

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

11 N° de publication : 2 726 006
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)
21 N° d'enregistrement national : 94 12554
51 Int Cl⁶ : C 12 N 15/48, 1/20, C 07 H 21/00, C 12 Q 1/68, C 07 K
14/16, G 01 N 33/569, A 61 K 39/20

12 DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

22 Date de dépôt : 20.10.94.

30 Priorité :

43 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 26.04.96 Bulletin 96/17.

56 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

60 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

71 Demandeur(s) : INSTITUT PASTEUR — FR.

72 Inventeur(s) : CHARNEAU PIERRE, CLAVEL
FRANCOIS, BORMAN ANDREW, QUILLET
CAROLINE, GUETARD DENISE et MONTAGNIER
LUC.

73 Titulaire(s) :

74 Mandataire : PLASSERAUD GUTMANN.

54 SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT DES ANTIGENES D'UN RETROVIRUS DU TYPE VIH-1 GROUPE O.

57 L'invention concerne une séquence nucléotidique,
plus particulièrement d'ADN et fragments d'ADN clonés
pouvant être obtenus à partir de l'ARN, de cADN ou
d'amorces utilisables pour l'amplification génique, dérivés
de l'ARN ou de l'ADN du rétrovirus HIV-1 groupe O. Cette
séquence nucléotidique comprend la séquence correspon-
dant à Seq ID N° 5 ainsi que toute portion de cette sé-
quence ou variant de cette portion susceptible d'hybrider
avec l'ADN ou l'ARN correspondant du virus HIV-1 groupe
O. L'invention concerne également une composition pour
la détection de la présence ou non d'un rétrovirus HIV-1
groupe O, notamment le rétrovirus HIV-1_(VAU) dans des
échantillons de sérum ou d'autres liquides ou tissu biologi-
que. La composition comprend la séquence nucléotidique
ou une partie de la séquence nucléotidique codant la pro-
téine env du rétrovirus HIV-1_(VAU). L'invention concerne éga-
lement la protéine env du rétrovirus HIV-1_(VAU) ainsi que tout
peptide, polypeptide, glycoprotéine ou variant dérivé de
cette séquence ayant un épitope susceptible d'être re-
connu par des anticorps induits par le virus HIV-1_(VAU) ainsi
que toute composition comprenant cette protéine.

DN sequence 2431 b.p. ATGACGAGATT ... CGACTCTCTTA linear

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
101	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
201	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
301	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
401	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
501	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
601	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
701	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
801	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
901	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
1001	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
1101	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
1201	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
1301	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
1401	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
1501	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
1601	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
1701	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
1801	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
1901	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
2001	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
2101	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
2201	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
2301	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
2401	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
2501	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT
2601	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT	ATGACGAGATT

FR 2 726 006 - A1



SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT DES ANTIGENES D'UN RETROVIRUS DU TYPE VIH-1 GROUPE O

L'invention concerne les antigènes obtenus par expression
5 de séquences nucléotidiques ou par synthèse chimique par exemple en
utilisant des synthétiseurs de marque Applied Biosystems, présents dans
les variants d'HIV-1 groupe O et particulièrement les antigènes
correspondant à ceux isolables des particules virales. A titre d'exemple de
virus HIV-1 du groupe O, on se réfère à l'isolat HIV-1_(VAU).

10 Rappelons que la désignation HIV utilisée dans ce texte
correspondant à la désignation VIH également utilisée.

L'invention concerne également les anticorps, polyclonaux
ou monoclonaux, induits par ces antigènes.

L'invention est également relative à des séquences d'ADN
15 clonées soit présentant une analogie de séquence, soit une
complémentarité avec l'ARN génomique du virus précité. Elle concerne
aussi des procédés de préparation de ces séquences d'ADN clonées.
L'invention concerne également les polypeptides contenant des
séquences d'acides aminés codés par les séquences d'ADN clonées.

20 De plus, l'invention concerne des applications des antigènes
mentionnés précédemment au diagnostic in vitro chez l'homme de
potentialité de certaines formes du SIDA et, en ce qui concerne certains
d'entre eux, à la production de compositions immunogènes et de
compositions vaccinales contre ce rétrovirus. De même, l'invention
25 concerne les applications aux mêmes fins des susdits anticorps et, pour
certains d'entre eux, leur application à la production de principes actifs de
médicaments contre ce sida humain.

L'invention concerne également l'application des séquences
d'ADN clonées et de polypeptides obtenus à partir de ces séquences
30 comme sondes ou amorces pour l'amplification génique, dans des
trousses de diagnostics.

L'invention est également relative à des compositions d'antigènes qui peuvent être obtenus par synthèse chimique ou par expression dans un hôte cellulaire recombinant permettant le diagnostic d'une infection due à un rétrovirus humain de type HIV indépendamment du sous-type HIV-1 ou HIV-2. De telles compositions comprennent au moins un peptide choisi parmi les peptides antigéniques communs aux virus HIV-1, HIV-2 et HIV-1_(VAU) ou des variants de ces peptides antigéniques possédant des caractéristiques immunogènes semblables.

L'invention vise également des compositions permettant le diagnostic spécifique d'une infection due à un rétrovirus humain de type HIV-1, plus particulièrement le HIV-1, groupe M, le HIV-2 ou le HIV-1 groupe O et comprenant au moins un peptide antigénique spécifique du virus HIV-1, un peptide antigénique spécifique du virus HIV-2 et un peptide antigénique spécifique du virus HIV-1 groupe O ou des variants de ces peptides antigéniques possédant des caractéristiques immunogènes semblables. Plus particulièrement, les peptides antigéniques sont dérivés de la protéine d'enveloppe des virus HIV-1 groupe M, HIV-2 et HIV-1 groupe O.

Etat de la technique

Deux types de virus de l'immunodéficience humaine (HIV) ayant une responsabilité dans le développement d'un SLA ou du SIDA ont été isolés et caractérisés. Un premier virus dénommé LAV-1 ou HIV-1 a été isolé et décrit dans la demande de brevet GB 8324.800 et la demande EP 84401.834 du 14/09/1984. Ce virus a également été décrit par F. Barré-Sinoussi et al dans Science (1983), 220, 868-871.

Le rétrovirus HIV de type 2 appartient à une classe distincte et n'a qu'une parenté immunologique réduite avec des rétrovirus HIV de type 1. Les rétrovirus HIV-2 ont été décrits dans la demande de brevet européen n° 87.400.151.4 publiée sous le numéro 239.425.

Le rétrovirus HIV-1 est le plus courant et sa présence est prédominante dans plusieurs régions du monde. Quant au rétrovirus HIV-2, il est le plus souvent retrouvé en Afrique de l'Ouest, bien que sa propagation à l'extérieur de cette région ait été récemment documentée par Grez et al, (1994) J. Virol. 68, 2161-2168.

L'ensemble des lentivirus de l'immunodéficience des primates, comprenant les virus du type 1 et du type 2 de l'immunodéficience humaine ainsi que plusieurs types de virus de primates non humains, augmente en taille et en complexité. Le plus courant de ces virus, le HIV-1, se répand actuellement sous forme d'épidémie mondiale et il est responsable d'un problème de santé public majeur. Peu après l'identification et la caractérisation moléculaire de ce virus, il a été reconnu comme étant très variable, et comprend actuellement plusieurs sous-types (Myers, 1994, Louwagie, et al. 1993, Louwagie, et al. 1992, Myers, G. (1994) HIV-1 subtypes and phylogenetics trees. In: Human Retrovirus and AIDS 1994; Myers, G., Korber, B., Wain-Hobson, S., Smith, R.F. and Pavlakis, G.N., eds. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM. III-2 - III-9.). Cette distinction de sous-type est surtout basée sur la divergence des gènes *gag* et *env*. Au moins 6 sous-types ont été identifiés, désignés A à F, mais plusieurs sont encore susceptibles d'émerger de l'enquête mondiale poussée en cours sur les isolats du HIV-1. Il a été trouvé que ces différents sous-types sont équidistants les uns des autres, dans un profil phylogénétique dit phylogénie en étoile, ce qui suggère que les différents sous-types du HIV-1 auraient évolué et divergé de façon synchrone à partir d'un ancêtre commun.

Récemment, deux virus distincts de ce groupe de virus HIV-1 ont été isolés et caractérisés. Ces deux virus ont été obtenus de patients vivant au Cameroun, en Afrique de l'Ouest Centrale (Gürtler, et al. 1994, Vanden Heasevelde, et al. 1994). Leur séquence, plus particulièrement la séquence de leur gène *env* (enveloppe), montre

clairement que ces virus appartenait à une catégorie distincte de virus apparentés au HIV-1, initialement désignée HIV-1 groupe O (NKENGASONG et al., 1993).

5 Toutefois, la diversité des isolats à l'intérieur de ce groupe de virus apparentés au HIV-1 n'est pas connue, et sa propagation en dehors de l'Afrique n'a pas été documentée.

Description de l'invention

10 Dans le contexte de la présente invention, les inventeurs ont isolé et séquencé le gène *env* d'un troisième isolat du groupe O, le HIV-1_(VAU), obtenu d'une patiente française qui n'a jamais voyagé en dehors de l'Europe et qui est morte du SIDA en 1992. Selon sa séquence d'enveloppe, le HIV-1_(VAU) est apparenté aux deux virus camerounais HIV_{ANT70} et HIV_{MVP5180} récemment caractérisés. L'analyse phylogénétique
15 des séquences *env* révèle que les trois virus semblent constituer un groupe distinct, qui sera appelé ici HIV-1 groupe O. L'isolement du HIV-1_(VAU) de cette patiente indique également qu'une certaine propagation des HIV-1 du groupe O s'est déjà produite en dehors de l'Afrique.

20 Isolement du virus HIV-1_(VAU)

HIV-1_(VAU) a été isolé en 1992 d'une patiente française âgée de 41 ans atteinte du SIDA. Cette patiente présentait en 1986 une leuco-neutropénie sévère associée à un carcinome du col utérin. Néanmoins, elle a progressivement montré des signes d'infections opportunistes, avec
25 une baisse du nombre de cellules T CD4⁺ circulantes et elle est morte du SIDA en 1992. Des anticorps anti-HIV-1 ont d'abord été détectés par ELISA (Elavia, SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR et Abbott) en 1990.

La patiente n'avait jamais voyagé en dehors de l'Europe, n'avait pas utilisé de médicaments par voie intraveineuse et n'avait subi
30 aucune transfusion sanguine connue. Aucun partenaire sexuel originaire de l'Afrique n'a été identifié. Elle a donné naissance à un enfant en bonne

santé en 1971, mais un fils, né en 1980, est mort à l'âge d'un an suite à un épisode clinique très suggestif de SIDA néo-natal. Son troisième enfant né en 1983 et son mari sont actuellement en bonne santé et non infectés.

5 L'isolement du virus a été réalisé de la manière suivante :
les cellules CD8+ présentes dans les PBMC (lymphocytes sanguins
périphériques) de la patiente ont été éliminées à l'aide de billes revêtues
d'IOT8 (Immunotech). Ces PBMC restantes ont été stimulées à la PHA,
puis cocultivées avec des PBMC épuisées en CD8 provenant d'un
10 donneur sain et stimulées à la PHA. La croissance virale dans la
coculture a été suivie par dosage de l'activité transcriptase inverse (RT)
du surnageant et par test ELISA de la p24 du HIV-1 (coffret de diagnostic
commercialisé par DuPont de Nemours). Le virus obtenu de la coculture
initiale a été soumis à plusieurs passages dans des cultures de PBMC
15 épuisées en CD8 et stimulées à la PHA. Plusieurs tentatives ont été
réalisées pour infecter par le HIV-1_(VAU) diverses lignées cellulaires
transformées, dont des cellules MT4 (Harada, et al. 1985) et CEM (Rey,
et al. 1989), ainsi que la lignée P4-2 de cellules Hela-CD4-LTRLacZ
(Clavel et Charneau 1994).

