de tampon 1M phosphate de sodium pH7,8 ; 2 µl d'eau distillée et 19,5 µl de dithiothreitol 50 mM (DTT), on agite au vortex pendant 15 s, et on incube 15 min à 25°C. On ajoute 16 µl de tampon phosphate de sodium 1M (NaH2PO4) pour abaisser le pH à 7, puis on bloque les groupes sulfhydryls par addition de 14 µl de N-éthyl-maléimide (NEM) 100mM, on incube pendant 15 min à 25°C. On réoxyde les groupes sulfhydryls par addition de tampon phosphate de sodium à pH 7,8 et on ajoute un mélange de 4,8 µl de glutathion réduit à 150 mM, et 71,6 µl de glutathion oxydé à 100 mM, on incube pendant 30 min à 25°C. On dissocie ensuite les dimères de gp160 par addition de 12 µl de dodécyl sulfate de sodium (SDS) à 3%. On place l'échantillon dans une cassette de dialyse d'une capacité de 3 ml contre 1000 volumes de tampon PBS (sans détergent). On effectue la dialyse pendant la nuit à température ambiante sous agitation douce. Les gp160 ainsi traitées se retrouvent sous forme de monomères et dimères. La protéine ainsi obtenue est nommée BA29.

En suivant le mode opératoire tel que décrit ci-dessus dans lequel le pH de 7 de l'étape d'alkylation par le NEM est remplacé par un pH de 7,8, on prépare une glycoprotéine BA29(7.8).

L'analyse SDS PAGE en condition réductrice (DTT) obtenue avec la gp160 dialysée, et fixée le cas échéant par l'agent de pontage bi-fonctionnnel éthylène-glycol-bis-succinimidyl-succinate (EGS) montre la présence de monomères et de dimères dans la solution de gp160 dialysée.

Exemple 3 : Préparation de glycoprotéines modifiées chimiquement avec variation de la concentration en agent alkylant.

Pour déterminer le rôle de l'agent alkylant qui est utilisé pour la préparation des protéines selon l'invention, plusieurs glycoprotéines modifiées chimiquement ont été préparées en présence de différentes concentrations en agent alkylant.

La préparation BA53 est réalisée selon le procédé décrit dans l'exemple 2 pour le BA29 dans lequel le NEM a été omis.

La préparation BA55 est réalisée selon le procédé décrit dans l'exemple 2 pour le BA29 dans lequel la concentration en NEM utilisée est 10 fois inférieure à celle indiquée à l'exemple 2. La préparation BA56 est réalisée selon le procédé décrit dans l'exemple 2 pour le BA29 dans lequel la concentration en NEM utilisée est 10 fois supérieure à celle indiquée à l'exemple 2.

Ces antigènes ont été préparés en parallèle pour être injectés aux animaux et pour une mesure biochimique de la quantité de NEM fixé par molécule de gp160. Pour cela, le NEM marqué au ^{14}C a été utilisé. Environ 4MBq de ^{14}C NEM ont été ajouté par mM de NEM non radioactif. La radioactivité mesurée est alors directement proportionnelle à la concentration de NEM. Il a été vérifié au cours de l'étape finale de dialyse que l'élimination du NEM radioactif était bien faite de façon exhaustive et que seule la radioactivité fixée de manière covalente à la protéine subsistait dans l'échantillon.

Des aliquotes des antigènes fabriqués selon les différents protocoles ont alors été placés dans les fioles à scintillation et le rayonnement β émis par la désintégration des atomes de ^{14}C a été enregistré pendant une minute. Les comptages de la radioactivité sont directement proportionnels à la quantité de NEM fixé. Connaissant la quantité de gp160 présente dans chaque aliquote, le rapport du nombre de molécule de NEM par molécule de gp160 a pu être établi.

Les résultats obtenus montrent que la gp160 non réduite ne peut pas fixer de NEM (témoin). La gp160 traitée selon l'invention (BA29) fixe 8 molécules de NEM par

molécule de gp160. Par conséquent , il y a au moins 4 ponts disulfures modifiés à l'intérieur de cet antigène. Il a été montré que l'utilisation d'une concentration de NEM dix fois moindre (BA55) permettait de ne fixer le NEM que sur 2 (1,6 à 1,8) sulfydryls par molécule de gp160. Il est possible qu'un seul pont disulfure soit modifié à l'intérieur de cet antigène. Il a été montré que l'utilisation d'une concentration de NEM dix fois supérieure (BA56) abolissait les propriétés immunologiques de la molécule.

