

(19)



Deutsches  
Patent- und Markenamt



(10) **DE 695 35 601 T3 2012.04.05**

(12)

## Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift

(97) EP 0 787 191 B2

(21) Deutsches Aktenzeichen: 695 35 601.1

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/FR95/01391

(96) Europäisches Aktenzeichen: 95 93 5996.9

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1996/012809

(86) PCT-Anmeldetag: 20.10.1995

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: 02.05.1996

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 06.08.1997

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: 26.09.2007

(97) Veröffentlichungstag  
des geänderten Patents beim EPA: 26.10.2011

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 05.04.2012

(51) Int Cl.:

**C12N 15/49 (2006.01)**

C07K 14/16 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

### Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:

9412554                    20.10.1994    FR  
9502526                    03.03.1995    FR

(73) Patentinhaber:

Institut Pasteur, Paris, FR

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675, München, DE

(84) Benannte Vertragsanstalten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,  
MC, NL, PT, SE

(72) Erfinder:

CHARNEAU, Pierre, F-75005 Paris, FR; CLAVEL,  
Francois, F-75016 Paris, FR; BORMAN, Andrew,  
F-28210 Nogent-le-Roi, FR; QUILLENT, Caroline,  
F-94400 VITRY SUR SEINE, FR; GUETARD,  
Denise, F-75015 Paris, FR; MONTAGNIER, Luc,  
F-92000 Le Plessis-Robinson, FR; DONJON DE  
SAINT-MARTIN, Jacqueline, F-92140 Clamart, FR;  
COHEN, Jacques, F-51100 Reims, FR

(54) Bezeichnung: **NUKLEOTIDEN-SEQUENZEN AUS RETROVIREN-ANTIGENEN HIV-I GRUPPE (ODER  
UNTERGRUPPE) O**

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

### Beschreibung

**[0001]** Die Erfindung betrifft die Antigene, die durch Expression der Nucleotidsequenzen oder durch chemische Synthese beispielsweise unter Verwendung von Synthesegeräten der Marke Applied Biosystems erhalten werden, die in den Varianten der HIV-1 Gruppe (oder Untergruppe) O vorliegen, und insbesondere die Antigene, die denjenigen entsprechen, die aus Viruspartikeln isolierbar sind. Als Beispiel eines HIV-1 Virus der Untergruppe O kann man das Isolat HIV-1<sub>(VAU)</sub> sowie das Isolat HIV-1<sub>(DUR)</sub> nennen.

**[0002]** Wir weisen darauf hin, dass die in diesem Text verwendete Bezeichnung HIV der ebenfalls verwendeten Bezeichnung VIH entspricht.

**[0003]** Die Erfindung betrifft auch die durch diese Antigene induzierten monclonalen oder polyclonalen Antikörper.

**[0004]** Die Erfindung betrifft auch clonierte DNA-Sequenzen, die entweder ein Analog der Sequenzen darstellen oder zur genomischen RNA des vorstehend genannten Virus komplementär sind. Sie betrifft auch Herstellungsverfahren dieser clonierten DNA-Sequenzen. Die Erfindung betrifft auch die Palypeptide, die Aminosäuresequenzen enthalten, die von den clonierten DNA-Sequenzen codiert werden.

**[0005]** Ferner betrifft die Erfindung Verwendungen der vorstehend erwähnten Antigene zum in-vitro-Nachweis beim Menschen auf die Möglichkeit bestimmter AIDS-Formen und, was Bestimmte von ihnen anbelangt, zur Herstellung immunogener Zusammensetzungen und Impfstoffzusammensetzung gegen dieses Retrovirus. Die Erfindung betrifft ebenso dieselben Verwendungszwecke der vorstehend genannten Antikörper und für Bestimmte unter ihnen ihre Verwendung zur Herstellung von Medikamentenwirkstoffen gegen dieses menschliche AIDS.

**[0006]** Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der clonierten DNA-Sequenzen und der ausgehend von diesen Sequenzen erhaltenen Polypeptide als Sonden oder Startermoleküle zur Genamplifizierung in diagnostischen Kits.

**[0007]** Die Erfindung betrifft auch Antigen-Zusammensetzungen, die durch chemische Synthese oder durch Expression in einem zellulären rekombinanten Wirt erhalten werden können und die die Diagnose einer Infektion aufgrund eines menschlichen Retrovirus vom Typ HIV unabhängig vom Subtyp HIV-1 oder HIV-2 ermöglichen. Derartige Zusammensetzungen umfassen mindestens ein Peptid, ausgewählt aus den antigenen Peptiden, die den Viren HIV-1, HIV-2, HIV-1<sub>(DUR)</sub> und HIV-1<sub>(VAU)</sub> gemeinsam sind, oder Varianten dieser antigenen Peptide, die ähnliche immunogene Merkmale besitzen.

**[0008]** Die Erfindung zielt auch auf Zusammensetzungen ab, die die spezifische Diagnose einer Infektion aufgrund eines menschlichen Retrovirus vom Typ HIV-1, genauer gesagt HIV-1 Gruppe M, HIV-2 oder HIV-1 Gruppe (oder Untergruppe) O ermöglichen und mindestens ein für das Virus HIV-1 spezifisches, antigenes Peptid, ein für das Virus HIV-2 spezifisches, antigenes Peptid, und ein für das Virus HIV-1 Gruppe (oder Untergruppe) O spezifisches, antigenes Peptid, oder Varianten dieser antigenen Peptide umfassen, die ähnliche immunogene Merkmale besitzen. Genauer gesagt stammen diese antigenen Peptide vom Hüllprotein der Viren HIV-1 Gruppe M, HIV-2 und HIV-1 Gruppe (oder Untergruppe) O.

**[0009]** Die Erfindung beschreibt außerdem ein Peptid, das einen Nachweis eines anti-HIV-Antikörpers ermöglicht, den die Peptide des Standes der Technik nicht immer nachzuweisen erlaubten, insbesondere basierend auf der Entdeckung eines neuen Stamms HIV-1: HIV DUR. Das Antiserum, das sich gegen ihn richtet, zeigt nicht immer Reaktivität mit den Consensus-HIV-Peptiden wie das, welches heutzutage verwendet wird. Der Begriff „Consensus-HIV“ bezieht sich auf Bereiche, die zwischen den Isolaten konserviert sind und deren Nachweis für die Entwicklung von Impfstoffen oder diagnostischen Reagenzien wesentlich ist, und deren Mutationen die Resistenz gegenüber antiviralen Medikamenten verleihen. Der Begriff „Peptid“, der in dem vorliegenden Text verwendet wird, definiert sowohl die Oligopeptide als auch Polypeptide.

### Stand der Technik

**[0010]** Zwei Typen des menschlichen Immunschwächevirus (HIV), die für die Entwicklung von AIDS oder AIDS verantwortlich sind, wurden isoliert und charakterisiert. Ein erstes Virus, das als LAV-1 oder HIV-1 bezeichnet wird, wurde isoliert und in der Patentanmeldung GB 8324.800 und in der Anmeldung EP 84401.834 vom

14.09.1984 beschrieben. Dieses Virus wurde auch von F. Barré-Sinoussi et al. in Science (1983), 220, 868–871 beschrieben.

**[0011]** Das HIV-Retrovirus vom Typ 2 gehört zu einer unterschiedlichen Klasse und weist nur eine geringe immunologische Verwandtschaft mit den HIV-Retroviren vom Typ 1 auf. Die HIV-2-Retroviren wurden in der europäischen Patentanmeldung Nr. 87.400.151.4, veröffentlicht unter der Nummer 239.425, beschrieben.

**[0012]** Das Retrovirus HIV-1 ist das gängigste und es tritt in mehreren Regionen der Welt vorherrschend auf. Was das HIV-2-Retrovirus anbelangt, findet man es am häufigsten in Westafrika, obwohl seine Verbreitung außerhalb dieser Region kürzlich von Grez et al., (1994), J. Virol. 68, 2161–2168, dokumentiert wurde.

**[0013]** Die Gesamtheit der Immunschwäche-Lentiviren der Primaten, die die menschlichen Immunschwäche-Viren vom Typ 1 und Typ 2 umfasst, sowie mehrere Typen der nicht-menschlichen Primatenviren, nimmt an Größe und Komplexität zu. Das gängigste dieser Viren, HIV-1, breitet sich derzeit pandemieartig aus und ist für ein wesentliches Problem der Volksgesundheit verantwortlich. Kurz nach der Identifizierung und molekularen Charakterisierung dieses Virus wurde erkannt, dass es sehr variabel ist, und es umfasst derzeit mehrere Subtypen (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. und Pavlakis, G. N., Herausg. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM. III-2-III-9.). Diese Unterscheidung der Subtypen basiert vor allem auf der Divergenz der Gene gag und env. Es wurden mindestens 6 Subtypen identifiziert, die als A bis F bezeichnet wurden, aber vermutlich werden noch mehrere bei der weltweiten Erhebung auftauchen, die zurzeit über die Isolate von HIV-1 vorangetrieben wird. Man hat herausgefunden, dass diese unterschiedlichen Subtypen zueinander äquidistant sind in einem phylogenetischen Profil, das als sternförmige Phylogenie bezeichnet wird, was nahelegt, dass sich die verschiedenen Subtypen von HIV-1 ausgehend von einem gemeinsamen Vorfahren synchron entwickelt haben und divergiert sind.

**[0014]** Kürzlich wurden zwei unterschiedliche Viren dieser HIV-1-Virus-Gruppe isoliert und charakterisiert. Diese beiden Viren wurden aus Patienten erhalten, die in Kamerun, in Zentralwestafrika leben (Gürtler, et al. 1994, Vanden Heusevelde, et al. 1994). Ihre Sequenz, genauer gesagt die Sequenz ihres env-Gens (Hülle), zeigt deutlich, dass diese Viren zu einer distinkten Kategorie der Viren gehören, die HIV-1 ähneln, die als HIV-1 Gruppe O bezeichnet wird (NKENGASONG et al., 1993).

**[0015]** Jedoch ist die Diversität der Isolate innerhalb dieser Gruppe der Viren, die zu HIV-1 gehören, nicht bekannt und seine Verbreitung außerhalb Afrikas wurde nicht dokumentiert.

**[0016]** Eine allgemeine Anforderung bei der Entwicklung von serologischen HIV-Tests besteht deshalb darin, die falsch positiven – oder falsch negativen – Reaktionen zu vermeiden, wobei gleichzeitig die Sensitivität bewahrt oder verbessert wird, die die bisherigen Tests zum Nachweis der Seropositivität ermöglichen.

**[0017]** Die Tests, die auf der Verwendung von Consensus-Peptid(en) basieren, die im Wesentlichen vom „env“-Gen stammen, wurden als fast ideale Lösung betrachtet, bis die Entdeckung der Variante HIV-1-O die Möglichkeit von falsch negativen Ergebnissen erahnen ließ (Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immuno-deficiency virus isolate. J. Virol. 1994; 68: 1586–96; a new subtype of human immuno-deficiency virus type 1 (MPV-5180) from Cameroon. J. Virol. 1994; 68: 1581–85).

**[0018]** Die fehlende Reaktivität bestimmter Tests auf das Antigen-Peptid „env“ bei Patienten, die trotzdem bestimmte klinische Syndrome zeigen, die für AIDS oder lymphadenopathische Syndrome charakteristisch sind und die ihnen manchmal vorausgehen, wird bis heute mitunter einer Infektion der Gruppe HIV-1-O zugeschrieben (HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients, Lancet 1994; 343 1393–94; New HIV-1 subtype in Switzerland. Lancet 1994; 344: 270–71).

#### Beschreibung der Erfindung

**[0019]** Die vorliegende Erfindung hat als Ziel, Diagnoselaboren Mittel zur Verfügung zu stellen, insbesondere spezifische Peptide, die einen Nachweis der anti-HIV-Antikörper ermöglichen, die bis heute nicht nachgewiesen werden können. Die vorliegende Anmeldung beschreibt auch Gemische aus Peptiden, die von HIV-1 DUR stammen, und aus Peptiden, die anderen HIV entsprechen, so dass potenzielle „falsch negative“ Ergebnisse vermieden werden.

**[0020]** Sie betrifft außerdem ein Verfahren zum Nachweis und zur Unterscheidung in einer biologischen Probe zwischen Antikörpern, die für ein Retrovirus vom Typ HIV-1-M charakteristisch sind, und Antikörpern, die für ein HIV-1-Retrovirus der Gruppe (oder Untergruppe) O charakteristisch sind.

**[0021]** Die Erfindung röhrt von Beobachtungen her, die bei einer seropositiven Frau gemacht wurden, die sich in Kamerun aufgehalten hatte und im Verlauf von mehreren Tests zur Erkennung der Infektion mit HIV eine atypische serologische Reaktivität gezeigt hatte, wobei diese Tests durch „Western-Blot“-Verfahren bestätigt worden waren.

**[0022]** Aufgrund dieser atypischen serologischen Reaktivität, insbesondere des Fehlens der Reaktivität bei bestimmten Tests der dritten Generation, die sogar für den Typ O modifiziert wurden, fanden die Erfinder es interessant, eine Sequenzierung bestimmter Teile des Genoms dieses Stamms HIV-1-DUR, genauer gesagt der Gene GAG und ENV durchzuführen.

**[0023]** Jedoch blieben die Genamplifizierungen durch PCR mit Hilfe von Startermolekülen, die von der Gruppe M stammen, und Startermolekülen, die aus der Gruppe O bekannt sind, für die Teile, die die V3-Schleife von gp120 codieren, und für die immundominante Region von gp41 ohne Ergebnis. Nur die GAG-Region war mit Hilfe von im Stand der Technik bekannten Startermolekülen amplifizierbar (Loussert-Ajaka I, Lancet 1994; 343: 1393). Ein anderes Ziel der vorliegenden Erfindung besteht somit in der Bestimmung von Startermolekülen, die geeignet sind, dieses Problem zu lösen. Diese Startermoleküle können nachstehend auch als „Primer“ bezeichnet werden.

**[0024]** Man hat Teilsequenzen der Glycoproteine gp41 und gp120 sowie der Kapsidproteine (GAG-Gen) ausgehend von Lymphocyten-DNA und Viruskulturen bestimmt, was zeigt, dass dieser Stamm HIV-1 DUR zu einem Teil der Gruppe HIV-1-O angehört und dass er sich erheblich von Gruppe M unterscheidet, genauer gesagt bei gp41 und gp120.

**[0025]** So konnte man, insbesondere hinsichtlich der GAG-Sequenz von HIV-1<sub>(DUR)</sub>, das Vorhandensein von Consensus-Sequenzen in der Gruppe O in mehreren Bereichen nachweisen, die sich von den Consensus-Sequenzen der Gruppe M in denselben Bereichen unterscheiden.

**[0026]** Die Clonierung der Sequenzen, die die Fragmente GAG, gp41 und gp120 von HIV-1<sub>(DUR)</sub> codieren, erfolgte in einem Bluescript®-Plasmid, das eine PstI-Schnittstelle enthält. Die Amplifizierungsprodukte wurden entweder nach den klassischen Verfahren unter Verwendung der Universalprimer T3 und T7 cloniert oder direkt unter Verwendung der Primer der vorhergehenden Amplifizierung sequenziert. Die Sequenzen wurden dann durch das automatische Sequenziergerät Applied Biosystems 373A (ESGS Montigny le Bretonneux, Frankreich) bestimmt.

**[0027]** Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung haben die Erfinder das env-Gen eines Isolats der Gruppe O, HIV-1<sub>(VAU)</sub>, isoliert und sequenziert, das aus einer französischen Patientin erhalten wurde, die niemals außerhalb Europas reiste und die 1992 an AIDS starb. Nach seiner HÜllsequenz, ist HIV-1<sub>(VAU)</sub> auf zwei kamerunische Viren HIV-1<sub>ANT70</sub> und HIV-1<sub>MVP5180</sub> zurückzuführen, die kürzlich charakterisiert wurden. Die phylogenetische Analyse der env-Sequenzen offenbart, dass die drei Viren eine distinkte Gruppe auszumachen scheinen, die hier als HIV-1 Gruppe O bezeichnet wird. Die Isolierung von HIV-1<sub>(VAU)</sub> dieser Patientin zeigt auch, dass sich eine bestimmte Verbreitung von HIV-1 der Gruppe O bereits außerhalb Afrikas zeigt.

#### Isolierung des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus

**[0028]** HIV-1<sub>(VAU)</sub> wurde 1992 aus einer 41 Jahre alten französischen Patientin isoliert, die an AIDS erkrankte. Diese Patientin zeigte 1986 eine schwere Leukopenie, die mit einem Gebärmutterhalskarzinom assoziiert war. Gleichwohl zeigte sie fortschreitend Zeichen von opportunistischen Infektionen zusammen mit einer verringerten Anzahl zirkulierender CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, und sie starb 1992 an AIDS. Anti-HIV-1-Antikörper wurden zuerst 1990 durch ELISA (Elavia, SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR, und Test ABBOTT) nachgewiesen.

**[0029]** Die Patientin ist niemals außerhalb Europas verreist, hat niemals Medikamente über den intravenösen Weg erhalten und wurde keiner bekannten Bluttransfusion unterzogen. Es wurde kein Sexualpartner identifiziert, der aus Afrika stammt. Sie hat 1971 ein gesundes Kind geboren, aber ein Sohn, geboren 1980, starb im Alter von einem Jahr nach einer klinischen Episode, die neonatales AIDS sehr nahelegt. Ihr drittes Kind, geboren 1983, und ihr Ehemann sind derzeit bei guter Gesundheit und nicht infiziert.

**[0030]** Die Isolierung des Virus wurde folgendermaßen durchgeführt: die CD8+-Zellen, die in den PBMC (peripheren Blut-Lymphocyten) der Patientin vorhanden waren, wurden mit Hilfe von Kügelchen entfernt, die mit IOT8-Antikörpern (Immunotech) beschichtet waren. Die verbleibenden PBMC wurden mit PHA stimuliert, dann gemeinsam mit PMBC gezüchtet, die arm an CD8 waren, von einem gesunden Spender stammten und mit PHA stimuliert wurden. Das Viruswachstum in der gemeinsamen Kultur wurde durch Bestimmung der Reversen Transkriptase (RT)-Aktivität des Überstandes und durch einen ELISA-Test von p24 von HIV-1 (Diagnosekit, vertrieben von DuPont, Nemours) verfolgt. Das aus der gemeinsamen Ausgangskultur erhaltene Virus wurde mehreren Passagen in PBMC-Kulturen unterzogen, die arm an CD8 waren und mit PHA stimuliert wurden. Mehrere Versuche wurden durchgeführt, um verschiedene transformierte Zelllinien mit HIV-1<sub>(VAU)</sub> zu infizieren, darunter MT4-Zellen (Harada, et al. 1985) und CEM-Zellen (Rey, et al. 1989), sowie die Zelllinie P4-2 der HeLa-CD4-LTR LacZ-Zellen (Clavel und Charneau 1994).