20 Caractérisation biologique de HIV-1_(VAU)

Deux semaines après la coculture des PBMC de la patiente
épuisées en CD8, stimulées à la PHA, avec des cellules similaires d'un
donneur sain, la production de virus a été détectée sous forme d'un pic
d'activité RT dans le surnageant de culture. Ce virus pouvait alors être
25 soumis à des passages en série sur des PBMC normales, épuisées en
CD8, stimulées à la PHA. Sur la figure 1, le panneau A représente la
production du HIV-1_(VAU) dans des surnageants de cultures de PBMC
infectées, contrôlées par dosage RT (cercles pleins) et ELISA de capture
d'antigène p24 HIV-1 (cercles vides). La concentration de p24 HIV-1 est
30 exprimée en ng/ml et l'activité RT en cpm/ μ l. Dans le panneau B, la même

expérience a été effectuée avec un isolat primaire standard du HIV-1 d'un patient atteint du SIDA.

5 Bien que la croissance du HIV-1_(VAU) ait été facilement détectée à l'aide du dosage RT, la détection de virus dans les surnageants de culture à l'aide de l'ELISA p24 HIV-1 (DuPont) était nettement moins sensible. La figure 1 montre la comparaison entre les profils d'infection productive des PBMC avec soit le HIV-1_(VAU) soit un isolat primaire du HIV-1 d'un patient atteint du SIDA, dosés en RT ou p24. Pour des quantités équivalentes de particules, déterminées par dosage de l'activité RT dans les surnageants dosés, approximativement 25 fois moins de p24 a été détecté pour le HIV-1_(VAU) que pour l'autre isolat HIV-1. La différence peut être consécutive au fait que l'anticorps monoclonal spécifique de la p24 du HIV-1, qui est utilisé pour revêtir les plaques ELISA, n'a qu'une faible affinité pour les produits gag du HIV-1_(VAU).

15 Plusieurs tentatives négatives ont été faites pour propager le HIV-1_(VAU) sur des lignées de cellules T humaines transformées, sensibles au HIV-1. En particulier, des cocultures entre des PBMC infectées par le HIV-1_(VAU) et soit des cellules MT4 soit des cellules CEM n'ont pas conduit à la propagation du virus. Il a également été trouvé que ce virus n'était pas capable d'infecter des cellules HeLa CD4⁺ (P4-2) (Clavel et Charneau 1994) portant un gène lacZ inducible par le gène tat. De même, aucune répllication du HIV-1_(VAU) ne pouvait être détectée dans des lymphocytes sanguins périphériques activés de plusieurs chimpanzés.

25 L'analyse de la séquence d'enveloppe HIV-1_(VAU), qui sera décrite en détail plus loin, et sa comparaison avec celle des deux isolats camerounais récemment décrits indique que tous les trois virus appartiennent au même groupe de virus apparentés au HIV-1. De plus, cette comparaison indique que ces trois variantes du virus sont approximativement phylogénétiquement équidistantes les unes des autres. Par conséquent, chacune des trois variantes de virus constitue en soi un sous-type, distinct, de leur groupe, qui est maintenant appelé HIV-1

groupe O. Ce groupe est distinct du groupe des autres isolats HIV-1, identifiés jusqu'ici, que les inventeurs appellent ici HIV-1, groupe M.

L'apparition de ce nouveau groupe pose la question de son origine : est-ce que le groupe O a évolué à partir des virus du groupe M (ou inversement) ou est-ce que chaque groupe a un passé distinct ? Les inventeurs pensent que dans la mesure où à la fois le groupe M et le groupe O présentent un profil de divergence interne similaire, il est vraisemblable qu'ils correspondent chacun à la diversification d'ancêtres distincts de virus dans des populations humaines distinctes. On ne peut pas apprécier à partir des données phylogénétiques et virologiques actuellement disponibles si l'ancêtre de l'un ou l'autre des deux groupes affectait les humains de manière naturelle ou a été introduit chez les humains à partir d'autres espèces. Le seul virus proche du HIV-1 présent chez un primate non humain est l'isolat SIVCPZGAB (Huet, et al. 1990), isolé à partir d'un chimpanzé apparemment infecté de façon naturelle, qui est clairement distinct à la fois du groupe M et du groupe O, et pour lequel aucun équivalent humain n'a été trouvé. Il est peu probable que les virus du groupe O aient récemment évolué à partir d'un virus de chimpanzé dans la mesure où le HIV-1_(VAU) n'a pas réussi à se répliquer dans des lymphocytes de chimpanzés.

Pourquoi l'épidémie du groupe O n'apparaît-elle que maintenant, quelques 15 à 20 ans plus tard que le groupe M ? Il y a trois explications possibles : premièrement, l'introduction de l'ancêtre des virus du groupe O chez les humains se serait produite plus récemment que celle du groupe M; deuxièmement, il se pourrait qu'on ait permis au groupe M de se propager plus tôt que le groupe O en raison de différentes conditions sociales dans leur région d'origine; et troisièmement, les virus du groupe O auraient une capacité de transmission plus réduite, comparée à celle des virus du groupe M. Il a été proposé qu'une telle propriété explique l'absence de propagation mondiale significative du HIV-2, pour lequel une charge virale plus faible

chez les sujets infectés est liée à une transmissibilité réduite (De Cock, et al. 1993). A cet égard, bien que nous n'ayons aucune donnée sur la charge virale chez les patients infectés par un HIV-1 du groupe O, le pouvoir pathogène de ces virus ne semble pas être différent de celui du HIV-1. La patiente chez qui le HIV-1_(VAU) a été isolé est morte du SIDA, comme le patient chez qui l'isolat HIV_{MVP5180} du groupe O a été obtenu.

Toutefois, l'histoire naturelle de l'infection de la patiente HIV-1_(VAU) n'est toujours pas claire, mais il existe plusieurs indications que cette patiente a été infectée avant 1980, comme le suggère la mort à cette date de son deuxième enfant atteint d'un syndrome ressemblant au SIDA.

L'invention concerne tout variant des séquences d'acide nucléique du virus HIV-1_(VAU) ou de tout virus équivalent du groupe O, contenant des protéines de structure qui présentent les mêmes propriétés immunologiques que les protéines de structure codées par le gène env comprenant la séquence décrite à la figure 6 et dénommée « vau », désignée encore par la SEQ ID N° 5.

La présente invention est également relative à des compositions contenant soit des antigènes selon l'invention, soit un mélange d'antigènes selon l'invention associés à des extraits originaux d'un ou plusieurs HIV-1 groupe O ou d'autres virus variants, d'une part, et d'un ou plusieurs HIV-2 et/ou HIV-1, d'autre part, ces compositions étant éventuellement marquées. On peut utiliser tous types de marqueur approprié : enzymatiques, fluorescents, radioactifs, etc.

Acides nucléiques

L'invention concerne les ADN ou fragments d'ADN, plus particulièrement ADN et fragments d'ADN clonés obtenus à partir de l'ARN, d'ADN_c ou d'amorces utilisables en PCR, dérivés de l'ARN ou de l'ADN du rétrovirus HIV-1_(VAU). L'invention concerne encore particulièrement tous les ADN équivalents, notamment tout ADN présentant des homologies de séquence avec l'ADN du HIV-1_(VAU), en

particulier avec la séquence codant la région *env* de la souche HIV-1_(VAU) comprenant la séquence correspondant à la SEQ ID N° 5 représentée à la figure 6 et appelée « *vau* ». L'homologie avec le HIV-1 groupe M est au moins égale à 50%, de préférence à 70% et plus avantageusement encore à environ 90%. D'une façon générale, l'invention concerne tout
5 ADN (ou ARN) équivalent capable de s'hybrider avec l'ADN ou l'ARN d'un rétrovirus HIV-1 du groupe O.

L'invention concerne aussi les séquences d'ARN correspondant aux séquences d'ADN définies ci-dessus.

10 L'invention concerne également le gène de l'intégrase du virus HIV-1_(VAU) comprenant la séquence identifiée par la désignation SEQ ID N° 7 ou s'hybridant avec la SEQ ID N° 7. L'invention vise aussi les ARN correspondant à l'ADN ci-dessus décrit.

L'invention a aussi pour objet des compositions contenant
15 les peptides ou polypeptides codés par la susdite ADN ou fragments d'ADN.

Des oligonucléotides dérivés de la séquence VAU ou encore du gène de l'intégrase du virus HIV-1_(VAU) particulièrement des oligonucléotides comprenant au moins 9 nucléotides, peuvent être utilisés
20 pour la détection de séquences ADN ou ARN de virus HIV-1 du groupe O dans des prélèvements biologiques, des cultures cellulaires, ou des extraits de cellules, par la technique de la PCR ou toute autre technique d'amplification génique. Ces séquences pourraient être utilisées soit comme amorces soit comme sondes en vue de la détection spécifique
25 des produits d'amplification génique. Sont utilisables également comme sonde d'hybridation, les produits d'amplification, ou leur séquence correspondante synthétique, obtenus par synthèse chimique (Applied Biosystems).

L'invention couvre également tout fragment d'au moins
30 100 nucléotides utilisable comme sonde dans des réactions d'hybridation

et capable de permettre une réaction avec une partie du génome d'un variant HIV-1_(VAU) dans des conditions d'hybridation de forte stringence.

Clonage et séquençage du gène *env* HIV-1_(VAU)

5 Pour l'amplification initiale par PCR de l'ADN du HIV-1_(VAU), l'ADN total a été extrait de PBMC infectées par le HIV-1_(VAU) et un segment du gène pol (région intégrase) a été amplifié à l'aide d'amorces dégénérées :

amorce 4506 : 5'AGTGGAT(A/T)(T/C)ATAGAAGCAGAAAGT3'; Seq. ID
10 N°1;

amorce 5011 : 5'ACTGC(C/T)CCTTC(A/C/T)CCTTTCCA3'; Seq. ID N°2;

Le milieu de réaction incluant KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,9), MgCl₂ 1,5 mM, gélatine 0,1 mg/ml, dNTP 0,2 mM, Taq Polymérase 1U (Amersham). La PCR a été effectuée pendant 43 cycles
15 thermiques à 92°C pendant 10 secondes, 50°C pendant 1 minute, 72°C pendant 40 secondes.

Le produit d'amplification résultant a été cloné dans un vecteur pBluescript, engendrant le clone ph4 déposé à la CNCM le 20 octobre 1994 sous le n° I-1486 qui a ultérieurement été utilisé comme
20 sonde pour cribler une banque lambda d'ADN de faible poids moléculaire, digéré par EcoRI, issu de cellules infectées par le HIV-1_(VAU). Brièvement, les PBMC infectées par le HIV-1_(VAU) ont été cocultivées avec des PBMC neuves stimulées à la PHA et épuisées en cellules CD8⁺, pendant 24 heures, après quoi un effet cytopathogène poussé (ECP) était visible.

25 L'ADN de faible poids moléculaire a alors été extrait suivant la méthode de Hirt (Hirt 1967), et digéré avec l'enzyme EcoRI. Une analyse en Southern-blot précédente de cet ADN avait bien montré que le génome HIV-1_(VAU) contenait un seul site EcoRI, permettant le clonage d'espèces d'ADN circulaire non intégré représentant la totalité du génome viral. Le
30 produit de digestion résultant a été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose, et la population de fragments d'ADN d'une taille de 8-12 kb

approximativement a été purifiée et ligaturée à de l'ADN lambda Zap digéré par EcoRI (Stratagene). Après l'encapsidation, l'étalement et le criblage par hybridation avec de l'ADN ph4 marqué au ^{32}P , un clone, λ H34, a été identifié comme étant positif, et amplifié. L'inserat EcoRI a été purifié, soniqué, et cloné par "shotgun" dans le vecteur M13mp18 traité à la phosphatase, digéré avec l'enzyme SmaI. Cent cinquante des clones obtenus ont été séquencés sur un séquenceur d'ADN 373A (Applied Biosystems), et les séquences résultantes ont été rassemblées en une seule séquence à l'aide du progiciel d'analyse d'ADN GCG-Wisconsin.

