(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) **N° de publication :** **2 777 007**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) **N° d'enregistrement national :** **98 04056**

(51) Int Cl^6 : **C 07 K 14/15,** C 07 K 16/10, A 61 K 39/21

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt :** 01.04.98.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 08.10.99 Bulletin 99/40.

(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 FRANCAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT EN COOPERATION ORSTOM Etablissement public à caractëre scientifique et technologique* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** VEAS FRANCISCO et JANSEN FRANZ.

(73) **Titulaire(s) :**

(74) **Mandataire(s) :** ARMENGAUD AINE.

(54) MUTANTS DE GLYCOPROTEINES D'ENVELOPPES DE RETROVIRUS ET LEURS APPLICATIONS BIOLOGIQUES.

(57) L'invention vise des mutants de glycoprotéines d'enveloppes de rétrovirus, caractérisés en ce qu'il s'agit de glycoprotéines capables de se lier spécifiquement avec les récepteurs chemokines et possédant une activité inhibitrice vis-à-vis d'une infection rétrovirale.

FR 2 777 007 - A1

Mutants de glycoprotéines d'enveloppes de rétrovirus et leurs applications biologiques

L'invention a pour objet des mutants de glycoprotéines d'enveloppes de rétrovirus et leurs applications biologiques.

On sait que, chez VIH-1, l'infection des cellules cibles (monocytes ou lymphocytes) est médiée par les glycoprotéines d'enveloppe, la gp120 et la gp41, avec une liaison de très forte affinité de la gp120 au récepteur CD4.

La gp120 a été soumise à diverses délétions et mutations ponctuelles afin d'identifier les sites participant à l'association au CD4.

Il est apparu, sur la base des différents travaux, que l'acide aminé en position 432, situé dans la 4ième région constante C4, est critique pour la liaison au CD4.

La liaison de la gp120 au CD4 induit des changements conformationnels dans les glycoprotéines d'enveloppe de VIH-1 qui doivent favoriser des étapes ultérieures pour l'entrée du virus.

Récemment, des co-récepteurs fusogènes ont été identifiés. Ainsi, on a rapporté le rôle important joué par des récepteurs appartenant à la famille des chemokines à plusieurs passages transmembranaires vis-à-vis de VIH-1, VIH-2 et VIS.

Il est apparu que des tropismes distincts de diverses souches de VIH résultent du ciblage de différents récepteurs de type chemokine et des études effectuées avec

des glycoprotéines recombinantes de VIH-1 ont montré le rôle central joué par la boucle V3 de la gp120 de VIH-1 vis-à-vis du tropisme à l'égard de macrophages et de la formation de syncytium ou de la fusion dans des cultures de lymphocytes CD4-positives.

Le récepteur CXCR4, à savoir la fusine, fonctionne comme un co-récepteur de souches de VIH présentant un tropisme vis-à-vis des cellules T ou des TCLA (T-cell line adapted).

Un changement de conformation de la gp120 serait nécessaire pour obtenir une liaison correcte de VIH aux chemokines et conduirait à la formation d'une association de 3 molécules, avec CXCR4 et le complexe gp120/CD4.

Dans leur étude sur les interactions entre VIH-1 et les cellules cibles, l'attention des inventeurs a été retenue par les régions fortement conservées parmi les gp120 de différentes souches de VIH-1, et également dans la famille des rétrovirus, comprenant en plus de VIH-1, VIH-2, VIS, HTLV-1, VISNA, VAIE, VLB et VSR. Ces structures conservées montrent souvent la structure d'une hélice α (en abrégé HXα).

Le criblage, à faible stringence, avec un anticorps, d'une banque de peptides combinatoire a permis de confirmer que le domaine C1 de la gp120 contient une hélice α, désignée HXα-1. Cette hélice α-1 correspond à la structure en hélice la plus importante, comparée aux autres structures hélice α dans la gp120. Elle est localisée à l'interface entre des molécules de gp120 adjacentes dans un complexe oligomère.

Prenant en compte ces différents enseignements, les inventeurs ont cherché à étudier les effets qui pouvaient résulter de la délétion de ces structures en hélice, et en particulier de HXα-1, et ont élaboré des glycoprotéines délétées correspondantes.

Les travaux qu'ils ont effectués ont montré que de telles délétions modifient les propriétés de liaisons aux récepteur(s) et co-récepteur(s) des glycoprotéines sur les cellules cibles, et leur confèrent des propriétés de grand intérêt pour lutter contre une infection par un rétrovirus.

Avantageusement, les résultats obtenus avec des glycoprotéines d'enveloppe de VIH peuvent être vérifiés avec d'autres glycoprotéines rétrovirales et permettent donc l'élaboration d'outils d'importance majeure pour prévenir et traiter des infections rétrovirales.

L'invention a donc pour but de fournir de nouveaux mutants de glycoprotéines d'enveloppes de rétrovirus, capables notamment d'interagir de manière spécifique à des récepteurs de type chemokine et d'exercer un effet inhibiteur vis-à-vis d'une infection virale.

Elle vise également les applications biologiques de ces mutants.

Les mutants de l'invention sont caractérisés en ce qu'il s'agit de glycoprotéines capables d'interagir spécifiquement avec les récepteurs chemokines et possédant une activité inhibitrice vis-à-vis d'une infection rétrovirale.

Ces mutants chemokines spécifiques sont caractérisés en ce que leurs activités notamment leur activité inhibitrice sont indépendantes du CD4.

Des mutants de l'invention sont caractérisés en ce qu'il s'agit de glycoprotéines d'enveloppes de rétrovirus, dépourvues d'au moins une structure en hélice α, telle que présente dans les glycoprotéines d'enveloppe natives.

L'invention vise en particulier les mutants dans lesquels les glycoprotéines sont dépourvues de la structure en hélice α-1, telle que présente dans la région C1 de la gp120 de VIH.

La séquence en acides aminés de ces mutants correspond donc, à l'exception de la structure hélice délétée, à celle d'une glycoprotéine d'enveloppe native soit complète, soit partielle, comprenant, dans ce dernier cas, au moins les régions impliquées dans la reconnaissance de co-récepteurs chemokines sur les cellules cibles.

En variante, la séquence en acides aminés des mutants correspond, à l'exception de la structure hélice délétée, à une séquence homologue d'une telle séquence complète ou partielle de glycoprotéine d'enveloppe native. De manière classique, l'homologie est définie à environ au moins 70% de similitude entre séquences, les modifications, délétions ou mutations, n'affectant pas les propriétés observées avec la séquence de référence.

La référence aux glycoprotéines d'enveloppe d'un rétrovirus ou aux glycoprotéines natives, dans la description et les revendications englobe donc les séquences homologues. Elle englobe également les glycoprotéines recombinantes telles qu'exprimées par des vecteurs ou des systèmes d'expression comme baculovirus, à la surface de cellules transfectées.

L'invention vise spécialement des mutants dans lesquels les glycoprotéines sont dépourvues du fragment correspondant à la séquence E61 à S85, telle que présente dans la région C1 de la gp120 de VIH.

De manière avantageuse, les mutants de l'invention constituent des enveloppes virales prototypes pour la recherche de leur pouvoir immunogène chez des mammifères, en particulier chez les primates.

L'invention vise ainsi également les anticorps formés contre les mutants de l'invention.

Les mutants de l'invention présentent en outre un intérêt comme compétiteurs de drogues pouvant utiliser le CXCR4 comme cible cellulaire, en permettant de sélectionner des drogues antivirales.