#### Biologische Charakterisierung von HIV-1<sub>(VAU)</sub>

**[0031]** Zwei Wochen nach der gemeinsamen Kultur der PBMC der Patientin, die arm an CD8 waren und mit PHA stimuliert wurden, mit ähnlichen Zellen eines gesunden Spenders, wurde die Produktion des Virus in Form eines RT-Aktivitätspeaks im Kulturüberstand nachgewiesen. Dieses Virus konnte dann Reihenpassagen auf normalen PBMC, die arm an CD8 waren und mit PHA stimuliert wurden, unterzogen werden. In **Fig. 1** stellt die Abbildung A die Produktion von HIV-1<sub>(VAU)</sub> in Kulturüberständen von infizierten PBMC-Kulturen dar, die durch die RT-Bestimmung (gefüllte Kreise) und ELISA zum Nachweis des HIV-1-p24-Antigens (leere Kreise) kontrolliert werden. Die Konzentration von HIV-1-p24 wird in ng/ml und die RT-Aktivität in cpm/µl ausgedrückt. In Abbildung B wurde derselbe Versuch mit einem primären Standardisolat von HIV-1 eines an AIDS erkrankten Patienten durchgeführt.

**[0032]** Obwohl das Wachstum von HIV-1<sub>(VAU)</sub> mit Hilfe der RT-Bestimmung leicht nachgewiesen wurde, war der Nachweis des Virus in den Kulturüberständen mit Hilfe von ELISA p24 HIV-1 (DuPont) deutlich weniger sensitiv. **Fig. 1** zeigt den Vergleich zwischen den produktiven PMBC-Infektionsprofilen entweder mit HIV-1<sub>(VAU)</sub> oder mit einem primären Isolat von HIV-1 eines an AIDS erkrankten Patienten, getestet auf RT oder p24. Für gleiche Partikelmengen, die durch Bestimmung der RT-Aktivität in den getesteten Überständen bestimmt wurden, wurde etwa 25-mal weniger p24 für HIV-1<sub>(VAU)</sub> als für das andere HIV-1-Isolat nachgewiesen. Der Unterschied kann darauf beruhen, dass der spezifische monoklonale Antikörper von p24 von HIV-1, der verwendet wurde, um die ELISA-Plaques zu binden, nur eine schwache Affinität für die gag-Produkte von HIV-1<sub>(VAU)</sub> hat.

**[0033]** Mehrere negative Versuche wurden durchgeführt, um HIV-1<sub>(VAU)</sub> in transformierten menschlichen T-Zelllinien, die gegenüber HIV-1 sensitiv sind, zu vermehren. Insbesondere die gemeinsamen Kulturen der mit HIV-1<sub>(VAU)</sub> infizierten PMBC entweder mit MT4-Zellen oder mit CEM-Zellen führten nicht zur Vermehrung des Virus. Man hat auch herausgefunden, dass dieses Virus nicht in der Lage ist, HeLa-CD4<sup>+</sup>-Zellen (P4-2) (Clavel und Charneau 1994) zu infizieren, die ein durch das tat-Gen induzierbares lacZ-Gen tragen. Ebenso konnte keine Replikation von HIV-1<sub>(VAU)</sub> in aktiven peripheren Blutlymphocyten von mehreren Schimpansen nachgewiesen werden.

**[0034]** Die Analyse der HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Hüllsequenzen, die nachstehend detailliert beschrieben wird, und deren Vergleich mit denjenigen der beiden kürzlich beschriebenen kamerunischen Isolate zeigt, dass alle drei Viren zu derselben Gruppe von Viren gehören, die HIV-1 ähneln. Außerdem zeigt dieser Vergleich, dass diese drei Varianten des Virus phylogenetisch etwa den gleichen Abstand zueinander haben. Folglich stellt jede der drei Varianten des Virus an sich einen distinkten Subtyp ihrer Gruppe dar, die nun als HIV-1 Gruppe O bezeichnet wird. Diese Gruppe unterscheidet sich von der Gruppe der anderen bisher identifizierten HIV-1-Isolate, die die Erfinder hier als HIV-1 Gruppe M bezeichnen.

**[0035]** Das Auftreten dieser neuen Gruppe stellt die Frage nach ihrem Ursprung: Hat sich die Gruppe O ausgehend von Viren der Gruppe M (oder umgekehrt) entwickelt oder hat jede Gruppe eine unterschiedliche Vergangenheit? Die Erfinder glauben, dass es in dem Maße, in dem die Gruppe M und die Gruppe O gleichzeitig ein ähnliches Profil der internen Divergenz zeigen, wahrscheinlich ist, dass sie jeweils einer Diversifizierung verschiedener Vorfahren des Virus in unterschiedlichen menschlichen Populationen entsprechen. Man kann ausgehend von den derzeit verfügbaren phylogenetischen und virologischen Daten nicht abschätzen, ob der Vorfahre der einen oder der anderen der beiden Gruppen die Menschen auf natürliche Weise infizierte oder durch andere Arten bei den Menschen eingeführt wurde. Das einzige Virus, das HIV-1 nahesteht, das bei einem nicht-menschlichen Primaten vorhanden ist, ist das Isolat SIVCPZGAB (Huet et al. 1990), das aus einem Schimpanse isoliert wurde, der offensichtlich auf natürliche Weise infiziert wurde, und das sich deutlich von Gruppe M und Gruppe O unterscheidet und für das kein menschliches Äquivalent gefunden wurde. Es ist wenig

wahrscheinlich, dass sich die Viren der Gruppe O ausgehend von einem Schimpansen-Virus jüngst in dem Maße entwickelt haben, dass es HIV-1<sub>(VAU)</sub> nicht gelang, sich in Schimpansen-Lymphocyten zu entwickeln.

**[0036]** Warum trat die Epidemie der Gruppe O erst jetzt, 15 bis 20 Jahre später, als die Gruppe M auf. Es gibt drei mögliche Erklärungen: erstens, die Einführung des Vorfahren der Viren der Gruppe O in den Menschen wäre kürzlicher erfolgt als diejenige der Gruppe M; zweitens wäre es möglich, dass sich die Gruppe M früher als die Gruppe O aufgrund der unterschiedlichen sozialen Bedingungen in ihrer Ursprungsregion vermehrten konnte; und drittens die Viren der Gruppe O hätten eine verringerte Übertragungskapazität verglichen mit derjenigen der Viren der Gruppe M. Man hat vorgeschlagen, dass eine derartige Eigenschaft das Fehlen der signifikanten weltweiten Verbreitung von HIV-2 erklärt, bei dem eine schwächere Virusbelastung bei den infizierten Patienten mit einer verringerten Übertragbarkeit verbunden ist (De Cock et al. 1993). In dieser Hinsicht scheint sich das Pathogenitätsvermögen dieser Viren nicht von demjenigen von HIV-1 zu unterscheiden, obwohl wir keine Daten über die Virusbelastung bei den mit einem HIV-1 der Gruppe O infizierten Patienten besitzen. Die Patientin, bei der HIV-1<sub>(VAU)</sub> isoliert wurde, starb an AIDS, ebenso wie der Patient, von dem das Isolat HIV-1<sub>MPV5180</sub> der Gruppe O erhalten wurde.

**[0037]** Jedoch ist die natürliche Vorgeschichte der Infektion der HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Patientin immer noch nicht ganz klar, aber es gibt mehrere Hinweise, dass diese Patientin vor 1980 infiziert wurde, wie der Tod ihres zweiten Kindes zu diesem Zeitpunkt nahelegt, welches an einem Syndrom litt, dass AIDS ähnelte.

**[0038]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch Zusammensetzungen, die entweder erfindungsgemäß Antigene oder ein erfindungsgemäßes Antigengemisch enthalten, die/das mit ursprünglichen Extrakten von einerseits einem oder mehreren HIV-1 Gruppe O oder anderen Virusvarianten und von andererseits einem oder mehreren HIV-2 und/oder HIV-1 assoziiert sind/ist, wobei diese Zusammensetzungen gegebenenfalls markiert sind. Man kann alle Arten geeigneter Markierungen verwenden: enzymatische, fluoreszierende, radioaktive etc.

#### Nucleinsäuren

**[0039]** Die Erfindung betrifft DNAs oder DNA-Fragmente, genauer gesagt clonierte DNAs und DNA-Fragmente, die ausgehend von RNA, cDNA oder von in der PCR oder anderen Verfahren der Genamplifizierung verwendbaren Primern erhalten werden, die von der RNA oder DNA des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Retrovirus stammen. Die Anmeldung beschreibt auch DNA-Äquivalente, die insbesondere Sequenzhomologien mit der DNA von HIV-1<sub>(VAU)</sub> zeigen, insbesondere mit der Sequenz, die die env-Region des Stamms HIV-1<sub>(VAU)</sub> codiert, umfassend die Sequenz, die in [Fig. 6](#) dargestellt ist und als „vau“ bezeichnet wird. Die Homologie mit der HIV-1 Gruppe M ist mindestens gleich 50%, vorzugsweise 70% und weiter am vorteilhaftesten etwa 90%. Die Anmeldung offenbart allgemein jede äquivalente DNA (oder RNA), die mit der DNA oder der RNA eines HIV-1-Retrovirus der Gruppe O hybridisieren kann.

**[0040]** Die Erfindung betrifft auch die RNA-Sequenzen, die den vorstehend definierten DNA-Sequenzen entsprechen.

**[0041]** Die Erfindung betrifft auch Zusammensetzungen, die die Peptide oder Polypeptide enthalten, die von den vorstehend beschriebenen DNAs oder DNA-Fragmenten codiert werden.

**[0042]** Oligonukleotide, die von der Sequenz VAU abgeleitet sind, insbesondere Oligonukleotide, die mindestens 9 Nukleotide umfassen, können für den Nachweis von DNA- oder RNA-Sequenzen der HIV-1-Viren der Gruppe O in biologischen Proben, Zellkulturen oder Zellextrakten durch das PCR-Verfahren oder alle anderen Verfahren zur Genamplifizierung verwendet werden. Diese Sequenzen könnten entweder als Starter zur Genamplifizierung oder als Sonden im Hinblick auf den spezifischen Nachweis von Genamplifizierungsprodukten verwendet werden. Die Amplifizierungsprodukte oder ihre entsprechende synthetische Sequenz, die durch chemische Synthese erhalten wird (Applied Biosystems), sind auch als Hybridisierungssonde verwendbar.

**[0043]** Die Erfindung umfasst auch jedes Fragment von mindestens 100 Nukleotiden, das als Sonde in Hybridisierungsreaktionen verwendbar ist und in der Lage ist, eine Reaktion mit einem Teil des Genoms einer HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Variante bei Hybridisierungsbedingungen mit hoher Stringenz zu erlauben.

Clonierung und Sequenzierung des env-HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Gens

**[0044]** Für die erste Amplifizierung der HIV-1<sub>(VAU)</sub>-DNA durch PCR wurde die Gesamt-DNA aus mit HIV-1<sub>(VAU)</sub> infizierten PBMC extrahiert und ein Abschnitt des pol-Gens (Integrase-Region) wurde mit Hilfe von degenerierten Primern amplifiziert:

Primer 4506 : 5'AGTGGAT(A/T)(T/C)ATAGAACAGAAGT3'; SEQ ID NO 1;

Primer 5011 : 5'ACTGC(C/T)CCTTC(A/C/T)CCTTTCCA3'; SEQ ID NO 2;

**[0045]** Das Reaktionsmedium umfasst 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,9), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mg/ml Gelatine, 0,2 mM dNTP, 1 U Taq-Polymerase (Amersham). Die PCR erfolgte über 43 Temperaturzyklen mit 92°C für 10 Sekunden, 50°C für 1 Minute, 72°C für 40 Sekunden.

**[0046]** Das sich ergebende Amplifizierungsprodukt wurde in einen pBluescript-Vektor cloniert, so dass sich der Clon ph4 ergibt, der bei der CNCM am 20. Oktober 1994 unter der Hinterlegungsnummer I-1486 hinterlegt wurde, der später als Sonde verwendet wurde, um eine Lambda-DNA-Genbank mit geringem Molekulargewicht zu durchmustern, die mit EcoRI gespalten wurde und von mit HIV-1<sub>(VAU)</sub> infizierten Zellen stammte. Kurz gesagt, wurden die mit HIV-1<sub>(VAU)</sub> infizierten PBMC für 24 Stunden gemeinsam mit neuen PBMC gezüchtet, die mit PHA stimuliert wurden und arm an CD8<sup>+</sup>-Zellen waren, woraufhin ein cytopathogener Effekt (ECP) sichtbar war. Die DNA mit geringem Molekulargewicht wurde dann nach dem Verfahren von Hirt (Hirt 1967) extrahiert und mit dem Enzym EcoRI gespalten. Eine vorausgehende Southern-Blot-Analyse dieser DNA hatte gut gezeigt, dass das HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Genom eine einzige EcoRI-Restriktionsschnittstelle enthielt, die die Clonierung zirkulärer, nicht-integrierter DNA-Arten ermöglicht, die die Gesamtheit des Virusgenoms repräsentieren. Das sich ergebende Spaltungsprodukt wurde einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen, und die Population der DNA-Fragmente mit einer Größe von etwa 8–12 kb wurde gereinigt und mit der mit EcoRI (Stratagene) gespaltenen Zap-Lambda-DNA ligiert. Nach der Verpackung, dem Ausplattieren und der Durchmustierung durch Hybridisierung mit der mit <sup>32</sup>P markierten ph4-DNA wurde ein Clon, λH34, als positiv identifiziert und amplifiziert. Die EcoRI-Insertion wurde gereinigt, mit Ultraschall behandelt und mit „Shotgun“-Clonierung in den mit Phosphatase behandelten, mit dem Enzym SmaI gespaltenen M13mp18-Vektor cloniert. 150 der erhaltenen Clone wurden mit einem DNA-Sequenzergerät 373A (Applied Biosystems) sequenziert und die sich ergebenden Sequenzen wurden mit Hilfe des GCG-Wisconsin-Softwarepakets zur DNA-Analyse zu einer einzigen Sequenz zusammengefügt.

**[0047]** Die Analyse dieser Sequenz offenbarte zahlreiche Unsinn-Codons in allen Leserahmen, was ein hy- permutiertes Genom sehr nahelegt (Vartanian, et al. 1991). Da diese Sequenz unbrauchbar ist, wurde folglich entschieden, das env-Gen von HIV-1<sub>(VAU)</sub> mit Hilfe der Gesamt-DNA der mit HIV-1<sub>(VAU)</sub> infizierten PMBC durch PCR und Oligonucleotidprimern zu amplifizieren, die von der Sequenz λH34 stammen:

Primer TH2 5'GCTCTAGATGGGATCTCCATGGCAGG3' SEQ ID NO 3;

Primer UH2 5'GCTCTAGATCAGGGAAGAATCCCTGAGTGT3'. SEQ ID  
NO 4;

**[0048]** Die Amplifizierung durch PCR erfolgte über 35 Temperaturzyklen mit 92°C für 15 Sekunden, 52°C für 1 Minute, 60°C für 2 Minuten und 72°C für 2 Minuten. Das sich ergebende Amplifizierungsprodukt mit einer Größe von 3,5 kb wurde in den M13mp18-Vektor cloniert und durch sukzessive Reaktionen sequenziert, wobei zuerst der Universalsequenzerprimer M13 verwendet wurde, dann die Primer, die von den stromaufwärtsliegenden Sequenzen abgeleitet sind. Die Analyse der Nucleotid- und Peptidsequenzen erfolgte mit Hilfe des GCG-Wisconsin-Softwarepakets zur DNA-Analyse. Das HIV-1<sub>(VAU)</sub>-env-Gen codiert insgesamt 877 Aminosäuren, einschließlich des Signalpeptids. Die Nucleotidsequenz des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-env-Gens entspricht der SEQ ID NO 5 (vgl. Fig. 3).

## Verwendung der Nucleinsäuren als Sonden

**[0049]** Die Erfindung betrifft natürlich auch die Verwendung von DNA, cDNA oder deren Fragmente oder der rekombinanten Plasmide oder anderer äquivalenter Vektoren, die diese Fragmente enthalten, als Sonden zum Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus in Serumproben oder anderen biologischen Flüssigkeiten oder Geweben, die von Patienten, die vermutliche Träger des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus sind, erhalten

wurden. Diese Sonden sind gegebenenfalls markiert (radioaktive, enzymatische und Fluoreszenzmarker etc.). Sonden, die besonders interessant für die Durchführung des Nachweisverfahrens des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus oder einer HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Variante sind, können dadurch gekennzeichnet sein, dass sie die Gesamtheit oder einen Teil der komplementären DNA des Genoms des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus oder auch insbesondere die in den verschiedenen Clonen enthalten Fragmente umfassen. Sonden, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie einen Teil der cDNA von HIV-1<sub>(VAU)</sub> umfassen, der die gesamte oder einen Teil der env-Region enthält, sind Teil der Erfindung.

**[0050]** Die Sonden, die in diesem Nachweisverfahren für das HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus oder in diagnostischen Kits eingesetzt werden, sind in keiner Weise auf die vorstehend beschriebenen Sonden begrenzt. Sie umfassen alle Nucleotidsequenzen, die abgeleitet sind vom HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virusgenom, einer HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Variante oder einem durch seine Struktur nahestehenden Virus, da sie ausgehend von biologischen Flüssigkeiten von Personen, die vermutlich an AIDS erkrankt sind, den Nachweis eines HIV-1-Virus der Gruppe O, insbesondere HIV-1<sub>(VAU)</sub> durch Hybridisierung mit der DNA oder der RNA des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus ermöglichen.

**[0051]** Besonders vorteilhaft sind die Sonden, die bei der Hybridisierung mit HIV-1 eine starke Reaktion mit den HIV, die zur Gruppe O gehören, und eine schwache Reaktion mit HIV, die zur Gruppe M gehören, ergeben.

**[0052]** Der Nachweis kann nach jeder an sich bekannten Art und Weise erfolgen, insbesondere: durch Inkontaktbringen dieser Sonden entweder mit Nucleinsäuren, die aus in biologischen Flüssigkeiten (beispielsweise Gehirn-Rückenmarkflüssigkeit, Speichel etc.) enthaltenen Zellen gewonnen wurden, oder mit den Flüssigkeiten selbst, nachdem ihre Nucleinsäuren für die Hybridisierung mit Hilfe dieser Sonde verfügbar gemacht wurden, und dies bei Bedingungen, die die Hybridisierung zwischen diesen Sonden und diesen Nucleinsäuren erlauben, und durch einen Nachweis der möglicherweise herbeigeführten Hybridisierung.

**[0053]** Das vorstehend genannte Diagnoseverfahren, das Hybridisierungsreaktionen ins Spiel bringt, kann auch mit Hilfe von Sondengemischen durchgeführt werden, die von HIV-1<sub>(VAU)</sub>, HIV-1 bzw. HIV-2 stammen, so dass es infolgedessen nicht notwendig ist, einen Unterschied zwischen den gesuchten HIV-Virus-Typen zu machen.

**[0054]** Die Anmeldung beschreibt auch Expressionsvektoren, die die Sequenz enthalten, die die Hüll-Proteine von HIV-1 codiert.

