

ROYAUME DE BELGIQUE

BREVET D'INVENTION



MINISTRE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1000811A4

NUMERO DE DEPOT : 8700922 C12Q C12N C12P G01N

Classif. Internat.: A61K C07K C07H C12R

Date de délivrance : 11 Avril 1989

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la Convention de Paris du 20 Mars 1883 pour la Protection de la propriété industrielle;

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d' invention, notamment l' article 22;

Vu l' arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d' invention, notamment l' article 28;

Vu le procès verbal dressé le 19 Aout 1987 à 14h15
à l' Office de la Propriété Industrielle

ARRETE :

ARTICLE 1.- Il est délivré à : GENETIC SYSTEMS CORPORATION
First Avenue 3005, SEATTLE WASHINGTON 98121(ETATS-UNIS D'AMERIQUE)

représenté(e)(s) par : PLUCKER Guy, OFFICE KIRKPATRICK, Square de Meeûs, 4
- 1040 BRUXELLES.

un brevet d' invention d' une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : ANTICORPS MONOCLONAUX, PEPTIDES ET COMPOSITIONS LES CONTENANT, DESTINEES AU DIAGNOSTIC ET AU TRAITEMENT DES INFECTIONS PAR LE VIRUS HIV.

Priorité(s) 20.08.86 US USA 898273 01.05.87 US USA 045026 29.06.87 US USA 067996

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l' invention, sans garantie du mérite de l' invention ou de l' exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeur(s).

Bruxelles, le 11 Avril 1989
PAR DELEGATION SPECIALE :


WUYTS L.
Directeur.

Anticorps monoclonaux, peptides et compositions les contenant,
destinées au diagnostic et au traitement des infections par le
virus HIV

La présente invention se rapporte d'une manière
générale au diagnostic, au traitement et à la prévention des
infections virales.

Elle concerne plus particulièrement des compositions
5 et des procédés pour la production d'anticorps monoclonaux
ainsi que des peptides utiles dans le diagnostic, la neutrali-
sation et la vaccination contre les infections par virus
d'immunodéficience humaine HIV (Human Immunodeficiency Virus).

L'agent d'infection responsable du syndrome d'immuno-
10 déficience acquis (SIDA) et ses phases prodromiques, le
complexe correspondant au SIDA ARC ("AIDS-related complex"),
et le syndrome de lymphadénopathie (LAS), est un nouveau rétro-
virus lymphotrophique. Le virus a été diversement appelé LAV,
HTLV-III, ARV, et plus récemment HIV.

15 Etant donné que le virus HIV atteint des proportions
pandémiques, le traitement des individus infectés et la préven-
tion de la transmission à des individus exposés et non infectés
est d'un intérêt fondamental. Diverses stratégies thérapeutiques
ont visé différentes étapes dans le cycle de vie du virus et
20 sont soulignées par Mitsuya et Broder, 1987, Nature 325:773.
Une approche consiste à utiliser des anticorps qui se lient au
virus et inhibent la réplication virale, soit en interférant
avec l'entrée du virus dans des cellules hôtes, soit par
d'autres mécanismes. Une fois que le ou les constituants du
25 virus susceptibles ou sensibles à l'intervention de l'anticorps
sont identifiés, on peut espérer que des titres d'anticorps
suffisants pour neutraliser le pouvoir infectieux du virus
puissent être engendrés par vaccination ou, alternativement,

par l'administration passive d'immunoglobulines ou d'anticorps monoclonaux de spécificité désirée.

On pense que les glycoprotéines formant l'enveloppe de la plupart des rétrovirus réagissent avec des molécules récep-
trices sur la surface des cellules susceptibles, ce qui permet
la détermination du pouvoir infectieux du virus pour certains
hôtes. Des anticorps qui se lient aux glycoprotéines peuvent
bloquer l'interaction du virus avec les récepteurs cellulaires,
en neutralisant le pouvoir d'infection du virus. Voir d'une
manière générale, The Molecular Biology of Tumor Viruses, 534
(J. Tooze, éd., 1973) et RNA Tumor Viruses, 226, 236 (R. Weiss
et autres, eds., 1982) ces deux documents étant cités ici
dans leur totalité à titre de référence. Voir également,
Gonzalez-Scarano et autres, 1982, Virology 120:42 (La Crosse
Virus); Matsuno et Inouye, 1983, Infect. Immun. 39:155
(Neonatal Calf Diarrhea Virus); et Mathews et autres, 1982,
J. Immunol. , 129:2763 (Encephalomyelitis Virus).

La structure générale d'un virus HIV est celle d'un
noyau de ribonucléoprotéine entouré par une enveloppe conte-
nant des lipides que le virus acquiert au cours d'un bour-
geonnement à partir de la membrane de la cellule hôte infec-
tée. Logées à l'intérieur de l'enveloppe et faisant saillie
de celle-ci, on trouve les glycoprotéines codées du virus.
Les glycoprotéines de l'enveloppe du HIV sont initialement
synthétisées dans la cellule infectée sous la forme d'une
molécule précurseur de 150.000-160.000 daltons (gp150 ou
gp160), qui est ensuite traitée dans la cellule pour former
un fragment N-terminal de 110.000-120.000 daltons (gp110 ou
gp120) afin d'engendrer la glycoprotéine externe, et un
fragment C-terminal de 41.000-46.000 daltons (gp 41), qui
représente la glycoprotéine d'enveloppe transmembranaire.

Pour les raisons données ci-dessus, la glycoprotéine
gp110 du virus HIV a été l'objet de recherche importantes en
tant que cible potentielle pour interrompre le cycle de vie
du virus. On a montré que des sérums d'individus infectés

par HIV neutralisaient HIV in vitro , et que des anticorps qui se lient à gp110 purifié sont présents dans les sérums. Voir Robert-Guroff et autres, 1985, Nature 316:72; Weiss et autres, 1985, Nature 316:69; et Mathews et autres, 1986, 5 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83:9709. La molécule gp110 recombinante et purifiée peut stimuler la production des anticorps de sérum neutralisant lorsqu'on l'utilise pour immuniser des animaux, voir Robey et autres, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83:7023; Lasky et autres, 1986, Science 10 233:209; et pour immuniser un être humain, voir Zagury et autres, 1986, Nature 326:249. La liaison de la molécule gp110 au récepteur (T4) CD4 a également été décrite , et des anticorps monoclonaux qui reconnaissent certains épitopes du récepteur CD4 ont été décrits comme bloquant la liaison HIV, 15 la formation syncytiale et le pouvoir infectieux. Voir McDougal et autres, 1986, Science 231:382. Putney et autres (1986, Science 234:1392) ont découvert des anticorps de sérums neutralisants chez des animaux après immunisation avec une protéine de fusion recombinante contenant la moitié du 20 carboxyle-terminal de la molécule gp110 et ont en outre démontré que la glycosylation de la protéine d'enveloppe n'est pas nécessaire pour une réponse d'anticorps neutralisante.

Un vaccin en sous-unité pour le SIDA utilisant la molécule gp110 de HIV ou des parties de celle-ci peut ainsi 25 être désirable. Des vaccins formant sous-unités constituent une alternative à des vaccins préparés à partir de virus atténués ou inactivés. Les vaccins inactivés sont préoccupants étant donné le défaut possible qu'ils présentent pour tuer toutes les particules virales, et les vaccins atténués peuvent 30 posséder un pouvoir de mutation et retrouver leur capacité à provoquer la maladie. Avec des vaccins de sous-unités, seulement les parties du virus qui contiennent les antigènes ou les épitopes qui sont capables de faire apparaître des réponses immunitaires, c'est-à-dire des anticorps neutralisants, 35 ADCC, et une réponse de cellule T cytotoxique, sont utilisées

pour immuniser l'hôte. Un avantage majeur des vaccins de sous-unités est que le matériau viral non intéressant est exclus

Des sous-unités virales utilisables dans un vaccin
5 peuvent être produites par plusieurs procédés. A titre d'exemple, la glycoprotéine d'enveloppe peut être exprimée et purifiée à partir d'un hôte bactérien, bien que cette molécule puisse être déficiente au niveau de la plupart des modifications post-translationnelles (telle que la glycosylation), ou
10 à partir d'autres procédés. Une telle modification peut être obtenue en utilisant un système d'expression eucaryotique, tel que la levure ou des cellules de mammifère cultivées. Des gènes de virus ont été introduits dans des cellules de mammifère en utilisant le virus des vaccins comme vecteur.
15 Voir par exemple Mackett M. et autres, 1982, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79:741b; Panicali, D. et Paoletti, E., 1982, Proc. Nat. Acad. Sci USA 79:4927. Un virus de vaccin recombinant peut être construit suivant la méthode de Hu et autres, Nature 320:537 (1986) ou Chakrabarti et autres, Nature 320:535
20 (1986), ces deux documents étant donnés ici à titre de référence. Dans ces systèmes, les glycoprotéines virales produites par des cellules infectées avec des vaccins recombinants sont glycosylées d'une manière appropriée et peuvent être transportées jusqu'à la surface de la cellule pour extrusion et
25 isolation ultime.

Une importante phase dans la production d'un vaccin de sous-unité est la purification adéquate de la glycoprotéine désirée à partir du mélange complexe du système d'expression. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour accomplir la
30 purification. Celles-ci comprennent , mais ne sont pas limitées à, l'électrophorèse sur gel polyacrylamide préparative, la chromatographie de perméation sur gel et diverses méthodes de chromatographie (c'est-à-dire échange d'ions, phase inverse, immunoaffinité, interaction hydrophobe), ainsi que d'autres
35 méthodes. La plupart de ces méthodes sont utilisées suivant

diverses combinaisons pour réaliser des préparations sensiblement pures (Kleid , D.G., et autres, 1981, Science 214:1125; Cabradilla, C.D. et autres, 1986, Biotechnology 4:128, Dowbenko, D.J., 1985, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:7748),
5 ces articles étant donnés ici à titre de référence.

Des méthodes qui réduisent le nombre de phases requises pour réaliser la purification maximum d'un antigène viral particulier à partir d'un mélange d'expression complexe, sont nécessaires pour fabriquer des vaccins de sous-unités. La
10 séparation efficace des antigènes des composants étrangers pourrait être réalisée en utilisant une chromatographie d'immunoaffinité. Cette technique, également connue sous l'appellation immuno-adsorption, consiste dans son principe à adsorber sélectivement un antigène sur un support solide
15 sur lequel un anticorps spécifique a été fixé de façon covalente. L'antigène adsorbé sélectivement est ensuite élué à partir d'un tel adsorbant à affinité d'anticorps, en changeant par exemple le pH et/ou la force ionique du tampon.

Des anticorps polyclonaux, obtenus à partir d'animaux
20 immunisés avec l'antigène désiré ou à partir d'individus naturellement infectés ou contaminés (voir par exemple Lasky et autres, supra), ont été utilisés fréquemment comme immuno-adsorbants, mais, en général, ces réactifs présentent des inconvénients substantiels , tels que (i) les anticorps liés
25 au support insoluble ne sont pas tous spécifiques pour la molécule d'intérêt, ce qui nécessite une purification supplémentaire; (ii) les rendements de l'antigène désiré sont fréquemment faibles ; et (iii) les affinités pour l'anticorps varient souvent d'une préparation à l'autre, ce qui exige
30 des modifications dans les processus d'éluion. L'utilisation des anticorps monoclonaux spécifiques pour l'antigène viral désiré et destinés à être utilisés dans la préparation de vaccin de sous-unités, plutôt que d'anticorps polyclonaux, devrait contourner ces difficultés.