Ils sont également utilisables pour rechercher des anticorps qui reconnaissent le même récepteur cellulaire, dans le but d'inhiber une infection virale par compétition.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention sont donnés dans les exemples qui suivent, dans lesquels il est fait référence aux figures 1 à 8,

- la figure 1 donnant une représentation schématique d'un procédé d'obtention d'un mutant de gp120 selon l'invention.

- la figure 2, des photos de co-cultures de HeLa-Tat et de HeLa-P4 comportant des gènes CD4 et Lac-Z, les cultures de HeLa-Tat étant transfectées avec une gp120 de type sauvage (gp 120 wt), ou un mutant selon l'invention, des cultures de cellules non transfectées étant utilisées à titre de témoin,

- la figure 3, les résultats de mesure de fluorescence obtenus avec des cellules HeLa-Tat co-transfectées par un plasmide exprimant une molécule membranaire et un plasmide exprimant soit gp120 wt, soit un mutant de gp120 selon l'invention.

- la figure 4, les gp120 recombinantes wt et mutante séparées par SDS-PAGE,

- la figure 5, les résultats d'analyses FACS c'est-à-dire avec un trieur de cellules par fluorescence et cellule-ELISA concernant les effets de gp120 wt et d'un mutant selon l'invention sur la liaison à la surface de cellules CEM d'anticorps monoclonaux anti-CD4,

- la figure 6, les résultats d'analyses FACS et cellule-ELISA se rapportant à l'étude de la liaison de SDF1-α au CXCR4 en présence de gp120 wt ou d'un mutant de gp120 selon l'invention,

- la figure 7, les résultats de l'analyse FACS concernant la liaison des gp120 wt et d'un mutant de gp120 selon l'invention à des cellules CHO-K1 CD4-négatives, exprimant un récepteur CXCR4 recombinant, et

- la figure 8, des résultats d'essais d'infection par VIH-1 de cellules HeLa-P4 en présence de gp120 wt et de mutant de gp120 selon l'invention.

MATERIEL UTILISE DANS LES EXPERIENCES

. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humide renfermant 5% de CO_2.

On utilise des cellules HeLa-P4 exprimant de manière stable le gène LacZ sous le contrôle de VIH-1 LTR (Cellules HeLa CD4 LTR LacZ) (P. Charneau, Institut Pasteur). Ces cellules sont cultivées en milieu Eagle modifié Dulbecco (DMEM) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF, Biomedia), 2 mM de L-glutamine, de la pénicilline, de la streptomycine, et 400 µg/ml de généticine (G418).

La lignée cellulaire HeLa-Tat (O. Schwartz, Institut Pasteur) est transfectée pour exprimer l'enveloppe de VIH-1 et cultivée dans un milieu DMEM complet avec 2 mM de méthotrexate.

La lignée cellulaire CEM CD4+, obtenue auprès de l'ATCC est cultivée dans un milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF.

La lignée cellulaire recombinante CHO-K1 (M. Parmentier, Euroscreen, Co. Bruxelles) est cultivée dans un milieu HamF12 (Life Technologies), supplémenté avec 10% de SVF et 400 µg/ml de G418. Le plasmide pHXB2R est un clone dérivé de VIH-1 IIIB (NIH, Bethesda, Aids Research and Reference Reagent Program, E.U.A.), et la souche VIH-1 LAI (H. Holmes, MRC, Aids Reagent Project, NIBSC, GB) est cultivée dans les lignées cellulaires CEM et HeLa-CD4.

. anticorps

L'anticorps monoclonal 12G5 anti-CXCR4 (J. Hoxie, Université de Pensylvannie, Philadelphie, E.U.A.) réagit spécifiquement avec la protéine CXCR4 humaine et reconnaît

un épitope conformationnel, vraisemblablement localisé sur la troisième boucle extramembranaire de la molécule.

Les échantillons de pools d'immunoglobulines VIH-immunes utilisés proviennent du N.I.H. (AIDS Reagent Repository). Il s'agit de mélanges d'Ig de sérums sélectionnés provenant de personnes séropositives.

L'anticorps polyclonal de mouton D7324 est un anticorps anti-gp120 élaboré contre un peptide contenant les acides aminés allant des positions 497 à 511 de la gp120 (Aalto BioReagents, Irlande).

L'anticorps monoclonal 110.4 anti-gp120 est dirigé contre la séquence GPGR de la boucle V3 (Genetic Systems, E.U.A.) et l'anticorps monoclonal 110-K anti-gp120 est dirigé contre un épitope qui sert à la liaison au CD4.

L'antisérum de lapin anti-gp120 a été obtenu par les inventeurs après immunisation avec une gp120 recombinante de VIH-1 IIIB d'Intracel Corp. (E.U.A.)

L'anticorps monoclonal Leu3a anti-CD4 est un produit commercialisé par Beckton et Dickinson (San Jose, Canada).

Les anticorps monoclonaux 13B8.2/10KT4A et BL4/10KT4 anti-CD4 sont des produits commercialisés par Immunotech S.A. (Marseille, France).

Les anticorps monoclonaux ST4/F101.69 anti-CD4, ST40/F142.63 anti-CD4, BF5 anti-CD4, F93,7G2 anti-CD100 et F145.GF3 anti-CD5 proviennent de Sanofi (Montpellier, France). L'anticorps monoclonal OKT4 anti-CD4 est un produit commercialisé par Ortho Diagnostic Systems, Inc (E.U.A.).

Les anticorps anti-SDF1-α sont des produits commercialisés par R & D Systems (Grande-Bretagne).

Exemple 1 : Procédé d'obtention d'un mutant de gp120; clonage et expression de gp120 de type sauvage et du mutant de gp120 ΔHXα-1.

On rapporte sur la figure 1 un schéma illustrant les étapes du procédé mis en oeuvre pour supprimer la structure hélice α-1 de la région C1 de la gp 120. Sur ce schéma, on a indiqué le peptide signal (ps), les régions conservées (C1 à C5) et les régions variables (V1 à V5).

Les astérisques désignent les sites de N-glycosylation et cystéine conservés dans l'hélice α-1.

. obtention de pBSm1

On amplifie par PCR un fragment de 1414 pb codant pour la gp120 (de l'acide aminé V12 à R481), en utilisant le plasmide pHXB2R comme matrice et les 2 amorces suivantes :

amorce sens: 5'GCAGGATCCGGTACCTGTGTGGAAGGAAGC 3'
amorce anti-sens: 5'GCACTGCAGTTAGCGTTTCTCTCTCTGCACCACTC 3'

Le fragment généré contient un site BamHI en amont du site KpnI de la gp120 (V12) et un codon stop à l'extrémité de la séquence de la gp120 suivi par un site Pst1.

Le fragment BamHI-Pst1 est alors cloné dans un vecteur Bluescript® (pBS) (Stratagène), dans lequel le site KpnI est éliminé par digestion avec Kpnl, suivie d'une

réparation avec la T4- ADN polymérase et d'une religation, ce qui conduit au sous-clone de gp120 pBSm1.

. élaboration de pBSm2

On ajoute ensuite la séquence codant pour la partie N-terminale de la gp120 (T1 à G11) et une nouvelle séquence de peptide signal, isolées du gène ecdystéroïde glycosyl transférase du baculovirus de *Autographa californica*. Pour ce faire, on utilise des oligonucléotides se chevauchant et insérés dans les sites BamHI-KpnI de pBSm1. Le plasmide résultant est appelé pBSm2.