L'analyse de cette séquence a révélé de nombreux codons non-sens dans tous les cadres de lecture, ce qui est très suggestif d'un génome hypermuté (Vartanian, et al. 1991). Cette séquence étant inutilisable, il a par conséquent été décidé d'amplifier par la PCR le gène *env* du HIV-1_(VAU) à l'aide de l'ADN total de PBMC infectées par le HIV-1_(VAU), et des amorces oligonucléotidiques dérivées de la séquence λ H34 :
amorce TH2 5'GCTCTAGATGGGGATCTCCCATGGCAGG3' Seq. ID N° 3;
amorce UH2 5'GCTCTAGATCAGGGAAGAATCCCTGAGTGT3'. Seq. ID N° 4.

L'amplification par le PCR a été effectuée pendant 35 cycles thermiques à 92°C pendant 15 secondes, 52°C pendant 1 minute, 60°C pendant 2 minutes et 72°C pendant 2 minutes. Le produit d'amplification résultant, d'une taille de 3,5 kb, a été cloné dans le vecteur M13mp18 et séquencé en des réactions successives, en utilisant d'abord l'amorce universelle de séquençage M13, puis des amorces déduites des séquences amont. L'analyse des séquences nucléotidiques et peptidiques a été effectuée à l'aide du progiciel d'analyse d'ADN GCG-Wisconsin. Le gène *env* HIV-1_(VAU) code 877 acides aminés au total, incluant le peptide signal. La séquence nucléotidique du gène *env* HIV-1_(VAU) correspond à la Seq. ID N° 5 (voir figure 3).

Utilisation d'acides nucléiques à titre de sondes

L'invention concerne naturellement aussi l'utilisation des ADN, ADN_c ou de leurs fragments, ou de plasmides recombinants ou
5 autre vecteur équivalent contenant ces fragments, en tant que sondes, pour la détection de la présence ou non du virus HIV-1_(VAU) dans des échantillons de sérum ou autres liquides ou tissus biologiques obtenus à partir de patients suspectés d'être porteurs du virus HIV-1_(VAU). Ces sondes sont éventuellement marquées (marqueurs radioactifs,
10 enzymatiques, fluorescents, etc.). Des sondes particulièrement intéressantes pour la mise en oeuvre du procédé de détection du virus HIV-1_(VAU) ou d'un variant HIV-1_(VAU) peuvent être caractérisées en ce qu'elles comprennent la totalité ou une fraction de l'ADN complémentaire du génome du virus HIV-1_(VAU) ou encore notamment les fragments
15 contenus dans divers clones. On mentionnera plus particulièrement une fraction de l'ADN_c du HIV-1_(VAU) contenant tout ou partie de la région *env*.

Les sondes mises en oeuvre dans ce procédé de détection du virus HIV-1_(VAU) ou dans des trousse de diagnostic, ne sont en aucune façon limitées aux sondes décrites précédemment. Elles comprennent
20 toutes les séquences nucléotidiques issues du génome du virus HIV-1_(VAU), d'un variant HIV-1_(VAU) ou d'un virus proche par sa structure, dès lors qu'elles permettent la détection, à partir de fluides biologiques de personnes susceptibles de présenter un sida, d'un virus HIV-1 du groupe O, en particulier HIV-1_(VAU) par hybridation avec de l'ADN ou de l'ARN du
25 virus HIV-1_(VAU).

Particulièrement avantageuses sont les sondes qui, lorsqu'hybridées avec HIV, donnent une réaction forte avec les HIV appartenant au groupe O et une réaction faible avec les HIV appartenant au groupe M. A titre d'exemple non limitatif, une sonde fabriquée à partir
30 de la séquence du gène de l'intégrase du virus HIV-1_(VAU) (SEQ ID N° 7) donne, lorsqu'hybridée avec HIV dans des conditions d'hybridation telles

que celles décrites dans le brevet EP 178 978, une réaction forte avec les HIV du groupe O et une réaction faible avec les HIV du groupe M.

La détection peut être réalisée de toute façon en soi connue, notamment :

5 par une mise en contact de ces sondes soit avec les acides nucléiques obtenus à partir de cellules contenues dans des fluides biologiques (par exemple liquide céphalo-rachidien, salive, etc.), soit avec ces fluides eux-mêmes, dès lors que leurs acides nucléiques ont été rendus accessibles à l'hybridation avec ces sondes, et ce dans des conditions permettant l'hybridation entre ces sondes et ces acides nucléiques

10 et par une détection de l'hybridation éventuellement produite.

Le susdit diagnostic mettant en jeu des réactions d'hybridation peut également être réalisé à l'aide de mélanges de sondes respectivement dérivées du HIV-1_(VAU), du HIV-1 et du HIV-2, dès lors qu'il n'est pas nécessaire de faire la distinction entre les types de virus HIV recherchés.

15 L'invention a aussi pour objet des vecteurs d'expression contenant la séquence codant pour les protéines d'enveloppe de HIV-1 ou contenant la séquence codant pour l'intégrase.

L'invention comprend des compositions pour la détection de la présence ou non de virus HIV-1_{VAU} dans des échantillons de sérum ou d'autres liquides ou tissus biologiques, obtenus à partir de patients suspectés d'être porteurs du virus HIV-1_{VAU}. Ces compositions sont caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une sonde obtenue à partir d'une séquence nucléotidique issue ou dérivée du génome du virus HIV-1_{VAU}, particulièrement un fragment d'ADN HIV-1_{VAU} contenant la région ou une partie de la région codant la protéine *env* du virus HIV-1_{VAU} ou d'un variant de HIV-1_{VAU}.

25
30

Avantageusement, la composition décrite ci-dessus comprend également une sonde obtenue à partir d'une séquence nucléotidique issue de HIV-1 ou de HIV-2.

5 D'autres compositions pour le diagnostic comprennent les amorces de l'invention utilisables pour l'amplification génique de rétrovirus de groupe O ou variants de ces rétrovirus.

Antigènes, notamment protéines et glycoprotéines

10 L'invention concerne une protéine d'enveloppe externe du rétrovirus HIV-1_{VAU} codée par le gène comprenant la séquence correspondant à la SEQ ID N° 5. Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, cette protéine est en outre caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence d'acides aminés correspondant à la Seq ID N° 6 représentée sur la figure 3 et comportant les résidus d'acides aminés 1 à
15 526. L'invention a aussi pour objet tout polypeptide ou variant, dérivé de ladite séquence, ayant un épitope susceptible d'être reconnu par des anticorps induits par le virus HIV-1_{VAU}.

La susdite protéine peut être obtenue sous forme glycosylée ou non glycosylée.

20 L'invention a aussi pour objet une protéine transmembranaire d'enveloppe comprenant l'enchaînement d'acides aminés SEQ ID N° 8 représenté sur la figure 3 entre les résidus d'acides aminés 527 et 877. Cette protéine transmembranaire est, dans le cadre de l'invention, sous forme glycosylée ou non.

25 L'invention concerne tous les antigènes, notamment protéines, glycoprotéines, polypeptides ou peptides, obtenus par expression de séquences codantes du génome HIV-1_(VAU) et ayant des propriétés immunologiques équivalentes à ceux ou celles du HIV-1_(VAU). Les antigènes sont dits équivalents dans le cadre de la présente
30 invention, dès lors qu'ils sont reconnaissables par les mêmes anticorps,

notamment des anticorps isolables à partir de sérum obtenu d'un patient ayant été infecté par un HIV-1_(VAU).

En particulier, l'invention a pour objet les peptides ou polypeptides synthétisés chimiquement et dont la séquence d'acides aminés est contenue dans celle des protéines d'enveloppe HIV-1_(VAU), représentée sur la figure 3, ou les peptides ou polypeptides équivalents.

On doit aussi inclure, parmi les peptides, polypeptides, protéines ou glycoprotéines équivalents, les fragments des antigènes qui précèdent et les peptides préparés par synthèse chimique ou par génie génétique, dès lors qu'ils donnent lieu à des réactions immunologiques croisées avec les antigènes dont ils sont dérivés. En d'autres termes, l'invention concerne tout peptide ou polypeptide ayant des épitopes identiques ou semblables aux épitopes des susdits antigènes, susceptibles d'être reconnus par les mêmes anticorps. Font partie de ce dernier type de polypeptides, les produits d'expression de séquences d'ADN correspondant aux séquences des ADN codant les polypeptides ou antigènes susdits.

Plus particulièrement, les antigènes obtenus à partir du virus HIV-1_(VAU) ou produits par génie génétique ou synthèse chimique classique et qui présentent le plus grand intérêt dans le contexte de la présente invention sont les antigènes qui permettent d'établir une distinction claire entre les virus HIV-1_(VAU) de l'invention et les virus des groupes HIV-1 et HIV-2. A cet égard, des différences considérables ont été observées au niveau de la protéine d'enveloppe du virus HIV-1_(VAU) ainsi qu'au niveau de l'épitope immunodominant de la portion externe de la protéine PM. Il semble que les protéines gag et pol présentent davantage de similitude avec le virus HIV-1 que la protéine d'enveloppe.

L'invention concerne aussi des peptides ou polypeptides identiques à la région immunodominante de la glycoprotéine transmembranaire d'enveloppe du HIV-1_(VAU). Cette région est représentée à la figure 3.

Des polypeptides préférés de cette région sont par exemple ceux qui contiennent la séquence CKNRLIC ou correspondent à cette séquence. Il peut s'agir aussi de polypeptides ou peptides répondant à la séquence RLLALETFIQNWWLLNLWGCKNRLIC ou comprenant cette séquence.

Un autre peptide préféré, identifié ci-après par la dénomination « peptide VAU », répond à la séquence suivante ou comprend cette séquence ou toute partie de cette séquence susceptible d'être reconnue par des anticorps dirigés contre le rétrovirus HIV-1_(VAU) RARLLALETFIQNQQLLNWLWGCKNRLICYTSVKWNKT.

Des polypeptides variants de cette séquence sont par exemple les polypeptides représentés sur la figure 4 pour les isolats HIV-1_(MVP5180) et HIV-1_(ant70). Ces polypeptides peuvent aussi être dérivés des précédents par insertion et/ou délétion et/ou substitution, par exemple substitution par des résidus d'acides aminés conservatifs.

Synthèse du peptide VAU

Le peptide VAU a été préparé par la technique classique de synthèse peptidique en phase solide par la méthode Fmoc en « flow continu ». Le peptide a été préparé à l'aide d'un synthétiseur Milligen 9050 PEP en utilisant la résine Millipore PEG PAL, substituée par le premier résidu d'acide aminé C-terminal. Les chaînes latérales des acides aminés sont protégées par les groupes suivants : Pmc pour l'arginine ; Trt pour l'asparagine, la glutamine et la cystéine ; Boc pour la lysine ; tBu ester pour l'acide glutamique ; tBu éther pour la sérine, la thréonine et la tyrosine. Les groupements temporaires Fmoc sont éliminés par une solution de pipéridine à 20% dans le DMF. Les réactions de couplage de chaque acide aminé sont réalisées avec 6 équivalents de DIPCDI et d'HOBt. Certains résidus nécessitent un double couplage notamment les arginines 1 et 23, les cystéines 19 et 26, l'asparagine 11, les glutamines 10, 12 et 13, l'alanine 4, l'isoleucine 9, les leucines 2, 3, 14 et 15.

Après couplage, la résine est séchée sous vide. Le peptide est clivé du support par le réactif K pendant 4 heures à température ambiante. Le brut est précipité et lavé à l'éther éthylique. Le produit est purifié par chromatographie haute pression (HPLC) sur un instrument

5 WATERS LC PREP 4000 avec des cartouches WATERS Delta Pak C18 40x100mm, débit 30 ml/mn, gradient acétonitrile/TFA 0,1%. Les fractions contenant le peptide sont rassemblées, concentrées à l'évaporateur rotatif puis lyophilisées.