35 Des anticorps monoclonaux murins qui se lient aux

antigènes HIV ont été décrits. Plusieurs groupes de chercheurs ont décrit des anticorps monoclonaux spécifiques pour la protéine de noyau p25 (voir par exemple di Marzo Veronese et autres, 1985, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:5199 et
5 Chassagne, J., et autres, 1986, J. Immunol. 136:1442). Des anticorps monoclonaux spécifiques pour la glycoprotéine de membrane gp41 ont également été décrits (voir par exemple di Marzo Veronese et autres, 1985, Science 229:1402).

Il demeure qu'il y a une nécessité dans la technique
10 concernée pour des anticorps monoclonaux spécifiques pour des épitopes dans des régions bien définies de la glycoprotéine d'enveloppe importante, gp110. Des anticorps monoclonaux qui se lient à ces régions et provoquent une réduction ou une élimination de la réplication et de la trans-
15 missibilité du virus HIV présenteraient une utilité prophylactique et thérapeutique substantielle. Par ailleurs, les anticorps monoclonaux pourraient également être utilisés pour purifier la région désirée de gp110 à partir de virus rompus ou brisés, ou de systèmes d'expression recombinants
20 pour une utilisation dans les vaccins, par exemple. En outre, la région contenant l'épitope ou les épitopes reconnus par les anticorps monoclonaux pourrait être chimiquement synthétisée, ce qui permet d'éviter les difficultés inhérentes à la purification et l'administration des fragments plus gros
25 de la molécule gp110. La présente invention répond aux besoins ci-dessus ainsi qu'à d'autres.

La présente invention propose des peptides capables d'imiter ou de mimer immunologiquement des épitopes neutralisants de protéines HIV, des sondes d'acide nucléique codant
30 de tels peptides et des anticorps monoclonaux réagissant avec de tels peptides, aussi bien que d'autres peptides interférant avec le pouvoir infectieux de HIV. Ces nouveaux matériaux trouvent une utilité par exemple dans les essais de diagnostic pour la détection des infections par HIV et dans les actions
35 thérapeutiques pour le traitement de ou la vaccination contre

de telles infections.

La présente invention a pour objet des nouvelles compositions et des nouveaux procédés pour neutraliser les infections par HIV, c'est-à-dire pour la prévention ou
5 l'inhibition substantielle de la formation ou de la transmission cellulaire des infections HIV chez un hôte. Plus particulièrement, des peptides imitant une région neutralisante du HIV et des anticorps monoclonaux réagissant avec une telle région sont utilisés pour diagnostiquer, traiter et
10 vacciner contre les infections HIV. A cet égard, l'expression "région neutralisante" indique les parties de HIV, particulièrement les protéines HIV, contenant des segments d'acides aminés définissant un ou plusieurs épitopes réagissant avec
15 avec d'autres anticorps de la présente invention, sont capables de neutraliser les infections par HIV. Des tests convenables pour la neutralisation sont bien connus et peuvent comprendre la réduction des infections par HIV dans les lignées de cellules T, la réduction d'unités formant des plaques de
20 pseudotypes VSV (HIV) portant les glycoprotéines d'enveloppe de HIV, les essais d'inhibition syncytiale, et les essais de liaison récepteur virion. Si on le désire, l'activité neutralisante peut être comparée à la réactivité d'anticorps dans les tests immunochimiques tels que l'essai d'immuno-
25 fluorescence, d'immunoblot et de radioimmunoprécipitation.

Suivant un aspect de l'invention, les nouveaux peptides, qui d'une manière typique possèdent moins d'environ 50 acides aminés, contiennent cinq ou plus d'acides aminés contigus formant des épitopes sensiblement similaires aux épitopes situés sur les
30 régions neutralisantes de gp110 ou p25 de HIV, codées par les régions env et gag respectivement, du génome HIV. Les régions qui sont d'un intérêt particulier sont celles qui s'étendent depuis environ 301 résidus d'acides aminés jusqu'à environ 336 de gp110, et depuis environ 278 jusqu'à environ
35 319 et depuis environ 315 jusqu'à environ 363 de p25, tous

provenant de la souche HIV désignée LAV_{BRU}. Les désignations de résidus d'acides aminés proviennent de la Banque de Données de Los Alamos (Base de données de séquence virus SIDA, Los Alamos National Laboratory, Theoretical Division, Los Alamos, NM 87545).

Les familiers de la technique apprécieront que des régions analogues supplémentaires ("homologues") à partir d'autres isolats HIV peuvent être identifiées sur la base de leur situation à l'intérieur des protéines correspondantes à partir d'isolats divers. En pratique, de tels homologues peuvent être identifiés par référence aux données de séquence LAV_{BRU}, comme suit :

(a) Les séquences d'acides aminés d'isolats HIV et de LAV_{BRU} peuvent être alignées pour obtenir une homologie maximum entre les deux séquences;

(b) Des peptides comprenant des séquences d'acides aminés d'isolats HIV correspondant au site des peptides de LAV_{BRU} qui imitent immunologiquement les protéines LAV_{BRU} peuvent être identifiés. Les peptides comprenant des séquences d'acides aminés d'isolats HIV ainsi identifiés imitent ou miment immunologiquement, et ce d'une manière typique, les protéines correspondantes d'isolat HIV.

Cette méthode peut être appliquée aux souches HIV qui sont encore à découvrir. Par exemple, lorsque des nouvelles souches de HIV sont identifiées, leurs séquences d'acides aminés de noyau et d'enveloppe peuvent être alignées avec celle de LAV_{BRU} pour obtenir une homologie maximum. Les méthodes grâce auxquelles les séquences sont alignées, sont connues de ceux qui sont familiers de la technique. En alignant les séquences, il est désirable de maintenir autant d'homologie que possible entre les résidus de cystéine. La séquence d'acides aminés de la nouvelle espèce ou souche HIV, qui correspond à la situation ou au site des peptides spécifiquement décrits présentement, peut être synthétisée et utilisée suivant la présente invention.

Une autre méthode pour déterminer les séquences d'une région homologue dans d'autres souches HIV est décrite par Scharf et autres, Science (1986) 233:1076. Elle utilise deux amorces d'oligonucléotides qui se lient à des séquences conservées à l'extérieur de la région de séquence d'intérêt, et contiennent différents sites restrictifs dans chaque amorce. De l'ADN à partir de souches HIV peut alors être amplifié in vitro par la suite, et les oligonucléotides résultants peuvent être clonés en vecteurs pour une analyse de séquence, et incorporés dans un vaccin sous la forme d'une cassette représentant un épitope particulier de la souche HIV.

Il n'est pas nécessaire pour la présente invention que les épitopes contenus à l'intérieur de telles séquences soient réactifs par réaction croisée avec des anticorps pour toutes les souches ou espèces de HIV. Les peptides englobant des épitopes immunologiques qui distinguent une espèce ou un séro groupe d'un autre, trouvent une utilité dans l'identification des espèces ou sérogroupe particuliers, et peuvent en fait aider à l'identification des individus infectés par une ou plusieurs espèces ou sérogroupe de HIV. Ils peuvent également être utiles en combinaison avec d'autres peptides à partir de soit une région homologue ou une autre région neutralisante, dans des compositions thérapeutiques.

Les peptides d'intérêt proviennent très préférablement de la région g110 du virus. Les peptides présentant un intérêt particulier dans cette région sont les peptides codés dans le cadre de lecture ouvert env s'étendant depuis environ la paire de base (bp) 6667 jusqu'à environ 6774 de l'isolat LAV_{BRU}. Ainsi, diverses régions homologues d'autres isolats HIV comprennent les séquences homologues obtenues à partir de la Banque de Données de Los Alamos (sauf LAV2), comme énoncé dans le Tableau I.

TABLEAU 1.

	HXB2	TGTACAAGACCCAACAACAATACAAGAAAAAGA.....ATCCGTATU	
		CysThrArgProAsnAsnAsnThrArgLysArg.....IleArgIle	309
	BH102	-----Ser-----	309
5	BH8	-----Lys-----	309
	HXB3	-----Lys-----	309
	H9M	-----Ser-----	314
	BRU	-----Ser-----	314
	MAL	-----Gly-----ArgGly-----HisPhe	310
	ELI	---Ala---TyrGln---Gln---ThrPro---	312
	ARV2	-----Ser-----Tyr---	306
	WMJ2	-----Tyr---Val---ArgSer-----LeuSer---	322
10	RFENV	-----Ser-----ThrLys	311
	Z6	-----TyrLys-----GlnSer-----ThrPro---	306
	Z3	-----GlySerAspLysLysIle-----GlnSer---	304
	NY5	-----Lys---Gly-----Ala---	320
	CDC42	-----His-----ValThrLeu.....	302
	LAV2	-----Gly---Lys---Val---Gln-----MetLeu	
15	HXB2	CAGAGA.....GGACCAGGGAGAGCATTGTTACAATAGGAAAAATAGGAAATATG	326
		GlnArg.....GlyProGlyArgAlaPheValThrIleGlyLysIleGlyAsnMet	326
	BH102	-----	326
	BH8	-----	326
	HXB3	-----	326
	H9M	-----	331
	BRU	-----	329
	MALGln---LeuTyr---Thr---IleVal---AspIle	323
20	ELI	GlyLeu-----GlnSerLeuTyrThr---Arg---IleValSerArgSer	327
	ARV2His---Thr---Arg---IleGlyAsp	320
	WMJ2Arg---ArgGlu...---IleGlyIle	337
	RFENVValIleTyrAlaThr---Gln---IleGlyAsp	327
	Z6	GlyLeu-----GlnAlaLeuTyrThr---Arg---ArgThrLysIleIle	319
	Z3	ArgIle-----LysVal---TyrAlaLys---Gly.....	320
	NY5	GlyPro-----ThrLeuTyrAlaArgGlu-----AspIle	335
25	CDC42ValTrpTyr---Thr---Glu---LeuGlyAsn	323
	LAV2	MetSer-----HisVal---HisSerHisTyrGlnProIle---Lys	
30	HXB2	...AGA...CAAGCACATTGT	331
		...Arg...GlnAlaHisCys	331
	BH102	-----	331
	BH8	-----	331
	HXB3	-----	331
	H9M	-----	336
	BRU	-----Arg---Tyr---	334
	MAL	-----	330
	ELI	IleIleGly-----	333
	ARV2	Ile---Lys...-----	326
	WMJ2	Ile-----	343
	RFENV	Ile---Lys...-----	334
35	Z6	Gly...-----	326
	Z3	IleThrGly-----	325
	NY5	-----	341
	CDC42	Ile-----	330
	LAV2	ArgProArg-----Met---	

D'autres peptides convenables pour engendrer ou obtenir par "screening" des anticorps monoclonaux, comprennent ceux codés dans le cadre de lecture ouvert env depuis environ bp 7246 jusqu'à environ 7317 de LAV_{BRU}. De tels anticorps et peptides réactifs sont particulièrement utiles dans les tests d'immunisation.