. élaboration de pBSm3

On introduit 2 sites uniques de restriction adjacents à la séquence HXα-1, en utilisant des oligonucléotides qui modifient les codons V57- N58 et K91-L92, sans modifier leur capacité à coder.

Selon la première modification, le codon GTA de V57 est remplacé par GTT et le codon AAT de N58 par AAC. En ce qui concerne la deuxième modification, le codon AAA de K91 est remplacé par AAG et le codon TTA de L92 par CTT, ce qui crée respectivement des sites HpaI et HindIII.

On introduit ensuite la séquence dans pBSm2, ce qui conduit à l'obtention du plasmide pBSm3.

. élaboration de pBSm4

Pour supprimer la séquence HXα-1, le fragment HpaI-HindIII de type sauvage est excisé du plasmide pBSm3 et remplacé par un fragment muté HpaI-HindIII.

Ce fragment est reconstitué en utilisant 2 oligonucléotides se chevauchant

5' AACGTGACACTTAAGCCATGTGTAA 3', et

5' AGCTTTACACATGGCTTAAGTGTCACGTT 3'

et un site AfIII est également introduit dans le codon L86 en changeant CTA en CTT afin d'identifier le fragment muté, ce qui conduit au plasmide pBSm4.

. clonage et expression de la gp120 de type sauvage et du mutant ΔHXα-1

On procède ensuite à l'excision, à partir de pBSm3 ou de pBSm3, pBSm4, du fragment BamHI-Pst1, comprenant la séquence codante complète de gp120. Ce fragment est cloné dans les sites BgIII-Pst1 du vecteur de transfert p119P du baculovirus P10 (M.H. Ogliastro).

Des cellules SF9 sont co-transfectées avec de l'ADN viral purifié provenant du baculovirus modifié AcSLP10 et de l'ADN provenant du vecteur recombinant de gp120 p119P.

Les baculovirus recombinants sont purifiés sur plaques, en utilisant les méthodes standards.

Les cellules SF9 sont infectées à une densité de $5x10^5$ cellules /ml et à une multiplicité d'infection de

5 UFP/cellule. On récupère le surnageant 6 jours après l'infection. La gp120 de type sauvage, ou gp120 wt, et la gp120 déletée, ou gp120 ΔHXα-1, sont concentrées et immunopurifiées avec l'anticorps anti-gp120 D7324, prélablement insolubilisé, sur du bromacétyl-Sépharose®.

Afin de vérifier la pureté des produits, les protéines sont séparées en appliquant un gradient de 4 à 15% de Phastgel® dodécyl sulfate de sodium, dans un système tampon discontinu (PhastSystem, Pharmacia).

Les bandes de protéines résolues sont transférées électrophorétiquement sur nitrocellulose. Après saturation, les empreintes sont mises à incuber avec les anticorps marqués appropriés.

Les séquences complètes de gp120 wt ou gp120 ΔHXα-1 sont clonées dans le vecteur d'expression d'enveloppe de VIH-1 pCEL/E160 sous le contrôle du promoteur CMV.

pCEL/E160 (Y. Boublik et M. Sitbon) dérive d'un vecteur d'expression d'enveloppe rétroviral par insertion de l'enveloppe de VIH-1 LAI.

Pour obtenir l'expression de l'enveloppe avec la gp120 désirée, le fragment KpnI-NheI,en utilisant un deuxième site de restriction NheI localisé en amont du codon stop dérivé soit de pBSm3, soit de pBSm4, est substitué dans la séquence correspondante originale de pCEL/E160.

Exemple 2 : Etude de la fusion cellulaire entre des protéines d'enveloppe de VIH-1 et des cellules cibles

. Utilisation de l'expression du gène LacZ pour la mise en évidence d'une fusion

On dépose sur des plaques à 6 puits, à fond plat, des cellules HeLa-Tat, à une concentration de $8x10^4$ puits.

Après 24 heures, on transfecte les cellules avec 1 µg du vecteur d'expression pCEL/E160 en utilisant le réactif Lipofectamine (Gibco Life Sciences, E.U.A.), en suivant les recommandations du fabricant.

On évalue l'aptitude des différentes glycoprotéines d'enveloppe à induire la fusion et la formation de syncytia. Pour ce faire, on procède à une co-culture avec des cellules HeLa-P4 comportant des gènes CD4 et LacZ sous le contrôle LTR de VIH-1.

Après 24h, les co-cultures confluentes sont lavées avec un tampon phosphate salin (PBS), fixées avec du glutaraldéhyde à 0,5% pendant 10 mn à température ambiante, et lavées à 2 reprises avec du PBS.

Les mono-couches cellulaires sont colorées par incubation avec une solution de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal), pendant 2h à 37°C, et lavées à 2 reprises avec PBS.

Des évènements de fusion entre les cellules de HeLa-P4 et les cellules effectrices exprimant l'enveloppe de VIH-1 et le transactivateur Tat se traduisent par l'induction de l'expression *in situ* du promoteur du gène

reporter lacZ. Pour chaque glycoprotéine d'enveloppe testée, on effectue le comptage du nombre total de *foci* colorés en bleu par puits.

On rapporte sur la figure 2, les résultats obtenus avec A) des cellules HeLa-Tat exprimant l'enveloppe wt (contenant la gp120 wt), B) des cellules Hela-Tat exprimant l'enveloppe sans hélice α-1 (contenant la gp120 ΔHXα-1) et C) des cellules HeLa-Tat non transfectées. La présence de syncitium bleu est indiquée par une flèche.

La transfection avec l'enveloppe de type sauvage conduit à un grand nombre de syncytia avec expression de β-galactosidase (1000 à 2000 *foci*/puits). Au contraire, on n'observe aucun *foci* après infection avec l'enveloppe du mutant ΔHXα-1 (figure 2) ou avec l'enveloppe du virus de leucémie murine écotropique de Friend (F-MuLv) qui n'est fusogène que pour les cellules de souris ou de rats.

. Analyse par cytométrie en flux de l'expression en surface des cellules d'enveloppe

L'absence de propriétés fusogènes observées avec la gp120 ΔHXα-1 a amené à vérifier si l'expression de l'enveloppe à la surface des cellules était modifiée.

Des expériences ont donc été réalisées pour contrôler les taux de gp120 à la surface de cellules HeLa-Tat transfectées, par cytométrie en flux, en procédant comme suit :

Le vecteur d'expression pCEL/E160, portant soit la gp120 wt (Sugp120 : Sous unité de gp120 en surface) ou la gp120 ΔHXα-1, est co-transfecté dans des cellules HeLa-Tat

avec le plasmide pMACS-Kk, qui exprime une molécule membranaire tronquée murine H-2Kk (Miltenyl Biotech Inc).

On effectue la transfection par bombardement de particules en utilisant un appareil biolistique PDS/1000/He (BioRad).

En résumé, sur 3 mg de billes d'or de 1,6 µm, on dépose un revêtement avec 2,5 µg d'ADN mixte, contenant 0,5 µg de pMACSKk et 2µg de pCEL/E160. Après bombardement 24h de culture, les cellules transfectées sont détachées, lavées, mises à incuber, pendant 1h, à 4°C avec 80 µl de microbilles magnétiques revêtues de l'anticorps monoclonal anti-H2Kk. On procède à une sélection positive des cellules exprimant la protéine H2Kk à l'aide de colonnes RS+ par séparation sur le système magnétique Vario-MACS, en suivant les recommandations du fabricant(Miltenyl Biotec Inc, Auburn, Canada). Les cellules sélectionnées sont mises à incuber, pendant 1h, à 4°C, avec 100 µg/ml d'IgG polyclonales humaines anti-VIH (VIH-IgG).