Cyclisation

10 Le peptide (0,025mM) est dissous dans une solution d'acétate d'ammonium 10mM. Le pH est amené à 8,5 avec une solution d'ammoniaque 1M. Le pH est réajusté après 3 ou 4 heures. La cyclisation est suivie par HPLC à 214 nm et 280 nm, colonne WATERS Delta Pak C18 5 μ , gradient acétonitrile/TFA 0,1%. La cyclisation est terminée au

15 bout de 15 heures. Le pH est amené à 6 à l'aide d'acide acétique 97-100%, la solution est lyophilisée puis purifiée dans les mêmes conditions que pour le peptide brut.

Le peptide est contrôlé par HPLC et par spectrométrie de masse selon la technique d'électrospray (spectrophotomètre FISON VG

20 Trio 2000).

Fmoc : Fluoroenyl-9 methyloxycarbonyl

Pmc : Pentanemethyl-8 chromane sulfonyl-6

Trt : Tritryl

Boc : Tertbutyloxycarbonyl

25 tBU : tert butyl

DMF : Dimethylformamide

DIPCDI : Diisopropyl carbodiimide

HOBT : Hydroxy-1 benzotriazole

TFA : acide trifluoroacétique

30 Réactif K : Phénol/Eau/Thioanisole/Ethanedithiol/TFA;
2,5ml/2,5ml/2,5ml/1,5ml/41ml

Comparaison de la séquence d'acides aminés de l'enveloppe HIV-1_(VAU) avec la séquence correspondante d'autres virus HIV.

L'analyse en Western-blot d'une série d'échantillons
 5 sériques provenant d'une patiente infectée par le HIV-1_(VAU) est présentée sur la figure 2. Des bandelettes de nitrocellulose, portant des protéines séparées par électrophorèse et provenant de particules de HIV purifiées (SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR), ont été mises à incuber avec des échantillons de sérum et leur réactivité a été évaluée selon les protocoles
 10 recommandés par le fabricant. Les résultats obtenus sont les suivants :
 Bandelette 1 : protéines spécifiques de HIV-2, qu'on a fait réagir avec un échantillon de sérum de la patiente HIV-1_(VAU) obtenu en février 1992.
 Bandelettes 2-7 : sérums positifs HIV-1 ; sérums de la patiente HIV-1_(VAU):
 2: obtenu en novembre 1990; 3 : en décembre 1990; 4 : en février 1991; 5
 15 : en février 1992; 6 : témoin négatif; 7 : témoin positif (sérum d'un individu infecté par le HIV-1). Les noms et la taille des protéines (en kD) sont indiqués dans la marge.

La figure 3 montre un alignement de la séquence d'acides aminés de l'enveloppe de HIV-1_(VAU) avec la séquence correspondante de
 20 l'isolat de référence HIV-1_{la1} (Wain-Hobson, et al. 1985). Les peptides signal, la boucle V3 et l'épitope immunodominant gp41 sont mis en relief par des rectangles hachurés. Le site de clivage entre la glycoprotéine d'enveloppe externe gp120 et la gp41 transmembranaire est indiqué par des flèches. Les lignes verticales entre les lettres d'acides aminés
 25 indiquent une identité complète, les deux-points (:) indiquent une forte homologie, et les points (.) indiquent une homologie limitée entre des acides aminés individuels. L'alignement a été effectué en utilisant le programme GAP du progiciel GCG-Wisconsin.

La version originale (1.0) des programmes GAP et BESTFIT
 30 a été écrite par Paul Haeberli à partir d'une étude détaillée des publications de Needleman et Vunsch (J. Mol. biol. 48, 443-453 (1970) et

de Smith et Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981). Les alignements limités ont été mis au point par Paul Haeberli et ajoutés au progiciel pour constituer la version 3.0. Ils ont ensuite été fusionnés en un seul programme par Philip Marquess pour constituer la version 4.0. Les pénalités d'absence d'écart dans l'alignement des protéines ont été modifiées tel que suggéré par Rechid, Vingron et Argos (CABIOS 5 ; 107-113 (1989).

L'alignement de la figure 3 révèle de nombreuses zones de divergences poussées, avec quelques domaines conservés çà et là. Ces régions conservées correspondent grossièrement aux domaines qui sont également conservés dans les isolats HIV-1 classiques (Alizon, et al. 1986, Benn, et al. 1985). Parmi les domaines divergents, la boucle V3, appelée également déterminant principal de neutralisation (Javaherian, et al. 1990, Javaherian, et al. 1989, Matsushita, et al. 1988) est clairement l'un des plus divergents, bien que les deux cystéines définissant la boucle soient conservées. La séquence de la coiffe de la boucle, GPGRF pour le HIV-1_{lai}, est GPMAWY chez le HIV-1_(VAU). Ce motif de la coiffe est identique à celui de l'isolat du groupe O camerounais HIV_{ANT70} (Vanden Heasevelde, et al. 1994), mais est différent de celui de l'autre isolat du groupe O, HIV_{MVP5180} (Gürtler, et al. 1994), pour lequel le motif est GPMRWR.

Dans l'ensemble de l'enveloppe, 29 sites de N-glycosylation potentiels ont été identifiés au total, dont 13 sont conservés comparativement à d'autres protéines d'enveloppe HIV-1. On a également trouvé 19 cystéines conservées au total, ce qui indique que l'architecture globale de repliement de la protéine est conservée, mais on a trouvé 5 cystéines non conservées.

La figure 4 montre l'alignement multiple des peptides immunodominants dans le segment extracellulaire de la glycoprotéine d'enveloppe transmembranaire de différents isolats HIV-1. Toutes les séquences sont comparées à la séquence de référence HIV-1_{LAI}. Des

traits d'union indiquent une identité au HIV-1LAI. L'alignement a été effectué à l'aide du programme PILEUP du progiciel GCG-Wisconsin.

Dans le programme PILEVP, la stratégie de rassemblement représentée par le dendrogramme est nommée UPGMA, qui signifie en anglais « Unweighted pair-group method using arithmetic averages » (Smith, P.H.A. Sokal, R.R. (1973) dans *Numerical Taxonomy* (p.p. 230-234), W.H. Freeman and Company, San Francisco, California, USA). Chaque alignement en pair de PILEVP utilise la méthode de Needleman et Wunsch (*Journal of Molecular Biology* 48 ; 443-453 (1970)).

Comme le montre la figure 4, la séquence d'acides aminés de l'épitope immunodominant de la portion extérieure de la protéine TM (Gnann, et al. 1987) est sensiblement différente de celle d'autres isolats HIV-1 et HIV-2. Toutefois, elle a gardé la plupart des acides aminés qui se sont révélés conservés entre les virus HIV-1 et HIV-2.

On a trouvé que certains acides aminés particuliers n'étaient conservés qu'entre les virus du groupe O : tel est le cas de la lysine en position 21 sur un peptide de 26 acides aminés, de la thréonine en position 7 et de l'asparagine en position 11. Ces différences pourraient expliquer l'absence de détection d'antigènes d'enveloppe HIV-1 classiques par un des sérums de la patiente HIV-1_(VAU) et également probablement par celui de patients infectés par d'autres virus de groupe O. Globalement, la comparaison entre les séquences d'enveloppe HIV-1_{lai} et HIV-1_(VAU) a montré une identité de 50 %. La séquence d'enveloppe HIV-1_(VAU) a également été comparée à celle d'autres représentants HIV dont les deux membres du sous-type O du HIV-1 décrits et séquencés :, HIV-1_{ANT70} et HIV-1_{MVP5180} et SIV. Les résultats de cette analyse, présentés sur le Tableau 1, établissent que le HIV-1_(VAU) appartient au sous-type O. L'enveloppe HIV-1_(VAU) est identique à 70 % à l'enveloppe HIV-1_{ANT70} et identique à 71 % à HIV-1_{MVP5180}. Parmi les sous-types HIV-1 les plus courants, l'identité au niveau de l'enveloppe est comparable, allant de 74 % à 80 %.

[illegible]

La relation entre le HIV-1_(VAU), d'autres membres de la phylogénie des HIV-1 et les deux virus récemment décrits du sous-type O a été analysée par construction d'un arbre phylogénétique de parcimonie non pondérée à l'aide de la séquence nucléotidique de la région transmembranaire *env*. Le résultat de cette analyse est représenté sur la fig. 5 dans laquelle les nombres indiquent le nombre de changements nucléotidiques. La figure 5 montre que le HIV-1_(VAU) est à peu près équidistant des deux autres virus du sous-type O, et que, globalement, ces trois virus semblent être approximativement équidistants les uns des autres. En effet, le nombre de changements nucléotidiques entre le HIV-1_{MVP5180} et le HIV-1_(VAU) est de 218 dans le segment de génome analysé, alors que la distance est de 183 entre le HIV-1_{MVP5180} et le HIV-1_{ANT70}, et de 213 entre le HIV-1_{ANT70} et le HIV-1_(VAU). Ce profil de divergence est très similaire à ce qu'on trouve dans l'ensemble des autres sous-types HIV-1, où le nombre de changements nucléotidiques uniques que l'on trouve entre deux sous-types distincts va de 157 (sous-type E au sous-type F) à 219 (sous-type A au sous-type D).

Le tableau 1 montre la comparaison des séquences d'enveloppe de différents virus apparentés au HIV-1. Les nombres indiquent le pourcentage d'identité en acides aminés entre des séquences d'enveloppe tels qu'ils ont été calculés, tels qu'ils ont été calculés à l'aide du programme GAP du progiciel GCG-Wisconsin. * : pour HIV_{ANT70}, seule la protéine d'enveloppe externe a été utilisée dans la comparaison.

25 Compositions comprenant des antigènes HIV-1_(VAU)

De façon générale, l'invention concerne toute composition utilisable en détection in vitro de la présence dans un fluide biologique, notamment de personnes ayant été mises au contact du HIV-1_(VAU), ou d'anticorps contre l'un au moins des antigènes HIV-1_(VAU). Cette composition peut être appliquée au diagnostic sélectif de l'infection par un

HIV-1 du groupe O, en mettant en oeuvre les techniques de diagnostic telles qu'elles sont décrites dans les demandes de brevet EP 84401.834 et EP 87400.151.4. Dans le contexte de la présente invention, on utilise tout constituant comprenant des déterminants antigéniques capables d'être reconnus par des anticorps produits contre le HIV-1_(VAU), par exemple des antigènes ou peptides recombinants ou peptides synthétisés chimiquement définis à partir de la séquence de l'enveloppe HIV-1_(VAU). A cet égard, l'invention concerne plus particulièrement des compositions contenant l'une au moins des protéines d'enveloppe du virus HIV-1_(VAU). On mentionnera, à titre d'exemples de compositions, celles qui contiennent des protéines, glycoprotéines ou peptides de la protéine d'enveloppe correspondant à l'ensemble de la région 590-620 de la protéine gp41 du HIV-1_(VAU) ou aux parties de cette région spécifiques du HIV-1_(VAU) tels que les peptides -TFIQN- ou -WGCKNR-.

L'invention concerne également des compositions associant des protéines et/ou glycoprotéines et/ou peptides HIV-1_(VAU), recombinants ou synthétiques, avec des protéines et/ou glycoprotéines et/ou peptides HIV-1 et/ou HIV-2 et/ou d'un autre HIV-1 groupe O obtenus par extraction ou dans des lysats ou par recombinaison ou par synthèse chimique et/ou de peptides dérivés de ces protéines ou glycoprotéines et susceptibles d'être reconnus par des anticorps induits par le virus HIV-1 et/ou HIV-2 et/ou HIV-1, groupe O.

Les compositions diagnostiques contenant des déterminants antigéniques capables d'être reconnus par des anticorps dirigés contre le HIV-1_(VAU), en particulier les compositions peptidiques, peuvent être incluses dans ou associées à des compositions ou des trousse déjà disponibles pour la détection de l'infection par des rétrovirus HIV-1 et/ou HIV-2, de façon à étendre le spectre de détection des trousse à la détection des rétrovirus HIV-1 du groupe O.