Dans la région gag de l'isolat LAV_{BRU}, les séquences d'acides aminés p25 depuis environ 278 jusqu'à 319 et depuis 315 jusqu'à 363 sont des régions neutralisantes supplémentaires de HIV. Ceux qui sont familiers de cette technique pourront comprendre que des régions de neutralisation supplémentaires de HIV peuvent être identifiées en se basant sur les enseignements donnés ici; en particulier, des combinaisons d'anticorps monoclonaux réagissant avec divers épitopes HIV différents présentent une activité de neutralisation.

Le peptide I, également appelé peptide 29 est codé dans le cadre de lecture ouvert env depuis un nombre de résidus d'acides aminés d'environ 308 jusqu'à environ 328, et présentera la séquence suivante d'acides aminés, où les oligopeptides inclus dans la séquence suivante comprendront des épitopes linéaires à l'intérieur d'une telle séquence :

I (29)

Y-Thr-Arg-Lys-Ser-Ile-Arg-Ile-Gln-Arg-Gly-
 Pro-Gly-Arg-Ala-Phe-Val-Thr-Ile-Gly-Lys-
 Ile-Y'

dans laquelle Y et Y' , s'ils sont présents, représentent chacun des séquences jusqu'à environ vingt acides aminés. Lorsqu'Y et/ou Y' sont présents, ils peuvent comprendre, par exemple, un ou plusieurs acides aminés à partir de séquences qui sont disposées à côté des résidus d'acides aminés 308 à 328 de la séquence d'enveloppe HIV ou de n'importe quelle partie de ces séquences latérales ou disposées à côté. A titre d'exemple non limitatif, Y peut comprendre toute ou des parties de la séquence d'acides aminés d'enveloppe LAV_{BRU}

depuis environ un nombre de résidus 301 à 307; et Y' peut comprendre toute ou des parties de la séquence d'acides aminés d'enveloppe LAV_{BRU} depuis un nombre de résidus d'environ 329 à 336 comme suit :

5 II (29a)

Cys-Thr-Arg-Pro-Asn-Asn-Asn-Thr-Arg-Lys-Ser-Ile-Arg-Ile-Gln-Arg-Gly-Pro-Gly-Arg-Ala-Phe-Val-Thr-Ile-Gly-Lys-Ile-Gly-Asn-Met-Arg-Gln-Ala-His-Cys.

10 Alternativement, des séquences tronquées de peptides selon la présente invention peuvent être préparées. A cet égard, les séquences suivantes du peptide 29 peuvent être particulièrement utiles :

III (29b)

15 Y-Thr-Arg-Lys-Ser-Ile-Arg-Ile-Gln-Arg-Gly-Pro-Gly-Y'

dans laquelle Y et/ou Y', s'ils sont présents, représentent chacun des séquences de jusqu'à environ vingt résidus d'acides aminés.

IV (29c)

20 Y-Ile-Gln-Arg-Gly-Pro-Gly-Arg-Ala-Phe-Val-Thr-Ile-Gly-Lys-Ile-Y'

dans laquelle Y et Y', s'ils sont présents, représentent chacun des séquences de jusqu'à environ vingt résidus d'acides aminés.

25 Suivant un autre mode de réalisation, des régions homologues de l'isolat ARV-2, d'un intérêt particulier, sont codées dans le cadre de lecture ouvert env depuis des nombres de résidus d'acides aminés d'environ 306 à environ 323 et présentent d'une manière typique, les séquences d'acides aminés suivantes, où les oligopeptides inclus dans la séquence
30 d'acides aminés suivante comprennent des épitopes linéaires à l'intérieur d'une telle séquence :

V (177)

35 Y-Thr-Arg-Lys-Ser-Ile-Tyr-Ile-Gly-Pro-Gly-Arg-Ala-Phe-His-Thr-Thr-Gly-Arg-Ile-Y'

dans laquelle Y et Y', s'ils sont présents, représentent chacun de un jusqu'à environ vingt ou plus de résidus d'acides aminés. Si Y et/ou Y' sont présents, ils peuvent comprendre un ou plusieurs résidus d'acides aminés de sé-

5 quences qui sont disposées à côté de résidus d'acides aminés 306 à 323 de la séquence d'enveloppe ARV-2 ou de n'importe quelle partie de ces séquences latérales ou disposées à côté. En particulier, Y peut comprendre toute ou des parties de la séquence d'acides aminés d'enveloppe HIV depuis environ des

10 nombres de résidus 299 à 306; Y' peut comprendre toute ou des parties de la séquence d'acides aminés d'enveloppe HIV depuis des nombres de résidus 324 à 333.

Alternativement, des séquences tronquées de peptide V peuvent être préparées. A cet égard, les séquences suivantes

15 peuvent être particulièrement utiles :

VI (177a)

Y-Thr-Arg-Lys-Ser-Ile-Tyr-Ile-Gly-Pro-Gly-Y'; et

VII

20 Y-Asp-Cys-Lys-Thr-Ile-Leu-Lys-Ala-Leu-Gly-Pro-Ala-Ala-Thr-Leu-Glu-Glu-Norleu-Norleu-Thr-Ala-Cys-Y'

dans lesquelles Y et/ou Y', s'ils sont présents, représentent chacun des séquences de jusqu'à vingt ou plus de résidus d'acides aminés.

25 Un autre exemple comprend des régions homologues de l'isolat LAV-2, telles que codées dans le cadre de lecture ouvert env depuis environ un nombre de résidus d'acides aminés 311 à 330, et présentent d'une manière typique la séquence suivante :

30 VIII (110-2-2)

Y-Lys-Thr-Val-Lys-Ile-Nor-Leu-Nor-Ser-Gly-His-Val-Phe-His-Ser-His-Tyr-Gln-Pro-Y'

dans laquelle Y et/ou Y', s'ils sont présents, représentent chacun des séquences de jusqu'à vingt ou plus de résidus

35 d'acides aminés. (Voir article dans Nature 326:662 (1987),

qui est donné ici à titre de référence).

Suivant un autre aspect de la présente invention, des nouvelles lignées cellulaires capables de produire des anticorps monoclonaux et des compositions comprenant de tels anticorps sont proposées, lesquels anticorps sont capables de reconnaître sélectivement à des titres extrêmement élevés (de 10^2 , à 10^4 jusqu'à environ 10^7 ou plus) des régions neutralisantes contenues dans une séquence prédéterminée de glycoprotéines d'enveloppe gp110 ou p25, leurs précurseurs de protéine, les protéines de fusion recombinantes biologiquement exprimées, et les peptides de synthèse qui contiennent un ou plusieurs épitopes dans la région de séquence prédéterminée de gp110 ou p25. Les cellules hybrides objet de l'invention présentent un chromosome identifiable dans lequel l'ADN de lignée germinale s'est réarrangé pour coder un anticorps possédant un site de liaison pour un épitope sur gp110 ou p25 commun à quelques ou tous les isolats cliniques HIV. Ces anticorps monoclonaux peuvent être utilisés suivant une grande variété de manières incluant les diagnostics et la thérapie, aussi bien que pour identifier d'autres anticorps réagissant de façon croisée, tels que les anticorps de blocage. Les peptides ou polypeptides contenant l'épitope ou les épitopes avec lesquels ils réagissent peuvent trouver des utilisations séparées comme immunogènes pour les vaccins, ou comme agents thérapeutiques.

Peptides de blocage

Suivant un autre mode de réalisation de la présente invention, on utilise, pour une utilisation conjointe avec les anticorps monoclonaux de neutralisation ou les peptides précédents, des peptides supplémentaires ou anticorps qui interfèrent avec la liaison HIV aux récepteurs pour en outre modérer le pouvoir infectieux de HIV. De préférence, des peptides appelés "peptides bloquants" capables d'inhiber la prolifération du virus, aussi bien que des anticorps monoclonaux spécifiques pour les épitopes contenus dans de tels

peptides bloquants, peuvent être utilisés pour augmenter l'efficacité des traitements contre les infections par HIV. Les peptides de blocage HIV correspondent d'une manière typique aux séquences d'acides aminés de HIV que l'on estime être essentielles pour la fixation du virus sur une cellule hôte, tel que les résidus d'acides aminés codés env d'environ 190 à environ 197 de LAV_{BRU} et d'environ 185 à environ 192 de ARV-2 et HTLV-III(BH-10). Ces peptides comprennent l'octapeptide T (Ala-Ser-Thr-Thr-Thr-Asn-Tyr-Thr) et ses divers dérivés (voir IX ci-dessous) et les analogues (par exemple XI ci-dessous) décrits par Pert et autres (1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:9254-9258, laquelle publication est donnée ici à titre de référence) situés sur la glycoprotéine d'enveloppe (gp110 ou 120).

Par exemple, les peptides de blocage possédant les séquences suivantes sont d'un intérêt particulier, de préférence avec une acétylation du NH₂-terminal et une amidation du COOH-terminal:

- IX (1730)
- 20 Y-_dAla-Ser-Thr-Thr-Thr-Asn-Tyr-Thr-Y';
- X (186)
- Y-Thr-Thr-Asn-Tyr-Thr-Y';
- XI (187)
- Y-Thr-Thr-Ser-Tyr-Thr-Y';
- 25 XII (188)
- Y-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Y';
- XIII (189)
- Y-Asn-Thr-Ser-Tyr-Gly-Y';
- XIV (190)
- 30 Y-Asp-Thr-Asn-Tyr-Ser-Y';
- XV (191)

Y-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Y';

dans lesquelles, pour chaque peptide, Y et Y', s'ils sont présents, comprennent chacun une séquence d'acides aminés de 35 jusqu'à environ 20 acides aminés. Les épitopes ou déterminants

antigéniques dans ces peptides sont d'une manière typique définis par au moins environ cinq acides aminés contigus, et trouvent une utilisation dans par exemple l'imitation des sites antigènes HIV se produisant naturellement pour produire
5 des anticorps réactifs HIV et des vaccins.

Production des anticorps monoclonaux

La préparation des anticorps monoclonaux peut être réalisée en immortalisant l'expression des séquences d'acides nucléiques qui codent des anticorps spécifiques pour HIV, en
10 introduisant de telles séquences, typiquement ADNc codant pour l'anticorps, dans un hôte capable d'être cultivé dans une culture. La lignée cellulaire immortalisée peut être une lignée cellulaire de mammifère qui a été transformée par oncogénèse, par transfection, mutation ou analogues. De
15 telles cellules comprennent les lignées de myélomes, les lignées de lymphomes ou d'autres lignées cellulaires capables de supporter l'expression et la sécrétion de l'anticorps in vitro. L'anticorps peut être une immunoglobuline se produisant naturellement d'un mammifère, produite par trans-
20 formation d'un lymphocyte, particulièrement d'un splénocyte, au moyen d'un virus ou par fusion du lymphocyte avec une cellule néoplasique, par exemple un myélome, pour produire une lignée cellulaire hybride. D'une manière typique, le splénocyte sera obtenu à partir d'un animal immunisé contre
25 le virus HIV ou un fragment de celui-ci contenant un site épitopique.