**[0055]** Die Erfindung umfasst Zusammensetzungen für den Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus in Serumproben oder anderen biologischen Flüssigkeiten oder biologischen Geweben, die von Patienten erhalten wurden, die vermutliche Träger des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus sind. Diese Zusammensetzungen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens eine Sonde umfassen, die ausgehend von einer Nucleotidsequenz erhalten wird, die vom Genom des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus stammt oder abgeleitet ist, insbesondere ein HIV-1<sub>(VAU)</sub>-DNA-Fragment, das die Region oder einen Teil der Region enthält, die das env-Protein des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus oder einer HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Variante codiert.

**[0056]** Vorteilhafterweise umfasst die vorstehend beschriebene Zusammensetzung eine Sonde, die ausgehend von einer Nucleotidsequenz erhalten wird, die von HIV-1 oder HIV-2 stammt.

**[0057]** Andere diagnostische Zusammensetzungen umfassen erfindungsgemäße Primer, die zur Genamplifizierung der Retroviren der Untergruppe O oder Varianten dieser Retroviren verwendbar sind.

#### Antigene, insbesondere Proteine und Glycoproteine

**[0058]** Die Erfindung betrifft ein Protein des HIV-1-Retrovirus Gruppe (oder Untergruppe) O, oder ein natürliches oder synthetisches Polypeptid oder Peptid, das mindestens einen Teil des Proteins umfasst, welches durch Antikörper erkannt werden kann, die ausgehend von Serum isoliert werden können, das nach einer Infektion mit einem HIV-1-Stamm Gruppe O VAU erhalten wurde.

**[0059]** Die Erfindung betrifft ein äußeres Hüllprotein des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Retrovirus, das von dem Gen codiert wird, das die in [Fig. 6](#) dargestellte Sequenz umfasst. Gemäß einer bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform ist dieses Protein außerdem dadurch gekennzeichnet, dass es die Aminosäuresequenz enthält, die in [Fig. 3](#) dargestellt ist und die Aminosäurereste 1 bis 526 umfasst. Die Erfindung betrifft auch alle Polypeptide oder Varianten, die von dieser Sequenz abgeleitet sind, die ein Epitop besitzen, das von durch das HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus induzierten Antikörpern erkannt werden kann.

**[0060]** Das vorstehend genannte Protein kann in glycosylierter oder nicht-glycosylierter Form erhalten werden.

**[0061]** Die Erfindung betrifft auch ein transmembranes Hüllprotein, das die Aminosäuresequenz, die in **Fig. 3** zwischen den Aminosäureresten 527 und 877 dargestellt ist, umfasst. Dieses transmembrane Protein liegt im Rahmen der Erfindung in glycosylierter oder nicht-glycosylierter Form vor.

**[0062]** Die Erfindung betrifft auch alle Antigene, insbesondere Proteine, Glycoproteine, Polypeptide oder Peptide, die durch Expression codierender Sequenzen des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Genoms erhalten werden und die immunologische Eigenschaften besitzen, die denjenigen von HIV-1<sub>(VAU)</sub> äquivalent sind. Die Antigene werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung als äquivalent bezeichnet, wenn sie von denselben Antikörpern erkannt werden können, insbesondere Antikörpern, die ausgehend von Serum eines Patienten erhalten werden können, der durch ein HIV-1<sub>(VAU)</sub> infiziert wurde.

**[0063]** Die Erfindung betrifft insbesondere die chemisch synthetisierten Peptide oder Polypeptide, deren Aminosäuresequenz in derjenigen der HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Hüllproteine enthalten ist, die in **Fig. 3** dargestellt ist, oder die äquivalenten Peptide oder Polypeptide.

**[0064]** Man muss bei den äquivalenten Peptiden, Polypeptiden, Proteinen oder Glycoproteinen auch die Fragmente der vorangehenden Antigene einschließen und die durch chemische oder durch gentechnische Verfahren hergestellten Peptide, wenn sie immunologische Kreuzreaktionen mit den Antigenen auslösen, von denen sie stammen. Mit anderen Worten betrifft die Erfindung alle Peptide oder Polypeptide, die Epitope besitzen, die zu den Epitopen der vorstehend beschriebenen Antigene identisch sind oder ähnlich sind, und die von denselben Antikörpern erkannt werden können. Zu dieser letzten Polypeptidart gehören die Expressionsprodukte der DNA-Sequenzen, die den DNA-Sequenzen entsprechen, die die vorstehend beschriebenen Polypeptide oder Antigene codieren.

**[0065]** Genauer gesagt sind die Antigene, die ausgehend vom HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus oder durch gentechnische Verfahren oder klassische chemische Synthese erhalten werden und die das größte Interesse im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung darstellen, die Antigene, die die Etablierung einer deutlichen Unterscheidung zwischen den erfindungsgemäßen HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Viren und den Viren der Gruppen HIV-1 und HIV-2 ermöglichen. In dieser Hinsicht wurden beträchtliche Unterschiede auf der Ebene des Hüllproteins des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus sowie auf der Ebene des immundominanten Epitops des äußeren Anteils des PM-Proteins beobachtet. Es scheint, dass die gag- und pol-Proteine mehr Ähnlichkeit mit dem HIV-1-Virus aufweisen als das Hüllprotein.

**[0066]** Die Erfindung betrifft auch Peptide oder Polypeptide, die mit der immundominanten Region des transmembranen Glycoproteins der Hülle von HIV-1<sub>(VAU)</sub> identisch sind. Diese Region ist in **Fig. 3** dargestellt.

**[0067]** Bevorzugte Polypeptide dieser Region sind beispielsweise diejenigen, die die Sequenz CKNRLIC enthalten oder dieser Sequenz entsprechen. Es kann sich auch um Polypeptide oder Peptide handeln, die der Sequenz RLLALETFIQNWWLLNLWGCKNRLIC entsprechen oder diese Sequenz umfassen.

**[0068]** Ein anderes bevorzugtes Peptid, das hier nachstehend als „VAU-Peptid“ bezeichnet wird, entspricht der folgenden Sequenz, RARLLALETFIQNQQQLNLWGCKNRLICYTSVKWNKT, oder umfasst diese Sequenz oder den Teil dieser Sequenz, der von Antikörpern erkannt werden kann, die gegen das HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Retrovirus gerichtet sind.

**[0069]** Polypeptidvarianten dieser Sequenz sind beispielsweise die in **Fig. 4** dargestellten Polypeptide für die Isolate HIV-1<sub>(MVP5180)</sub> und HIV-1<sub>(ANT70)</sub>. Diese Polypeptide können auch von den Vorstehenden durch Insertion und/oder Deletion und/oder Substitution stammen, beispielsweise konservative Substitution durch Aminosäurereste.

#### Synthese der VAU-Peptide

**[0070]** Ein VAU-Peptid wurde mit dem klassischen Peptidsynthese-Festphasenverfahren, dem Fmoc-Verfahren, im „kontinuierlichen Fluss“ hergestellt. Das Peptid wurde mit Hilfe eines Milligen 9050 PEP-Synthesegeräts unter Verwendung des „Millipore“ PEG PAL-Harzes hergestellt, das mit dem ersten C-terminalen Aminosäurerest substituiert ist. Die Seitenketten der Aminosäuren werden durch die folgenden Gruppen geschützt: Pro für Arginin; Trt für Asparagin, Glutamin und Cystein; Boc für Lysin; tBu-Ester für Glutaminsäure; tBu-Ether für Serin, Threonin und Tyrosin. Die temporären Fmoc-Gruppierungen werden durch eine 20%-ige Piperidin-DMF-Lösung entfernt. Die Kopplungsreaktionen jeder Aminosäure werden mit 6 Äquivalenten DIPCDI und

HOBT durchgeführt. Bestimmte Reste benötigen eine doppelte Kopplung, insbesondere die Arginine 1 und 23, die Cysteine 19 und 26, Asparagin 11, die Glutamine 10, 12 und 13, Alanin 4, Isoleucin 9, die Leucine 2, 3, 14 und 15.

**[0071]** Nach der Kopplung wird das Herz vakuumgetrocknet. Das Peptid wird mit Hilfe des Reagenz K für 4 Stunden bei Raumtemperatur von dem Träger abgespalten. Das Rohpeptid wird präzipitiert und mit Ethylether gewaschen. Das Produkt wird durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) auf einem WATERS LC PREP 4000-Gerät mit WATERS Delta Pak C18-40 × 100 mm-Patronen, Durchfluss 30 ml/mn, 0,1%-iger Acetonitril/TFA-Gradient gereinigt.

**[0072]** Die Fraktionen, die das Peptid enthalten, werden gesammelt, im Rotationsverdampfer konzentriert und anschließend lyophilisiert.

#### Zyklisierung

**[0073]** Das Peptid (0,025 mM) wird in einer 10 mM Ammoniumacetat-Lösung gelöst. Der pH-Wert wird mit einer 1 M Ammoniaklösung auf 8,5 gebracht. Der pH-Wert wird nach 3 oder 4 Stunden erneut eingestellt. Die Zyklisierung wird durch HPLC bei 214 nm und 280 nm, WATERS Delta Pak C18 5 µ-Säule, 0,1%-iger Acetonitril/TFA-Gradient verfolgt. Die Zyklisierung ist nach 15 Stunden abgeschlossen. Der pH-Wert wird mit Hilfe von 97–100%-iger Essigsäure auf 6 gebracht, die Lösung wird lyophilisiert, dann bei denselben Bedingungen wie beim Rohpeptid gereinigt.

**[0074]** Das Peptid wird durch HPLC und durch Massenspektroskopie nach dem Elektrosprayverfahren (FISON VG Trio 2000-Spektrophotometer) überwacht.

Fmoc: Fluoroenyl-9-methyloxycarbonyl

Pro: Pentanmethyl-8-chromansulfonyl-6

Trt: Triptyl

Boc: Tertbutyloxycarbonyl

tBU: tert Butyl

DMF: Dimethylformamid

DIPCDI: Diisopropylcarbodiimid

HOBT: Hydroxy-1-benzotriazol

TFA: Trifluoressigsäure

Reagenz K: Phenol/Wasser/Thioanisol/Ethandithiol/TFA;

2,5 ml/2,5 ml/2,5 ml/1,5 ml/41 ml

**[0075]** Vergleich der Aminosäuresequenzen der HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Hülle mit der entsprechenden Sequenz von anderen HIV-Viren.

**[0076]** Die Western-Blot-Analyse von einer Reihe von Serienproben, die von einer mit HIV-1<sub>(VAU)</sub> infizierten Patientin stammen, ist in [Fig. 2](#) dargestellt. Nitrozellulosestreifer, die die durch Elektrophorese aufgetrennten und von gereinigten HIV-Partikeln stammenden Proteine tragen (LAV BLOT, SANOFI DIAGNOSTICS PAS-TEUR), wurden mit Serumproben inkubiert und ihre Reaktivität wurde nach den vom Hersteller empfohlenen Vorschriften bewertet. Die erhaltenen Ergebnisse sind die Folgenden:

Streifen 1: spezifische VIH-2-Proteine, die man mit einer im Februar 1992 erhaltenen Serumprobe der HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Patientin reagieren ließ.

Streifen 2–7: HIV-1-positive Seren; Seren der HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Patientin: 2: erhalten im November 1990; 3: im Dezember 1990; 4: im Februar 1991; 5: im Februar 1992; 6: Negativkontrolle; 7: Positivkontrolle (Serum eines mit HIV-1 infizierten Individuums). Die Namen und die Größe der Proteine (in kD) sind am Rand angegeben.

**[0077]** [Fig. 3](#) zeigt einen Sequenzvergleich der Aminosäuresequenz des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Hüllproteins mit der entsprechenden Sequenz des Referenzisolats HIV-1-LAI (Wain-Hobson, et al. 1985). Die Signalpeptide, die V3-Schleife und das immundominante gp41-Epitop sind durch schraffierte Rechtecke hervorgehoben. Die Spaltungsstelle zwischen dem externen Glycoprotein der Hülle gp120 und dem transmembranen gp41 ist durch Pfeile angegeben. Die vertikalen Linien zwischen dem Buchstabencode der Aminosäuren geben eine vollständige Identität an, die Doppelpunkte (:) geben eine starke Homologie an und die Punkte (.) geben eine begrenzte Homologie zwischen den einzelnen Aminosäuren an. Der Vergleich wurde unter Verwendung des GAP-Programms des GCG-Wisconsin-Softwarepaketes durchgeführt.

**[0078]** Die Orginalversion (1.0) der GAP- und BESTFIT-Programme wurde von Paul Haeberli ausgehend von einer detaillierten Studie der Veröffentlichungen von Needleman und Vunsch (J. Mol. Biol. 48, 443–453 (1970)) sowie Smith und Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482–489 (1981)) geschrieben. Die limitierten Vergleiche wurden von Paul Haeberli entwickelt und dem Softwarepaket hinzugefügt, um die Version 3.0 zu erstellen. Sie wurden dann in einem einzigen Programm von Philip Marquess zusammengefasst, um die Version 4.0 zu erstellen. Die Strafwerte (Penalities) beim Fehlen des Abstands in dem Vergleich der Proteine wurden modifiziert, so wie von Rechid, Vingron und Argos (CABIOS 5; 107–113 (1989)) vorgeschlagen.

**[0079]** Der Vergleich in [Fig. 3](#) zeigt zahlreiche Bereiche mit starker Divergenz mit einigen vereinzelten konservierten Domänen. Diese konservierten Regionen entsprechen größtenteils zwei Domänen, die ebenfalls in den klassischen HIV-1-Isolaten konserviert sind (Alizon, et al. 1986, Benn, et al. 1985). Unter den divergierenden Domänen ist die V3-Schleife, die auch als Neutralisationshauptdeterminante (Javaherian, et al. 1990, Javaherian, et al. 1989, Matsushita, et al. 1988) bezeichnet wird, deutlich eine der am meisten divergierenden, obwohl die beiden Cysteine, die die Schleife definieren, konserviert sind. Die Sequenz an der Spitze der Schleife, GPGRAF bei HIV-1-LAI, ist bei HIV-1<sub>(VAU)</sub> GPMAWY. Dieses Motiv der Spitze ist mit demjenigen des kamerunischen Isolats HIV-1<sub>(ANT70)</sub> der Gruppe O identisch (Van den Heasevelde, et al. 1994), unterscheidet sich aber von demjenigen des anderen Isolats HIV-1<sub>(MVP5180)</sub> der Gruppe O (Gürtler, et al. 1994), für welches das Motiv GPMRWR ist.

**[0080]** In der ganzen Hülle wurden insgesamt 29 potenzielle N-Glycosylierungsstellen identifiziert, von denen 13 im Vergleich zu anderen HIV-1-Hüllproteinen konserviert sind. Man hat insgesamt auch 19 konservierte Cysteine gefunden, was zeigt, dass die globale Faltungsarchitektur des Proteins konserviert ist, aber man hat 5 nicht-konservierte Cysteine gefunden.

**[0081]** [Fig. 4](#) zeigt den Mehrfachvergleich der immundominanten Peptide im extrazellulären Abschnitt des transmembranen Hüll-Glycoproteins verschiedener HIV-1-Isolate. Alle Sequenzen werden mit der HIV-1-LAI-Referenzsequenz verglichen. Bindestriche zeigen eine Identität mit HIV-1-LAI an. Der Vergleich erfolgte mit Hilfe des PILEUP-Programms des GCG-Wisconsin-Softwarepaketes.

**[0082]** Im PILEUP-Programm wird die Ähnlichkeitstrategie, die durch das Dendrogramm dargestellt ist, als UPGMA bezeichnet, was auf Englisch „Unweighted pair-group method using arithmetic averages“ bedeutet (Smith, P. H. A Sokal, R. R. (1973) in Numerical Taxonomy (S. 230–234), W. H. Freeman and Company, San Francisco, Kalifornien, USA). Jeder paarweise Vergleich von PILEUP nutzt das Verfahren von Needleman und Wunsch (Journal of Molecular Biology 48; 443–453 (1970)).

**[0083]** Wie [Fig. 4](#) zeigt, unterscheidet sich die Aminosäuresequenz des immundominanten Epitops des externen Teils des TM-Proteins (Gnann, et al. 1987) deutlich von derjenigen der anderen HIV-1- und HIV-2-Isolate. Dennoch hat sie die meisten Aminosäuren beibehalten, von denen sich herausstellte, dass sie zwischen den HIV-1- und HIV-2-Viren konserviert sind.

**[0084]** Man fand heraus, dass bestimmte besondere Aminosäuren ausschließlich unter den Viren der Gruppe O konserviert waren: Dies ist der Fall beim Lysin in Position 21 in einem Peptid mit 26 Aminosäuren, beim Threonin an Position 7 und beim Asparagin an Position 11. Diese Unterschiede könnten das Fehlen des Nachweises der klassischen HIV-1-Hüllantigene durch eines der Seren der HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Patientin und auch wahrscheinlich von denjenigen Patienten, die von anderen Viren der Gruppe O infiziert wurden, erklären. Im Großen und Ganzen zeigte der Vergleich zwischen den HTV-1-LAI- und HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Hüllsequenzen eine 50%-ige Identität. Die HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Hüllsequenz wurde auch mit derjenigen von anderen HIV-Vertretern verglichen, deren beide Mitglieder der Gruppe O von HIV-1 beschrieben und sequenziert wurden: HIV-1<sub>ANT70</sub> und HIV-1<sub>MVP5180</sub> und SIV. Die Ergebnisse dieser Analyse, die in Tabelle 1 dargestellt sind, beweisen, dass HIV-1<sub>(VAU)</sub> zur Gruppe O gehört. Die HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Hülle ist zu 70% mit der HIV-1<sub>ANT70</sub>-Hülle und zu 71% mit der HIV-1<sub>MVP5180</sub>-Hülle identisch. Unter den gängigsten HIV-1-Subtypen ist die Identität auf der Ebene der Hülle vergleichbar, die zwischen 74% und 80% liegt.

**[0085]** Das Verhältnis zwischen HIV-1<sub>(VAU)</sub>, anderen Mitgliedern der Phylogenie von HIV-1<sub>(VAU)</sub> und den beiden kürzlich beschriebenen Viren der Gruppe O wurde mit Hilfe der Nucleotidsequenz der transmembranen env-Region durch Konstruktion eines phylogenetischen Parsimony-Baums ohne Gewichtung beschrieben. Das Ergebnis dieser Analyse ist in **Fig. 5** dargestellt, wobei die Zahlen die Anzahl der Nucleotidaustausche angeben.

**Fig. 5** zeigt, dass HIV-1<sub>(VAU)</sub> ungefähr den gleichen Abstand zu den beiden anderen Viren der Gruppe O hat und dass diese drei Viren im Allgemeinen etwa gleichen Abstand zueinander haben. Tatsächlich beträgt die Anzahl der Nucleotidaustausche zwischen HIV-1<sub>MPV5180</sub> und HIV-1<sub>(VAU)</sub> 218 im analysierten Abschnitt des Genoms, während die Entfernung zwischen HIV-1<sub>MPV5180</sub> und HIV-1<sub>ANT70</sub> 183 beträgt und 213 zwischen HIV-1<sub>ANT70</sub> und HIV-1<sub>(VAU)</sub>. Dieses Divergenzprofil ähnelt sehr demjenigen, das man bei allen anderen HIV-1-Subtypen findet, bei denen die Anzahl der einzigartigen Nucleotidaustausche, die man zwischen zwei verschiedenen Subtypen findet, zwischen 157 (Subtyp E bis Subtyp F) und 219 (Subtyp A bis Subtyp D) liegt.