A titre d'exemples non limitatifs :

- soit des protéines du noyau (core), particulièrement les protéines gag, pol, HIV-1 et HIV-2 ou des peptides de celles-ci, et des protéines ou peptides d'enveloppe HIV-1_(VAU),

5 - soit des glycoprotéines d'enveloppe HIV-1, des glycoprotéines d'enveloppe HIV-2 et des glycoprotéines d'enveloppe HIV-1_(VAU),

- soit des mélanges de protéines et/ou glycoprotéines HIV-1, de protéines et/ou glycoprotéines HIV-2 et de protéines et/ou glycoprotéines d'enveloppe HIV-1_(VAU).

10 Il est important de noter que, bien que les anticorps de patients infectés par des virus HIV-1, groupe O réagissent fortement avec des antigènes gag et pol de virus HIV-1 groupe M, leur réactivité est pratiquement nulle avec des antigènes d'enveloppe de virus du groupe M. Il est donc important que la composition de la présente invention
15 comprenne au moins une protéine ou un peptide d'enveloppe HIV-1_(VAU) de façon à ce que ce virus puisse être détecté avec certitude.

De telles compositions, utilisées en diagnostic, aident par conséquent au diagnostic du sida ou des symptômes qui lui sont associés, qui s'étendent sur un plus large spectre des agents étiologiques
20 responsables. Il va sans dire que l'utilisation de compositions de diagnostic qui ne contiennent que des protéines et/ou glycoprotéines d'enveloppe HIV-1_(VAU) n'en restent pas moins utiles pour la détection plus sélective de la catégorie de rétrovirus qui peut être tenue pour responsable de la maladie.

25

Procédés et trousse de diagnostic d'infections causées notamment par le virus HIV-1_(VAU)

La présente invention concerne un procédé de diagnostic in vitro de l'infection par les HIV, agents étiologiques du SIDA et de
30 syndromes apparentés, qui comprend la mise en contact d'un sérum ou d'un autre milieu biologique, provenant d'un patient ou sujet faisant l'objet

du diagnostic, avec une composition contenant l'un(e) au moins des protéines, glycoprotéines ou peptides HIV-1_(VAU), et la détection d'une réaction immunologique éventuelle. Des exemples de telles compositions ont été décrits plus haut.

5 Des méthodes préférées mettent en jeu, par exemple, des réactions immunoenzymatiques de type ELISA ou d'immunofluorescence. Les titrages peuvent être des mesures par immunofluorescence directe ou indirecte ou des dosages immunoenzymatiques directs ou indirects.

De tels titrages comprennent par exemple :

10 - le dépôt de quantités déterminées de l'extrait ou des compositions antigéniques visées conformes à la présente invention dans les puits d'une microplaque de titrage ;

- l'introduction dans ces puits d'un sérum dilué ou non dilué, ou de dilutions croissantes du sérum, contenant essentiellement les anticorps dont la présence doit être détectée in vitro ;

15 - l'incubation de la microplaque ;

- le lavage soigneux de la microplaque avec un tampon approprié ;

20 - l'introduction dans les puits de la microplaque d'anticorps marqués spécifiques anti-immunoglobuline humaine, le marquage étant réalisé par une enzyme choisie parmi celles qui sont capables d'hydrolyser un substrat de telle sorte que ce dernier subit alors une modification de son absorption des radiations, au moins dans une bande de longueur d'onde déterminée, et

25 - la détection, de préférence de façon comparative par rapport à un témoin, de l'importance de l'hydrolyse du substrat en tant que mesure des risques potentiels ou de la présence effective de l'infection.

30 La présente invention est également relative à des nécessaires ou trousse de diagnostic de l'infection par le virus HIV-1_(VAU), lesquels comprennent :

- un extrait, une fraction plus purifiée, ou un antigène synthétique dérivé des types de virus indiqués ci-dessus, cet extrait fraction ou antigène marqué, par exemple, de façon radioactive, enzymatique, fluorescente ou autre,

5 - des antiimmunoglobulines humaines ou une protéine A (fixée de façon avantageuse sur un support insoluble dans l'eau) telles que des billes d'agarose) ou des puits de microplaque, etc.),

- éventuellement un échantillon de fluide biologique ou cellules obtenu à partir d'une personne en bonne santé ;

10 - des tampons et, le cas échéant, des substrats pour la visualisation du marquage.

L'invention a aussi pour objet des compositions immunogènes capables d'induire des anticorps reconnaissant des antigènes pouvant être obtenus par synthèse chimique ou par

15 recombinaison.

Sérologie

La capacité des anticorps sériques de la patiente infectée par le HIV-1_(VAU) à réagir avec des préparations antigéniques HIV-1 a été

20 évalué à l'aide de diverses trousse disponibles dans le commerce : GENELAVIA MIXT (SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR), Abbott, Wellcome, et Behring. La réactivité de ces anticorps avec différentes protéines HIV-1 a été examinée à l'aide de la trousse de Western-blot de SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR, suivant les protocoles

25 recommandés par le fabricant.

Plus précisément, le sérum de la patiente a été examiné plusieurs fois à l'aide de trousse ELISA spécifiques HIV-1. Il a d'abord été testé et s'est avéré être positif en 1990, étant noté 7,33 (ce chiffre correspond au rapport entre la Do mesurée et la Do du bruit de fond)

30 avec la trousse de SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR, 3,50 avec la trousse Abbott et 2,70 avec la trousse Wellcome. En utilisant des réactifs

spécifiques à la fois du HIV-1 et du HIV-2, le sérum a été noté 1,42 avec la trousse Behring et 4,40 avec la trousse Wellcome.

La capacité du sérum de la patiente à réagir à différentes dates avec différentes protéines de structure HIV-1 à l'aide du dosage par immunoempreinte LAV BLOT HIV-1, test commercialisé par SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR. Comme le montre la figure 5, avec tous les échantillons de sérum testés, on n'a remarqué qu'une très faible réactivité du sérum avec les protéines *env* HIV-1 gp160 et gp120. Toutefois, le sérum a réagi fortement avec les protéines *gag* de HIV-1 p55 (précurseur de *gag*) et p24 (CA), et avec les produits *pol* p66 (RT) et p34 (IN). En immunoempreinte HIV-2, on n'a détecté qu'une très faible réactivité avec la p26 *gag*.

Ceci illustre que la détection d'anticorps spécifiques du groupe O avec des trousses de diagnostic sérique disponibles dans le commerce doit être soigneusement contrôlée. Bien que des anticorps sériques de patients infectés par des virus du groupe O présentent de fortes réactions croisées avec les antigènes *gag* et *pol* du groupe M, ils présentent peu ou pas de réactions avec les antigènes d'enveloppe de groupe M. On peut, par conséquent, supposer qu'une proportion significative de ces patients pourrait ne pas être détectée en utilisant certaines trousses à base de réactifs antigéniques d'enveloppe du groupe M. En effet, dans une étude préliminaire récente de plusieurs sérums de patients infectés par le groupe O, il a été trouvé que la capacité de détecter des anticorps spécifiques du groupe O était très différente selon la trousse de détection utilisée (Loussert-Ajaka, I., Ly, T.D., Chaix, M.L., Ingrand, D., Saragosti, S., Courroucé, A.M., Brun-Vézinet, F. and Simon, F. (1994). HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients. *Lancet*. **343**, 1393-1394.). Ceci implique qu'une étude soignée et poussée de la réactivité d'un grand nombre de sérums du groupe O avec toutes les trousses de diagnostic disponibles sur la marché est nécessaire.

Compositions comprenant des anticorps polyclonaux ou monoclonaux préparés à partir des antigènes recombinants ou synthétiques du virus HIV-1_(VAU).

5 L'invention concerne un sérum susceptible d'être produit chez l'animal par inoculation à celui-ci du HIV-1_(VAU), particulièrement les épitopes antigéniques du HIV-1_(VAU) et plus particulièrement les épitopes antigéniques de la protéine d'enveloppe du virus HIV-1_(VAU). L'invention concerne plus particulièrement les anticorps polyclonaux plus
10 spécifiquement orientés contre chacun des antigènes, notamment protéines ou glycoprotéines du virus. Elle concerne aussi des anticorps monoclonaux produits par différentes techniques, ces anticorps monoclonaux étant orientés respectivement plus spécifiquement contre les différentes protéines du HIV-1_(VAU), particulièrement les protéines
15 d'enveloppe du HIV-1_(VAU).

Ces anticorps polyclonaux ou monoclonaux sont utilisables dans différentes applications. On mentionnera essentiellement leur utilisation pour neutraliser les protéines correspondantes, voire inhiber l'infectivité du virus entier. Ils peuvent également être utilisés par exemple
20 pour mettre en évidence les antigènes viraux dans les préparations biologiques ou pour réaliser des opérations de purification des protéines et/ou glycoprotéines correspondantes, par exemple lors de l'utilisation dans des colonnes de chromatographie d'affinité.

A titre d'exemple, des anticorps anti-enveloppe ou des
25 anticorps anti-gag sont des réactifs utilisables en diagnostic, en particulier pour la détection de particules HIV-1 groupe O par ELISA de capture d'antigène.

L'invention concerne des anticorps dirigés contre un ou des antigènes du virus HIV-1_(VAU) produits à partir de séquences d'acides aminés du HIV-1_(VAU). Des techniques d'obtention d'anticorps à partir
30

d'épitopes antigéniques semblables aux épitopes antigéniques du virus HIV-1_(VAU) de la présente invention ont été décrites précédemment.

La technique de préparation d'anticorps décrite dans la publication de ULMER et al., 1993 peut être utilisée par l'homme du métier pour préparer les anticorps de la présente invention, les modifications permettant d'adapter cette technique aux antigènes de la présente invention faisant partie des connaissances de l'homme du métier.

De ce qui précède, il résulte que l'invention concerne la détection du virus HIV-1_(VAU) ou d'un variant grâce à la mise en oeuvre des anticorps décrits précédemment dans un procédé faisant appel à différentes étapes, ces étapes étant spécifiquement prévues pour faire apparaître les propriétés caractéristiques du virus HIV-1_(VAU).

D'une façon générale, le procédé de détection du virus HIV-1_(VAU) ou d'un variant dans des échantillons de sérum ou d'autres liquides biologiques ou tissus, obtenus à partir de patients suspectés d'être porteurs du virus HIV-1_(VAU) comprend les étapes suivantes :

- la fabrication d'au moins une sonde éventuellement marquée ;
- au moins une étape d'hybridation conduite dans des conditions permettant l'hybridation par mise en contact de l'acide nucléique de l'échantillon du patient suspect avec ladite sonde marquée et immobilisation du complexe formé sur un support solide approprié,
- le lavage dudit support solide avec une solution de lavage adéquate,
- la détection dudit complexe et donc de la présence ou non du virus HIV-1_(VAU) par méthode appropriée d'immunodétection, ou autre, connue de l'homme du métier.

Dans un autre mode de réalisation préféré du procédé selon l'invention, l'hybridation précitée est conduite dans des conditions non

stringentes et le lavage de la membrane est réalisé dans des conditions adaptées à celles de l'hybridation.

En utilisant une sérologie ou une technique d'amplification génique telle que la Polymerase Chain Reaction (PCR) spécifique, l'importance de l'épidémie HIV-1 du groupe O a été évaluée précisément. Il a été trouvé que 5 à 10 % de patients infectés par un HIV-1 au Cameroun sont en réalité infectés par des virus du groupe O. Toutefois, à part l'isolat de virus décrit ici, la propagation de virus du groupe O en dehors de l'Afrique de l'Ouest Centrale n'a pas été documentée. La patiente chez qui le HIV-1_(VAU) a été isolé a toujours vécu en France et n'a jamais voyagé en Afrique. Jusqu'ici, nous n'avons aucune preuve précise concernant l'origine de son infection, mais ce cas indique qu'une certaine propagation des virus du groupe O en Europe s'est déjà produite.