Les protocoles d'immunisation sont bien connus et peuvent varier considérablement pour demeurer cependant efficaces. Voir Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and
30 Practice, Academic Presse, 2è édition (1986), qui est donné ici à titre de référence. Un virus rompu ou brisé, des peptides de synthèse, et des protéines de fusion bactérienne qui contiennent des fragments antigéniques de la molécule gp110 ou p25, peuvent être utilisés comme immunogènes. De
35 préférence, l'immunogène du virus brisé, des peptides ou des

protéines recombinantes sera enrichi en protéines ou en ses fragments contenant les épitopes pour lesquels les cellules B produisant l'anticorps ou les splénocytes sont désirés. Plus particulièrement, des solutions contenant des extraits
5 ou lysats de virus brisé ou rompu, ou des surnageants de protéines recombinantes biologiquement exprimées ou des vecteurs d'expression rompus ou séparés, peuvent être enrichis en glycoprotéines, si on le désire, en utilisant des méthodes de purification, telles que par exemple, l'électrophorèse
10 sur gel polyacrylamide. La purification d'affinité par lectine est une méthode pratique et préférée pour purifier gp110 et d'autres glycoprotéines, par exemple la purification d'affinité utilisant la lectine de lentille. L'étendue
jusqu'à laquelle les glycoprotéines sont purifiées à partir
15 des solutions pour une utilisation comme immunogènes, peut varier d'une manière importante, c'est-à-dire de moins de 50%, habituellement ou au moins de 75% à 95% , d'une manière désirable de 95% à 99% et, plus désirablement , jusqu'à l'homogénéité absolue.

20 Une fois que les protéines ont été purifiées jusqu'au degré désiré, elles peuvent être mises en suspension ou diluées dans un support physiologique approprié pour immunisation, ou bien peuvent être couplées à un adjuvant. Une technique préférée, par exemple, consiste en l'adsorption des
25 protéines et de leurs fragments sur de l'agarose de lectine de lentille ou sur un autre support macromoléculaire pour l'injection. Des quantités immunogènes de préparations antigéniques enrichies en protéines HIV, comprenant la glycoprotéine gp110 et la protéine de noyau p25 ou des
30 fractions antigéniques de celles-ci, sont injectées , généralement à des concentrations comprises dans l'intervalle 1 µg à 20 mg/kg d'hôte. L'administration peut se faire par injection, par exemple intramusculaire, péritonéale, sous-cutanée, intraveineuse etc. L'administration peut se faire en une
35 ou plusieurs fois, habituellement suivant des intervalles de

une à quatre semaines. Les animaux immunisés sont contrôlés pour la production de l'anticorps en les antigènes désirés, puis les rates sont enlevées et les lymphocytes B spléniques isolés et combinés avec une lignée cellulaire de myélomes
5 ou transformés. La transformation ou la fusion peut être réalisée suivant des manières classiques, la technique de fusion ou combinaison étant décrite dans un grand nombre de brevets, par exemple les brevets américains N° 4 172 124; N° 4 350 683; N° 4 363 799; N° 4 381 292; et N° 4 423 147.
10 Voir encore , Kennett et autres, Monoclonal Antibodies (1980), et les références citées dans cet article qui sont citées à titre de référence, et voir encore Goding, supra.

Les lignées cellulaires immortalisées peuvent être clonées et triées , suivant les techniques classiques , et
15 on détecte les anticorps dans les produits surnageants qui sont capables de se lier aux protéines virales HIV désirées de gp110 ou p25 , les protéines de fusion recombinantes ou les peptides de synthèse qui contiennent la région épitopique désirée. Les lignées de cellules immortalisées appropriées
20 peuvent ensuite être soumises à une croissance in vitro ou injectées dans la cavité péritonéale d'un hôte approprié pour production d'un fluide ascite. En vertu du fait que l'on dispose de certains anticorps de la présente invention qui sont connus comme étant spécifiques pour des épitopes contenus
25 par exemple dans les régions codées par la région génomique LAV_{BRU} d'environ 6688 bp à environ 6750 bp (peptide codant 29), ou d'environ 7246 bp à environ 7317 (peptide codant 36) (numérotage bp selon Wain-Hobson et autres, Cell 44:9 1985, qui est donné ici à titre de référence), les surnageants
30 peuvent être sélectionnés en compétition avec les anticorps monoclonaux objet de l'invention dans un test de compétition. Ainsi, des lignées cellulaires d'hybridomes immortalisées supplémentaires avec les caractéristiques de liaison désirées peuvent être produites facilement à partir d'une variété de
35 sources en fonction de la disponibilité des anticorps

présents spécifiques pour l'antigène particulier. Alternativement, ces lignées cellulaires peuvent être combinées avec d'autres cellules B néoplasiques, où de telles autres cellules B peuvent servir comme récepteurs pour l'ADN du
5 génome codant pour l'anticorps.

Bien que des cellules B néoplasiques de rongeur, particulièrement murin soient préférées, d'autres espèces de mammifères peuvent être utilisées telles que lagomorphe, bovin, ovin, équin, porcine, avien ou analogues. L'immunisation de ces animaux peut être facilement réalisée et leurs
10 lymphocytes, particulièrement les splénocytes, peuvent être obtenus pour des fusions.

L'anticorps monoclonal sécrété par les lignées cellulaires hybrides ou transformées peut être l'un quelconque
15 des classes ou sous-classes d'immunoglobulines, telles que IgM, IgD, IgA, IgG₁₋₄, ou IgE. Etant donné que IgG est l'isotype le plus commun utilisé dans les tests de diagnostic, il est souvent préféré. Les anticorps monoclonaux peuvent être utilisés intacts, ou sous la forme de fragments, tels
20 que Fv, Fab, F(ab')₂, mais habituellement intacts.

Pour atténuer l'antigénicité possible dans un hôte humain d'un anticorps monoclonal, dérivé d'un animal autre qu'un être humain, des anticorps chimériques peuvent être construits, dans lesquels le fragment de liaison à l'antigène
25 d'une molécule d'immunoglobuline (région variable), est relié par une liaison peptidique à au moins une partie d'une autre protéine non reconnue comme étrangère par les humains, telle que la partie évacuée d'une molécule d'immunoglobuline humaine. Ceci peut être réalisé en fusionnant ou combinant
30 des exons de régions variables d'animal avec des exons de régions constantes gamma ou kappa d'un être humain. Diverses techniques sont connues par ceux familiers de la technique, telles que celles décrites dans la demande de brevet international N° 86/01533, et dans les demandes de brevets
35 européens 171496 et 173494, qui sont données ici à titre

de référence.

Utilisation et formulations pharmaceutiques

Les anticorps monoclonaux de cette invention qui
présentent une activité de neutralisation, tels que ceux qui
5 réagissent avec un site épitopique sur gp110 ou p25 ou qui
réagissent avec un peptide de blocage, peuvent également
être incorporés comme constituants d'une composition pharma-
ceutique pour atténuer les infections par HIV. La composition
doit contenir une quantité prophylactique ou thérapeutique
10 d'au moins l'un des anticorps monoclonaux de cette invention
avec un support pharmaceutiquement efficace. Le support
pharmaceutique doit être constitué par n'importe quel
substance compatible, non toxique et convenable pour permettre
l'administration des anticorps monoclonaux au malade. De
15 l'eau stérile, de l'alcool, des produits gras, des cires et
des produits solides inertes peuvent être utilisés comme
support. Des adjuvants pharmaceutiquement acceptables
(agents tampon, agents de dispersion) peuvent également être
incorporés dans la composition pharmaceutique. De telles
20 compositions peuvent contenir un anticorps monoclonal unique
de façon à être par exemple spécifiques pour des souches de
HIV avec des glycoprotéines d'enveloppe contenant un site
épitopique dans une région codée par 6688 bp-6750 bp.
Alternativement, la composition pharmaceutique peut contenir
25 un ou plusieurs anticorps monoclonaux pour former un
"cocktail". Par exemple, un cocktail contenant des anticorps
monoclonaux contre les diverses souches de HIV constituerait
un produit universel avec une activité prophylactique ou
thérapeutique contre la grande majorité des isolats cliniques
30 de HIV. Le cocktail peut contenir des anticorps monoclonaux
qui se lient à des protéines ou des glycoprotéines de HIV
autres que gp110 ou p25, telles que, par exemple, à la
glycoprotéine gp41 ou à l'intégrase/p34 nucléase. Le rapport
molaire des divers constituants d'anticorps monoclonaux ne
35 différera habituellement pas de plus d'un facteur 10, plus

habituellement de pas plus d'un facteur 5, et sera habituellement compris entre environ 1:1-2 pour chacun des autres constituants d'anticorps.

Les anticorps monoclonaux de la présente invention
5 peuvent être utilisés sous la forme de compositions administrées séparément et données en conjonction avec d'autres agents anti-rétroviraux, comprenant des peptides de blocage. L'état actuel du développement des agents anti-rétroviraux, et des agents anti-HIV en particulier, est décrit dans la
10 publication de Mitsuya et autres, Nature 32b:773-778, 1987, qui est donnée ici à titre de référence.

Les anticorps monoclonaux, les peptides et les compositions pharmaceutiques de ceux-ci selon la présente invention sont particulièrement utiles pour une administration
15 par voie orale ou parentérale.

De préférence, les compositions pharmaceutiques peuvent être administrées par voie parentérale, c'est-à-dire par voie sous-cutanée, intramusculaire ou intraveineuse. Ainsi, cette invention propose des compositions pour une
20 administration parentérale, qui comprennent une solution de l'anticorps monoclonal, d'un peptide ou d'un cocktail de ceux-ci, dissous dans un support acceptable, de préférence un support aqueux. Une grande variété de supports aqueux peut être utilisée, par exemple l'eau, l'eau tamponnée, une
25 solution saline 0,4%, de glycine 0,3% ou analogues. Ces solutions sont stériles et généralement dépourvues de particules. Ces compositions peuvent être stérilisées par des techniques classiques et bien connues de stérilisation. Les compositions peuvent contenir des substances auxiliaires
30 pharmaceutiquement acceptables comme exigé pour satisfaire approximativement aux conditions physiologiques, tels que les agents tampon et d'ajustage du pH, les agents d'ajustage de la toxicité ou analogues, par exemple l'acétate de sodium, le chlorure de sodium, le chlorure de potassium, le chlorure
35 de calcium, le lactate de sodium etc. La concentration de

l'anticorps dans ces formulations peut varier d'une manière importante, c'est-à-dire de moins environ 0,5%, habituellement à ou au moins environ 1% jusqu'à autant que 15 ou 20% en poids, et la concentration sera choisie essentiellement en fonction des volumes de fluide, des viscosités, etc., de préférence en fonction du mode particulier d'administration choisi.

Ainsi, une composition pharmaceutique typique pour injection intramusculaire pourra être confectionnée de façon à contenir 1 ml d'eau tamponnée stérile, et 50 mg d'anticorps monoclonal. Une composition typique pour injection intraveineuse pourrait être confectionnée de façon à contenir 250 ml de solution de Ringer stérile, et 150 mg d'anticorps monoclonal. Des méthodes pour préparer des compositions administrables par voie parentérale sont bien connues de ceux qui sont familiers de la technique et sont décrites en plus de détail dans par exemple la publication Remington's Pharmaceutical Science, 15^e Ed. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvanie (1980), qui est indiquée ici à titre de référence.

Les anticorps monoclonaux et les peptides de cette invention peuvent être lyophilisés pour le stockage et reconstitués dans un support ou véhicule convenable avant usage. Cette technique s'est montrée comme efficace avec des globulines immunes classiques et des techniques de reconstitution et de lyophilisation connues dans la technique peuvent être utilisées. Il sera apprécié par ceux familiers de la technique que la lyophilisation et la reconstitution peuvent conduire à divers degrés de perte d'activité de l'anticorps (par exemple avec des immunoglobulines classiques, des anticorps IgM tendent à avoir une plus grande perte d'activité que les anticorps IgG) et que des niveaux ou proportions d'utilisation peuvent nécessiter un ajustement pour compensation.