**[0086]** Tabelle 1 zeigt den Vergleich der Hüllsequenzen verschiedener Viren, die HIV-1 ähneln. Die Zahlen geben die prozentuale Aminosäureidentität zwischen den Hüllsequenzen an, wie sie mit Hilfe des GAP-Wisconsin-Softwarepakets berechnet wurde. \*: für HIV-1<sub>ANT70</sub> wurde nur das externe Hüllprotein im Vergleich verwendet.

#### Zusammensetzungen, die HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Antigene umfassen

**[0087]** Im Allgemeinen betrifft die Erfindung jede Zusammensetzung, die zum in-vitro-Nachweis der Anwesenheit in einer biologischen Flüssigkeit verwendbar ist, insbesondere von Personen, die mit HIV-1<sub>(VAU)</sub> in Kontakt gebracht wurden, oder Antikörper gegen mindestens eines der HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Antigene. Diese Zusammensetzung kann bei der selektiven Diagnose der Infektion durch HIV-1 der Gruppe O anwendbar sein, wobei Diagnoseverfahren eingesetzt werden, wie in den Patentanmeldungen EP 84401.834 und EP 87400.151.4 beschrieben. im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung werden alle Bestandteile verwendet, die antigenen Determinanten enthalten, die von gegen HIV-1<sub>(VAU)</sub> produzierten Antikörpern erkannt werden können, beispielsweise Antigene oder rekombinante Peptide oder chemisch synthetisierte Peptide, die ausgehend von der HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Hüllsequenz bestimmt werden. In dieser Hinsicht betrifft die Erfindung insbesondere Zusammensetzungen, die ein oder mehrere Hüllproteine des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus enthalten. Als Beispiele für Zusammensetzungen sind diejenigen zu erwähnen, die Proteine, Glycoproteine oder Peptide des Hüllproteins enthalten, die der gesamten Region 590–620 des gp41-Proteins von HIV-1<sub>(VAU)</sub> oder spezifischen Teilen dieser Regionen von HIV-1<sub>(VAU)</sub> entsprechen, wie die Peptide -TFIQN- oder -WGCKNR-.

**[0088]** Die Erfindung betrifft auch Zusammensetzungen, die assoziiert sind mit rekombinanten oder synthetischen HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Proteinen und/oder -Glycoproteinen und/oder -Peptiden, mit Proteinen und/oder Glycoproteinen und/oder Peptiden von HIV-1 und/oder HIV-2 und/oder eines anderen HIV-1 Gruppe O, die durch Extraktion oder in Lysaten oder durch Rekombination oder durch chemische Synthese erhalten werden, und/oder Peptiden, die von diesen Proteinen oder Glycoproteinen stammen und von Antikörpern erkannt werden können, die durch das HIV-1 und/oder HIV-2 und/oder HIV-1-Virus Gruppe O induziert werden.

**[0089]** Die diagnostischen Zusammensetzungen, die antigenen Determinanten enthalten, die von Antikörpern erkannt werden können, die gegen HIV-1<sub>(VAU)</sub> gerichtet sind, insbesondere die Peptidzusammensetzungen, können in die bereits zur Verfügung stehenden Zusammensetzungen oder Kits zum Nachweis der Infektion durch HIV-1- und/oder HIV-2-Retroviren eingeschlossen oder damit assoziiert werden, so dass das Spektrum des Nachweises der Kits auf den Nachweis von HIV-1-Retroviren der Gruppe O ausgeweitet wird.

**[0090]** Als nicht-begrenzende Beispiele:

- entweder Kern(Core)-Proteine, insbesondere die HIV-1- und HIV-2-Proteine gag, pol, oder Peptide von diesen, und HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Hüllproteine oder Hüllpeptide,
- oder HIV-1-Hüllglycoproteine, HIV-2-Hüllglycoproteine und HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Hüllglycoproteine,
- oder Gemische aus HIV-1-Proteinen und/oder Glycoproteinen und/oder aus HIV-2-Proteinen und/oder Glycoproteinen und aus HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Hüllproteinen und/oder Hüllglycoproteinen.

**[0091]** Es ist wichtig anzumerken, dass, obwohl die Antikörper der mit HIV-1 Gruppe O infizierten Patienten stark mit gag- und pol-Antigenen des HIV-1-Virus Gruppe M reagieren, ihre Reaktivität mit den Antigenen der Hülle des Virus von Gruppe M praktisch null ist. Es ist daher wichtig, dass die Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung mindestens ein HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Hüllprotein oder Hüllpeptid umfasst, so dass dieses Virus mit Sicherheit nachgewiesen werden kann.

**[0092]** Derartige Zusammensetzungen, die in der Diagnose verwendet werden, unterstützen folglich die Diagnostik von AIDS oder damit assoziierten Symptomen, die sich über ein größeres Spektrum der verantwortlichen ätiologischen Agenzen erstrecken. Es versteht sich von selbst, dass die Verwendung der diagnostischen Zusammensetzungen, die nur HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Hüllproteine und/oder Glycoproteine enthalten, nicht weniger nützlich für den selektiveren Nachweis der Retroviruskategorie sind, die für die Krankheit verantwortlich gehalten werden kann.

Verfahren und Kits zur Diagnose von Infektionen, die insbesondere vom HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus verursacht werden

**[0093]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein in-vitro-Diagnoseverfahren der Infektion durch HIV, dem ätiologischen Agens von AIDS, und den damit assoziierten Syndromen, umfassend das Inkontaktbringen eines Serums oder eines anderen biologischen Mediums, das von einem Patienten oder Probanden stammt, der Gegenstand der Diagnose ist, mit einer Zusammensetzung, die mindestens ein HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Protein, -Glycoprotein

oder -Peptid gemäß den Ansprüchen enthält, und den Nachweis einer etwaigen immunologischen Reaktion. Beispiele derartiger Zusammensetzungen wurden weiter oben beschrieben.

**[0094]** Bevorzugte Verfahren setzen beispielsweise immunenzymatische Reaktionen vom Typ ELISA oder Immunfluoreszenz ein. Die Nachweise können durch direkte oder indirekte Immunfluoreszenz oder durch direkte oder indirekte immunenzymatische Tests erfolgen.

**[0095]** Derartige Nachweise umfassen beispielsweise:

- das Einbringen vorbestimmter Mengen des Extraks oder der zu betrachtenden antigenen Zusammensetzungen gemäß der vorliegenden Erfindung in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte;
- die Einführung eines verdünnten oder unverdünnten Serums in jede Vertiefung, das die Antikörper enthalten kann, deren Vorliegen in vitro nachgewiesen werden soll;
- die Inkubation der Mikrotiterplatte;
- das sorgfältige Waschen der Mikrotiterplatte mit einem geeigneten Puffer;
- die Einführung von markierten Antikörpern, die spezifisch gegen menschliche Immunglobuline gerichtet sind, wobei die Markierung mit einem Enzym durchgeführt wird, das aus denjenigen ausgewählt wird, die ein Substrat hydrolysieren können, so dass dieses Letztere dann eine Modifizierung seiner Strahlenabsorption mindestens in einem bestimmten Wellenlängenbereich erfährt, und
- den Nachweis, vorzugsweise im Vergleich zu einer Kontrolle, des Ausmaßes der Hydrolyse des Substrats als Maß des potenziellen Risikos oder des effektiven Vorliegens der Infektion.

**[0096]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch Bestecke oder Kits zur Diagnose der Infektion durch das HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus, die insbesondere umfassen:

- ein Extrakt, eine stärker gereinigte Fraktion oder ein synthetisches Antigen, das von den vorstehend angegebenen Virustypen stammt, wobei dieser Extrakt, diese Fraktion oder dieses Antigen markiert ist, beispielsweise radioaktiv, enzymatisch, mittels Fluoreszenz oder anders,
- gegen menschliche Immunglobuline gerichtete Antikörper oder ein Protein A (vorteilhafterweise an einen in Wasser unlöslichen Träger gebunden, wie beispielsweise Agarosekügelchen oder Mikrotiterplattenvertiefungen etc.),
- möglicherweise eine Probe biologischer Flüssigkeit oder Zellen, die aus einem Probanden als Negativkontrolle erhalten wurden;
- Puffer und gegebenenfalls Substrate zur Sichtbarmachung der Markierung.

**[0097]** Die Erfindung betrifft auch immunogene Zusammensetzungen, die in der Lage sind, die Bildung von Antikörpern zu induzieren, die Antigene erkennen, die durch chemische Synthese oder durch Rekombination erhalten werden können.

### Serologie

**[0098]** Die Kapazität der Serumantikörper der mit HIV-1<sub>(VAU)</sub> infizierten Patientin, mit den antigenen HIV-1-Zubereitungen zu reagieren, wurde mit Hilfe von verschiedenen im Handel erhältlichen Kits bewertet: SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR, (GENELAVIA MIXT) ABBOTT, WELLCOME und BEHRING. Die Reaktivität dieser Antikörper mit verschiedenen HIV-1-Proteinen wurde mit Hilfe des Western-Blot-Kits von SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR unter Befolgung der durch den Hersteller empfohlenen Vorschriften untersucht.

**[0099]** Genauer gesagt wurde das Serum der Patientin mehrmals mit Hilfe von ELISA-Kits, die für HIV-1 spezifisch sind, untersucht. Es wurde zuerst 1990 getestet und es stellte sich als positiv heraus, wobei es mit dem SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR-Kit einen Wert von 7,33 (diese Zahl entspricht dem Verhältnis der gemessenen OD zu der OD des Hintergrunds), mit dem ABBOTT-Kit 3,50 und mit dem WELLCOME-Kit 2,70 erreichte. Bei der gleichzeitigen Verwendung spezifischer Reagenzien für HIV-1 und HIV-2, erreichte das Serum einen Wert von 1,42 mit dem Behring-Kit und 4,40 mit dem WELLCOME-Kit.

**[0100]** Die Kapazität des Serums der Patientin, zu verschiedenen Zeitpunkten mit verschiedenen HIV-1-Strukturproteinen zu reagieren, wurde mit Hilfe des Immunprinting-HIV-1-LAV-BLOT-Tests untersucht, ein von SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR vertriebener Test. Wie **Fig. 5** zeigt, stellte man mit allen getesteten Serumproben nur eine sehr schwache Reaktivität des Serums mit den HIV-1-env-Proteinen gp160 und gp120 fest. Das Serum hat jedoch stark mit den gag-Proteinen von HIV-1 p55 (Vorläufer von gag) und p24 (CA) sowie mit den Produkten pol p66 (RT) und p34 (IN) reagiert. Beim HIV-2-Immunprinting-Verfahren, wurde nur eine sehr schwache Reaktivität mit p26 gag nachgewiesen.

**[0101]** Dies zeigt, dass der Nachweis von Antikörpern, die für Gruppe O spezifisch sind, mit im Handel erhältlichen Serumdiagnose-Kits sorgfältig kontrolliert werden muss. Obwohl Serumantikörper von mit den Viren der Gruppe O infizierten Patienten starke Kreuzreaktionen mit den gag- und pol-Antigenen der Gruppe M zeigen, zeigen sie wenig oder keine Reaktionen mit den Hüllantigenen der Gruppe M. Man kann folglich annehmen, dass ein signifikanter Anteil dieser Patienten bei der Verwendung bestimmter Kits, die auf antigenen Reagenzien der Hülle der Gruppe M beruhen, nicht entdeckt werden könnte. Tatsächlich fand man in einer kürzlichen Vorstudie von mehreren mit der Gruppe O infizierten Patienten, dass die Kapazität, für die Gruppe O spezifische Antikörper nachzuweisen, sich sehr nach dem verwendeten Nachweis-Kit unterschied (Loussert-Ajaka, I., Ly, T. D., Chaix, M. L., Ingrand, D., Saragosti, S., Courroucé, A. M., Brun-Vézinet, F. und Simon, F. (1994). HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients. Lancet. 343, 1393–1394.). Dies impliziert, dass eine sorgfältige und strenge Studie der Reaktivität einer großen Anzahl Seren der Gruppe O mit allen auf dem Markt zur Verfügung stehenden Diagnose-Kits notwendig ist.

**[0102]** Zusammensetzungen, die polyclonale oder monoklonale Antikörper umfassen, die ausgehend von rekombinanten oder synthetischen Antigenen des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus hergestellt werden.

**[0103]** Die Erfindung betrifft ein Serum, das in einem Tier hergestellt werden kann durch dessen Inkulation mit HIV-1<sub>(VAU)</sub>, insbesondere den antigenen Epitopen von HIV-1<sub>(VAU)</sub> und genauer gesagt den antigenen Epitopen des Hüllproteins des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus. Die Erfindung betrifft weiterhin die polyclonalen Antikörper, die spezifischer gegen jedes der Antigene gerichtet sind, insbesondere Proteine oder Glycoproteine gemäß den Ansprüchen. Sie betrifft auch monoklonale Antikörper, die durch verschiedene Verfahren hergestellt werden, wobei diese monoklonalen Antikörper jeweils spezifischer gegen die Hüllproteine von HIV-1<sub>(VAU)</sub> gerichtet sind.

**[0104]** Diese polyclonalen oder monoklonalen Antikörper sind in verschiedenen Anwendungen einsetzbar. Im Wesentlichen ist ihre Verwendung zur Neutralisierung der entsprechenden Proteine zu erwähnen, sogar um die Infektiosität des ganzen Virus zu hemmen. Sie können auch beispielsweise verwendet werden, um die viralen Antigene in den biologischen Zubereitungen nachzuweisen oder um Verfahren zur Reinigung der entsprechenden Proteine und/oder Glycoproteine durchzuführen, beispielsweise bei der Verwendung in Affinitätschromatographie-Säulen.

**[0105]** Als Beispiel sind anti-Hüll-Antikörper verwendbare Reagenzien bei der Diagnose, insbesondere für den Nachweis von Partikeln von HIV-1-Gruppe O durch ELISA zum Einfangen des Antigens.

**[0106]** Die Erfindung betrifft Antikörper, die gegen ein oder mehrere Antigene des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus gerichtet sind, die ausgehend von Aminosäuresequenzen von HIV-1<sub>(VAU)</sub> gemäß den Ansprüchen produziert werden. Verfahren zum Erhalten der Antikörper ausgehend von antigenen Epitopen, die den antigenen Epitopen des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus der vorliegenden Erfindung ähneln, wurden vorstehend beschrieben.

**[0107]** Das in der Veröffentlichung von ULMER et al., 1993, beschriebene Antikörper-Herstellungsverfahren kann vom Fachmann zur Herstellung der Antikörper der vorliegenden Erfindung verwendet werden, wobei die Modifizierungen, die die Anpassung dieses Verfahrens an die Antigene der vorliegenden Erfindung ermöglichen, zum Fachwissen des Fachmanns gehören.

#### Studie zur Immunreakтивität des vau-Peptids

**[0108]** Die Immunreakтивität des vau-Peptids wurde, nachdem experimentelle ELISA-Plaques hergestellt wurden, nach einer etablierten Vorschrift für einen Durchmusterungstest für anti-HIV-Antikörper überprüft. Dieser Test beruht auf dem Nachweis einer Festphase, die mit dem Peptid hergestellt wurde, das das immundominante Epitop des Hüll-Glycoproteins des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus Gruppe (oder Untergruppe) O, Isolat VAU, nachahmt. Die Durchführung des Tests erfolgte nach der Vorschrift, die für den GENELAVIA® MIXT-Kit vorgeschlagen wurde, mit den Reagenzien dieses Kits.

**[0109]** Die Versuchsdaten, die in den beiden Tabellen der **Fig. 21** und **Fig. 22** zusammengefasst wurden, zeigen, dass

- a) die vier Seren, die mit dem HIV-1-Virus Gruppe (oder Untergruppe) O infizierten Patienten entnommen wurden, gegenüber dem vau-Peptid sehr reaktiv sind;
- b) von den 19 Seren, die vom Pasteur-Institut von Yaoundé überlassen wurden, die zehn Seren, die den mit dem HIV-1-Virus (Gruppe oder Untergruppe) O infizierten Patienten entnommen werden konnten, gegenüber demselben Peptid ebenfalls sehr reaktiv sind;

- c) die Seren (4 Proben), die mit dem HIV-1-Virus Subtyp B (in der Hochphase) infizierten Probanden entnommen wurden, dem vau-Peptid gegenüber nicht reaktiv sind;
- d) die Seren, die asymptomatischen Blutspendern (48 getestete Proben) entnommen wurden, dem vau-Peptid gegenüber nicht reaktiv sind; Diese Versuchsdaten bescheinigen, auch wenn sie begrenzt sind (in Anbetracht der wenigen positiven HIV-1 Gruppe (oder Subgruppe) O Antikörperproben), die Sensibilität und Spezifität des ausgewählten Peptids.

[0110] Aus dem Vorstehenden ergibt sich, dass die Anmeldung auch den Nachweis des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus oder einer Variante dank des Einsatzes der vorstehend beschriebenen Antikörper in einem Verfahren offenbart, das sich verschiedener Schritte bedient, wobei diese Schritte spezifisch geplant werden, damit die charakteristischen Eigenschaften des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus zu Tage treten.

[0111] Die Erfindung betrifft auch den Nachweis des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus durch molekulare Hybridisierung.

[0112] Im Allgemeinen umfasst dieses Nachweisverfahren des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus oder einer Variante in Serumproben oder anderen biologischen Flüssigkeiten oder Geweben, die aus Patienten erhalten werden, die vermutliche Träger des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus sind, die folgenden Schritte.

- die Herstellung von mindestens einer Sonde, die gegebenenfalls markiert ist;
- mindestens einen Hybridisierungsschritt, der unter Bedingungen durchgeführt wird, die die Hybridisierung erlauben, durch Inkontaktbringen der Nucleinsäure der Probe des im Verdacht stehenden Patienten mit der markierten Sonde und gegebenenfalls die Immobilisierung des gebildeten Komplexes auf einem geeigneten festen Träger,
- gegebenenfalls Waschen des festen Trägers mit einer geeigneten Waschlösung,
- den Nachweis des Komplexes und somit die Anwesenheit oder Abwesenheit des HIV-1<sub>(VAU)</sub>-Virus durch ein geeignetes, dem Fachmann bekanntes Nachweisverfahren.

[0113] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, wird die vorstehend erwähnte Hybridisierung unter nicht-stringenten Bedingungen durchgeführt und das Waschen des Trägers (Membran) erfolgt unter Bedingungen, die an diejenigen der Hybridisierung angepasst sind.