Les cellules sont ensuite lavées, colorées avec des IgG anti-humaines de chèvre, conjuguées à de la phycoérythrine (PE) (50 µl d'une dilution au 1/50; Immunotech, Marseille, France), pendant 1h, à 4°C.

Les cellules sont lavées 3 fois dans PBS/0,3% de BSA avant de procéder à l'analyse en cytométrie à flux en utilisant un appareil FACSort (Beckton & Dickinson) pour mesurer les taux de gp120 à la surface des cellules.

Comme témoins négatifs, on utilise des cellules transfectées par le vecteur pMACS Kk (H2Kk) seul (coloration avec IgG anti-VIH et conjugué IgG-PE anti-

humain) et des cellules HeLa-Tat co-transfectées avec un plasmide d'enveloppe wt et le vecteur pMACS Kk, mais coloré avec seulement l'anticorps secondaire anti-humain conjugué à PE.

Les résultats obtenus sont rapportés sur la figure 3 qui donne le nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence pour les témoins et les cellules transfectées.

On observe une population unimodale avec une faible intensité de fluorescence (intensité de fluorescence moyenne = 15,1) après la coloration des cellules HeLa-Tat témoins.

Avec des cellules transfectées par un vecteur d'expression d'enveloppe de type sauvage ou de type délété, on note des distributions similaires des populations négatives et positives.

Dans les deux cas, la population positive est détectée à une intensité de fluorescence moyenne d'environ 170.

Exemple 3 : Etudes de la liaison des protéines recombinantes gp120 wt et gp120 ΔHXα-1 aux cellules CEM

. méthode générale

On réalise toutes les expériences de liaison avec $2x10^5$ cellules CEM remises en suspension dans 50 µl de PBS/3% de BSA contenant l'anticorps monoclonal désiré à la concentration appropriée.

Après 1 h d'incubation sous agitation à 37°C, les cellules sont lavées 2 fois dans PBS/0,3% de BSA, puis on

ajoute un anticorps IgG-FITC (Sigma) anti-souris, ou un conjugué IgG-PE anti-humain (Immunotech), ou un conjugué IgG-FITC anti-humain (Immunotech), ou un conjugué streptavidine -PE (Sigma), à un dilution de 1/50.

Après 1h supplémentaire d'incubation, sous agitation, à température ambiante, les cellules sont lavées 3 fois, remises en suspension dans PBS et analysées par cytométrie à flux (une couleur) en utiilisant un FACSort (Beckton & Dickinson) avec un logiciel Lysis II. Chaque point représente l'acquisition de 10 000 évènements pris en compte.

. liaison à des anticorps spécifiques

La liaison des anticorps monoclonaux anti-CD4, Leu3a, F101.69, 1388.2, ST40, BL4, OKT4 et BF5, est également contrôlée après incubation des cellules CEM avec la gp wt ou la gp120 ΔHXα-1 soluble (10 µg/ml) pendant 1 h, à 37°C.

Les cellules sont lavées (2 lavages dans PBS/0,3 % de BSA) et colorées avec le conjugué FITC, anti-souris, IgG-spécifique (100 µg/ml) avant d'effectuer l'analyse cytométrique en flux, comme décrit dans l'exemple 2 ci-dessus, en présence ou en l'absence d'azide de sodium à 0,02% dans les solutions de lavage et d'anticorps.

Dans ces essais, on utilise les gp120 solubles (gp120 wt ou gp120 ΔHXα-1), dans un volume de 50 µl, selon différentes concentrations.

Les glycoprotéines gp120 recombinantes de baculovirus mises en oeuvre sont concentrées et immunopurifiées comme

décrit ci-dessus. Les protéines sont résolues par SDS-PAGE (gradient de 4 à 15%).

La figure 4 donne les photos des gels avec A) les protéines (4 µg) colorées avec du nitrate d'argent ou transférées sur une membrane de nitrocellulose et l'empreinte immunologique ensuite obtenue, B) avec un anti-sérum polyclonal de lapin anti-gp120, ou un antisérum polyclonal de lapin formé contre un surnageant de cellules SF9 infectées par un baculorivus wt (SF9SNBwt).

Sur chaque plaque, on a indiqué les pistes correspondant aux gp120 wt, gp120 ΔHXα-1 et SF9SNBwt et les marqueurs de poids moléculaire (PM).

Les positions des monomères(m), des dimères (d) et des polymères (p) des gp120 sont marquées par des flèches.

On a déterminé les réactivités des anticorps 110.4 (D) et 110.K(E) anti-gp120 avec la gp120 wt native (carrés noirs et la gp120 ΔHXα-1 (carrés blancs). Tous les résultats ont été corrigés en tenant compte d'une absorption de base d'anticorps en l'absence de gp120 (habituellement DO_{492} inférieure à 0,100).

L'examen de la figure 4A montre la présence de 2 bandes majeures correspondant à des monomères et à des dimères de la gp120 wt et de la gp120 ΔHXα-1 solubles, avec un degré de pureté supérieur à 95%.

L'analyse des immunoblots des protéines produites par le baculovirus, avec un antisérum polyclonal de lapin anti-gp120, confirme la présence de formes monomères et oligomères de gp120 (figure 4B).

La pureté des protéines de gp120 est démontrée par l'absence de réactivité avec un anticorps de lapin dirigé contre le surnageant provenant de cellules SF9 infectées avec un baculovirus de type sauvage (figure 4C).

On a ensuite vérifié si la protéine de gp120 ΔHXα-1 était reconnue par les anticorps monoclonaux 110.4 et 110.K, anti-gp120, qui réagissent, respectivement, avec la boucle V3 et des structures conformationnelles impliquées dans la reconnaissance du CD4.

Les résultats obtenus montrent que la boucle V3 est reconnue de manière équivalente dans la gp120 wt et la gp120 ΔHXα-1 (figure 4D). En revanche, l'anticorps monoclonal dirigé contre le site conformationnel de reconnaissance du CD4 n'apparaît pas capable de réagir avec la gp120 wt (FIG 4E).

. effet des gp120 sur la liaison d'anticorps monoclonaux anti-CD4 à la surface cellulaire

- analyse FACS

On a évalué l'aptitude de la gp120 ΔHXα-1 soluble à s'associer avec le CD4 en déterminant le taux de liaison d'anticorps monoclonaux CD4-spécifiques, Leu 3a et F101.69-PE, qui réagissent avec la boucle CDR2 dans le premier domaine D1 de CD4, après pré-incubation des cellules CEM avec la gp120 de type sauvage ou gp120 ΔHXα-1 (10 µg/ml), en présence de 0,02% d'azide de sodium.

On rapporte sur la figure 5A les résultats de l'analyse FACS. Sur cette figure a) à d) correspondent respectivement aux conditions suivantes :

a) incubation des cellules CEM avec un conjugué IgG anti-souris de chèvre -FITC, à titre de témoin négatif,

b) liaison de l'anticorps Leu3a, après incubation avec gp120 wt,

c) liaison de l'anticorps Leu3a, après incubation avec le mutant gp120 ΔHxα-1, et

d) liaison de l'anticorps Leu3a aux CEM.

On constate à l'examen de ces résultats que la gp120 wt inhibe plus de 98% de liaison de Leu3a (graphe b de la figure 5A). Au contraire, la gp120 ΔHXα-1 ne modifie pas la liaison de l'anticorps (<5,6%, graphe c de la figure 5A).