Les compositions contenant les anticorps monoclonaux

de la présente invention, les peptides ou leurs cocktails peuvent être administrés pour le traitement thérapeutique et/ou prophylactique des infections par HIV. Dans les applications thérapeutiques, les compositions sont administrées à un

5 malade déjà infecté avec le HIV, suivant une quantité suffisante pour guérir ou au moins partiellement arrêter l'infection et ses complications. Une proportion adéquate pour accomplir ceci est définie comme étant une "dose thérapeutiquement efficace". Des quantités efficaces pour cette utilisation

10 dépendent de la sévérité de l'infection et de l'état général du système immunitaire propre du malade, mais sont généralement comprises entre environ 1 et environ 200 mg d'anticorps par kilogramme de poids du corps, des doses comprises entre 5 et

15 25 mg par kilogramme étant plus communément utilisées. On doit garder à l'esprit que les matériaux de cette invention peuvent être généralement utilisés dans des états de maladie sérieux, c'est-à-dire dans des situations où la vie est menacée ou potentiellement menacée. Dans de tels cas, il est possible et peut être estimé désirable par le médecin traitant d'administrer ces anticorps suivant des excès sensibles.

20

Dans les applications prophylactiques, les compositions contenant les présents peptides, anticorps ou leurs cocktails sont administrées à un malade qui n'est pas déjà infecté par le virus HIV, mais qui a peut-être été récemment exposé ou

25 qui est estimé avoir été exposé à un risque d'infection par le virus ou au virus lui-même, de façon à renforcer la résistance du malade à une telle infection potentielle ou de façon à le vacciner contre le virus. On définit la quantité administrée par une "dose prophylactiquement efficace".

30 Dans cette utilisation, les quantités précises dépendent de nouveau de l'état de santé du malade et de son état général immunitaire, mais sont généralement comprises entre 0,1 mg et 25 mg par kilogramme, tout particulièrement entre 0,5 mg et 2,5 mg par kilogramme.

35 Des administrations uniques ou multiples des

compositions peuvent être réalisées avec des doses et un protocole choisis par le médecin traitant. Dans tous les cas, les formulations pharmaceutiques doivent fournir une quantité de l'anticorps ou des anticorps de cette invention qui sont
5 suffisantes pour traiter efficacement le malade.

En outre, les anticorps monoclonaux de la présente invention peuvent trouver une utilisation en tant que molécule support ou véhicule spécifique pour une cible. Un anticorps peut être lié à une toxine pour former une immunotoxine
10 ou un matériau radioactif ou un médicament pour former un produit pharmaceutique ou radiopharmaceutique. Des procédés pour produire des immunotoxines et des produits radiopharmaceutiques sont bien connus (voir par exemple, Cancer Treatment Reports 68:317 (1984)).

15 Il est également possible que des hétéroagrégats d'anticorps monoclonaux de la présente invention et d'activateurs de cellules T humaines, tels que des anticorps monoclonaux pour l'antigène CD3 ou le récepteur gamma F_c sur des cellules T, puissent permettre à des cellules T humaines ou
20 à des cellules portant F_c -gamma (telles que des cellules K ou neutrophiles) de tuer des cellules infectées par HIV via une cytolyse par l'intermédiaire de cellules dépendant d'anticorps ("antibody dependent cell-mediated cytotoxicity" : "ADCC"). De tels hétéroagrégats peuvent être assemblés, par
25 exemple, par liaison covalente des anticorps anti-HIV aux anticorps anti-CD3 en utilisant le réactif hétéro-bifonctionnel N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol)propionate, comme décrit par Karpowsky et autres, J. Exp. Med. 160:1686 (1984), cette publication étant donnée ici à titre de référence.

30 Les compositions peptidiques elles-mêmes objet de cette invention peuvent également trouver une utilisation thérapeutique, lorsque l'administration produit la réduction ou l'élimination du virus HIV dans un hôte infecté. Ces compositions, telles que le peptide 29, les peptides de blocage et
35 le peptide 126 peuvent être administrées dans des supports

ou véhicules physiologiques appropriés, par voie intra-veineuse, sous-cutanée, intramusculaire, intrapéritonéale etc. Divers véhicules comprennent une solution saline tamponnée au phosphate, une solution saline, de l'eau, du chlorure de potassium, du lactate de sodium ou analogues. La concentration des peptides varie largement en fonction de son usage ultime, de l'activité et du mode d'administration. De préférence, les peptides comportent une amidation du COOH-terminal, une formylation du NH₂-terminal ou d'autres dérivés pharmaceutiquement acceptables. L'addition de peptides bloquants aux peptides imitant une région du HIV neutralisante et/ou les anticorps spécifiquement réactifs de la présente invention procurera une efficacité thérapeutique accrue de manière significative. D'autres agents anti-HIV peuvent également être inclus dans les formulations (autres que les anticorps monoclonaux qui lient les peptides) tels que la 3'-azido-3'-déoxythymidine, la 2',3'-didéoxycytidine, la 2',3'-didéoxy-2',3'-didéhydrocytidine, etc.

20 Utilisation des anticorps monoclonaux dans la purification d'immunoaffinité

Des anticorps monoclonaux spécifiques pour les polypeptides contenant gp110 ou d'autres déterminants antigéniques, particulièrement les déterminants antigéniques obtenus à partir des protéines de fusion recombinantes biologiquement exprimées ou des lysats ou extraits d'HIV cultivé, sont particulièrement avantageux pour une utilisation dans les protocoles de purification. Généralement les anticorps possèdent des constantes d'association par affinité de l'ordre de 10^8 à 10^{12} M. De tels anticorps peuvent être utilisés pour purifier les protéines recombinantes à partir du milieu de culture du système d'expression recombinant si la protéine exprimée est sécrétée ou à partir des constituants du système d'expression biologique rompu si elle n'est sécrétée. Généralement, les anticorps monoclonaux qui sont capables de réagir avec gp110 ou d'autres déterminants antigéniques sont attachés

ou immobilisés sur un substrat ou support. La solution contenant les déterminants antigéniques HIV est ensuite mise en contact avec l'anticorps immobilisé dans des conditions convenables pour la formation de complexes immuns entre l'anticorps et les polypeptides contenant les déterminants antigéniques gp110. Le matériau non lié est séparé des complexes immuns liés, lesquels complexes ou fragments antigéniques de gp110 sont ensuite séparés du support.

D'une manière typique, les anticorps monoclonaux sont purifiés bruts à partir d'un fluide ascite ou de surnageants de culture de cellules avant fixation sur un support. De tels processus sont bien connus de ceux familiers de la technique, et peuvent inclure un fractionnement avec des sels neutres à concentration élevée. D'autres méthodes, telles que la chromatographie DEAE, la chromatographie de filtration sur gel, l'électrophorèse sur gel préparative, ou la chromatographie d'affinité protéine A, peuvent également être utilisées pour purifier l'anticorps monoclonal avant son utilisation comme un immunoadsorbant.

Le support sur lequel les anticorps monoclonaux sont immobilisés doit avoir les caractéristiques générales suivantes : (a) interactions faibles avec les protéines en général pour minimiser les liaisons non spécifiques, (b) bonnes caractéristiques d'écoulement qui permettent l'écoulement au travers de matériaux de poids moléculaire élevé, (c) possession de groupes chimiques qui peuvent être activés ou modifiés pour permettre la liaison chimique de l'anticorps monoclonal, (d) stabilité physique et chimique dans les conditions utilisées pour lier l'anticorps monoclonal et (e) stabilité aux conditions et constituants des tampons exigés pour l'adsorption et l'élution de l'antigène. Certains supports communément utilisés sont l'agarose, les polystyrènes dérivés, les polysaccharides, les grains de polyacrylamide, la cellulose activée, le verre et analogues. Diverses méthodes chimiques existent pour la fixation des anticorps sur les

supports formant substrats. Voir généralement Cuatrecasas, P., Advances in Enzymology 36:29 (1972). Les anticorps de la présente invention peuvent être fixés directement sur le support ou, alternativement, par l'intermédiaire d'un bras
5 de liaison ou d'entretoise.

Les conditions générales requises pour l'immobilisation des anticorps monoclonaux sur les supports chromatographiques sont bien connues dans la technique. Voir par exemple Tijssen, P. 1985, Practice and Theory of Enzyme Immunoassay,
10 cette publication étant donnée ici à titre de référence. Les processus actuels de couplage dépendent légèrement des caractéristiques et du type de l'anticorps à coupler. Les anticorps monoclonaux possèdent des caractéristiques qui sont habituellement constantes d'un mélange à l'autre, ce qui
15 permet à de telles conditions ou caractéristiques d'être optimisées. La fixation se produit typiquement par l'intermédiaire de liaisons covalentes.

Une suspension d'extraits ou lysats de virus HIV, le surnageant d'un système d'expression biologique cultivé, ou
20 une suspension des cellules rompues ou brisées est ensuite ajoutée à la matrice de séparation. Le mélange est incubé sous des conditions et pendant un temps suffisant pour que se produise la formation du complexe immun, habituellement pendant au moins 30 minutes, plus habituellement pendant un
25 temps de 2 à 24 heures. Les complexes immuns contenant des polypeptides avec des parties antigéniques de gp110 sont ensuite séparés du mélange. D'une manière typique, le mélange est enlevé, par exemple par élution, et les complexes immuns liés sont lavés d'une manière exhaustive avec du tampon
30 d'adsorption. Les complexes immuns peuvent être ensuite élués à partir de la matrice de séparation en utilisant un éluant compatible avec le support particulier qui est utilisé, lesquels éluants sont bien connus par ceux qui sont familiers de la technique. Egalement, les polypeptides contenant le
35 gp110 ou d'autres fractions antigéniques peuvent être éliminés

sélectivement. Par exemple, les peptides qui contiennent un épitope reconnu par les anticorps peuvent être utilisés pour entrer en compétition avec le site de liaison de l'anticorps, ce qui constitue une technique d'élution alternative qui peut être réalisée dans des conditions d'élution douces. Le polypeptide sélectivement adsorbé contenant l'antigène gp110 peut être élué à partir d'un adsorbant d'affinité d'anticorps en altérant le pH et/ou la force ionique du tampon. Des agents chaotropiques peuvent également trouver une utilisation dans l'élimination de l'antigène lié. La sélection de l'agent chaotropique, sa concentration et d'autres conditions d'élution dépendent des caractéristiques de l'interaction anticorps-antigène, mais une fois qu'elles sont déterminées, elles ne doivent pas être soumises à des changements habituellement nécessaires dans les systèmes de séparation par affinité polyclonale.

Le matériau élué peut exiger un ajustage à un pH physiologique si des tampons de force ionique ou pH faibles ou élevés sont utilisés pour séparer les antigènes gp110 liés de la matrice de séparation. Une dialyse ou une chromatographie de filtration sur gel peuvent également être exigées pour éliminer les sels en excès utilisés dans l'éluant de façon à permettre la reconstitution de gp110 ou des polypeptides contenant des fractions antigéniques de gp110 sur des conformations naissantes.