[0114] Unter Verwendung einer Serologie oder eines genetischen Amplifizierungsverfahrens wie der spezifischen Polymerasenkettensreaktion (PCR) wurde das Ausmass der Epidemie von HIV-1 der Gruppe O genau bewertet. Man hat herausgefunden, dass 5 bis 10% der mit einem HIV-1 infizierten Patienten aus Kamerun in Wirklichkeit mit Viren der Gruppe O infiziert sind. Allerdings wurde, abgesehen von dem hier beschriebenen Virusisolat, die Verbreitung der Viren der Gruppe O außerhalb von Zentralwestafrika nicht dokumentiert. Die Patientin, bei der HIV-1<sub>(VAU)</sub> isoliert wurde, hat immer in Frankreich gelebt und ist niemals nach Afrika gereist. Bisher haben wir keinen genauen Beweis, was den Ursprung ihrer Infektion anbelangt, aber dieser Fall zeigt, dass eine bestimmte Verbreitung der Viren der Gruppe O in Europa bereits stattgefunden hat.

[0115] Die biologische Probe kann insbesondere aus Blut, Plasma, Serum oder allen anderen biologischen Extrakten bestehen. Die vorstehend beschriebenen Zusammensetzungen sind für den Nachweis von Antikörpern in einer der vorstehend genannten biologischen Proben verwendbar.

[0116] Die Anmeldung offenbart auch ein Verfahren zur in-vitro-Diagnose einer Infektion, die spezifisch auf ein Retrovirus des HIV-Typs zurückzuführen ist, gekennzeichnet durch die Schritte:

- des Inkontaktbringens einer biologischen Probe, die vermutlich Antikörper enthält, die infolge einer Infektion durch ein HIV-Retrovirus Gruppe (oder Untergruppe) O produziert wurden, mit einem wie vorstehend definierten Peptid oder mit einer Peptidzusammensetzung, wie vorstehend definiert, bei geeigneten Bedingungen, die die Bildung eines Immunkomplexes vom Typ Antigen/Antikörper zulassen,
- des Nachweises des möglichen Vorliegens des Komplexes.

[0117] Zudem wird eine immunogene Zusammensetzung beschrieben, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie mindestens ein Peptid in Assoziation mit einem pharmazeutischen Träger umfasst, der für die Herstellung von Impfstoffen akzeptabel ist.

[0118] Die Erfindung bezieht sich auch auf ein Verfahren zur Herstellung von Kapsidproteinen und von gp 41- und gp120-Glycoproteinen eines retroviralen Stamms gemäß der Erfindung, wobei das Verfahren durch folgende Schritte gekennzeichnet ist:

- Lyse der mit einem HIV-1-Retrovirus gemäß der Erfindung infizierten Zellen und Trennung des Überstands und der infizierten Zellen oder Lyse der durch Zentrifugation hergestellten Viruspellets,
- Aufbringen des Zellextrakts und/oder des Virusextrakts auf ein Immunadsorbens, das gereinigte Antikörper enthält, die ausgehend von einem Serum eines mit einem Retrovirus gemäß der Erfindung infizierten Probanden erhalten werden, und vorteilhaft auf einem angepassten Träger fixiert sind, wobei das Serum des infizierten Probanden die Kapazität besitzt, mit Hüllproteinen des erfindungsgemäßen Virus stark zu reagieren,
- Inkubation in Gegenwart eines Puffers und über einen Zeitraum, der lang genug ist, um die Bildung eines Antigen/Antikörper-Immunkomplexes zu erreichen,
- Waschen des Immunadorbens mit einem Puffer zur Entfernung der Moleküle, die nicht auf dem Träger zurückgehalten werden,
- Gewinnung der gesuchten antigenen Proteine.

**[0119]** Nach einer ersten Ausführungsform dieses Herstellungsverfahrens erfolgt die Trennung und die Gewinnung der Kapsidproteine und der gp41- und gp120-Glycoproteine von HIV-1 DUR durch Elektrophorese und Elektroreduktion der Proteine.

**[0120]** Nach einer anderen Ausführungsform dieses Herstellungsverfahrens werden die Proteine gewonnen durch:

- Eluierung der auf dem vorstehend genannten Immunadsorbens fixierten Proteine,
- Reinigung der so eluierten Produkte über eine Chromatographiesäule, die fixiert auf dem Trennungsträger Antikörper enthält, die die Kapsidproteine und die gp41- und gp120-Glycoproteine der HIV-1 Gruppe (oder Untergruppe) O DUR erkennen.

**[0121]** Im Rahmen der Erfindung liegt ebenfalls ein Herstellungsverfahren für ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder Peptid, wobei dieses Polypeptid oder Peptid erhalten wird

- entweder durch Expression einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure,
- oder durch chemische Synthese, durch Addition von Aminosäuren, bis dieses Polypeptid oder Peptid erhalten wird.

**[0122]** Die klassischen Prinzipien und genetischen Verfahren können hier genutzt werden („Molecular Cloning”, Sambrook, Fritsch, Maniatis, CSH 1989).

**[0123]** Die Anmeldung beschreibt ein Herstellungsverfahren für eine vorstehend definierte Nucleinsäure, die entweder durch Isolierung aus einem erfindungsgemäßen Virus oder durch chemische Synthese hergestellt werden kann, oder unter Verwendung von in-vitro-Amplifizierungsverfahren für Nucleinsäuren ausgehend von spezifischen Primern.

#### Bestimmung der für die Gruppe O spezifischen Oligonucleotide

**[0124]** Mit Hilfe der Sequenz VAU und ihrer Korrelation mit den Sequenzen MVP5180 und ANT70 hat man die Oligonucleotidprimer definiert, die sich als spezifisch für die gesamte Untergruppe O für die V3-Region und die gp41-Region erwiesen. Diese ermöglichen die Amplifizierung des Stamms DUR und lösen folglich das Amplifizierungsproblem, auf das man gestoßen ist. Die Position sowie die Sequenz dieser HIV Untergruppe O-Primer sind in **Fig. 13** dargestellt. Mit diesen Primern kann mit einem einzigen Schritt mit 30 PCR-Zyklen eine bei Ethidiumbromid-Färbung sichtbare Amplifizierungsbande erhalten werden. Teilesequenzen wurden erhalten:

- GAG: 513 Basenpaare (171 Aminosäuren) = SEQ ID NO 9
- gp 120 V3-Schleife: 525 Basenpaare (175 Aminosäuren) = SEQ ID NO 10
- immundominante gp41-Region: 312 Basenpaare (104 Aminosäuren) = SEQ ID NO 11.

**[0125]** Die Nucleotid- (**Fig. 15**) und Proteinvergleiche (**Fig. 16**) der DUR-Sequenzen mit den Sequenzen MVP 5180, ANT und VAU für die Untergruppe O, LAI für das Cosenus-HIV-1, die repräsentative afrikanische HIV-1-MAL-Sequenz und CPZ für CIV des gabunischen Schimpansen, zeigen, dass DUR genauso weit von den anderen veröffentlichten HIV-1 Gruppe (oder Untergruppe) O entfernt ist, wie diese untereinander.

**[0126]** Die Unterschiede sind in der GAG-Region geringer und in der V3-Schleifenregion von gp120 maximal, bei der der Proteinvergleich 40% Unterschied erreicht (**Fig. 16**). Die phylogenetischen Bäume bestätigen einerseits, dass der Stamm DUR zu der Untergruppe O gehört, und andererseits das Ausmass der Unterschiede zwischen den verschiedenen beschriebenen O-Stämmen, sofern sich die Verzweigungen der Subtypen nicht deutlich hervorheben (**Fig. 17**).

## Vergleich der GAG-Sequenzen

**[0127]** Beim Vergleich der erhaltenen GAG-Sequenz mit den beiden anderen veröffentlichten O-Stämmen ANT70 und MVP5180, sowie mit den für die Gruppe M repräsentativen Sequenzen (**Fig. 8**) kann man feststellen, dass ein O-Consensus in mehreren Bereichen existiert, der sich vom M-Consensus in denselben Bereichen unterscheidet. Man kann auch zwei hypervariable Bereiche, die für O variabler als für M sind, und einige punktuelle Unterschiede für den einen oder anderen Stamm feststellen. Dennoch scheinen die Regionen SPRT...SEGA, MLNAI...KEVIN, GPLPP...QQEQI, VGD...SPV den O-Consensus vom M-Consensus zu unterscheiden.

**[0128]** Die Regionen QQA und LWTTRAGNP sind hypervariable Regionen. Der HIV-1 Stamm Gruppe (oder Untergruppe) O DUR hebt sich in drei Positionen gegenüber dem M und O-Consensus ab (1 für I und 2-mal für E) und nimmt eine spezifische Aminosäure in drei isolierten hypervariablen Positionen V Position 19; A Position A77; L Position 110 auf.

**[0129]** Zudem ist es möglich, in der GAG-Region Abschnitte zu definieren, die der Gruppe O und der Gruppe M gemeinsam sind, wie SPRTLNAWK, GSDIAGTTST und QGPKEPFRDYVDRF.

## Vergleich der Sequenzen der V3-Schleife

**[0130]** Diese Vergleichsstudie hat beträchtliche Unterschiede offenbart, die 56% Abweichungen auf Proteinebene zu dem Consensus HIV-1 Untergruppe M und 35 bis 42% zu den anderen HIV-1 Gruppe (oder Untergruppe) O erreichen.

**[0131]** Die Alignments der Peptidsequenzen der V3-Schleifenregionen von gp120 und der immundominanten Region von gp41 sind in **Fig. 9** angegeben. Die Sequenz des Inneren der V3-Schleife des DUR-Stamms unterscheidet sich wesentlich von derjenigen des Consensus-HIV-1 Untergruppe M. Sie teilt das Motiv GPMA-WYSM mit den Stämmen VAU und ANT70, jedoch nicht mit dem Stamm MVP, der zwei Substitutionen zeigt: R für A und R für Y.

**[0132]** Die linken und rechten Teile der V3-Schleife unterscheiden sich deutlich von allen anderen bekannten HIV und lassen keine anderen Kreuzreaktivitäten annehmen. Außerdem ist die V3-Schleife von DUR um eine Aminosäure länger als die anderen O-Sequenzen, die selbst um eine andere Aminosäure länger sind als die Sequenzen der Gruppe HIV-1 M.

## Vergleich der Alignments hinsichtlich der immundominaten Region von gp41

**[0133]** Die „Minischleife“ des DUR-Stamms der Sequenz CRGKAIC stellte sich als sehr spezifisch für diesen Stamm heraus: sie macht ein Epitop aus (vgl. **Fig. 9**). Zudem sollte diese Sequenz geeignet sein, bei der Modifizierung der Faltungsbedingungen des gp41-Glycoproteins und folglich bei der Infektiosität des Stamm einzugreifen.

**[0134]** Eine lange Sequenz mit 11 Aminosäuren, die diese Schleife links flankiert, ist mit der Sequenz VAU identisch. Man kann einen Polymorphismus des DUR-Stamms für eine Position S oder T nach den analysierten Clonen feststellen.

**[0135]** Ebenfalls in **Fig. 9** sind entsprechende Peptide dargestellt, die von anderen bekannten Retrovirus-Stämmen stammen.

**[0136]** Der Stamm DUR erlaubt auch die Definition eines Consensus HIV Untergruppe O der gp41-Region, von der mehrere homologe ausreichend lange Regionen verwendet werden könnten. Diese homologen Regionen sind unter anderem: RL\*ALET, QNQQ, LWGC, CYTV (\*stellt eine variable Aminosäure dar).

## Serologische Korrelationen:

**[0137]** Das anti-DUR-Antiserum reagiert nicht mit den Peptiden der V3-Schleife des Consensus von HIV-1 M, HIV-MAL, HIV-1 CPZ oder HIV-1 Gruppe (oder Untergruppe) O MVP5180, reagiert jedoch allerdings mit dem Peptid der V3-Schleife von HIV-1-O ANT70. Was die immundominante gp41-Region anbelangt, reagiert es nicht mit dem „klassischen“ Consensus von HIV-1 Untergruppe M, reagiert jedoch, schwach aber überraschenderweise, mit dem Consensus von HIV-1 Untergruppe M, der sich nach rechts erstreckt.

## LITERATUR

- 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 VIH-1-related retrovirus from AIDS patient (L'isolement de rétrovirus atypique apparenté au VIH-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., Gruet, 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.
- Benn, S., Rutledge, R., Folks, T. et al. (1985). Genomic heterogeneity from AIDS retroviral isolates from North America and Zaire (Hétérogénéité génomique d'isotats rétroviraux de SIDA de l'Amérique du Nord et du Zaïre). *Science*. 230, 949–951.
- 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.
- 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.
- De Cock, K. M., Adjorilo, G., Epkini, E., Sibailiy, T., Kouadio, J., Maran, M., Brattegaard, K., Vetter, K., Doornly, R. et Gayle, H. (1993). Epidemiology and transmission of VIH-2: why there is no VIH-2 epidemic (Epidémiologie et transmission de VIH-2: pourquoi il n'y a aucune épidémie de VIH-2). *JAMA*. 270, 2083–2086.
- De Leys, R., Vanderborgh, 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 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.
- 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.
- 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 (VIH-1 and VIH-2) mixed infections in India reveals a recent spread of VIH-1 and VIH-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 (VIH-1 et VIH-2) en Inde révèle une propagation récente de VIH-1 et de VIH-2 à partir d'un seul ancêtre pour chacun de ces virus). *J. Virol.* 68, 2161–2168.
- 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.
- 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.
- 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.
- Huct, T., Cheynier, R., Meyerhans, A., Roclants, G. et Wain-Hobson, S. (1990). Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to VIH-1 (Organisation génétique d'un lentivirus de chimpanzé apparenté au VIH-1). 345, 356–359.
- 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 VIH-1 (Anticorps neutralisant un spectre large induit par le déterminant neutralisant hypervariable de VIH-1). *Science*. 250, 1590–1593.
- Javaherian, K., Langlois, A. J., McDanal, C., Ross, K. L., Eckler, L. I., Jellis, C. L., Profy, A. T., Rusche, J. R., Bolognesi, D. R., 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.
- Louwagie, J., McCutchan, F., Peeters, M., Brennan, T., Sanders-Buell, E., Eddy, G., van der Groen, G., Fransen, K., Gershy-Damet, G. et Deleye, R. (1993). Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international VIH-1 isolates provides evidence for multiple genotypes (L'analyse phylogénétique de gènes gag de 70 isolats internationaux de VIH-1 fournit la preuve de génotypes multiples). AIDS. 7, 769–80.
- 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 VIH-1 isolates from Africa, Europe, and North America (Comparaison génétique d'isolats de VIH-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, Bd. 7, Nr. 11, S. 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 Heusevelde, M., Decourt, J. L., de Leys, R. J., Vanderborgh, H., 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.
- Vartanian, J.-P., Meyerhans, A., Asjö, B. et Wain-Hobson, S. (1991). Selection, recombination, and G→A hypermutation of VIH-1 genomes (Sélection, recombinaison, et hypermutation G→A de génomes de VIH-1). J. Virol. 65, 1779–1788.
- 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.

### Patentansprüche

1. Nucleinsäure, die den Nachweis des HIV-1<sub>VAU</sub>-Virus ermöglicht, und die die Sequenz wie in [Fig. 6](#) darstellt, umfasst.
2. Als Sonde verwendbare Nucleinsäure, die aus einem Fragment von mindestens 100 Basenpaaren der Sequenz wie in [Fig. 6](#) dargestellt besteht.
3. Als Sonde verwendbare Nucleinsäure, die dadurch gekennzeichnet ist, dass es sich um DNA handelt und dass es aus einem Fragment einer Nucleinsäure nach Anspruch 1 besteht und dass es ein Polypeptid des Hüllproteins codiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Sequenzen, die enthalten oder entsprechen:
  - (i) Sequenz CKNRLIC;
  - (ii) Sequenz RLLALETFIQNQQQLNLWGCKNRLIC;
  - (iii) Sequenz RARLLALETFIQNQQQLNLWGCKNRLICYTSVKWNKT;
  - (iv) Schleife V3 der Sequenz CERPGNQTIQKIMAGPMAWYSMALSNTKGDTRAAYC;
  - (v) Sequenz TFIQN;
  - (vi) Sequenz WGCKNR;
  - (vii) Aminosäuren 1 bis 526 der Sequenz wie in [Fig. 3](#) dargestellt; und
  - (viii) Aminosäuren 527 bis 877 der Sequenz wie in [Fig. 3](#) dargestellt.
4. Als Sonde verwendbare Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um markierte DNA oder RNA handelt, insbesondere mittels radioaktiver, enzymatischer oder fluoreszierender Marker.
5. Nucleinsäure nach Anspruch 1, die dadurch gekennzeichnet ist, dass es sich um RNA handelt.
6. Zusammensetzung zum Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit eines HIV-1<sub>VAU</sub>-Retrovirus in Serumproben oder anderen biologischen Flüssigkeiten oder Geweben, die von Patienten erhalten wurden, die

mögliche Träger eines HIV-1<sub>V<sub>AU</sub></sub>-Retrovirus sind, wobei die Zusammensetzung dadurch gekennzeichnet ist, dass sie mindestens eine Sonde nach einem der Ansprüche 2 bis 4 umfasst.

7. Peptid oder Polypeptid, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- einem Polypeptid, das aus der Sequenz wie in **Fig. 3** dargestellt, besteht und von einer Nucleinsäure codiert wird, die aus der Sequenz wie in **Fig. 6** dargestellt, besteht,
- einem Teit des env-Proteins der Sequenz der von einer Nucleinsäure codiert wird, die aus einem Fragment von mindestens 100 Basenpaaren der Sequenz wie in **Fig. 6** dargestellt, besteht, und
- einem Polypeptid (i) der Sequenz CKNRLIC, (ii) der Sequenz RLLALETFIQNQQQLNLWGCKNRLIC, (iii) der Sequenz RARLLALETFIQNQQQLNLWGCKNRLICYSVKWNKT, (iv) der Sequenz CERPGNQKIMAGPMA-WYSMALSNTKGDTTRAAYC, (v) der Sequenz TFIQN, (vi) der Sequenz WGCKNR, (vii) bestehend aus den Aminosäuren 1 bis 526 der Sequenz wie in **Fig. 3** dargestellt, oder (viii) bestehend aus den Aminosäuren 527 bis 877 der Sequenz wie in **Fig. 3** dargestellt.

8. Hüllprotein des HIV-1<sub>V<sub>AU</sub></sub>-Retrovirus, dadurch gekennzeichnet, dass es erhältlich ist durch die Expression einer Nucleinsäure, die die Sequenz wie in **Fig. 6** dargestellt, entspricht, in einer Wirtszelle und dadurch, dass das Protein entweder die zwischen den Resten 1 und 526 der Sequenz wie in **Fig. 3** dargestellt, enthaltene Aminosäuresequenz oder die zwischen den Resten 527 bis 877 der Sequenz wie in **Fig. 3** dargestellt, enthaltene Aminosäuresequenz umfasst.

9. Polypeptid oder Peptid, dessen Sequenz in der Sequenz der HIV-1<sub>V<sub>AU</sub></sub>-Hüllproteine nach Anspruch 8 enthalten ist, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Epitop umfasst, das von durch das HIV-1<sub>V<sub>AU</sub></sub>-Virus induzierten Antikörpern erkannt werden kann.