- Méthode cellule-ELISA

On étudie l'effet des gp120 sur la liaison des anticorps monoclonaux F101.69 par la méthode cellule-ELISA en procédant comme suit :

Des plaques de microtitration (Nunc) en forme de U, Maxisorb® sont saturées avec PBS/3% de BSA, pendant 30 minutes, à 37°C, et mises à incuber avec 25 µl d'un mélange 1:1 (10 µg/ml) d'un anticorps monoclonal anti-CD5 (F145,6F3) et anti-CD100 (F93, 7G2) pendant 16 heures, à 4°C.

Après plusieurs lavages, 10^5 cellules de CEM sont distribuées dans chaque puits, avant centrifugation de la plaque à 900 g pendant 5 minutes, puis incubation pendant 30 minutes à 37°C, et 2 lavages avec 200 µl de PBS/0,3% de BSA par puits.

Des puits, en quatre exemplaires, sont mis à incuber avec des protéines de gp120 solubles pendant 1 heure, à 37°C, et lavés deux fois dans PBS/0,3% de BSA.

Pour les expériences d'inhition du CD4, les cellules sont ensuite mises à incuber pendant 30 minutes, à 37°C, avec une dilution de 1/1000 de l'anticorps monoclonal F101.69 anti-CD4 couplé à la peroxydase.

En variante, après incubation avec les protéines de gp120, on ajoute SDF-1α à une concentration de 10 µg/ml, pendant 30 minutes, à 20°C. Les puits sont lavés deux fois avec PBS/0,3% de BSA, puis mis à incuber avec un anticorps biotinylé de chèvre, anti-SDF-1α dans PBS/3% de BSA/0,02% d'azide de sodium, puis révélés avec un complexe de streptavidine-biotine-peroxydase, à 20°C, pendant 30 minutes.

On mesure la densité optique (DO) à 492 nm sur un spectrophotomètre Labsystème Multiscan RC. La plaque cellule-ELISA comprend deux standards internes, sans gp120 et sans SDF1α.

Les valeurs expérimentales sont exprimées en tant que pourcentage d'inhibition des valeurs de référence correspondantes.

Les DO de référence varient de 1,0 à 1,5.

Les puits sans cellules saturés avec PBS/3% de BSA, indiquent que la liaison non spécifique des protéines de gp120 recombinante est inférieure à 5%.

Des résultats similaires sont obtenus avec l'anticorps conjugué anti-CD4 F101.69-PE et confirmés par la méthode cellule-ELISA (figure 5B) avec des résultats similaires en présence ou non d'azide de sodium.

- étude de l'effet de la gp120 sur la liaison d'autres anticorps monoclonaux anti-CD4 par FACS

Des études équivalentes effectuées avec différents anticorps monoclonaux anti-CD4 dirigés contre des sites distincts de la boucle CDR2 de D1 dans CD4, montrent que la gp120 ΔHXα-1 n'interfère pas avec l'aptitude de ces anticorps à se lier au récepteur CD4.

Ces résultats sont donnés dans le tableau 1. Tous les anticorps anti-CD4 ont été détectés avec un antisérum de chèvre anti-souris marqué avec FITC, excepté l'anticorps 13B8.2 qui a été conjugué à PE.

TABLEAU 1

	Effet des gp120 sur la liaison des AcM anti-CD4		
	Intensité de Fluorescence moyenne		
	Pré-incubation		
Anticorps	Aucune	gp120 wt	gp120 ΔHXα-1
13B8.2	1054,78	73,13	940,74
ST40	416,00	87,73	360,16
BL4	489,38	93,40	418,96
OKT4	526,53	481,65	530,00
BF5	430,00	410,00	424,31

Il ressort de ces résultats que la gp120 ΔHXα-1 est incapable de se lier au récepteur CD4.

Compte tenu de ces résultats, on a vérifié l'aptitude des gp120 à se lier à la surface de cellules CEM en fonction de leur concentration.

L'analyse FACS a été réalisée avec les cellules en présence d'azide de sodium (0,02%) pour empêcher une internalisation possible des récepteurs cibles.

Dans ces conditions, comme le montre la figure 5C, la gp120 ΔHXα-1 se lie à la surface des cellules CEM de

manière dose-dépendante, mais à des niveaux plus faibles que la gp120 wt.

Lorsque ces dernières expériences sont réalisées en l'absence d'azide de sodium, on n'observe pas de liaison de la gp120 ΔHXα-1 sur les cellules CEM.

On notera avec intérêt que l'absence d'azide de sodium ne modifie pas l'aptitude de la gp120 wt à inhiber la liaison des anticorps monoclonaux anti-CD4.

- étude de l'inhibition de la liaison de SDF1-α au CXCR4

La liaison de la gp120 ΔHXα-1 aux cellules CEM a amené à déterminer si l'association avec le récepteur de chemokine CXCR4 pouvait être responsable du phénomène rapporté ci-dessus.

A cet effet, on a examiné si la gp120 wt ou la gp120 ΔHXα-1 pouvait inhiber la liaison de SDF1-α.

Les figures 6A et 6B donnent les résultats, respectivement, des analyses FACS et cellule-ELISA effectuées.

La figure 6A concerne un essai avec coloration à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-SDF1-α biotinylé révélé avec un conjugué streptavidine-PE. Les cellules CEM sont mises à incuber avec SDF1-α seul (10 µg/ml) ou sont mises à incuber au préalable avec gp120 wt ou ΔHxα-1, à des concentrations, respectivement, de 10 µg/ml et 30 µg/ml.

A titre de témoin, on utilise des cellules CEM qui n'ont pas été exposées à SDF1-α.

Les essais correspondant aux résultats de la figure 6B sont effectués en présence de différentes concentrations de gp120 wt et de mutant ΔHxα-1 en appliquant la méthode cellule-ELISA.

On observe que la liaison de SDF1-α (10 µg/ml) diminue jusqu'à 44,4% et 36% de la valeur témoin en présence, respectivement, de 10 µg/ml et de 30 µg/ml de gp120 wt (figure 6A).

Après pré-incubation avec la gp120 ΔHXα-1 à une concentration de 10 µg/ml et 30 µg/ml, on observe également des chutes significatives, respectivement jusqu'à 35,3% et 25% par rapport au témoin.

Des résultats similaires sont obtenus en utilisant la méthode Cellule-ELISA comme représenté par les niveaux respectifs d'inhibition (figure 6B).

On observe donc une interaction spécifique entre CXCR4 et les gp120 wt et gp120 ΔHXα-1.

- étude de l'inhibition de la liaison d'anticorps anti-CXCR4

On a également évalué l'aptitude de la gp120 wt et de la gp120 ΔHXα-1 à, inhiber la liaison de l'anticorps monoclonal 12G5, anti-CXCR4.

On utilise l'anticorps à raison de 10 µg/ml. Les mesures sont effectuées après pré-incubation avec la gp120 wt ou le mutant ΔHxα-1, ou SDF1-α. Les résultats sont donnés dans le tableau 2 et exprimés en % de la liaison totale prise comme 100%.

TABLEAU 2

	Effet des gp120 sur la capacité de liaison d'un AcM anti-CXCR4		
	Concentration (µg/ml)		
Pré-incubation	10	40	90
SDF-1α	20,7	ND	ND
gp120 wt	59,5	58	ND
gp120 ΔHXα-1	80,0	77,2	44,8

On observe que les gp120 inhibent la liaison de l'anticorps avec une liaison d'environ 80% et 60% par rapport au témoin à des concentrations, respectivement de 10 et 40 µg/ml, et inférieures à 45% à une concentration de 90 µg/ml de gp120 ΔHXα-1.