Les procédés de cette invention procurent, par exemple, du gp110 sensiblement purifié ou des polypeptides contenant des fragments antigéniques de celui-ci, soit produits naturellement par des cultures de cellules infectées ou par des systèmes d'expression recombinants de bactéries, levures, ou des cellules de mammifère ou d'insectes cultivées. Le gp110 et les fragments ou d'autres protéines purifiées seront d'une manière typique d'une pureté supérieure à 50%, plus usuellement d'au moins 75% et fréquemment plus grande que 95 à 99%. Ces molécules peuvent ensuite trouver un usage

ultérieur dans une grande variété d'applications.

Les protéines de gp110 HIV, les polypeptides contenant des fragments antigéniques de celles-ci, ou d'autres protéines sensiblement purifiées selon les procédés de la présente invention, peuvent trouver une utilisation dans une grande variété d'applications, comprenant les formulations de sous-unités de vaccin SIDA, dans lesquelles l'immunogène comprend une dose efficace de déterminants antigéniques de, par exemple, gp110 ou d'une région neutralisante de gp110. D'autres constituants de la formulation peuvent inclure les fractions antigéniques des protéines HIV ou des glycoprotéines qui stimulent la production d'anticorps (de préférence anticorps neutralisants) dans un hôte immunisé, lesquels anticorps sont capables de constituer une protection contre une infection subséquente par HIV.

Utilisations pour diagnostic des anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux de la présente invention sont également utiles dans des buts de diagnostic. Ils peuvent être soit marqués ou non marqués dans ce but. Typiquement, des tests de diagnostic permettent la détection de la formation d'un complexe par l'intermédiaire de la liaison de l'anticorps monoclonal sur un antigène HIV. S'ils sont non marqués, les anticorps trouvent l'utilisation par exemple dans les tests d'agglutination. En outre, des anticorps non marqués peuvent être utilisés en combinaison avec d'autres anticorps marqués (seconds anticorps) qui réagissent avec l'anticorps monoclonal, tels que des anticorps spécifiques pour l'immunoglobuline. Alternativement, les anticorps monoclonaux peuvent être marqués directement. Une grande variété de marqueurs peut être utilisée, tels que des radionucléides, des agents fluorescents, des enzymes, des substrats d'enzyme, des cofacteurs d'enzyme, des inhibiteurs d'enzyme, des ligands (particulièrement haptens), etc. Divers types d'immuno-essais sont disponibles, et, à titre d'exemple, ceux décrits dans les brevets américains N°s 3 817 827; 3 850 752; 3 901 654;

3 935 074; 3 984 533; 3 996 345; 4 034 074; et 4 098 876 qui sont donnés ici à titre de référence.

De manière habituelle, les anticorps monoclonaux et les peptides de la présente invention sont utilisés dans des immuno-essais d'enzyme où, par exemple, les anticorps objet de l'invention, ou les seconds anticorps d'une espèce différente, sont conjugués à un enzyme. Lorsqu'un échantillon biologique contenant des antigènes HIV, tels que le sérum sanguin humain, la salive, le sperme, les sécrétions vaginales ou une suspension de culture de cellules infectées par virus, est combiné avec les anticorps, une liaison se produit entre les anticorps et les molécules présentant l'épitope désiré. De telles protéines ou particules virales peuvent ensuite être séparées des réactifs non liés, et un second anticorps (marqué avec un enzyme) ajouté. Par la suite, la présence du conjugat anticorps-enzyme spécifiquement lié à l'antigène est déterminée. D'autres techniques classiques bien connues des familiers de la technique peuvent également être utilisées.

Des kits peuvent également être réalisés pour être utilisés avec les anticorps dans la détection de l'infection HIV ou pour la présence de l'antigène HIV. Ainsi, les compositions d'anticorps monoclonaux selon la présente invention peuvent être proposées, habituellement sous forme lyophilisée, soit seules ou conjointement avec des anticorps supplémentaires spécifiques pour d'autres épitopes de HIV. Les anticorps, qui peuvent être conjugués à un marqueur ou non conjugués, sont inclus dans les kits avec des tampons, tels que Tris, phosphate, carbonate etc..., des stabilisateurs, des biocides, des protéines inertes, par exemple de l'albumine de sérum bovin, ou analogues. D'une manière générale, ces matériaux seront présents suivant une proportion de moins d'environ 5% en poids basée sur la quantité d'anticorps actifs, et seront habituellement présents suivant une quantité totale d'au moins environ 0,001% en poids basée sur la concentration d'anticorps. Fréquemment, il est désirable

d'inclure un agent de dilution inerte ou un excipient pour diluer les ingrédients actifs, où l'excipient peut être présent suivant une quantité d'environ 1% à 99% en poids de la composition totale. Si un second anticorps capable de se
5 lier à l'anticorps monoclonal est utilisé, celui-ci sera habituellement présent dans un récipient séparé. Le second anticorps est d'une manière typique conjugué à un marqueur et formulé d'une manière analogue aux formulations d'anticorps décrites ci-dessus.

10 La détection des antigènes p25 ou de gp110, ou du virus entier, dans des échantillons biologiques variés peut trouver une utilisation dans le diagnostic d'une infection courante par le virus HIV. Les échantillons biologiques peuvent comprendre, mais ne sont pas limités à, le sérum
15 sanguin, la salive, le sperme, les échantillons de tissus obtenus par biopsie (cerveau, peau, nodosités lymphatiques, rate, etc.), des surnageants de culture de cellules, des systèmes d'expression bactériens et eucaryotiques rompus ou brisés, et analogues. La présence du virus est testée par
20 incubation de l'anticorps monoclonal avec l'échantillon biologique dans des conditions contribuant à la formation d'un complexe immun, ce après quoi on détecte la formation du complexe. Suivant une réalisation, la formation de complexe est détectée par l'utilisation d'un second anticorps capable
25 de se lier à l'anticorps monoclonal qui est typiquement conjugué à un marqueur et formulé d'une manière analogue aux formulations d'anticorps décrites ci-dessus. Dans une autre réalisation, l'anticorps monoclonal est fixé sur un support à phase solide qui est ensuite mis en contact avec un échan-
30 tillon biologique. Après une phase d'incubation, l'anticorps monoclonal marqué est ajouté pour détecter l'antigène lié.

Préparation et utilisation des peptides de synthèse

La présente invention a pour objet des nouveaux
peptides qui, entre autres, imitent immunologiquement des
35 épitopes de protéine codés par le rétrovirus HIV,

particulièrement des épitopes codés dans les régions gag ou env du génome viral codant respectivement gp110 ou p25. Pour satisfaire les variations de souche à souche, parmi les différents isolats, des ajustements pour les substitutions conservatives, et une sélection parmi les alternatives si des substitutions non-conservatives sont nécessaires, peuvent être réalisés. Ces peptides peuvent être utilisés comme des immunogènes, pour inhiber ou éliminer la production d'antigène HIV in vitro ou in vivo, pour la détection du virus ou des anticorps sur le virus dans un échantillon physiologique. En fonction de la nature du protocole, les peptides peuvent être conjugués à un support ou d'autres composés, marqués ou non marqués, liés à une surface solide, ou analogue.

Suivant un mode de réalisation, des peptides d'intérêt peuvent dériver de la région gp110 du virus. La région qui présente un intérêt particulier est celle qui se trouve dans le cadre de lecture ouvert env s'étendant depuis environ la paire de bases 6688 bp jusqu'à environ 6750 bp et depuis environ 7246 bp jusqu'à environ 7317.

Les peptides d'intérêt, comprenant les peptides bloquants, comprennent au moins cinq, parfois six, quelquefois huit, parfois douze, parfois 21, habituellement un peu moins que 50, plus habituellement un peu moins qu'environ 35 et de préférence moins d'environ 25 acides aminés compris dans une séquence codée par un rétrovirus HIV. D'une manière désirable, le peptide sera aussi petit que possible tout en maintenant encore sensiblement toute l'activité antivirale ou d'immuno-réactivité du peptide plus important. Dans quelques cas, il peut être désirable de réunir deux ou plus d'oligopeptides qui ne se chevauchent pas pour former une structure de peptide unique ou pour les utiliser comme des peptides individuels en même temps, lesquels procurent ensemble ou séparément une sensibilité équivalente au peptide père.

Le peptide peut être modifié en introduisant des substitutions conservatives ou non-conservatives dans le

peptide, habituellement moins de 20%, plus habituellement moins de 10% des acides aminés étant échangés. Dans les situations où des régions sont trouvées comme étant polymorphiques, il peut être désirable de faire varier un ou
5 plusieurs acides aminés particuliers pour imiter plus efficacement les différents épitopes des différentes souches rétrovirales. Dans beaucoup de cas pour obtenir une stabilité chimique, la méthionine peut être remplacée par la norleucine (Nor).

10 Il convient de comprendre que le peptide utilisé dans la présente invention n'a pas besoin d'être identique à une séquence de polypeptides d'HIV particulière, pour autant que le composé soit capable de procurer une compétition immunologique avec des protéines d'au moins l'une des souches du
15 rétrovirus HIV. Par conséquent, le peptide de l'invention peut être sujet à divers changements, tels que des insertions, des suppressions et des substitutions, soit conservatifs ou non-conservatifs, si de tels changements peuvent procurer certains avantages lors de l'utilisation. Par substitutions
20 conservatives, on entend des substitutions dans des groupes tels que gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; phe, tyr; et nor, met. Habituellement, la séquence ne diffère de pas plus de 20% par rapport à la séquence d'au moins une souche d'un rétrovirus HIV sauf où
25 des acides aminés supplémentaires peuvent être ajoutés sur l'un ou l'autre terminal de façon à procurer un "bras" par lequel le peptide de cette invention peut être convenablement immobilisé. Les bras peuvent avoir une longueur qui est habituellement d'au moins 1 acide aminé et peut être de 50
30 ou plus d'acides aminés, plus souvent de 1 à 10 acides aminés.

Le peptide dans lequel la séquence d'acides aminés est modifiée par la substitution, l'addition ou la suppression des résidus d'acides aminés, doit retenir sensiblement toute l'activité antivirale ou d'immunoréactivité des peptides non
35 modifiés, ce qui peut être commodément mesuré par diverses

techniques de test présentement décrites. La forme isomère d d'un ou plusieurs acides aminés peut être utilisée, si on le désire, pour modifier les propriétés biologiques, telles que l'activité, le taux de rupture etc..

5 En outre, un, deux ou plusieurs acides aminés peuvent être ajoutés sur les parties terminales d'un oligopeptide ou d'un peptide pour faciliter la liaison des peptides l'un à l'autre, pour le couplage à un support ou un peptide plus grand, pour des raisons qui seront discutées plus loin, pour
10 modifier les propriétés physiques ou chimiques du peptide ou de l'oligopeptide, ou analogues.

Des acides aminés tels que la tyrosine, la cystéine, la lysine, l'acide aspartique ou glutamique, ou analogues, peuvent être introduits sur le C ou N terminal du peptide
15 ou de l'oligopeptide pour procurer une fonctionnalité utile dans la liaison. La cystéine est particulièrement préférée pour faciliter le couplage covalent à d'autres peptides ou pour former des polymères par oxydation.

En outre, les séquences de peptide ou d'oligopeptide
20 peuvent différer de la séquence naturelle par le fait que la séquence est modifiée par acylation du NH₂-terminal, par exemple acétylation ou amidation par acide thioglycolique, amidation du carboxy-terminal, par exemple, avec de l'ammoniac ou de la méthylamine, pour procurer une stabi-
25 lité, un pouvoir hydrophobe accru pour la liaison à un support ou une autre molécule, ou pour la polymérisation.