10. Polypeptid oder Peptid nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Sequenz umfasst, die aus den folgenden Sequenzen ausgewählt ist:

- (i) Sequenz CKNRLIC;
- (ii) Sequenz RLLALETFIQNQQQLNLWGCKNRLIC; oder
- (iii) Sequenz RARLLALETFIQNQQQLNLWGCKNRLICYSVKWNKT.

11. Polypeptid abgeleitet aus dem Polypeptid nach Anspruch 10 (ii) durch konservative Substitution von Aminosäuren, wobei das Polypeptid dieselben antigenen Eigenschaften bewahrt, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- (i) der Sequenz RLLALETFIQNWWLLNLWGCKNRLIC; und
- (ii) der Sequenz RLLALETLLQNQQQLLWGCKGKLVC.

12. Peptid oder Polypeptid nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um ein synthetisches Peptid handelt.

13. Zusammensetzung, die für den In-vitro-Nachweis für die Anwesenheit von anti-HIV-1<sub>V<sub>AU</sub></sub>-Antikörpern in einer biologischen Probe, die vom Menschen stammt, geeignet ist, wobei die Zusammensetzung mindestens ein Antigen umfasst, das ein Polypeptid oder ein Peptid des Hüllproteins eines HIV-1<sub>V<sub>AU</sub></sub>-Retrovirus umfasst, wie in einem der Ansprüche 7 bis 12 definiert.

14. Zusammensetzung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, das sie zusätzlich ein Antigen umfasst wie ein Protein, ein Glycoprotein, ein Polypeptid oder ein Peptid eines nicht zur Gruppe O gehörigen HIV-1-Virus und/oder eines HIV-2 Virus oder ein Peptid abgeleitet von einem nicht zur Gruppe O gehörigen HIV-1-Virus und/oder von einem HIV-2-Virus mit einem Epitop, das von den Antikörpern, die durch das nicht zur Gruppe O gehörige HIV-1-Virus und/oder das HIV-2-Virus induziert werden, erkannt werden kann.

15. Zusammensetzung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteine und/oder Glycoproteine des nicht zur Gruppe O gehörigen HIV-1 und/oder des HIV-2 GAG- oder POL-Proteine oder Fragmente von GAG- oder POL-Proteinen sind.

16. Zusammensetzung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteine und/oder Glycoproteine des nicht zur Gruppe O gehörigen HIV-1 und/oder des HIV-2 Hüllglycoproteine sind.

17. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 13 bis 16, die für den In-vitro-Nachweis der Anwesenheit von anti-HIV-1<sub>V<sub>AU</sub></sub>-Antikörpern in einer biologischen Probe, die vom Menschen stammt, geeignet ist, dadurch

gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung eine Peptidsequenz umfasst, die der Gesamtheit oder einem Teil der Region 590–620 des Proteins gp41 von HIV-1<sub>VAU</sub> entspricht.

18. Zusammensetzung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Peptidsequenz die Sequenz TFIQN, CKNRLIC oder WGCKNR ist.

19. Antikörper, der geeignet ist, ein Protein, ein Peptid oder ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 7 bis 12 zu erkennen.

20. In-vitro-Diagnoseverfahren für eine durch das HIV-1<sub>VAU</sub>-Virus ausgelöste Infektion, wobei das Verfahren umfasst:

– Inkontaktbringen eines Serums oder eines anderen biologischen Mediums, das von einem Kranken stammt, der Gegenstand der Diagnose ist, mit mindestens einem Protein, einem Peptid oder einem Polypeptid nach einem der Ansprüche 7 bis 12 oder einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 13 bis 18, und  
– Nachweis einer Immunreaktion.

21. Für die Western-Blot-Analyse oder ELISA-Analyse erforderliches Reagenz, das ein Protein, ein Peptid oder ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 7 bis 12 oder eine Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 13 bis 18 enthält.

22. Nucleotidsequenz nach Anspruch 1 zur Verwendung der In-vivo-Induktion der Synthese von Antikörpern, die gegen das von der Sequenz codierte Antigen gerichtet sind.

23. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 13 bis 18, die fähig ist, bei einem Tier Antikörper zu induzieren.

24. Kit für den In-vitro-Nachweis eines HIV-1<sub>VAU</sub>-Retrovirus in einer biologischen Probe, dadurch gekennzeichnet, dass er als optional markierte Sonde mindestens eine Nucleotidsequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 4, umfasst.

25. Kit nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass er des Weiteren Reagenzien enthält, die für die Durchführung einer Hybridisierung erforderlich sind.

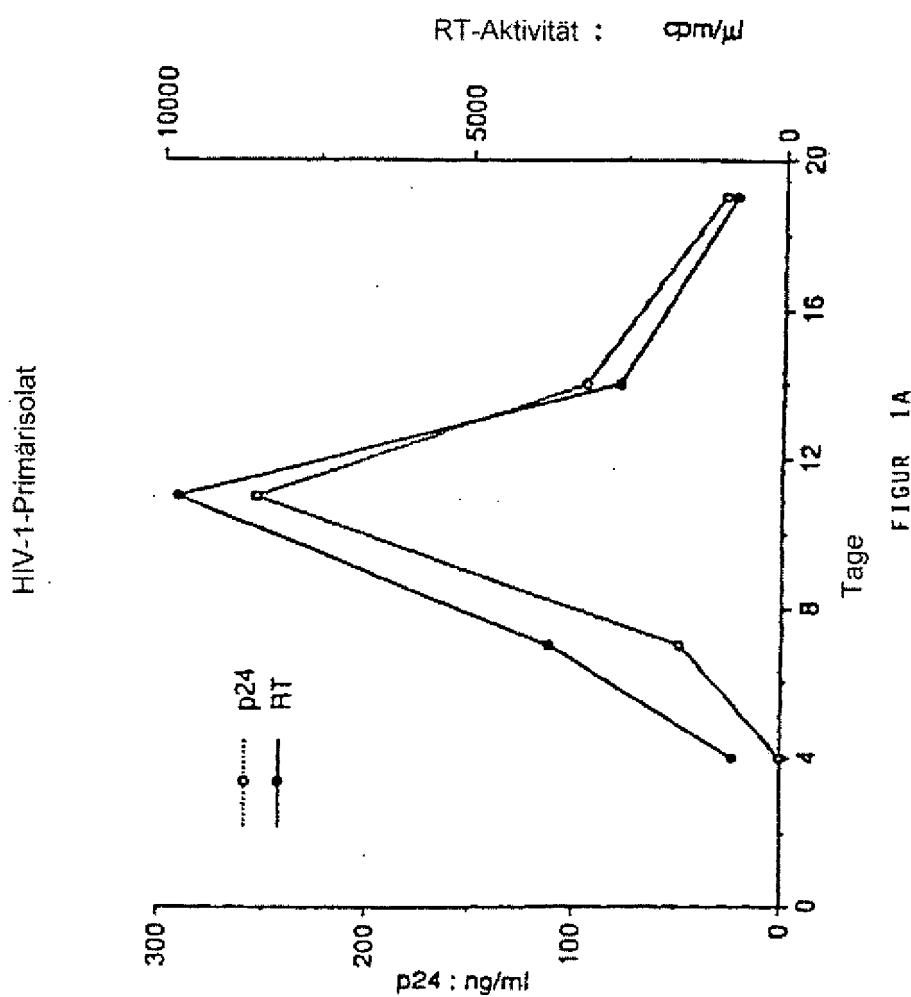
26. Verfahren für den Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit des HIV-1<sub>VAU</sub>-Virus in Serumproben oder anderen biologischen Flüssigkeiten oder Geweben, die von Patienten erhalten wurden, die vermutliche Träger des HIV-1<sub>VAU</sub>-Virus sind, umfassend:

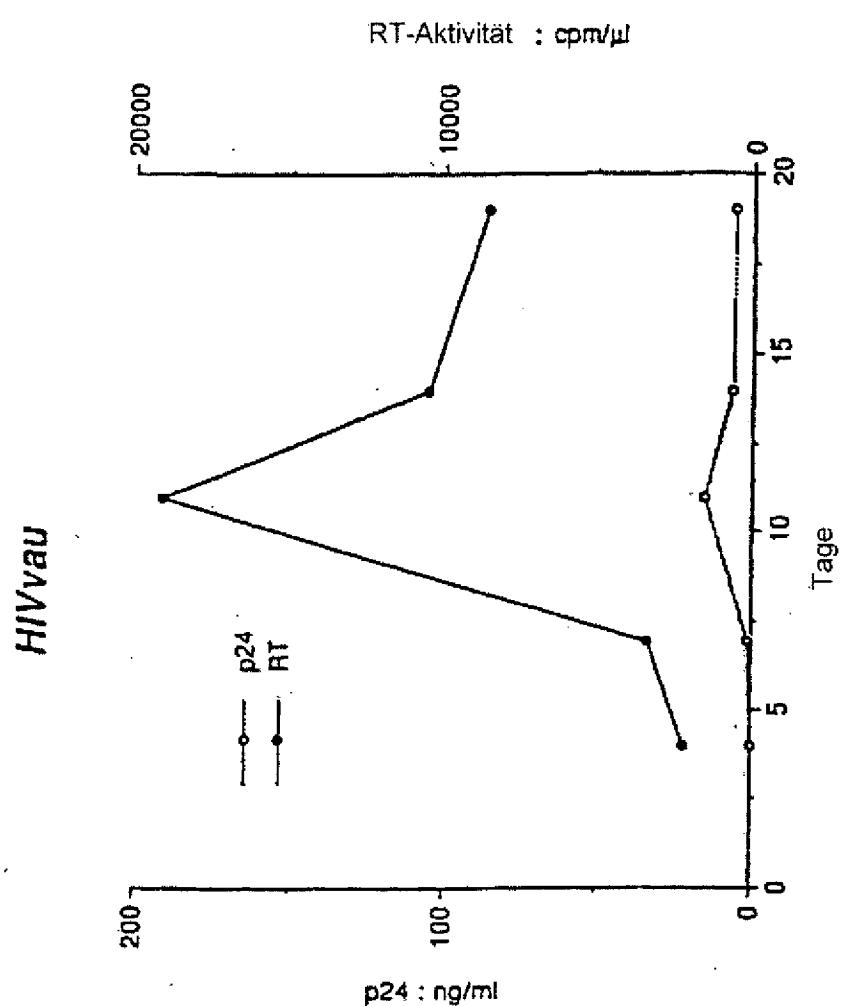
– Inkontaktbringen einer Sonde nach einem der Ansprüche 2 bis 4 entweder mit Nucleinsäuren, die ausgehend von in biologischen Flüssigkeiten enthaltenen Zellen gewonnen wurden, oder mit den Flüssigkeiten selbst, nachdem ihre Nucleinsäuren für die Hybridisierung mithilfe der Sonde verfügbar gemacht wurden, und dies unter Bedingungen, die die Hybridisierung zwischen der Sonde und den Nucleinsäuren erlauben, und  
– Nachweis der möglicherweise herbeigeführten Hybridisierung.

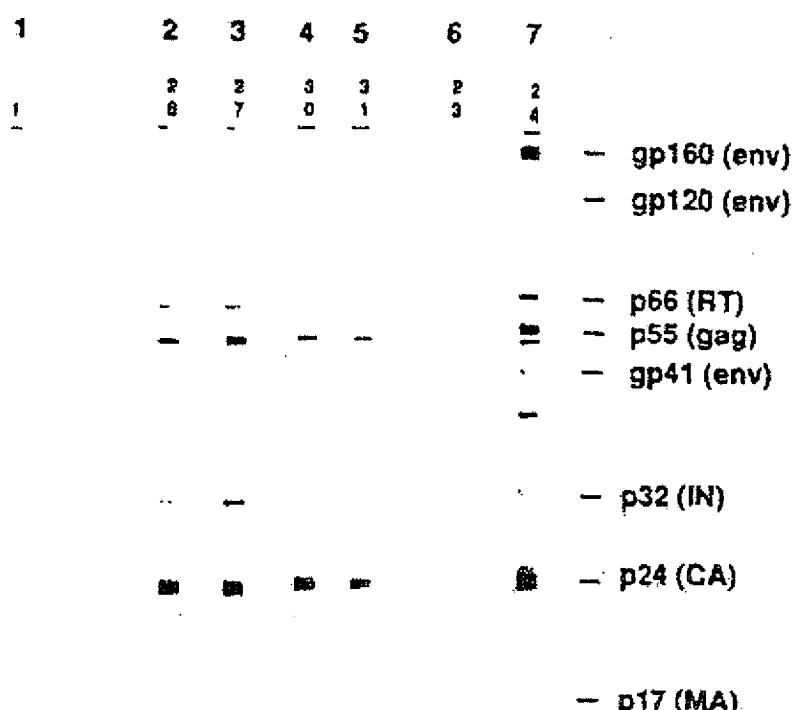
27. Verfahren zur Herstellung eines Antigens, Polypeptids oder Peptids durch Expression einer Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4.

Es folgen 31 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen







FIGUR 2

## Peptidsignal

vau	1	WTAYMKANGKERNKTSIWCILIAELIPCFSCNQLYATVYSGVPVWEDA	48
	1	:   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :	
la1	1	MRYKEKIGHLRWWKNGTAKLWVYVYSGVPVWKEA	48
		:   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :	
vau	49	KPTLEFCASDAHLSTSTEQHNIWATOACVPTDPSPNEYELKNVTGKENIWKN	98
	49	:   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :	
la1	49	TITLEFCASDAKAYDTEVHNWATHACVPTDPPNPQEYWLVNVTEFNMMWKN	98
		:   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :	
vau	99	YIVDOMHEDIIDLWDQSLKPCVQMTFLCVQMNCIDIKNSINTTNSPLNSN	148
	99	:   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :	
la1	99	DMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVSLKCTDGNATNTNSSNTNSS	148
		:   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :	
vau	149	NTK.....EVKQCDFNVTTLKDQERKKQALFYVTOLVKINATSNETHY	192
	149	:   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :	
la1	149	SGEMMMEKGGEIRNCSEWNTSIRGKVQKEYAFFYKLDDIIPID.NDTTSY	196
		:   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :	

FIGUR 3A

vau	193	RLINCNSTTIROACPKVSEFPIHYCAPAGCAJFKCNETGFNGTGLCKN	242
lai	197	TITSANTSITQACPKVSEFPIHYCAPAGEAIIKCNNKTFGTGPCTN	246
vau	243	VTVVVTCTHGIKPTVSTOLILNLGKGNITIUNGKNISDSGENILITLNTN	292
lai	247	VSTVQCTHGIRVVSTQLLLNGSLAAEEVVIRSANFTDNAKTIVOLNQS	296
vau	293	ITIAICERPNOTICKYMAZPHAWXSMALSMTKGDITRAZYNSATDWNKA	342
lai	297	VEINCTERPNNNTRKSIIRGRCRGAETIGCHENBROAHCNISRAKWNAT	346
vau	343	LKNITERYLEIVEYNQTDVTMKFGNHSGEDAEVVNFFNCHGEFFYCNIN	392
lai	347	LKQIASKLREQFGNNKTTI...FKQSSGGDPEIVTHSFNCGGEFFYCNST	393
vau	393	RLENHTECSCKKNMTNNKINCTHNISNNNSNGIOAI..PCLRROVVRDWMRG	440
lai	394	QLNSTWFL.....NSTWSTEGSNNTEGSDTITLPCRIKQFINMMHQEVG	436

FIGUR 3B

vau 441 SGLYAPPPIPGLNLYCRSNITGMILQLDTPWNRKTHPNSTTLPRGGDMKDIW 490  
 la1 437 KAMYAPPISGQIRCSSNITGLLTDGGNNNN..GSEIFRPGGGDMRDNW 484

gpl20 ← → gp41

vau 491 RTQLEFKYKVVRVKPFSVAPTKIARPPTGTRSHREKRAAGLAMLFGLLSA 540  
 la1 485 RSELYKYKVVKIEPLGVAPTIKAKRRVV...QREKRAVGIGALFLGFLGA 530

vau 541 AGSTMGAATALTVRTQHLIKGIYQQODNLRAIAQHQHLLRPSVNGIRQ 590  
 la1 531 AGSTMGARSMLTVQARQLSGIVQQNNLRAIAEQHQHLLQLTWNGIKQ 580

Immundominantes Epitop

vau 591 LRAHLIALEIEIYQDQLLNKGKRLICITSVKWNKTWGGDN.ESIWDE 639  
 la1 581 LOAHHLAVERHVLKQODDLIGCCEGCKLITCTAVPHNASWSNSKSLEQIWN 630

FIGUR 3c

vau 640 LTWOQWQQINNVSSFTIYERKQEAQEQQEKEELLEDEWASIIWNWLDI 689  
 :ii :ii :ii :ii :i  
 lai 651 MIHMEMOREINNNYTSLIKSLIEESQNQEQEKNENQEEQELLEDKWAISIWNWFNI 680

vau 690 TKWLUWYIKIAIIIIVGALLIGVRRVVMIVLNLUVKMIRGGYQPLSIQIPIOQQA 739  
 .i  
 lai 691 TNWLWYIKIFIMIVGGGLVGLRIVFAVLSIVNVRQGYSPLSFQTHLPTPR 730

vau 740 EVGTPGGCOPEDARRWTPLPOGFLLLYTDLRTIILWIIHLLSNLA 789  
 :: :i  
 lai 751 GPDRAPEGIEEGGERDRDRSIRLVNGSLALIWDLLRSICLFSYHRLROLL 780