Exemple 4 : Analyse de l'immunogénicité chez le cobaye des glycoprotéines modifiées chimiquement

Formulation des glycoprotéines modifiées chimiquement

Les glycoprotéines modifiées chimiquement sont diluées stérilement en milieu stabilisateur puis adsorbées sur du phosphate d'aluminium. Le mélange stabilisant est composé d'un mélange d'acides aminés et de milieu "Dulbecco's Modified Eagle Medium" DMEM-F12 (Gibco, France). Les glycoprotéines modifiées chimiquement préparées dans les exemples 2-4 (BA29, BA29(7.8), BA52, BA53 et BA55 et BA56) sont diluées dans le mélange stabilisateur avant qu'un volume égal de phosphate d'aluminium à 6,3 mg/ml en PBS soit ajouté à ce mélange.

Les glycoprotéines modifiées chimiquement nommées BA53 et BA52 sont obtenues par utilisation du procédé décrit dans l'exemple 2 pour le BA29 dans lequel l'étape d'alkylation par le NEM a été supprimée (préparation BA53) ; ou l'étape de dénaturation par le SDS a été supprimée (préparation BA52) .

Immunisations

Pour chaque glycoprotéine modifiée chimiquement, on utilise un groupe de 5 cobayes femelle albinos Dunkin-Hartley (Charles River) de 400 g. Chaque cobaye reçoit 5µg d'antigène par voie intramusculaire, dans les cuisses droite et gauche (0,5 ml dans chaque cuisse) à J1 et à J29. Un volume de 3 ml de sang est prélevé par ponction cardiaque sous anesthésie aux jours –1, 28 et 56 (saignée finale environ 30 ml).

Titrages des sérums par ELISA contre la gp160 MN/LAI

Les sérums des cobayes ainsi obtenus ont été analysés par dosage ELISA contre la gp160 MN/LAI native. La gp160 MN/LAI est immobilisée sur la phase solide à raison de 130 ng par cupule pendant 1 heure à 37°C. La plaque est vidée puis saturée par un tampon PBS, Tween 20 0,1% contenant 5% de lait écrémé en poudre. Chaque sérum est

dilué sur la plaque selon des dilutions sériées de raison 3, entre 1/100^{e} et 1/100000^{e} selon les cas, en tampon de saturation et incubé pendant 1 heure 30 à 37°C.

Un anticorps de lapin anti-cobaye (Sigma, St Louis) couplé à la peroxydase, dilué au 1/3000^{e}, permet de révéler la présence d'anticorps spécifiques de la gp160MN/LAI. Les titres sont calculés automatiquement par le lecteur à partir de la densité optique lue et de la droite obtenue avec un sérum étalon. Les valeurs moyennes du titre des immunoglobulines spécifiques de la gp160 MN/LAI pour chaque groupe de cobayes sont comprises entre 10.^{5} et 10.^{6}.

Le groupe témoin injecté avec de la gp160 MN/LAI non traitée est identifié sous le code BA1. Les préparations BA55 et BA29 induisent des anticorps spécifiques ; le BA29 conduisant à un titre supérieur à 5.10^{5}. Aucun anticorps spécifique de la gp160 MN/LAI n'a été détecté dans les sérums pré immuns.

Ces résultats montrent clairement que les glycoprotéines modifiées chimiquement selon la présente invention sont capables d'induire des anticorps reconnaissant spécifiquement la glycoprotéine d'enveloppe du VIH.

Exemple 5 : Test de neutralisation des isolats primaires de VIH

Les tests de neutralisation des isolats primaires de VIH ont été mis en œuvre sur les isolats Bx17 et T051 par utilisation de la méthode de C. Moog et al, telle que décrite dans AIDS Res. Hum. Retroviruses, 1997, 13, 19-27 dont l'intégralité est incorporée ici à titre de référence.

Ce test a été mis en œuvre contre plusieurs isolats primaires de VIH-1; seuls les résultats obtenus avec l' isolats Bx17 et T051 sont détaillés ici.

Les résultats obtenus montrent clairement que les glycoprotéines modifiées chimiquement selon la présente invention sont supérieures aux glycoprotéines non traitées ou soumises à des traitements différents et permettent la neutralisation d'isolats primaires du virus bien qu'elles soient obtenues à partir d' une gp160 isolée à partir d'une souche adaptée en laboratoire (TCLA). On peut dans ces conditions raisonnablement penser que les mélanges de glycoprotéines modifiées chimiquement selon l'invention puissent conduirent à la neutralisation de nombreux isolats primaires du VIH.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 1 page suivante :

Tableau 1 : titre de neutralisation des isolats primaires des virus HIV1, exprimés en inverse de la dilution

Sérums	Bx17	T051
BA1	NN	NN
BA29	7	10
BA52	NN	NN
BA53	NN	Non déterminé
BA55	10	Non déterminé
BA56	NN	Non déterminé

NN : Non Neutralisant

Les chiffres indiquent l'inverse de la dilution du sérum pour laquelle, une neutralisation a été observée.