Ainsi, par exemple, dans les peptides I-VIII et IX-XV décrits ci-dessus, lorsque Y ou Y' sont présents, un mode de réalisation préféré existe si Y ou Y' comprend un ou plusieurs
30 résidus de cystéine ou une combinaison d'un ou plusieurs résidus de cystéine avec des acides aminés d'espacement. La glycine constitue un moyen d'espacement ou une entretoise particulièrement préféré. Des peptides préférés pour utilisation dans une polymérisation oxydante sont ceux dans lesquels
35 Y ou Y' représente au moins deux résidus de cystéine. Si deux

résidus de cystéine sont présents à la même extrémité du peptide, une réalisation préférée existe lorsque les résidus de cystéine sont séparés au moyen d'un à trois résidus d'acides aminés d'espacement, de préférence la glycine. La présence de résidus de cystéine peut permettre la formation de dimères du peptide et/ou augmenter le caractère hydrophobe du peptide résultant ce qui facilite l'immobilisation du peptide dans des systèmes immobilisés de test ou des systèmes de phase solide.

10 Un usage d'un intérêt particulier est celui du groupe mercaptan des cystéines ou des acides thioglycoliques utilisés pour les groupes amino terminaux d'acylation ou analogues pour lier deux des peptides ou oligopeptides ou leurs combinaisons par une liaison disulfure ou une liaison plus grande 15 pour former des polymères qui contiennent un certain nombre d'épitopes. De tels polymères présentent l'avantage d'une réaction immunologique accrue. Si différents peptides sont utilisés pour fabriquer le polymère, ils possèdent la possibilité supplémentaire d'induire des anticorps qui immuno- 20 réagissent avec plusieurs déterminants antigéniques de différents isolats HIV.

Pour obtenir la formation de polymères antigéniques (multimères synthétiques), on peut utiliser des composés possédant des groupes bis-haloacétyles, des nitroarylhalogénures, 25 ou analogues, lorsque les réactifs sont spécifiques pour les groupes thio. Ainsi, la liaison entre les deux groupes mercapto des différents peptides ou oligopeptides peut être une liaison simple ou un groupe liant d'au moins 2, habituellement d'au moins 4, et pas plus d'environ 16, habituellement 30 pas plus d'environ 14 atomes de carbone.

Le peptide objet de l'invention peut être utilisé en étant lié à un support macromoléculaire soluble (par exemple pas moins de 5 kDal). D'une manière commode, le support peut être un poly(acide aminé), soit naturel ou synthétique, vis- 35 à-vis duquel des anticorps ont peu de chance d'être rencontrés

dans le sérum humain. Des exemples de tels supports sont la poly-L-lysine, l'hémocyanine limpet keyhole, la thyroglobuline, les albumines, telles que l'albumine de sérum bovin, le toxoïde du tétanos etc.. Le choix du support est essentiel-
5 lement dépendant de l'utilisation ultime de l'antigène, et dépend des commodités et des disponibilités.

Avec de tels produits conjugués, il y aura au moins une molécule d'au moins un peptide de l'invention par macromolécule, et pas plus qu'environ 1 par 0,5kDal, habituellement
10 pas plus d'environ 1 par 2kDal de la macromolécule. Un ou plusieurs peptides différents peuvent être liés à la même macromolécule.

La façon de réaliser la liaison est classique, et utilise des réactifs tels que l'acide p-maléimidobenzoïque,
15 l'acide p-méthylthiobenzoïque, l'anhydride d'acide maléique, l'anhydride d'acide succinique, le glutaraldéhyde etc. La liaison peut se produire sur le N-terminal, le C-terminal ou sur un site intermédiaire entre les extrémités de la molécule. Le peptide objet de l'invention peut être dérivé par liaison,
20 peut être lié tout en étant relié à un support, ou analogues.

Divers protocoles d'essai connus de ceux qui sont familiers de la technique peuvent être utilisés pour détecter la présence de soit les anticorps sur les protéines rétrovirales soit les protéines rétrovirales elles-mêmes. Il y a
25 un intérêt particulier à utiliser le peptide sous la forme du réactif marqué, si le marqueur permet un signal détectable, ou à lier le peptide, soit directement ou indirectement sur une surface, si l'anticorps sur le peptide dans l'échantillon devient lié au peptide sur la surface. La présence d'un
30 anticorps humain lié au peptide peut alors être détectée en utilisant un anticorps xénogène spécifique pour l'immunoglobuline humaine, normalement à la fois IgM et IgG humaines, ou une protéine marquée spécifique pour des complexes immuns, par exemple le facteur Rf de la protéine A S. aureus.

35 A titre d'illustration d'une technique d'essai, on

citera l'utilisation d'un conteneur d'échantillons, par exemple les puits de plaques comportant des micropuits, où le polypeptide objet de l'invention ou les produits conjugués de celui-ci sont adsorbés sur le fond du récipient et/ou les parois soit de façon covalente ou non covalente. L'échantillon, qui est normalement du sang humain ou du sérum dilué dans un milieu tamponné de manière appropriée, est mis dans le récipient et un temps suffisant est laissé pour la formation du complexe entre le ou les polypeptides et tous les anticorps parents dans l'échantillon. Le surnageant est éliminé et le récipient lavé pour enlever les protéines non spécifiquement liées. Une protéine de liaison spécifique marquée qui se lie spécifiquement au complexe, tel que l'antisérum xénogénique pour l'immunoglobuline humaine, est utilisée pour la détection.

Le peptide peut être préparé suivant une grande variété de façons. Le peptide, en raison de ses dimensions relativement courtes, peut être synthétisé en solution ou sur un support solide suivant les techniques classiques. Divers appareils automatiques de synthèse sont disponibles dans le commerce aujourd'hui et peuvent être utilisés avec des protocoles connus. Voir par exemple Stewart et Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2^e ed., Pierce Chemical Co., 1984; et Tam et autres, *J. Am. Chem. Soc.* (1983) 105:6442.

Alternativement, la technologie ADN hybride peut être utilisée si un gène synthétique peut être préparé en utilisant des brins uniques qui codent pour le polypeptide ou des brins sensiblement complémentaires de celui-ci, si les brins uniques se chevauchent et peuvent être mis ensemble dans un milieu de recuisson de façon à permettre l'hybridation. Les brins ou filaments hybridés peuvent être ensuite ligaturés pour former le gène complet, et, par le choix de terminaisons appropriées, le gène peut être inséré dans des vecteurs d'expression, qui sont facilement disponibles aujourd'hui. Voir par exemple Maniatis et autres, *Molecular Cloning*,

A Laboratory Manual, CSH, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. Ou bien la région du génome viral codant pour le peptide peut être clonée par des techniques ADN recombinant classiques et exprimée (voir Maniatis, supra).

5 Des séquences codantes ADN des isolats LAV_{BRU} et ARV-2 de HIV qui peuvent être utilisées pour exprimer les peptides, sont les suivantes :

	LAV _{BRU}	TGT ACA AGA CCC AAC AAC AAT ACA AGA AAA AGT
		ATC CGT ATC CAG AGG GGA CCA GGG AGA GCA TTT
10		GTT ACA ATA GGA AAA ATA GGA AAT ATG AGA CAA
		GCA CAT TGT
	ARV-2	TGT ACA AGA CCC AAC AAC AAT ACA AGA AAA AGT
		ATC TAT ATA GGA CCA GGG AGA GLA TTT CAT ACA
		ACA GGA AGA ATA ATA GGA GAT ATA AGA AAA GCA
15		CAT TGT

Des fragments d'une séquence peuvent être utilisés pour l'expression de fragments de peptide, des changements de base conservatifs peuvent être faits, si le ou les codons codent pour le ou les mêmes acides aminés, ou bien des chan-
20 gements non-conservatifs dans la séquence codante peuvent être faits, si l'acide aminé résultant peut être un changement conservatif ou non-conservatif dans la séquence d'acides aminés, comme cela a été discuté précédemment.

La séquence codante peut être étendue soit au
25 5' ou 3' terminal ou aux deux terminaux pour allonger le peptide, tout en retenant son ou ses sites épitopiques. L'allongement peut procurer un bras pour la liaison, par exemple à un marqueur, tel qu'un enzyme, pour réunir deux ou tous les peptides ensemble dans la même chaîne, de façon
30 à procurer une activité antigénique, des sites de restriction convenables pour le clonage, ou analogues.

La séquence ADN par elle-même, ses fragments, ou des séquences plus grandes, habituellement d'au moins 15 bases, de préférence d'au moins 18 bases, peuvent être utilisés
35 comme sondes nucléotidiques pour la détection d'ARN rétroviral

ou d'ADN proviral, ou pour identifier les régions homologues pour le clonage ou la formation de séquence. De nombreuses techniques sont décrites, telles par exemple la technique Grunstein-Hogness, la technique Southern, la technique
5 Northern, dot-blot, leurs perfectionnements, aussi bien que d'autres méthodologies, telles que celles décrites dans le brevet américain N° 4 358 535 qui est donné ici à titre de référence.

Les peptides objet de l'invention, comprenant des
10 peptides de blocage, et leurs analogues trouvent une utilisation en eux-mêmes ou en combinaison dans des vaccins. De manière similaire, des anticorps anti-idiotypes c'est-à-dire réagissant avec les idiotypes des anticorps de la présente invention et contenant par conséquent des épitopes imitant les
15 régions neutralisantes de HIV, peuvent également être utilisés dans des vaccins. Les peptides ou anticorps anti-idiotypes peuvent être formulés d'une manière convenable, généralement à des concentrations dans l'intervalle de 1 µg à 20 mg/kg d'hôte. Des milieux physiologiquement acceptables peuvent
20 être utilisés comme supports, tels que l'eau stérile, une solution saline, une solution saline tamponnée au phosphate ou analogues. Des adjuvants peuvent être utilisés tels que le gel d'hydroxyde d'aluminium, les substances actives en surface telles que la lysolécithine, les polyols pluroniques,
25 les polyanions, les peptides, les protéines (par exemple toxine du choléra ou diphtérie) et les émulsions d'huile. Les peptides peuvent également être incorporés dans des liposomes, ou conjugués à des polysaccharides, des polypeptides ou des polymères pour une utilisation dans une
30 formule de vaccin. L'administration peut se faire par injection, par exemple par voie intramusculaire, péritonéale, sous-cutanée, intraveineuse etc. L'administration d'une dose immunogéniquement efficace peut être faite en une ou plusieurs fois, habituellement dans un intervalle de une à quatre
35 semaines. Une "dose immunogéniquement efficace" correspond à

- 100 NP-40. De la Sepharose de lectine de lentille (Pharmacia, Piscataway, N.J.) fut prélavée dans le tampon de dislocation 100 NP-40 et ensuite équilibrée dans le tampon d'adsorption (Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M, aprotinine 1%, NP-40 0,5%).
- 5 L'extrait viral clarifié fut adsorbé avec de la Sepharose lectine de lentille pendant 42 heures à 4°C. Le matériau non adsorbé fut éliminé par lavage avec du tampon d'adsorption en excès. L'élution du matériau adsorbé fut réalisée avec de l'alpha méthyl mannoside 0,2 M dans du tampon d'adsorption.
- 10 L'éluant fut dialysé contre PBS pour éliminer le sucre et le matériau fut réadsorbé sur la Sepharose de lectine de lentille.