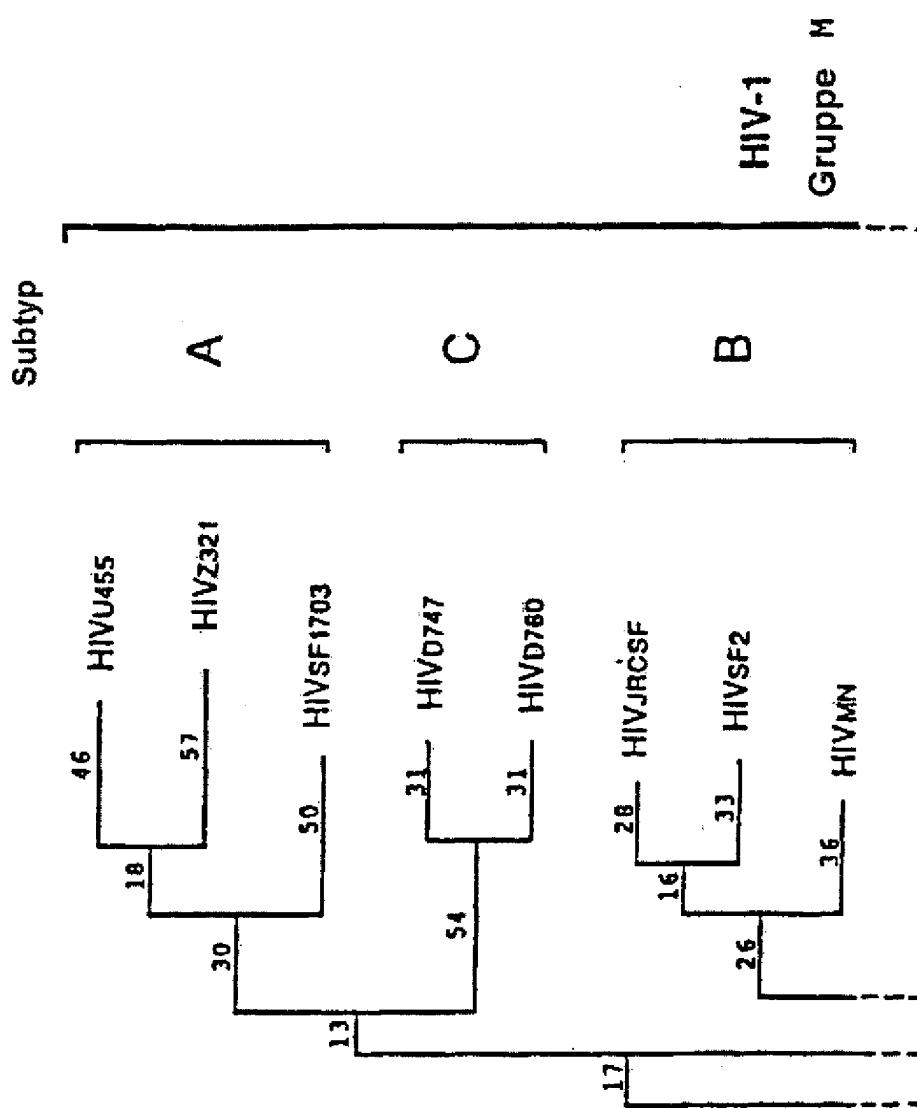
vau 790 SEIQKLIRHLGLHIGORTIEACRLFKAIIONWMOELQTSATNLLOTV 839  
 :i  
 lai 781 LIVTRIVE.....LGGRGWEALKYWWNLLQXWSQELKNSAVSLLNAT 823

vau 840 AVAVANWIDSTILGIOSIGRGILNIPRRIROGLERLLL 877  
 i :i  
 lai 854 AIAVAEGTDRVIEVVGACRAIAHIPRRIROGLERILL 861

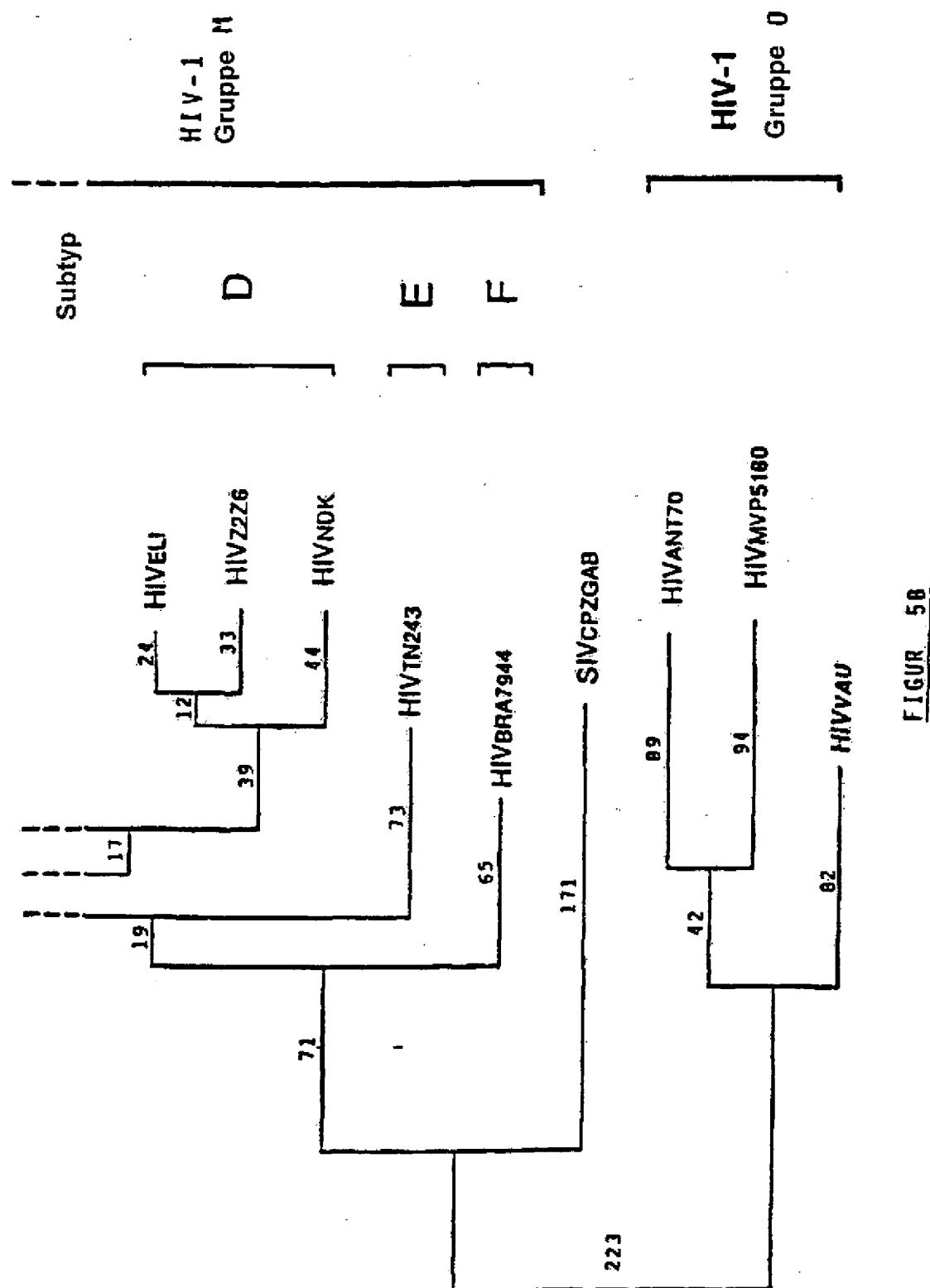
FIGUR 3D

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----
ant 70	-L--L-TL-QN----SL---K---V-
 HIV-2rod	 -VT-I-K--Q--AR-NS---AFRQV-
HIV-2D194	-VT-I-K-----AQ-NS---AFRQV-

FIGUR 4



FIGUR 5A



DNA-Sequenz 2631 b.p. ATGACAGGGT ... CGACTCCTGTT linear

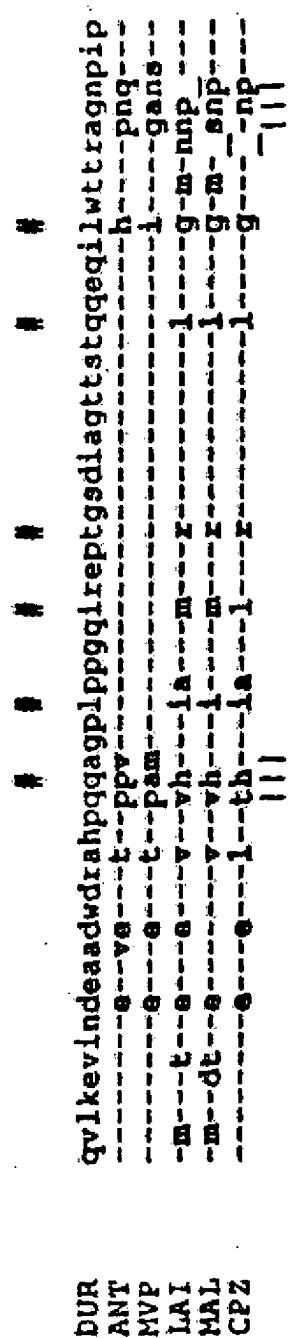
1	10		20		30		40		50		60		70		80		90		100
1	ATGACAGGGA TTATGAAAGC AATGGGAAG AGGAACAGGA AGITAGGGAT		CIGGTGCTTC ATITTGCTT TGATAATCCC ATGTTGAGC TGTAAACAC																
101	TATAATGCCAC AGTCTATCTT GGGTACCTG TATGGGAAGA TGCAAAACCA		ACATGTTCTI GTGCTTCAGA TGCTTAACCTG ACAAGCCTG AACGGCTAA																
201	TATTTGGCA ACACAGCTT CIGTTCGGCAG AGACCCCTAGT CCATATGGAT		ATGAGCTAA AATATGGACA GGTAAATTCA ATATATGGA AAATTATA																
301	GTAGACCAA TTGACCGAAA CATTATGAT TTGTTGGAC AGRTTAAA		ACITCTGCTT CAATAGCTT TCITGCTGT ACAATGAAAT TGICAGATA																
401	TCAAAATAG TATTTATCC ACACAGCTC CCTTAACCTC AAACAACTCA		AGAGGTTA ACAGTTGGA CTTTAACTG TAATAGTA																
501	ACAGGAAA AAACGGCTC TATTCATGT GACAGATTT GTTAACTTAA		AGCCACATC AATAGAACAA ATGTTAGAT TAATATGTA																
601	ACCATGGC AGGGCTGTC AAAGGTACTT TTGAGGCCA TTCCATACA		CTTATGCTT CCAGGGGAT GTGCCACTT TAATGTTAT GAACAGGAT																
701	TTAATGGAC AGGTCTGT AAACAGTTA CAGTAGTTAC TTGTTACAT		GGCACTAACG CAACAGTAAG TACCAACIA ATACTAAATG GGACACTCTC																
801	TAAGGAAAT AATACAAATCA TGGGAAGAA TATTTCAGAC AGTGGGAGA		ACATCTTAAT AACCTTAAT ACTAATATAA CAAIAGGATG TGAGAGACCA																
901	GGAAATCAGA CAATACAAA GATATGGCA GGTCAAAATG CTGGTACAG		CATGGCTT AGTAATCAAAGGTTAAGGATAA AGGGGATAC																
1001	ATAGTGGCAC TGACTGGAC ABRAGCTTA AAACACATAAC TGAAAGATAT		TTAGACTTC TAGAATATAA TCAAACTGAT																
1101	TCACAGCTGT GAAGATGGAG AAGTACAAA TTCTCTTTT AACTCTCATG		GNGAATCTT TTATTTAAC ACMAAUUUGGC TTGTATATCA TACCTTTCC																
1201	TGCAAGAGA ATATACCAA TAACAGCAA TAATGACTA ATATAGCAA		TAATAGCTAT GGCACTCAGG CAAATACCTG CAGGTGAGA CAAGTAGAA																
1301	GGGACTGGAT GAGGGAGGA TCGGGACCTT ATGGACCTC CATECCAGGA		ACCTAGAT GCAGGTAA CAATACCAA CATAGCTGA AATGGACAC																
1401	GCCATGGAT AAAACACATC CTAAACGGAC CACCCCTAGA CCAGGGGG		GGGATATGAA AGATATATGG AGMACTCAT ATGTTAAATA TAATGTTAGTA																
1501	AGAGTAAAC CTTTATGTT AGCACCACAA AAAATGCAAA GGCCAACTAT		AGGACTCTGA TCATATAGAG AGGAAAGGGC AGCAGGTGTC GCAATGCTT																
1601	TCTTGGGAT TCTAATGTCG GCAGGGAGCA CTATGGGGCG AGGGCAACAA		GGGGTGTACGG TACGGGACCA GGTCTGATAA GGTCTGATAA AGGGTATAG TGOAACAGCA																
1701	GGATTAACCTG CTAAAGCAA TCAAGGCCA GCAACACTG CTGAGGCCAT		CTGTATGGGG TATTAAGACAA CTGGGAGCTC AGCTCAGTAA AACTCTGCTAC AGTCTGATC AGAATAGACT																
1801	TTTATTCAGA ATCAGGACT CCTTACCTG TUGGGCTGCA AGAATAGACT		AACCTGAGCT CCFICATATA TGPMAAATAA CAAGGGCAC AAGAACACAA																
1901	AATCAATTTG GGATGAGTT ACATGGCAGG AGTGGGATCA ACAGATAAAC		AACGTAACTT GGTCTGAGTT AGGAAAGAT TGCTTGGAGTT AGGAACTATG GCAGTGTGTT TGACATAACT AATATGGTTG																
2001	GGAGAAAT GAGAAAGAT TGCTTGGAGTT AGGAACTATG GCCTCTNTT		GGTATATAA AATAGCTTA TETTCTAAG AGCATTAAGC AGGGATATCA ACCCCCTCTG TTACAGATA																
2101	ATCTATGAG TGGCACTAT AGCTCTAAGA GTAGTATAA TATGTTAA		GGTCTGAGGAGC AAGGAGAGGA GGTGGAGAGC AAGGAGGG CAGCTGGACT CCATGGCCG AAGGGTCTC																
2201	CCATCCAACA ACAGGGCAA GTAGGACCC CAGGAGAAC AGGAGAGGA		TCTTGGACAA CTIAGCTCA GAGATCCAGA AGTCTGATAG ACACCTGGGA																
2301	GCATCTGTG TACAGGGACC TCAGGCAAT ATCTCTGEG ATTACACC		TAAGCTATA ATACAAACT CCTACAAAGA ATGCTAACT AGTCTAACT AGTCTAACT																
2401	CTTGGACTAT GGATCTAGG GCAGAGGACA ATGGAAGCTT CGAGACTT		ATGCTAGGA TACCTAAAGA TACAGGAGGG ATTCCTAAACA TACCAAGAAG																
2501	ATCTACTAGA TACTCTGCA GTGGCACTG CAAATGGMC GACTCTGTT A		ATCTAGGA TACCTAAAGA TACAGGAGGG ATTCCTAAACA TACCAAGAAG																
2601	GATTAGACAG GGCTTGAAC GACTCTGTT A																		

FIGUR 6

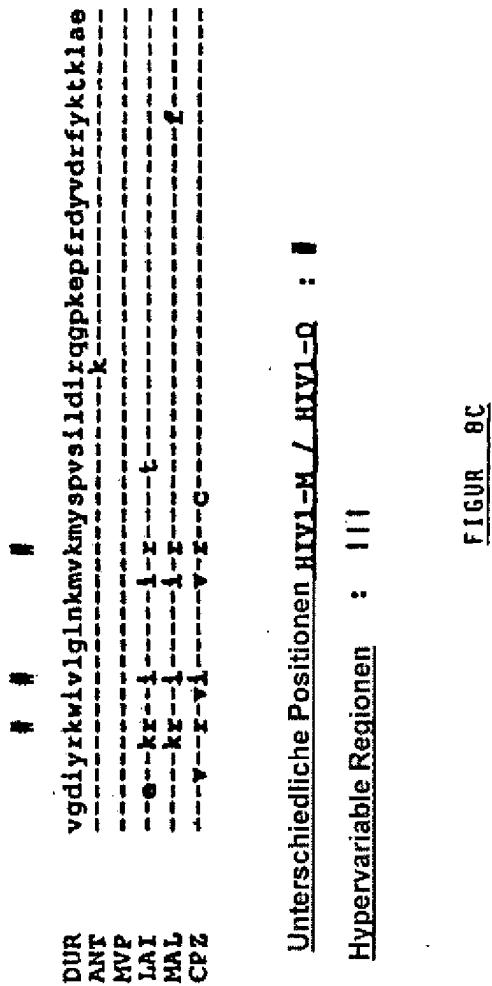
GAG-REGION

DUR qgqmvhqalsprtlnawvkaveekafnpeiipmalsegavpydinnumlnaighqgal  
ANT -----i-----  
MVP -----i-----t-----  
LAI -----i-----v-----s-----t-----t-----s-----  
MAL -----i-----v1-----s-----v-----t-----q-----l-----t-----t-----s-----n  
CPZ -----i-----v1-----s-----v-----s-----v-----t-----q-----l-----m-----l-----v-----s-----n

FIGUR 8A



FIGUR 8B



V3-SCHLEIFENREGION VON GP120

<pre> -----XK-----QRTG-----Q-LX-----THR-I-DI-----MAD----- GTRPNNNTRKSIRIQRGPGRAFVT _IGK_IGNM _RQAHQ -----NR-S-----H-----TKQ-I-DI ----- -----A-----YQ-----QRTP-----L-QSLY-----TR_SRSII_G----- -----G-----RGIHF -----QALY-----T-----V-DI -----R-Y- -----S-----Y-TRKNIRRYSI-S-QAFYV _T---I-DI _Q--- -----H-----G-----GE_VQI-----MTFYN _ENVV-DT _S-Y- </pre>	<pre> LAI OYI ELI MAL 455 CPZ  -----QI_DIQE_MRI -----H-WYSMG---GTA---S_S----X- -----I-EGIAEVQD-YT -----MRNRSM_TLIRSNNT_S-V-Y- -----E-G-QTIQK-MA -----M-WYSMALSNTK-DT_S-A-Y- -----V-G-SV-E-K -----M-WYSMQ-EREGKGANS-T-F- </pre>	<pre> ANT MVP VAU DUR  *****GP_H*W*SH*****SRAC </pre>
		<b>HIV-O Consensus</b>
		<b>DUR</b>

FIGUR 9A

IMMUNDOMINANTE REGION VON GP41

	[-----]	[-----]
MAD	-Y-----O-----H-----T-----S-----	
LAI	RILAVERYLKDQQQLIGIWCSCGKLICTAVPWNASHS	
OVI	-V-----	
ELI	------H-----N-----S-----	
MAL	-V-----Q---R---M-----H-----F-----S-----	
455	-V-----Q-----T-----S-----	
CPZ	-L-----Q---I---L-----AV-Y-T-----N---P	
ANT	-L--L-TL-QN----SL---K---Y-S-X--RT-I	
HVP	-LQ-L-TLQN--R-NL---K-----Y-S-K--RT-I	
VAU	-L--L-TFLQI--NL---KMR---Y-S-K--KT-G	
DUR	-L--L-TLMQN---NL---R-A--Y-S-Q--ET-G	
<b>HIV-0 Consensus</b>		
DUR	PLALETI <sup>*</sup> QNQQ*L*LMGC* <sup>***</sup> CYTSV*WN*TW*	
	[-----]	[-----]
		...