Conclusions

Les antigènes selon la présente invention sont fabriqués à partir d'une gp160MN/LAI, d'un virus VIH-1 adapté en laboratoire. Cependant ces antigènes permettent d'induire chez l'animal immunisé une réponse humorale capable de neutraliser des isolats primaires du virus VIH-1, ce qui constitue un progrès par rapport aux connaissances actuelles sur ce sujet.

Revendications

1.- Une glycoprotéine d'enveloppe du VIH sous forme purifiée susceptible d'être obtenue par un procédé comprenant les étapes suivantes :

(1) obtention d'une glycoprotéine d'enveloppe sous forme purifiée,

(2) réduction d'au moins un pont disulfure de la glycoprotéine de l'étape (1),

(3) alkylation d'au moins deux groupes sulfhydryls libres,

(4) éventuellement oxydation des groupes sulfhydryls libres restants

(5) dénaturation et

(6) renaturation.

2.- La glycoprotéine selon la revendication 1 dans laquelle, la glycoprotéine (1) est sous forme dimérique.

3.- La glycoprotéine selon la revendication 2 dans laquelle la glycoprotéine de l'étape (1) est une gp160MN/LAI.

4.- La glycoprotéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 dans laquelle l'étape (2) est mise en œuvre par addition d'un agent réducteur selon un rapport molaire (moles d'agent réducteur) /(moles de groupes sulfhydryls) de 1 à 500 fois.

5.- La glycoprotéine selon la revendication 4 dans laquelle on utilise comme agent réducteur du DTT selon un rapport molaire (moles d'agent réducteur)/(moles de groupes sulfhydryls) de 50 fois.

6.- La glycoprotéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 dans laquelle l'étape (3) est mise en œuvre par addition d'un agent alkylant selon un rapport molaire (moles d'agent alkylant) /(moles de groupes sulfhydryls) de 1 à 1000.

7.- La glycoprotéine selon la revendication 6 dans laquelle on utilise comme agent alkylant le NEM selon un rapport molaire (moles de NEM) /(moles de groupes sulfhydryls) de 1 à 100, de préférence 10.

8.- La glycoprotéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 dans laquelle l'étape de dénaturation est mise en œuvre par addition d' un détergent ionique en une quantité de 0,1 à 5% (poids/vol), de préférence du SDS en une quantité de 0,1 % (poids/vol).

9.- La glycoprotéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 dans laquelle la gp160MN/LAI sous forme purifiée (1) est modifiée chimiquement par : (2) réduction par incubation avec du DTT selon un rapport molaire (moles de DTT)/(moles de groupes SH) de 50 à un pH de 7, pendant une durée d'environ 15 minutes à la température ambiante, (3) alkylation par incubation avec du NEM selon un rapport molaire (moles de NEM)/(moles de groupes SH) de 10 à un pH de 7, pendant une durée d'environ 15 minutes, à la température ambiante, (4) oxydation par incubation du produit de l'étape (3) avec un mélange glutathion réduit/glutathion oxydé selon un rapport molaire (moles de glutathion oxydé)/(moles de groupes SH) de 500 avec un rapport glutathion réduit/glutathion oxydé de 10, à un pH de 7,8 pendant une durée d'environ 30 minutes, (5) dénaturation du produit de l'étape 4 par incubation avec 0,1% de SDS (poids/vol.) pendant une durée d'environ 15 minutes et à un pH de 7,8 , puis (6) renaturation par dialyse contre du tampon PBS pendant la durée d'une nuit à la température ambiante.

10.- Composition comprenant un mélange de glycoprotéines selon l'une quelconque des revendications 1à 9.

11.- Anticorps dirigé contre la glycoprotéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

12.- Vaccin contre le VIH comprenant:

(a) Une glycoprotéine d'enveloppe modifiée chimiquement selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 ou une composition selon la revendication 10, ou un anticorps selon la revendication 11 ou un mélange de ces anticorps,

(b) un support ou diluant pharmaceutiquement acceptable et

(c) éventuellement un adjuvant ou mélange d'adjuvants.

13.- Le vaccin selon la revendication 12 comprenant une glycoprotéine d'enveloppe modifiée chimiquement selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 ou une composition selon la revendication 10 pour son utilisation pour induire des anticorps neutralisants le VIH chez un sujet humain à titre thérapeutique ou prophylactique.