La liaison de l'anticorps monoclonal 12G5 après incubation avec SDF-1α fait chuter jusqu'à 20% la liaison par rapport aux cellules CEM à celle du témoin.

. étude de la liaison de la surface de cellules CD4 négatives

On a ensuite vérifié si la gp120 ΔHXα-1 est capable de se lier à la surface de cellules CD4-négatives exprimant de

manière récente le récepteur CXCR4 (lignée cellulaire CHO-K1).

Les glycoprotéines de gp120 (2 µg/ml) sont incubées pendant 4 h, à 4°C, avec des cellules CD4 négatives (CHO-K1). Les cellules sont incubées avec des anticorps humains anti-gp120 et sont ensuite lavées et colorées avec un conjugué anti-humain IgG-PE ou -FITC et les cellules sont traitées par analyse en cytométrie de flux comme décrit dans l'exemple 2 ci-dessus.

L'inhibition de la liaison de SDF1-α est déterminée après incubation des cellules CEM avec différentes concentrations de gp120 wt et de gp120 ΔHXα-1, pendant 1 h, à 37°C, dans PBS/3% de BSA .

SDF1-α (10 µg/ml) est alors ajouté dans PBS/3% de BSA pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules sont colorées avec un anticorps polyclonal de chèvre biotinylé, anti-SDF1-α anti-humain, dans PBS/3% de BSA/0,02% d'azide de sodium pendant 30 min à température ambiante.

On ajoute le conjugué de streptavidine-PE pendant 30 min à température ambiante dans PBS/3% de BSA/0,02% d'azide de sodium avant l'analyse par cytométrie en flux.

On détermine l'inhibition de la liaison de l'anticorps monoclonal 12G5 anti-CXCR4 après incubation des cellules CEM avec différentes concentrations de gp120 wt, gp120 ΔHXα-1, ou 10 µg/ml de SDF-1α, pendant 30 min, à 37°C.

L'accessibilité du CXCR4 est contrôlée par addition de l'anticorps monoclonal 12G5 (10 µg/ml) en présence de 0,02% d'azide de sodium, pendant 1 h, à 4°C.

Les cellules sont lavées à 2 reprises avec PBS/0,3% de BSA/0,02% d'azide de sodium, et colorées avec un anticorps IgG anti-souris, conjugué à FITC dans PBS/3% de BSA/O,O2% d'azide de sodium, avant l'analyse par cytométrie en flux.

Les résultats sont donnés sur la figure 7 où la courbe a) correspond au fond de fluorescence, la courbe b) se rapporte à la liaison de gp120 wt (2 µg/ml) aux cellules et la courbe c) à la liaison du mutant de gp120.

La liaison de la gp120 wt et de la gp120 ΔHXα-1 aux cellules CHO-K1 a été déterminée en utilisant une IgG anti-VIH-1 et révélée avec une IgG anti-humaine marquée avec PE.

On observe bien une liaison avec une intensité de fluorescence moyenne atteignant 11,92 et 13,92, respectivement pour la gp120 wt et la gp120 ΔHXα-1, alors que l'intensité du témoin, obtenue en l'absence de gp120, est de 3,35.

Exemple 4 : Etude de l'inhibition de l'infectivité de VIH-1 par la gp120 ΔHXα-1 recombinante soluble

Pour étudier l'aptitude de la gp120 ΔHXα-1 à inhiber l'infection par VIH-1, on fait pré-incuber des cellules HeLa P4 avec la protéine soluble, à 4°C, pendant 1 h, avant de les exposer au virus VIH-1 LAI.

Les essais sont réalisés comme suit :

On provoque une infection 24 heures après l'ensemencement de 10^4 cellules HeLa-P4 (CD4+, LTR-LacZ)/puits, dans des plaques de microtitration à 96 puits.

Les cellules sont alors pré-incubées, sous agitation modérée, dans un milieu DMEM, dépourvu de sérum, en présence de différentes concentrations de gp120 wt ou de gp120 ΔHXα-1 recombinantes solubles, pendant 1 heure, à 4°C. Elles sont ensuite mises à incuber avec 25 µl de particules infectieuses ultracentrifugées de VIH-1 LAI produites à partir des cellules infectées de CEM.

L'induction d'une activité β-galactosidase, c'est-à-dire du produit du gène LacZ des HeLa P4 reflète la transactivation Tat et, par conséquent, l'infection par VIH-1.

Après 24 heures, l'activité β-galactosidase est mesurée dans les lysats cellulaires des puits utilisés en quatre exemplaires.

A cet effet, les cellules sont lysées dans 100 µl d'un tampon contenant 0,125% de NP40, 60 mM de Na_2HPO_4, 40 mM de NaH_2PO_4, 50 mM de β-mercaptoéthanol, 25 mM d'EDTA, 10 mM de KCl, 10 mM de $MgSO_4$, et 100 µl de 80 mM de phosphate de sodium à pH 7,4, 10 mM de $MgCl_2$, 10 mM β-mercaptoéthanol avant l'addition de 6 mM de *rouge de chlorophénol-sels monosodiques de b-galactopyranoside*.

Le mélange est incubé pendant 30 minutes à 37°C et on mesure l'absorbance à 574 nm.

Les résultats obtenus montrent une inhibition virale de 50% (IC_{50}) après pré-incubation avec l'une ou l'autre des gp 120 wt ou gp120 ΔHXα-1 à une concentration de 100 nM (Fig 8).

Ainsi, malgré son absence d'interaction de la gp120 ΔHXα-1 avec CD4, cette molécule est capable d'inhiber une

infection virale par VIH-1, vraisemblablement par interaction avec le récepteur secondaire CXCR4.

REVENDICATIONS

1. Mutants de glycoprotéines d'enveloppes de rétrovirus, caractérisés en ce qu'il s'agit de glycoprotéines capables d'interagir spécifiquement avec les récepteurs chemokines et possédant une activité inhibitrice vis-à-vis d'une infection rétrovirale.

2. Mutants selon la revendication 1, caractérisés en ce que leurs activités, notamment leur activité inhibitrice, sont indépendantes du CD4.

3. Mutants selon la revendication 1 ou 2, caractérisés en ce qu'il s'agit de glycoprotéines d'enveloppes de rétrovirus, dépourvues d'au moins une structure en hélice α, telle que présente dans les glycoprotéines d'enveloppe natives.

4. Mutants selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisés en ce que les glycoprotéines sont dépourvues de la structure en hélice α-1, telle que présente dans la région C1 de la gp120 de VIH.

5. Mutants selon la revendication 4, caractérisés en ce que les glycoprotéines sont dépourvues du fragment correspondant à la séquence E61 à S85, telle que présente dans la région C1 de la gp120 de VIH.

6. Mutants selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisés en ce que les glycoprotéines sont recombinantes.

7. Anticorps, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre les mutants selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

8. Application des mutants selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, comme enveloppes virales prototypes pour l'étude de leur pouvoir immunogène.

9. Application des mutants selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, comme compétiteurs de drogues antivirales ou d'anticorps au niveau du récepteur du virus.