FIGUR 9B

<b>V3</b>	
HIV1-M Consensus	Negativ
HIV1-M MAL (afrikanisch)	Negativ
HIV1-M CIV-CPZ (Schimpanse)	Negativ
HIV1-O MVP5180	Negativ
HIV1-O ANT70	Positiv

<b>GP41</b>	
<b>HIV1-M Consensus :</b>	
- Klassischer Pasteur-Test	Negativ
- Erweiterung nach rechts, Innogenetics	Schwach positiv
<b>HIV1-O MVP5180 :</b>	
- Innogenetics	Negativ
- Erweiterung nach links, Behring	Positiv
<b>HIV1-O VAU</b>	Positiv

FIGUR 14

NUCLEOTIDVERGLEICHE

AUSGEDRÜCKT DURCH PROZENTUALEN UNTERSCHIED

GP41 (über 330 Basen)

LAI	0						
MAL	11	0					
CPZ	33	31	0				
MVP5180	39	38	38	0			
ANT70	36	39	37	15	0		
VAU	39	38	38	14	14	0	
DUR	38	36	37	13	15	11	0
	LAI	MAL	CPZ	MVP	ANT	VAU	DUR
				5180	70		

FIGUR 15A

## V3 (über 558 Basen)

LAI	0					
MAL	19	0				
CPZ	37	34	0			
MVP5180	46	43	45	0		
ANT70	45	44	43	23	0	
VAU	44	41	41	24	24	0
DUR	46	43	42	25	22	24
	LAI	MAL	CPZ	MVP	ANT	VAU
	5180	70				DUR

## gag (über 520 Basen)

LAI	0					
MAL	9	0				
CPZ	21	25	0			
MVPS180	24	26	25	0		
ANT70	25	25	24	10	0	
DUR	25	26	25	9	10	0
	LAI	MAL	CPZ	MVP	ANT	DUR
	5180	70				

FIGUR\_ 15B

**PROTEINVERGLEICHE**

AUSGEDRÜCKT DURCH PROZENTUALEN UNTERSCHIED

**GP41 (über 109 Aminosäuren)**

LAI	0						
MAL	17	0					
CPZ	33	28	0				
MVP5180	42	40	41	0			
ANT70	42	45	39	22	0		
VAU	44	47	45	19	21	0	
DUR	44	42	39	17	17	14	0
	LAI	MAL	CPZ	MVP	ANT	VAU	DUR
	5180	70					

FIGUR 16A

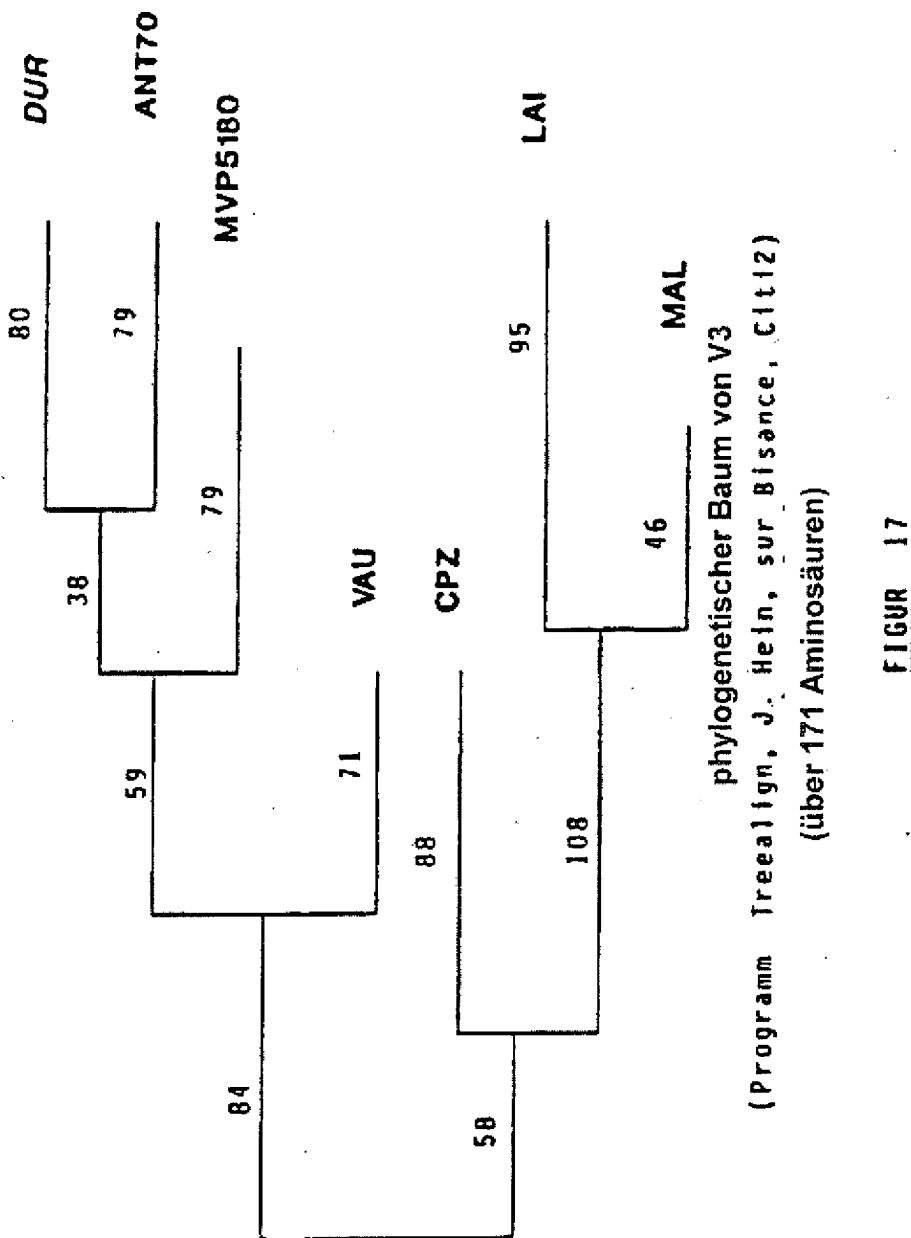
## V3 (über 186 Aminosäuren)

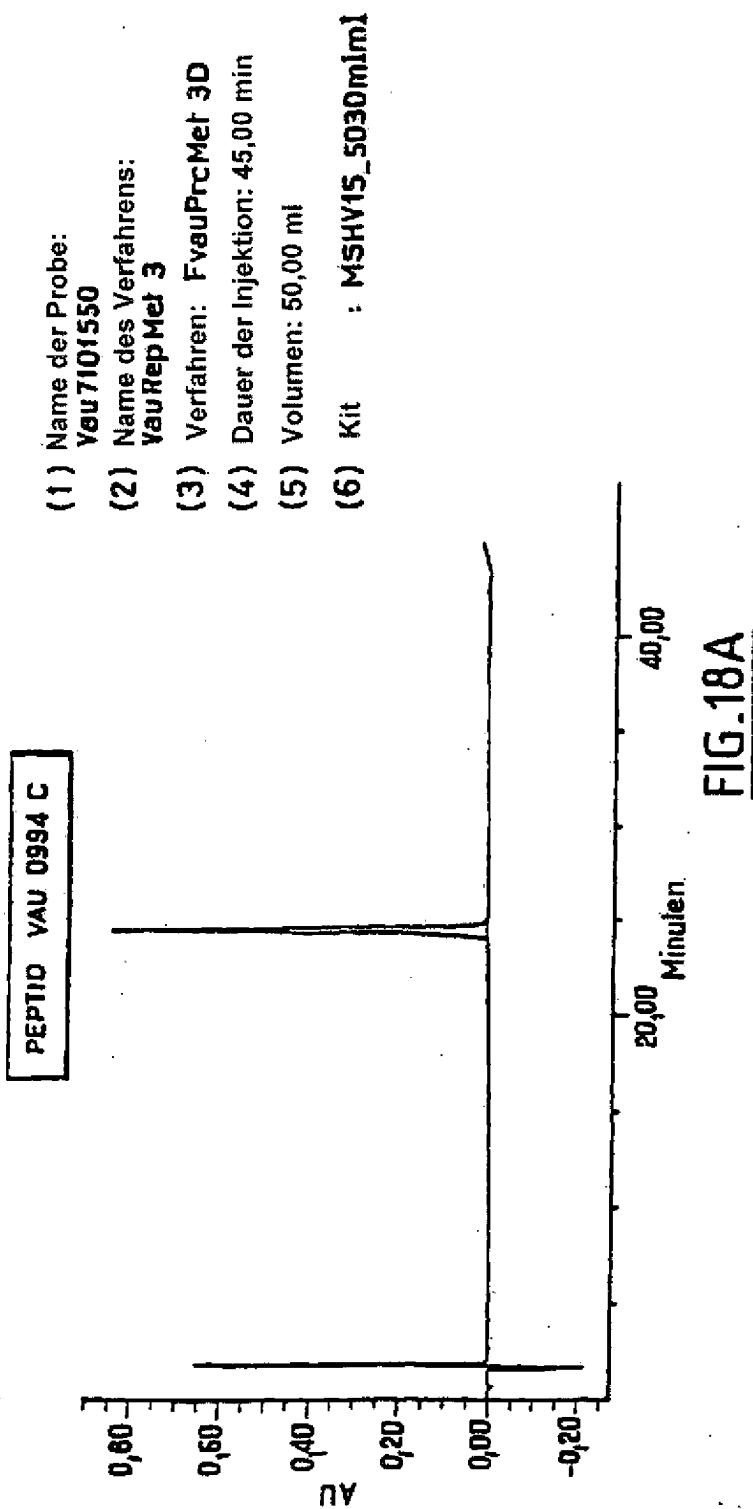
LAI	0						
MAL	31	0					
CPZ	46	39	0				
MVP5180	55	50	59	0			
ANT70	55	50	55	36	0		
VAU	55	51	55	39	36	0	
DUR	56	51	56	39	35	42	0
	LAI	MAL	CPZ	MVP	ANT	VAU	DUR
	5180	70					

## gag (über 174 Aminosäuren)

LAI	0						
MAL	6	0					
CPZ	11	14	0				
MVP5180	21	23	18	0			
ANT70	21	24	19	6	0		
DUR	22	22	19	7	9	0	
	LAI	MAL	CPZ	MVP	ANT	DUR	
	5180	70					

FIGUR 16B





**FIG. 18A**

Ergebnis Chromato

Retentionszeit (min)	Startzeit (min)	Endzeit (min)	%Ober- fläche	Int	Typ
24,482	23,898	24,932	100,00		BB

FIGUR 108

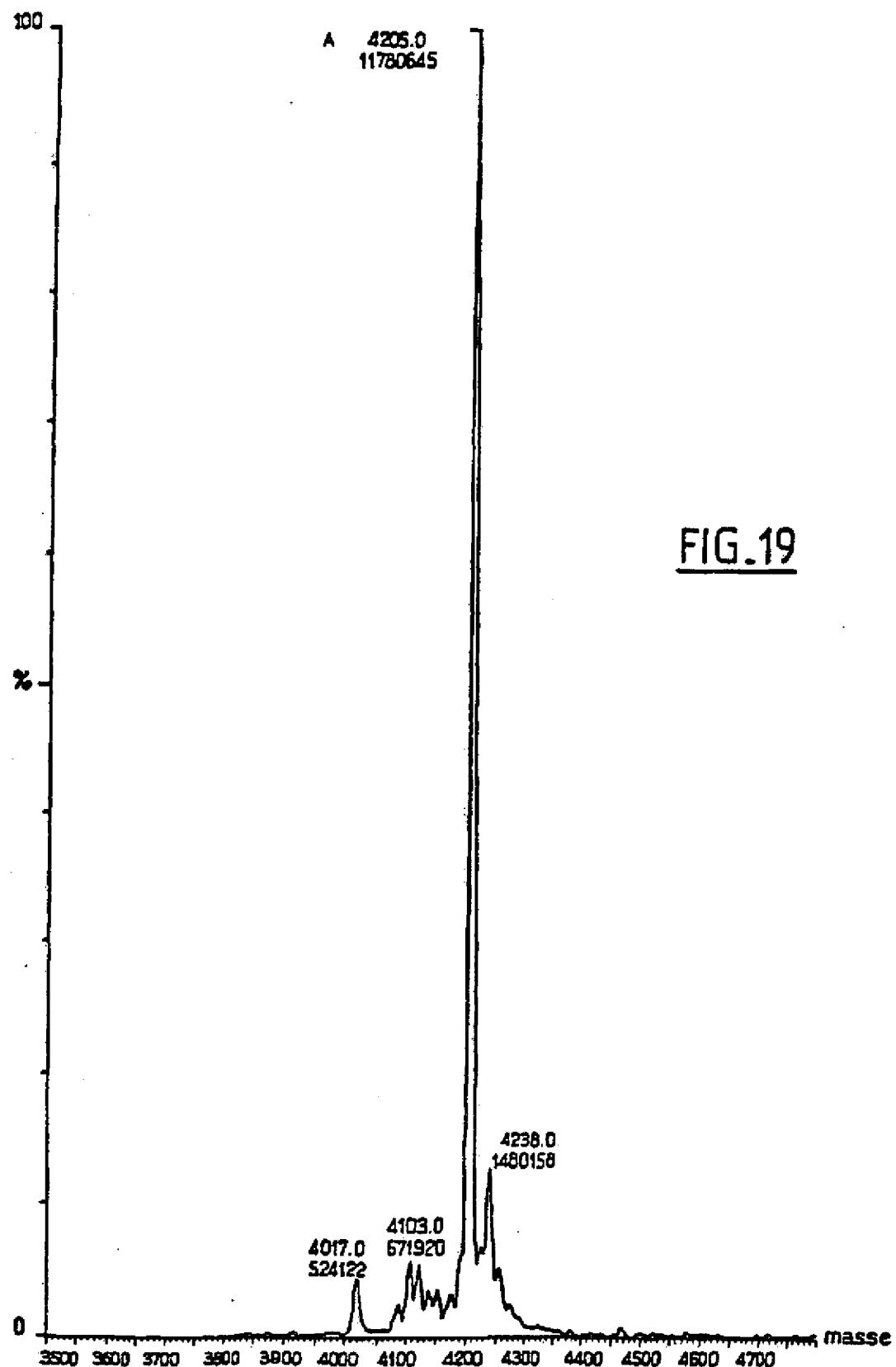


FIG.19

PEPTID VAU

REF : F V8u 0994 C 710

SEQUENZ : RLLAETFIQNQQ<sup>LLNLWGCKNR</sup>LIC<sup>YTSV</sup>KWNKT

LÄNGE : 35

MOLEKULARGEWICHT : 4210

ANALYTISCHE KONTROLLEN : > 95% durch HPLC und Massenspektrometrie

FIGUR 20

**STUDIE ZUR IMMUNREAKTIVITÄT DES PEPTIDS, DAS DAS  
IMMUNDOMINANTE EPITOPI DER GP160-VAU-SEQUENZ  
(SUBTYP O) NACHAHMT**

VS = 0,1	PEPTID VAU 2µg/ml
Seren HIV1: Panel BB/	
B01 N° 12	0,80
B01 N° 13	0,40
B01 N° 15	0,80
PRB91 K6	0,20
Seren HIV1 (Rumänien)	
Phase 3/4	
3989	9,50
5116	8,60
Seren HIV1 (Panel AFM)	
Subtyp O	
MAA	>30
10B	>30
HAM	>30
DUR	12,50
Serum HIV1 (Reims)	
Subtyp M?	
MAD	0,20

**FIGURE 21A**

Verdacht auf Subtyp O Pasteur-Zentrum Yaoundé	
950	0,60
3372	>30
3381	28,80
1507	28,70
3167	>30
2628	28,10
1060	0,60
4020	0,30
4783	0,30
5322	0,40
6661	0,50
5527	0,30
5863	25,00
5969	>30
5487	>30
5509	0,70
6782	>30
5453	27,30
3826	1,50
Seren HIV2	
BERT	0,30
PAOL	4,50
RIV	15,80

Vorschrift indirekter EIA-Test ; 3 X 30min Typ Genelavia Mixt

negative Seren	
N=48	
Mittelwert	0,022
DS	0,007
Mittelwert	
+12DS	0,107
VS	0,100

FIGUR 21B

## ZUSAMMENFASSUNG DER ERHALTENEN ERGEBNISSE BEI DEN AFRIKANISCHEN SEREN

	ERGEBNISSE WB1										
	GP 160	GP 120	P 68	P 55	GP 41	P 40	P 34	P 25	P 18		
3361	++	+-	+				++	+	+	POS	
1607	+	+-					+-	+-		POS	
2628	+-		++	++		+	+	++	++	POS	
3167	++	+	++	++	+	+	++	++	++	POS	
3372	++	+	+	++	+	+	++	++	+-	POS	
5453	++	+	+	+	+-	+	+	+	+	POS	
5863	++	+	+	+	+-	+-	+	+	+	POS	
5969	+-		+	+		+	+	+		IND	
6487	++		+	+			+	+-	+-	IND	
6782	++		+	+	+	+	+	+		POS	
950	+-		+-				+-	+-	+-	IND	
1060	+-							+-	+	IND	
5527										?	
6509	++		+-				+-			IND	
6661	+							+		IND	
4020=	+							(+-)		IND	
SEMT											
4783=	+-							+-	+-	IND	
5322											
3826								+-	+-	IND	
MAD	++	+	+	+	+	+	+	+	+	POS	
DUR											
MAA											
LOB	+		++	+-			++	++		IND	
HAM			+				+	+		IND	

=Verhält.<1
=Verhält.>2

FIGUR\_22A

	DURCHMUSTERUNGSTESTS (Verhältnis: DO/VS)				
	Cloniert Ind HIV1+2	GEM Ind HIV1+2	Abbott sdw HIV1+2	Murex sdw HIV1+2	Murex comp HIV1
3361	0,10	18,00	0,56	0,72	1,40
1507	0,97	14,25	3,03	5,35	0,98
2628	0,70	18,00	4,84	1,71	1,34
3167	0,38	18,30	11,89	>6	0,88
3372	0,19	16,80	11,63	3,76	0,47
5453	2,50	>20			1,70
5863	2,30	>20			1,90
5969	2,30	15,20			2,25
6487	0,32	19,70			1,90
6782	0,07	13,40			2,95
950	1,20	6,00	5,76	>6	0,68
1060	0,60	18,00	0,46	1,25	0,67
5527	0,27	2,40			0,52
6509	0,32	>16			2,14
6661	8,10	10,10			1,54
4020=	0,23	6,30	1,03	4,88	4,12
SEMT					
4783=	0,19	8,10	0,41		0,55
5322		10,90			0,52
3826		3,93		1,64	0,72
MAD	-	+	+		
DUR		>8	2,00	0,80	
MAA					
LOB		>19	2,00	2,70	1,50
HAM		>19	1,80	7,80	2,70

FIGUR 22B

	EIA PEPTIDE							
	Clonatec rap HIV1	39D6 HIV1B	FER HIV1B	39A HIV1B	VAU HIV1O	MVPP 5180 HIV1O	BNR 19 HIV1O	PEPTI- LAV1-2
3361	+				28,8	25,80	NT	
1607	Zweifelhaft			8,4	28,7	28,80	1,7	
2628				3,6	28,1	19,30	1,2	
3167	+			>30	>30	>30	1,6	
3372	+-			2,8	>30	24,00	4,9	
5453	-	4,36	1,37	3,6	27,3		1,6	-
6863	-	1,42	0,40	1,4	25		0,5	-
5969	-	0,94	1,90	19,4	>30		0,6	+
6487	+	25,75	5,76	>30	>30		0,7	
6782	-	0,64	0,49	0,8	>30		10,3	-
950					0,6		0,4	
1060	Zweifelhaft			1,9	0,6	0,40	0,6	
5527	-			4,6	0,3		0,2	+/-
6509	+			16,9	0,7		0,2	
6661	+			2,8	0,5		0,4	
4020=	7Ag-			1,15	0,3		0,5	
SEMT				1,2	0,7		0,9	
4783=				2,5	0,3		0,3	
5322				4	0,4		0,3	
3826				1,6	1,5		0,7	
MAD		0,66	2,72	26,7	0,2		>30	-
DUR		>30	>30	>30	12,5		0,2	
MAA				NT	>30		NT	
LOB		1,02	5,62	12,5	>30		>30	
HAM		0,73	0,41	13,3	>30		0,7	

FIGUR\_22C