REFERENCES

Agut, H., Candotti, D., Rabanel, B., Huraux, J., Remy, G., Ingrand, D., Tabary, T., Chippaux, C., Chamaret, S., Guétard, D., Dauguet, C. et Montagnier, L. (1992).

Isolation of atypical HIV-1-related retrovirus from AIDS patient (L'isolement de rétrovirus atypique apparenté au HIV-1 de patient atteint du SIDA). *Lancet*. 340, 681-682.

Alizon, M., Wain-Hobson, S., Montagnier, L. et Sonigo, P. (1986). Genetic variability of the AIDS virus : nucleotide sequence analysis of two isolates from African patients (Variabilité génétique du virus du SIDA : analyse de la séquence nucléotidique de deux isolats de patients africains). *Cell*. 46, 63-74.

Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Brun-Vezinet, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. et Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic

retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS) (Isolement d'un rétrovirus lymphotrope T d'un patient présentant un risque de symptôme de l'immunodéficience acquise (SIDA)). *Science*. 220, 868-871.

5

Benn, S., Rutledge, R., Folks, T. et al, e. (1985). Genomic heterogeneity from AIDS retroviral isolates from North America and Zaire (Hétérogénéité génomique d'isolats rétroviraux de SIDA de l'Amérique du Nord et du Zaire). *Science*. 230, 949-951.

10

Clavel, F. et Charneau, P. (1994). Fusion from without directed by Human immunodeficiency virus particles (Fusion de l'extérieur dirigée par des particules du virus de l'immunodéficience humaine). *J. Virol.* 68, 1179-1185.

15

Clavel, F., Guétard, D., Brun-Vézinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A. G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Champalimaud, J. L. et Montagnier, L. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS (Isolement d'un nouveau rétrovirus humain de patients ouest-africains atteints du SIDA). *Science*. 233, 343-346.

20

De Cock, K. M., Adjuorlolo, G., Epkini, E., Sibailly, T., Kouadio, J., Maran, M., Brattegaard, K., Vetter, K., Doorly, R. et Gayle, H. (1993). Epidemiology and transmission of HIV-2 : why there is no HIV-2 epidemic (Epidémiologie et transmission de HIV-2 : pourquoi il n'y a aucune épidémie de HIV-2). *JAMA*. 270, 2083-2086.

25

De Leys, R., Vanderborght, B., Vanden Haesevelde, M., Heyndrickx, L., van Geel, A., Wauters, C., Bernaerts, R., Saman, E., Nijs, P. et Willems, B. (1990). Isolation and partial characterization of an unusual human

30

immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin (Isolement et caractérisation partielle d'un rétrovirus inhabituel de l'immunodéficience humaine de deux personnes originaires de l'Afrique de l'Ouest Centrale). *J Virol.* 64, 1207-1216.

5

Gnann, J., Cormick, J., Michell, S., Nelson, J. et Oldstone, M. (1987). Synthetic peptide immunoassay distinguishes HIV type 1 and type 2 infections (L'immunodosage par peptide de synthèse distingue les infections de HIV du type 1 et du type 2). *Science.* 237, 1346-1349.

10

Grez, M., Dietrich, U., Balfe, P., von Briesen, H., Maniar, J., Mahambre, G., Delwart, E., Mullins, J. et Rubsamen-Waigmann, H. (1994). Genetic analysis of Human Immunodeficiency virus type 1 and 2 (HIV-1 and HIV-2) mixed infections in India reveals a recent spread of HIV-1 and HIV-2 from a single ancestor for each of these viruses (L'analyse génétique d'infections mixtes du virus de l'immunodéficience humaine du type 1 et 2 (HIV-1 et HIV-2) en Inde révèle une propagation récente de HIV-1 et de HIV-2 à partir d'un seul ancêtre pour chacun de ces virus). *J. Virol.* 68, 2161-2168.

15

20

Gürtler, L. G., Hauser, P. H., Eberle, J., von Brunn, A., Knapp, S., Zekeng, L., Tsague, J. M. et Kaptue, L. (1994). A new subtype of Human Immunodeficiency Virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon (Un nouveau sous-type de virus de l'immunodéficience humaine du type 1 (MVP-5180) du Cameroun). *J Virol.* 68, 1581-1585.

25

Harada, S., Koyanagi, Y. et Yamamoto, N. (1985). Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay (Infection de HTLV-III/LAV dans des cellules MT-2 et MT-4 porteuses de HTLV-I et application dans un dosage sur plaque). *Science.* 229, 563-566.

30

Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures (Extraction sélective d'ADN de polyome à partir de cultures de cellules de souris infectées). *J. Mol. Biol.* 26, 365-369.

5

Huct, T., Cheynier, R., Meyerhans, A., Roelants, G. et Wain-Hobson, S. (1990). Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1 (Organisation génétique d'un lentivirus de chimpanzé apparenté au HIV-1). 345, 356-359.

10

Javaherian, K., Langlois, A. J., LaRosa, G. J., Profy, A. T., Bolognesi, D. P., Herlihy, W. C., Putney, S. D. et Matthews, T. J. (1990). Broadly neutralizing antibodies elicited by the hypervariable neutralizing determinant of HIV-1 (Anticorps neutralisant un spectre large induit par le déterminant neutralisant hypervariable de HIV-1). *Science*. 250, 1590-1593.

15

Javaherian, K., Langlois, A. J., Mc Danal, C., Ross, K. L., Eckler, L. I., Jellis, C. L., Profy, A. T., Rusche, J. R., Bolognesi, D. P., Putney, S. D. et Matthews, T. J. (1989). Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein (Domaine neutralisant principal de la protéine d'enveloppe du virus de l'immunodéficience humaine de type 1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86, 6768-6772.

20

Louwagie, J., McCutchan, F., Peeters, M., Brennan, T., Sanders-Buell, E., Eddy, G., van der Groen, G., Fransen, K., Gershy-Damet, G. et Deleys, R. (1993). Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes (L'analyse phylogénétique de gènes gag de 70 isolats internationaux de HIV-1 fournit la preuve de génotypes multiples). *AIDS*. 7, 769-80.

25

30

Louwagie, J., McCutchan, F., Van der Groen, G., Peeters, M., Fransen, K., Piot, P., Gershy-Damet, G., Roelants, G., Van Heuverswyn, H. et Eddy, G. (1992). Genetic comparison of HIV-1 isolates from Africa, Europe, and North America (Comparaison génétique d'isolats de HIV-1 de l'Afrique, de l'Europe et de l'Amérique du Nord). *AIDS Res Hum Retroviruses*. 8, 1467-9.

Matsushita, S. M., Robert-Guroff, M., Rusche, J., Koito, A., Hattori, T., Hoshino, H., Javaherian, K., Takatsuki, K. et Putney, S. (1988). Characterization of a Human immunodeficiency virus neutralizing monoclonal antibody and mapping of the neutralizing epitope. (Caractérisation d'un anticorps monoclonal neutralisant le virus de l'immunodéficience humaine et cartographie de l'épitope neutralisant). *J. Virol* 62, 2107-2114.

NKENGASONG, J.N. et al., *AIDS* 1993, Vol. 7, N° 11, pp. 1536-1538.

Rey, M. A., Krust, B., Laurent, A. G., Montagnier, L. et Hovanessian, A. G. (1989). Characterization of human immunodeficiency virus type 2 envelope glycoproteins : dimerization of the glycoprotein precursor during processing (Caractérisation des glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'immunodéficience du type 2 : dimérisation du précurseur glycoprotéique au cours de la maturation). *J. Virol.* 63, 647-658.

ULMER J.B. et al., *Science* Vol. 259, Mars 1993, pp. 1745-1749.

Vanden Heasevelde, M., Decourt, J. L., de Leys, R. J., Vanderborght, B., van der Groen, G., van Heuverswijn, H. et Saman, E. (1994). Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African Human Immunodeficiency Virus isolate (Clonage génomique et analyse

de la séquence complète d'un isolat africain très divergeant du virus de l'immunodéficience humaine). *J Virol.* 68, 1586-1596.

5 Vartanian, J.-P., Meyerhans, A., Asjö, B. et Wain-Hobson, S. (1991).
Selection, recombination, and G→A hypermutation of HIV-1 genomes
(Sélection, recombinaison, et hypermutation G→A de génomes de HIV-1).
J. Virol. 65, 1779-1788.

10 Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, O., Cole, S. et Alizon, M. (1985).
Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV (Séquence nucléotidique du
virus du SIDA, LAV). *Cell* 40, 9-17.

REVENDEICATIONS

1. Séquence nucléotidique, plus particulièrement ADN et fragments d'ADN clonés pouvant être obtenus à partir de l'ARN, de cADN ou d'amorces utilisables pour l'amplification génique, dérivés de l'ARN ou de l'ADN du rétrovirus HIV-1 groupe O, ladite séquence nucléotidique étant caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence correspondant à Seq ID N° 5 ainsi que toute portion de cette séquence ou variant de cette portion susceptible d'hybrider avec l'ADN ou l'ARN correspondant du virus HIV-1 groupe O.

2. Séquence nucléotidique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'il s'agit d'ADN ou de fragments d'ADN obtenus à partir de l'ARN, de cADN ou d'amorces pour l'amplification génique, dérivés de l'ARN ou de l'ADN du rétrovirus HIV-1_(VAU), la séquence comprenant l'enchaînement correspondant à Seq ID N° 5 ainsi que toute portion de cette séquence ou variant de cette portion susceptible d'hybrider avec l'ADN ou l'ARN correspondant du virus HIV-1_(VAU).

3. Séquence nucléotidique selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que ladite séquence est choisie parmi le groupe de séquences correspondant à Seq ID N° 1, Seq ID N° 2, Seq ID N° 3 et Seq ID N° 4.

4. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend l'enchaînement de nucléotides correspondant à SEQ ID N° 7 et en ce qu'elle code pour l'intégrase d'un rétrovirus HIV-1 groupe O, en particulier d'un rétrovirus HIV-1_(VAU) ou séquence nucléotidique hybridant avec la séquence contenant l'enchaînement SEQ ID N° 7.

5. Oligonucléotide comprenant au moins 9 nucléotides, tel qu'obtenu à partir d'une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, susceptible d'être utilisée comme amorce pour l'amplification génique d'un rétrovirus HIV-1 groupe O.

6. Séquence de nucléotides utilisable comme sonde, caractérisée en ce qu'elle hybride dans des conditions d'hybridation de forte stringence avec l'ADN produit par amplification génique au moyen d'amorces selon la revendication 5.

5 7. Composition pour la détection de la présence ou non d'un rétrovirus HIV-1 groupe O, notamment le rétrovirus HIV-1_(VAU) dans des échantillons de sérum ou d'autres liquides ou tissu biologique obtenu à partir de patients suspectés d'être porteurs d'un rétrovirus HIV-1 groupe O, ladite composition étant caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une sonde
10 obtenue à partir d'une séquence nucléotidique issue du génome du virus HIV-1_(VAU), particulièrement un fragment de l'ADN de HIV-1_(VAU) contenant la région ou une partie de la région *env* du virus HIV-1_(VAU), d'un variant de HIV-1_(VAU) tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 5.

 8. Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce que
15 ladite composition comprend également une sonde obtenue à partir d'une séquence nucléotidique issue de HIV-1 n'appartenant pas au groupe O et/ou de HIV-2.

 9. Composition pour la détection de la présence ou non d'un rétrovirus HIV-1 groupe O, notamment le rétrovirus HIV-1_(VAU) dans un
20 échantillon biologique, ladite composition étant caractérisée en ce qu'elle comprend au moins deux séquences nucléotidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, , issues du génome du virus HIV-1_(VAU), utilisables en tant qu'amorces pour l'amplification notamment par PCR de l'ADN et/ou de l'ARN de rétrovirus HIV-1 du groupe O et en particulier de HIV-1_(VAU).