Figure 1

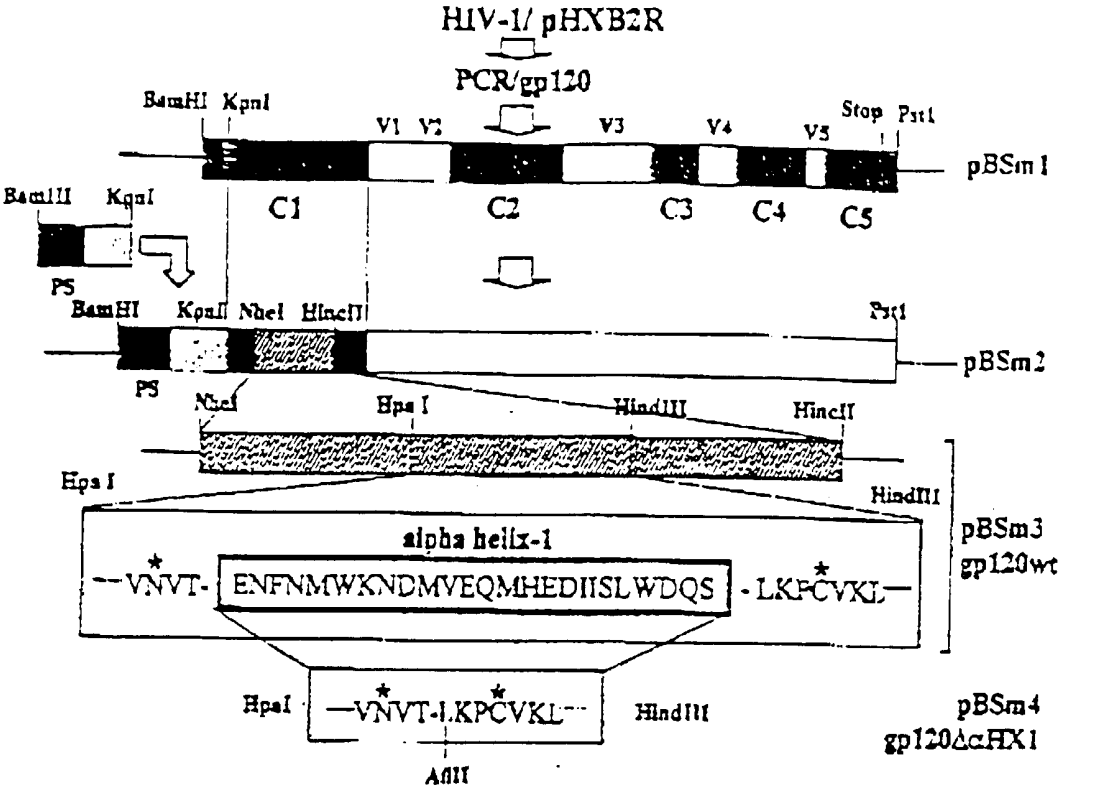


Figure 2

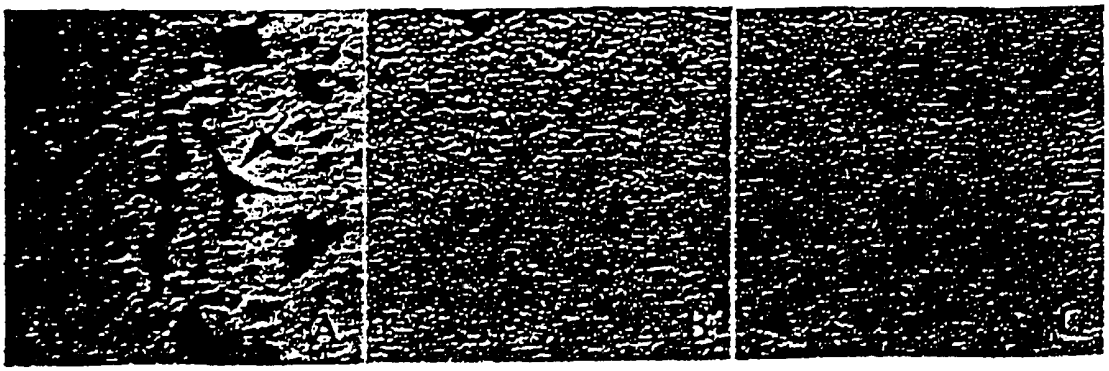


Figure 3

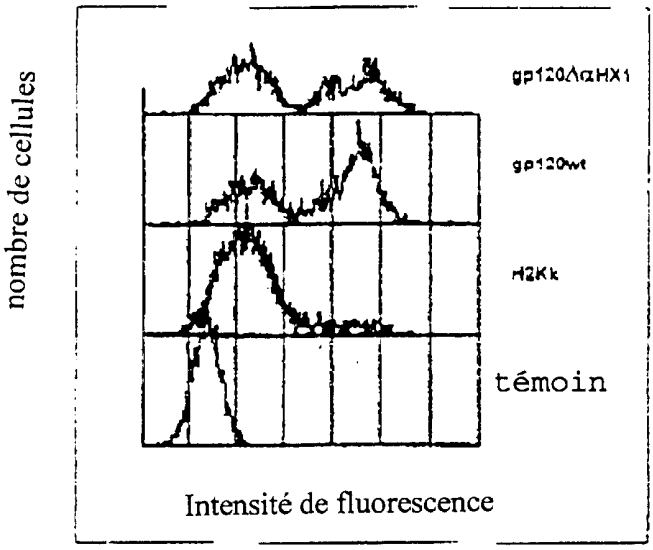

nombre de cellules
gp120ΔαHX1
gp120wt
H2Kk
témoin
Intensité de fluorescence

Figure 4

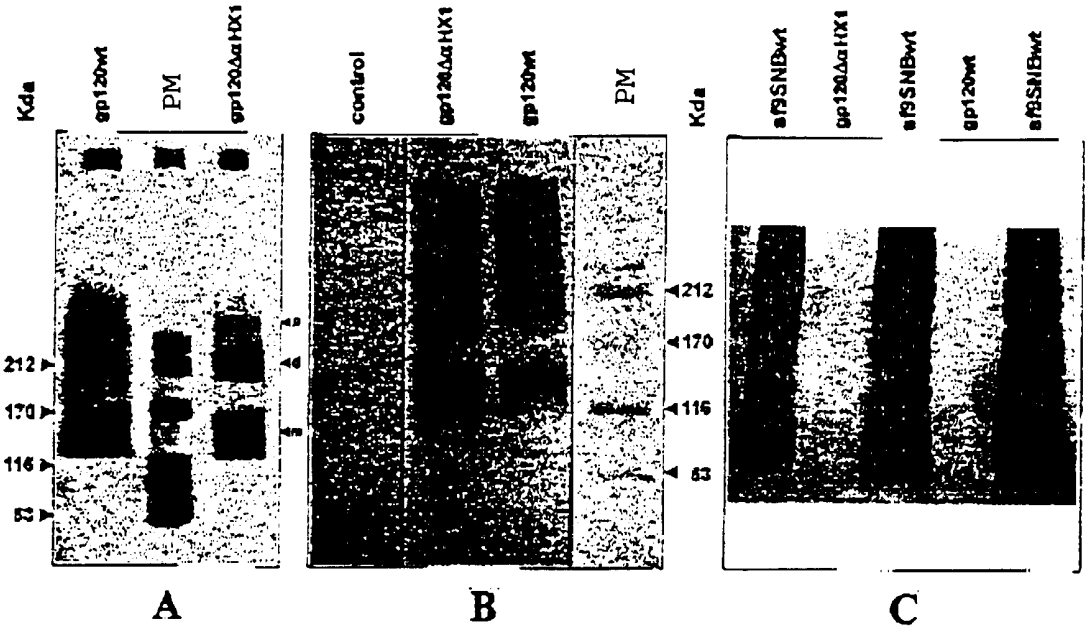

Kda
gp120wt
PM
gp120ΔαHX1
212
170
116
83
A
control
gp120ΔαHX1
gp120wt
PM
Kda
212
170
116
83
B
sf9SNBwt
gp120ΔαHX1
sf9SNBwt
gp120wt
sf9SNBwt
C