25 10. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'il s'agit d'une séquence d'ARN correspondant à une séquence d'ADN selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

 11. Protéine d'enveloppe du rétrovirus HIV-1_(VAU), caractérisée en ce qu'elle peut être obtenue par l'expression dans un hôte cellulaire d'une
30 séquence nucléotidique selon la revendication 1, et en ce que ladite protéine comprend la séquence d'acides aminés comprise entre les résidus 1 et 526

de Seq ID N° 6 ainsi que tout peptide, polypeptide, glycoprotéine ou variant dérivé de ladite séquence ayant un épitope susceptible d'être reconnu par des anticorps induits par le virus HIV-1_(VAU).

5 **12.** Protéine d'enveloppe du rétrovirus HIV-1_(VAU), caractérisée en ce qu'elle peut être obtenue par l'expression dans un hôte cellulaire d'une séquence nucléotidique selon la revendication 1, et en ce que ladite protéine comprend la séquence d'acides aminés comprise entre les résidus 527 à 877 de Seq ID N° 7 ainsi que tout peptide, polypeptide, glycoprotéine ou variant dérivé de ladite séquence ayant un épitope susceptible d'être reconnu par
10 des anticorps induits par le virus HIV-1_(VAU).

13. Polypeptide ou peptide selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence CKNRLIC ou en particulier la séquence RLLALETFIQNWWLLNLWGCKNRLIC ou un variant de cette séquence tel que la séquence RLWALETLIQNQQRLNLWGCKGKLIC, la
15 séquence RLLALETLLQNQQLLSLWGCKGKLVC ou la séquence RARLLALETFIQNQQLLNLWGCKNRLICYTSVKWNKT.

14. Peptide synthétique caractérisé en ce qu'il s'agit d'un fragment d'une protéine selon l'une des revendications 11 ou 12, en ce qu'il est issu de la séquence SEQ ID N° 6 ou de la séquence SEQ ID N° 7 et en
20 ce qu'il est reconnu par des anticorps induits contre un rétrovirus HIV-1_(VAU) ou variant de ce fragment capable d'être reconnu par des anticorps induits par un rétrovirus HIV-1_(VAU).

15. Composition pour la détection in vitro de la présence dans un échantillon biologique humain d'anticorps anti-HIV- 1_(VAU), ladite
25 composition comprenant au moins un antigène comprenant une protéine, une glycoprotéine, un polypeptide ou un peptide de la protéine d'enveloppe d'un rétrovirus HIV-1_(VAU) tel que défini dans l'une quelconque des revendications 11 à 14.

16. Composition selon la revendication 15, caractérisée en ce
30 qu'elle comprend en outre un antigène tel qu'une protéine, une glycoprotéine, un polypeptide ou un peptide d'un virus HIV-1 n'appartenant

pas au groupe O et/ou d'un virus HIV-2 ou un peptide dérivé d'un virus HIV-1 n'appartenant pas au groupe O et/ou d'un virus HIV-2 ayant un épitope susceptible d'être reconnu par les anticorps induits par le virus HIV-1 n'appartenant pas au groupe O et/ou le virus HIV-2.

5 **17.** Composition selon la revendication 16, caractérisée en ce que les protéines et/ou glycoprotéines de HIV-1 n'appartenant pas au groupe O et/ou de HIV-2 sont des protéines gag, pol ou des peptides de celles-ci.

18. Composition selon la revendication 16, caractérisée en ce que les protéines et/ou glycoprotéines de HIV-1 n'appartenant pas au groupe
10 O et/ou de HIV-2 sont des glycoprotéines d'enveloppe.

19. Composition selon l'une quelconque des revendications 15 à 18, caractérisée en ce que ladite composition comprend une séquence peptidique correspondant à l'ensemble de la région 590-620 de la protéine gp41 de HIV-1_(VAU) ou une partie de cette région spécifique à HIV-1_(VAU).

15 **20.** Composition selon la revendication 19, caractérisée en ce que ladite séquence peptidique est la séquence -TFIQN-, CKNRLIC ou WGCKNR.

21. Anticorps susceptible de reconnaître une protéine d'enveloppe, un peptide ou un polypeptide dérivé de ladite protéine
20 d'enveloppe selon la revendication 11.

22. Procédé de diagnostic in vitro d'une infection causée par le virus HIV-1_(VAU), ledit procédé comprenant :

 - la mise en contact d'un sérum ou d'un autre milieu biologique provenant d'un malade faisant l'objet du diagnostic avec au moins une des
25 protéines, glycoprotéines d'enveloppe du virus HIV-1_(VAU) ou d'un polypeptide ou d'un peptide issu d'une de ces protéines ou glycoprotéines selon l'une quelconque des revendications 11 à 14 ou une composition selon l'une quelconque des revendications 15 à 20, et

 - la détection d'une réaction immunologique.

30 **23.** Réactif nécessaire à la réaction de western blot (immunoempreinte) ou d'ELISA comportant une protéine ou glycoprotéine

d'enveloppe du virus HIV-1_(VAU) ou d'un polypeptide ou d'un peptide issu d'une de ces protéines ou glycoprotéines selon l'une quelconque des revendications 11 à 14 ou une composition selon l'une quelconque des revendications 15 à 20.

5 **24.** Utilisation d'une séquence nucléotidique selon la revendication 1 ou 2 pour induire *in vivo* la synthèse d'anticorps dirigés contre l' antigène codé par ladite séquence.

25. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 15 à 20, capable d'induire des anticorps chez l'animal.

10 **26.** Trousse (kit) de diagnostic pour la détection in vitro sur un échantillon biologique, d'une infection par un rétrovirus HIV-1 du groupe O, par exemple d'un rétrovirus HIV-1_(VAU), caractérisée en ce qu'elle comprend :

- des amorces selon la revendication 5 pour l'amplification génique d'un rétrovirus HIV-1 du groupe O,
- 15 - des réactifs nécessaires à la réaction d'amplification génique.

27. Trousse de détection in vitro, sur un échantillon biologique, d'un rétrovirus HIV-1 du groupe O, caractérisée en ce qu'elle comprend comme sonde éventuellement marquée, au moins une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 ou une
20 composition selon l'une des revendications 7, 8 ou 9, et éventuellement une autre sonde nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou composition selon l'une quelconque des revendications 7, 8 ou 9, éventuellement immobilisée sur un support solide.

28. Trousse selon la revendication 27, caractérisé en ce qu'elle
25 comprend également les réactifs nécessaires à la mise en oeuvre d'une hybridation.

29. Souche bactérienne déposée à la CNCM le 20 octobre 1994 sous le numéro d'accèsion I-1486.

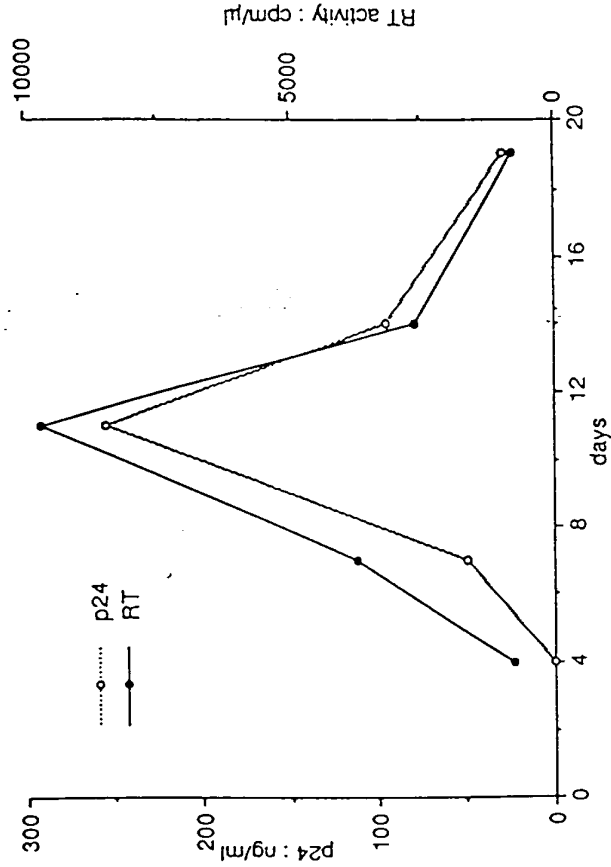
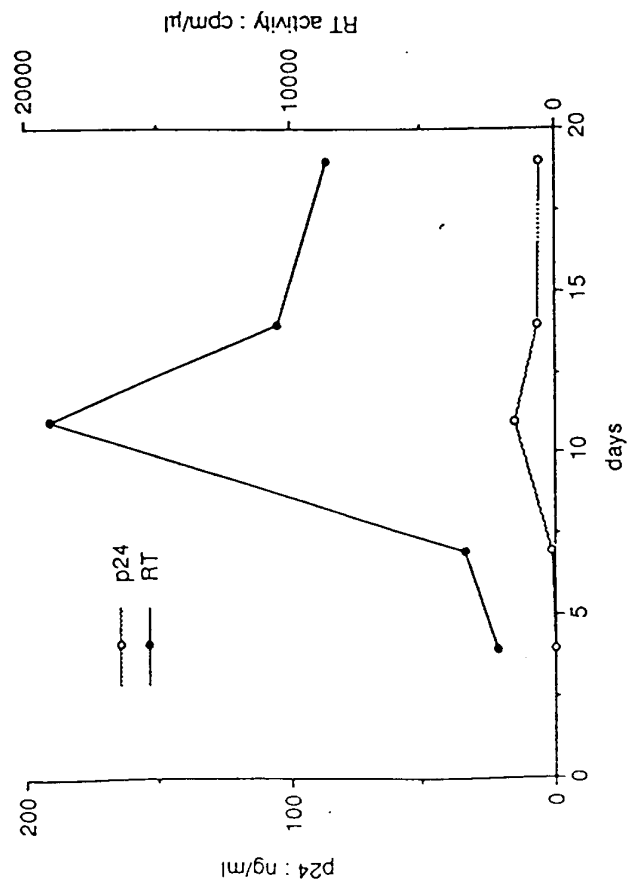
primary HIV-1 isolate*HIVvau*

FIGURE 1

FIGURE 2

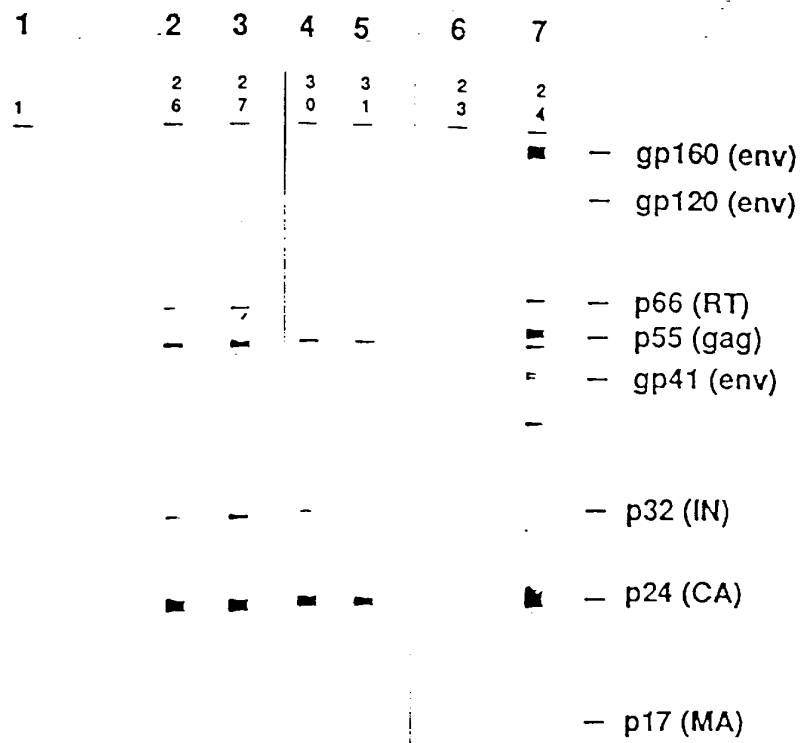


FIGURE 3

signal peptide		
vau	1	..NTAINKAMGRNRKLGWCLIALIIPCLSCNQLYATVYSGVPWEDA 48
la1	1	MRVKEYOHLRWGKKG...TMLGILMICSATEKLKLVTVYGVPUWKEA 48
vau	49	KPTLFCASDANLTSTEQHNIAWQACVPTDPSPEYELKVKVTGKFNKN 98
la1	49	TTTTFCASDAKAYDTEVHNWVWATHACVPTDPNPQEVVLNVNTEFNMMKN 98
vau	99	YIVDOQHIEDIIDLWQSLKPCVOMTFLCVOMNCTDIKNSINTTNSPLNSN 148
la1	99	OHVEQMHIEDIISLWQSLKPCVKLTPLCVSLKCTDLGNATNTNSSTNSS 148
vau	149	NTK.....EVKQGFNVTVTLKDQKQKQALFYVTVDLVKINATSNETMY 192
la1	149	SGEMMEKEIKNCSFNISTISIRGKVQKEYAFFYKLDIIPID..NDTTSY 196
vau	193	RLINCNSTTIROACPKVSEFPIPIHYCAPAGCAIFKCNETGFNGTGLCKN 242
la1	197	TLTSCNTSVITQACPKVSEFPIPIHYCAPAGFAILKCNKTFNGTGPCTN 246
vau	243	VTVVTCHTGKPTVSTOLIINGTLSKGNITIMGKNISDSGENILITLNTN 292
la1	247	VSTVOCTHGIRPVVSTOLLNGSLAEVEVIRSANFTONAKTIIVQLNQS 296
		V3 loop
vau	293	ITIACERPGRQTIQKINAGPMWYSMALSNTKGDTAAAYCNSATWNKA 342
la1	297	VEINCTRPNNTRKASIRIQRGEGRAFTVTCIKIGHMROAHCNISRAKNAT 346
vau	343	LKNITERYLELVEYNQTDVTKMFGNHSGEDAEVTNFFFNCHGEFFYCNTN 392
la1	347	LKOIASKLREOFGNKKTII...FKOSSGGDPEIVTHSFNCGGEFFYCNS 393
vau	393	RLFNHTFSCCKNMTNNKINCTNISNNSNGTQAI..PCRLRQVVRDWMRG 440
la1	394	QLFNSTWF.....NSTWSTEGSNNTGSDTITLPCRIKQFINMMQEVG 436
		gp120 ← gp41
vau	441	SGLYAPPITGNLVCRSNITGMILQLOTPWNKTHPNSTTLRPGCGDMKDIW 490
la1	437	KMIYAPPISGQIRCSSNITGLLLTRDGGNNNN..GSEIFRPGCGDMRDNW 484
vau	491	RTQLFKYKVVRUKPFSVNPATKIARTPTIGTRSHREKRAAGLMLFLGILSA 540
la1	485	RSELYKYKVVKIEPLGVAPTKAKRRV...OREKRAVGIGALFLGFLCA 530
vau	541	AGSTMGAANTALTVRTOHLIKGIVQOONLLRATQAOQHLLRP SVWGIRQ 590
la1	531	AGSTMGARSMTLTVQARQLLSGIVQOONLLRAIEAQOHLQLLTVWGICK 580
		immunodominant epitope
vau	591	LRARLLALETFIQNQQLLENLWCKNRILCYTSVKNNKTWGGDN.ESIMDE 639
la1	581	LOARILAVERYLKDQQLLGIGWCGCKLICCTTAVPNWASWSNKSLEQIWN 630
vau	640	LTHQWDOQIINNVSFIYEKIOEAQEQEKNEKELLEDEWASIMWMLDI 689
la1	631	MTWMEWDREINNYTSLIHSLEEESQNOQEKNEQELLELDKKNASLWVFN 680
vau	690	TKWLWYIKIALIIVGALIGVRVVMVLMVKNIROGYQPLSLQIPIQOQA 739
la1	681	TNWLWYIKIFIMIVGGLVGLRIVFAVLSIVNRVROGYSPLSFQTHLPTPR 730
vau	740	EVCTPGGTGEGGDEDRRWTPLPQGFHLHLYTDLRTIILWIYHLLSNLA 789
la1	731	GPDRPEGIEEGGENDRDRSIRLVNGSLALFWDLRSLCLFSYHRLROLL 780
vau	790	SEIQKLIRHLGLGLWIIIGORTIEACRLFKAIQYWLQELQTSATNLLQTV 839
la1	781	LIVTRIVE.....LLGRRGWEALKYWNLLQYWSQELKNASVLLNAT 823
vau	840	AVAVANWTDSTILGIQSIQIRGINIPRIRIROGLERLLL 877
la1	824	AIATAEGTDRIEUVQACRAIRHPRIRIROGLERILL 861

FIGURE 4

HIV-1lai	RILAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLIC
HIV-1Z321	-----I--
HIV-1eli	-----H--
HIV-1JRCSF	-V-----M-----
HIV-1WMJ	-V-----R-----
HIV-1NDK	-V-----R-----RH--
HIV-1mal	-V-----Q--R--M-----H--
SIVCPZGAB	-L-----Q---I--L-----AV-
 vau	 -L--L-TFIQN----NL---KNR---
mvp5180	-LQ-L-TLIQN--R-NL---K-----
ant70	-L--L-TL-QN----SL---K---V-
 HIV-2rod	 -VT-I-K--Q--AR-NS---AFRQV-
HIV-2D194	-VT-I-K-----AQ-NS---AFRQV-

5/7

FIGURE 5

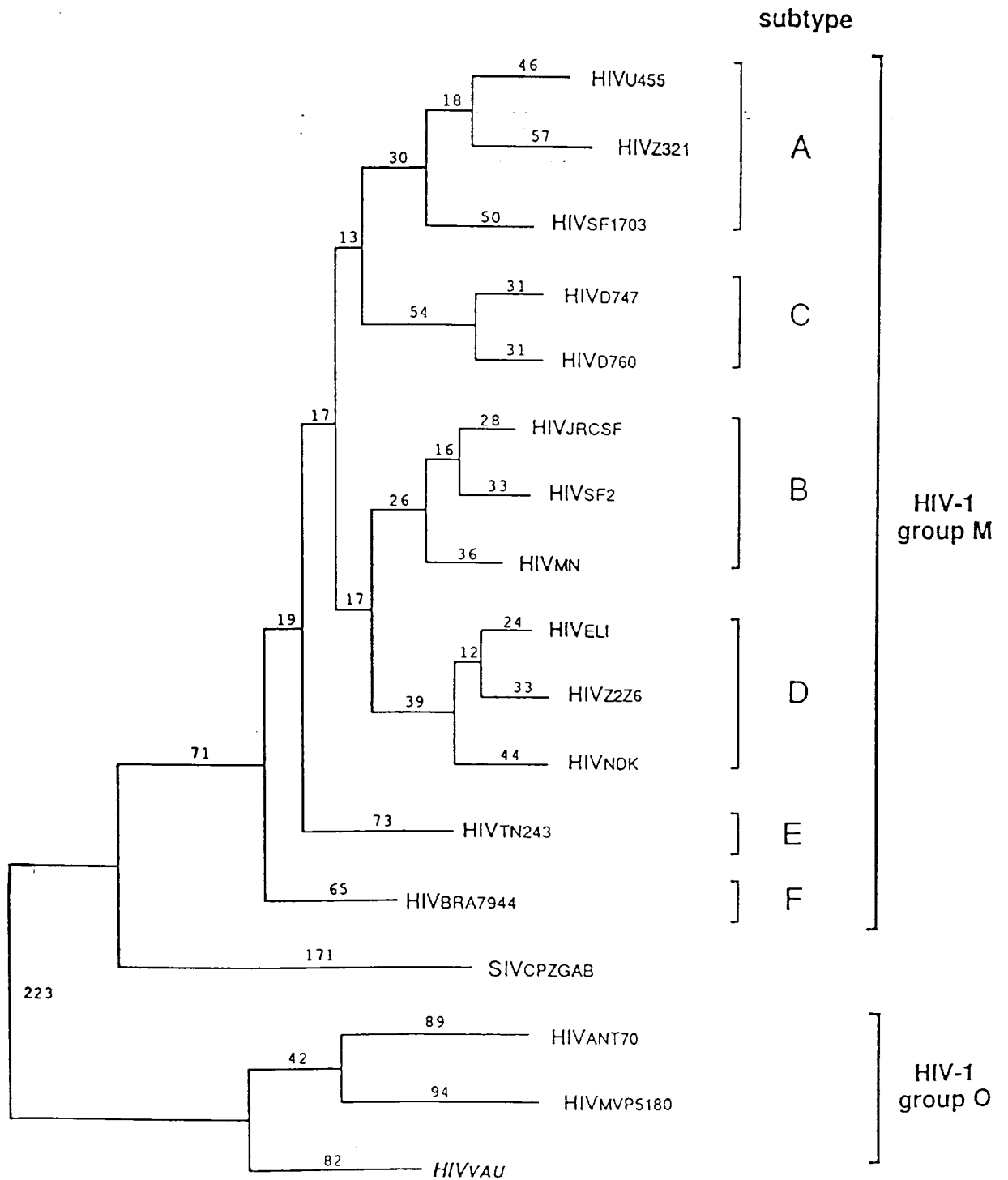


FIGURE 6

[illegible]

DNA sequence 453 b.p. GCACAGACAGGA ... GCACAGCTCCTG linear

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
1	GCAGAGACAG	GACAGGAAC	TGCTACTTC	CTGTTAAAAT	TAGCAGCAAG	ATGGCCTATT	AAAATACTAC	ATACAGACAA	TGGGCCTAAC	TTTACAAGTG
101	CAGCCATGAA	AGCTGCATGT	TGTTGGACAA	ACATACAACA	TGAGTTTGA	ATACCATACA	ATCCACAAG	TCAAGGAGTA	GTAGAAGCCA	TGAACAAGGA
201	ATTAAATCA	ATCATACAGG	TGAGGGACCA	AGCAGAGCAC	TTAAGGCAC	CAGTACAAAT	GGCAGTATTT	GTTCACAATT	TTAAAAGAAA	AGGGGGGATT
301	GGGGGTACA	CTGCAGGAGA	GAGATTAAAT	GACATATTAG	CATCACAAAT	ACAAACAACA	GAACCTACAA	AACAAATTTT	AAAAAATTCAA	AATTTTCGGG
401	TCTATTACAG	AGACAGCAGA	GACCTTATTT	GGAAAGGACC	GGCACAGCTC	CTG				453
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2726006

N° d'enregistrement
nationalFA 505482
FR 9412554

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
T	VIROLOGY, vol.205, no.1, 15 Novembre 1994 pages 247 - 253 CHARNEAU, P. ET AL. 'Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolata: definition of a new HIV-1 group' ---	1-15
A	JOURNAL OF VIROLOGY, vol.68, no.3, Mars 1994 pages 1581 - 1585 GÜRTLER, L. G. ET AL. 'A new subtype of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (MVP-5180) from Cameroon' ---	1
A	AIDS, vol.8, no.10, 1 Octobre 1994 pages 1405 - 1412 NKENGASONG J.N. ET AL. 'Genomic subtypes of HIV-1 in Cameroon' * le document en entier *	1
A	EP-A-0 591 914 (BEHRINGWERKE) * le document en entier *	1
A	JOURNAL OF VIROLOGY, vol.68, no.3, Mars 1994 pages 1586 - 1596 VAN DEN HAESEVELDE, M. ET AL. 'Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent african Human Immunodeficiency Virus isolate' --- -/--	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C07K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
19 Juin 1995		Chambonnet, F
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande I : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2726006

N° d'enregistrement
national

FA 505482
FR 9412554

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
T	THE LANCET, vol.344, no.8933, 12 Novembre 1994 pages 1333 - 1334 SCHABLE, C. ET AL. 'Sensitivity of United States HIV antibody tests for detection of HIV-1 group 0 infections' * le document en entier * -----	15,21
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
19 Juin 1995		Chambonnet, F
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1
EPO FORM 1503 00.82 (P04C13)