Figure 5

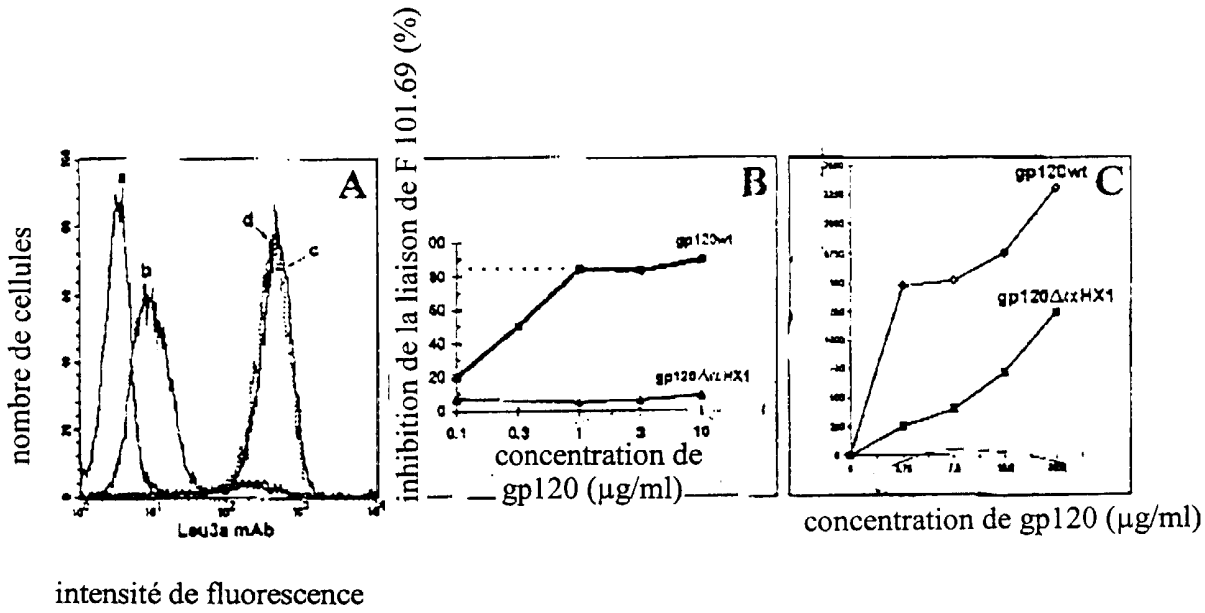

A
B
C
nombre de cellules
intensité de fluorescence
Leu3a mAb
a
b
c
d
inhibition de la liaison de F 101.69 (%)
concentration de gp120 (µg/ml)
gp120wt
gp120ΔxHX1
0.1
0.3
1
3
10
concentration de gp120 (µg/ml)

Figure 6

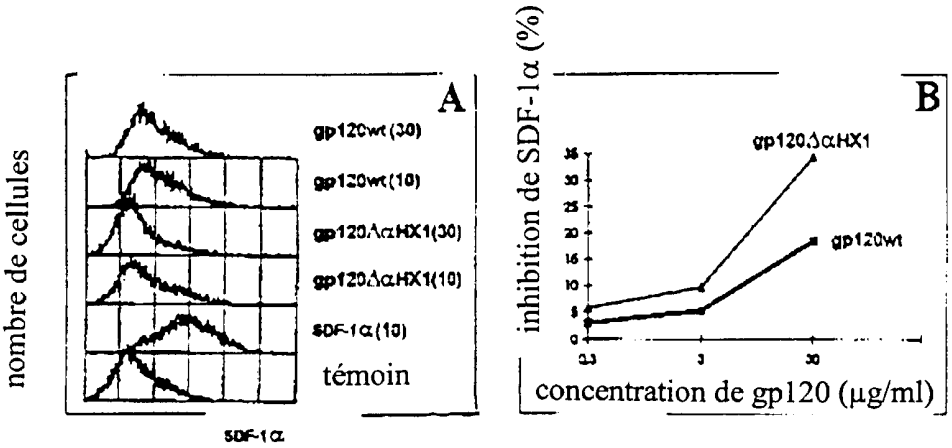
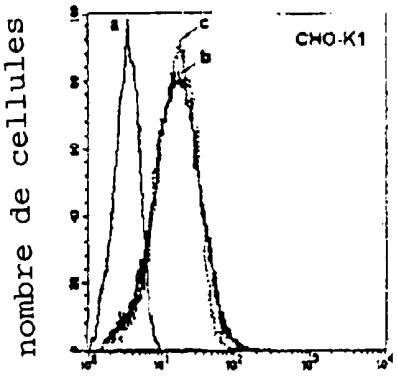
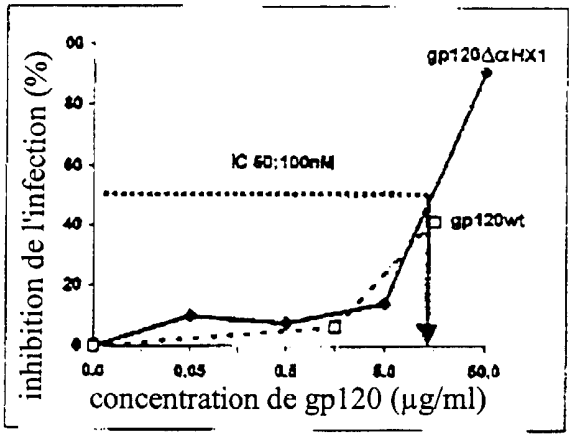

A
gp120wt(30)
gp120wt(10)
gp120ΔαHX1(30)
gp120ΔαHX1(10)
SDF-1α(10)
témoin
nombre de cellules
SDF-1α
Intensité de fluorescence
SDF-1α
B
gp120ΔαHX1
gp120wt
inhibition de SDF-1α (%)
concentration de gp120 (µg/ml)

Figure 7



intensité de fluorescence
de gp120 wt ou de
gp120ΔHX1-2

Figure 8


inhibition de l'infection (%)
100
80
60
40
20
0
gp120ΔαHX1
IC 50:100nM
gp120wt
0,0
0,05
0,5
5,0
50,0
concentration de gp120 (µg/ml)

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE

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

N° d'enregistrement national

FA 556298
FR 9804056

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendications concernées de la demande examinée
T	MISSE D. ET AL.: "Dissociation of the CD4 and CXCR4 binding properties of human immunodeficiency virus type 1 gp120 by deletion of the first putative alpha-elical conserved structure" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 72, no. 9, septembre 1998, pages 7280-7288, XP002086991 BALTIMORE, US	1-9
A	WYATT R. ET AL: "Immunologic analysis of variable and conserved region deleted HIV-1 gp120 glycoproteins" JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, no. Suppl. 21b, 1995, page 229 XP002086993 * abrégé *	1-4
A	WO 90 02568 A (CHIRON CORP) 22 mars 1990 * abrégé *	1,6-8
A	THALI M ET AL: "CHARACTERIZATION OF CONSERVED HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 GP120 NEUTRALIZATION EPITOPES EXPOSED UPON GP120-CD4 BINDING" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 67, no. 7, juillet 1993, pages 3978-3988, XP002061249	1,2,6-9

DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)

C07K

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
5 janvier 1999	Panzica, G

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

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)