Le complexe de Sepharose de lectine de lentille-glycoprotéine fut utilisé pour immuniser des souris BALB/c par trois injections intrapéritonéales sans adjuvant et 15 données séparément sur une période de 2-3 semaines. Des rates furent éliminées des souris immunisées, qui démontraient la présence d'un anticorps circulant sur les glycoprotéines de HIV par immunoblot, RIP et/ ou ELISA.

- 20 Les protocoles utilisés pour la production de lignées cellulaires étaient généralement ceux de Kohler et Milstein (Nature 256:495 (1985)) avec les modifications de Goldstein L.C. et autres (Infect. Immun. 38:273 (1982)). Les lymphocytes B spléniques des souris immunisées furent fusionnés avec 25 des cellules de myélome NS-1 utilisant 40% (poids/volume) de polyéthylène glycol. Après la fusion, le mélange de cellules fut remis en suspension dans un milieu HAT (milieu RPMI - 1640 supplémenté avec 15% de sérum de veau foetal, de l'hypoxanthine 1×10^{-4} M, de l'aminoptérine 4×10^{-7} M et de 30 la thymidine $1,6 \times 10^{-5}$ M) pour choisir la croissance des cellules hybrides, et ensuite le mélange fut délivré dans des plateaux de microculture à 96 puits à une concentration de $1 \text{ à } 3 \times 10^6$ cellules/ml et incubé à 37°C dans une atmosphère humide contenant 6% de CO₂. Les cultures furent alimen- 35 tées par remplacement d'une moitié du surnageant avec du

milieu HAT frais. Les puits furent observés en utilisant un microscope inversé pour les indications de prolifération de cellules et lorsque les cellules étaient d'une densité suffisante les surnageants furent testés pour l'anticorps

5 anti-LAV.

Les puits contenant des cellules hybrides produisant un anticorps vis-à-vis de LAV furent identifiés par test ELISA en mesurant la liaison à soit le virus rompu entier purifié soit les protéines de fusion biologiquement exprimées.

10 Des tests ELISA utilisant du virus rompu furent réalisés sur des plaques LAV EIA (Genetic Systems, Seattle, Washington). Les plaques furent incubées avec des fluides de culture de cellule à 37°C pendant 45 minutes et ensuite lavées trois fois avec 0,5% de Tween 20 dans une solution saline tamponnée
15 au phosphate (PBS-Tween).

De l'IgG anti-souris chèvre-peroxydase (dilution 1:2.000 dans PBS-Tween; Zymed Laboratories, Inc., San Francisco Sud, Californie) fut ajouté (100 µl par puits), et les plaques furent incubées pendant 45 minutes à 37°C et
20 lavées comme ci-dessus. Un substrat (acide citrique 0,025 M, phosphate de sodium dibasique 0,05 M, pH 5 contenant 14 mg de o-phénylènediamine et 10 µl de peroxyde d'hydrogène 30% par 50 ml) fut ajouté et les plaques furent incubées pendant
30 minutes à température ambiante dans le noir. La réaction
25 fut arrêtée avec de l'acide sulfurique 3N, et des réactions colorimétriques furent quantifiées avec un lecteur automatique de microplaques. Les puits qui donnaient des résultats positifs furent sous-clonés par dilution limitée, retestés pour la spécificité, puis étendus.

30 Les anticorps monoclonaux sécrétés par les lignées de cellules hybrides résultantes furent ensuite caractérisés en ce qui concerne la spécificité et la réactivité par immunoblot, immunoprécipitation et test ELISA en utilisant du virus LAV rompu, des protéines de fusion LAV recombinantes et des
35 peptides LAV de synthèse. Tous les anticorps furent déterminés

comme étant de l'isotype IgG₁. Des lignées cellulaires HIV-gp110-1, HIV-gp110-2 et HIV-gp110-3 ont été déposées auprès de (l'American Type Culture Collection) avant le dépôt de cette demande et sont référencées sous les N°s ATCC
5 HB 9175, HB 9176 et HB 9177 respectivement.

Les protéines de fusion recombinantes testées pour la réactivité ont précédemment été appelées ENV2, ENV3, ENV4 et ENV5. La protéine ENV2 est exprimée à partir de pENV2 (ATCC N° 53071), qui est une région de LAV de la paire de bases
10 bp 6598 à bp 7178 (numérotation selon Wain-Hobson et autres Cell 44:9 (1985)), ENV3 est exprimée à partir de pENV3 (ATCC N° 53072) qui comprend la région LAV de bp 7178 à bp 7698; ENV4 est exprimée à partir de pENV4 (ATCC N° 53073), et comprend bp 7698 à bp 8572; et ENV5 est exprimée à
15 partir de pENV5 (ATCC N° 53074) qui comprend la région LAV bp 5889 à bp 7698.

Assemblage de peptides de synthèse

Les peptides I (29) et VIII (110-2-2) furent assemblés sur une résine de benzhydrylamine (polystyrène/divinylbenzène)
20 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, Californie). Le peptide V (177) fut assemblé sur une résine p-butyloxy-carbonyl(Boc)-éthylbenzylcystéine-phénylacétamidométhyl (PAM) polystyrène/divinylbenzène. Des couplages d'anhydride symétriques furent réalisés dans un synthétiseur 430A
25 (Applied Biosystems). De la cystéine fut ajoutée comme un premier résidu dans les deux peptides.

Des couplages de dicyclohexylcarbodiimide en présence d'hydroxybenzotriazole furent utilisés pour l'asparagine et la glutamine. Une protection de chaîne latérale ou ramifiée
30 à base de benzyle et une protection d'alpha-amine Boc furent utilisées. D'autres protections de chaîne latérale utilisées de manière habituelle étaient constituées par tryptophane (formyl) Boc, sulfoxyde de méthionine Boc, arginine (tosyl) Boc, cystéine (méthylbenzyl) Boc, histidine (tosyl) Boc,
35 lysine (chlorobenzoyloxycarbonyl) Boc et tyrosine (bromobenzyl-

oxycarbonyl) Boc.

Lorsque les peptides furent radiomarqués, ce le fut par acétylation du terminal amino avec de l'acide acétique-³H et un excès de dicyclohexylecarbodiimide.

5 La déprotection et le clivage du peptide à partir de la résine furent effectués par le protocole HF "bas-élevé" Tam (Tam et autres, supra). L'extraction de la résine fut faite avec de l'acide acétique 5% et l'extrait fut soumis à une chromatographie de filtration par gel dans de l'acide
10 acétique 5%.

Les peptides de synthèse HIV testés pour la réactivité avec les anticorps monoclonaux comprenaient les peptides 29, 36 et 39. Le peptide 29 est codé par la région de génome LAV_{BRU} à partir de 6688 bp jusqu'à 6750 bp; le peptide 36
15 est codé par la région depuis environ 7246 bp jusqu'à 7317 bp; et le peptide 39 est codé par la région depuis environ 7516 bp jusqu'à 7593 bp. Les peptides 36 et 39 sont décrits en détail dans le brevet américain N° 4 629 783 qui est donné ici à titre de référence.

20 Les peptides de blocage, IX-XV furent assemblés essentiellement comme décrit ci-dessus sur une résine de méthyl-benzhydrylamine (polystyrène/divinylbenzène) (Applied Biosystems, Inc., Foster City, Californie). Les couplages d'anhydride symétriques furent réalisés sur un appareil de
25 synthèse 430A (Applied Biosystems). Les couplages de dicyclohexylcarbodiimide en présence d'hydroxylbenzotriazole furent utilisés pour l'asparagine. Pour la protection, une protection par Boc alpha-amine et par chaîne latérale à base de benzyle fut utilisée, tandis que Boc (bromobenzyloxy-
30 carbonyl) fut utilisé spécifiquement pour les chaînes ramifiées de tyrosine. L'acétylation, si elle est présente, fut réalisée en utilisant de l'anhydride acétique ou de l'acide acétique glacé et du dicyclohexylcarbodiimide. La déprotection et le clivage du peptide de la résine furent accomplis par le
35 protocole HF "haut" standard (Stewart et autres, voir supra).

L'extraction de la résine fut réalisée avec 50% d'acide acétique, et l'extrait fut ensuite soumis à une chromatographie de filtration sur gel dans 20% d'acide acétique. Comme désiré, une chromatographie liquide à haute performance fut
5 réalisée sur une colonne Vydac C18 (Rainin Instrument Co., Emeryville, CA) en utilisant un acide trifluoacétique 0,1%, gradient d'acétonitrile.

Immunoblot

La caractérisation par immunoblot fut réalisée sur
10 des surnageants de clone ou un fluide ascite en utilisant du virus LAV purifié et des protéines de fusion recombinantes comme antigènes. Les antigènes furent d'abord séparés par électrophorèse sur gel à gradient polyacrylamide (7-15%) et transférés sur une membrane de nitrocellulose (NCM) par
15 électrophorèse pendant 4 heures à 25 V dans du phosphate de sodium 25 mM (pH 7). Après transfert, le NCM fut bloqué pour empêcher les interactions non spécifiques par incubation dans PBS-Tween ou Blotto (5% lait sec non gras dans PBS) pendant une heure à la température ambiante. Le NCM fut incubé
20 avec du surnageant de culture de cellules ou un fluide ascite dilué dans PBS-Tween pendant une heure à la température ambiante et fut rincé avec trois changements de PBS-Tween. Dans la seconde phase, le NCM fut incubé avec une peroxydase de radis noir IgG anti-souris chèvre, diluée dans PBS-Tween
25 pendant une heure à la température ambiante. Cette incubation fut suivie par un lavage avec PBS-Tween et ensuite une immersion dans une solution de développement en couleur de peroxydase de radis noir (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Californie) pendant 20 minutes. La réaction fut arrêtée par
30 immersion dans de l'eau déionisée. La réactivité de l'anticorps monoclonal fut comparée à un sérum témoin positif réagissant avec le virus rompu purifié ou une protéine de fusion exprimée. Les résultats montraient que tous les anticorps se liaient à
35 préparations de virus rompus ou séparés. Les anticorps 110-1

et 110-2 reconnaissaient également la protéine de fusion ENV3, tandis que les anticorps 110-3, 110-4, 110-5 et 110-6 formaient un immunocomplexe ENV2.

Immunoprécipitation

5 Des extraits de virus pour précipitation radioimmune furent préparés à partir de cellules CEM infectées avec l'isolat LAV_{BRU} de HIV apte à une croissance lytique par passage continu. Lorsque les effets cytopathes précoces étaient évidents, les cellules furent transférées dans un milieu marquant contenant de la méthionine ³⁵ [S] (0,05 mCi/ml) ou de la glucosamine ³ [H] (0,025 mCi/ml), puis incubées pendant 24 heures jusqu'à ce que la plupart des cellules aient été lysées, ce qui relâche le virus dans le surnageant de la culture. Le virus fut transformé en pilules ou comprimés (une heure à 100.000 xg) à partir du surnageant dépourvu de cellules, et des extraits de détergent furent préparés dans un tampon P-RIPA (solution saline tamponnée au phosphate contenant 1% de Triton X-100, 1% de déoxycholate, 0,1% de SDS et 1% d'aprotinine). Des extraits similaires furent préparés à partir des surnageants de cellules CEM non infectées.

15 Les tests d'immunoprécipitation furent réalisés avec 100 µl d'extrait de virus incubé avec 100 µl de surnageant de culture à partir de lignées cellulaires hybrides pendant 25 une heure sur de la glace. Quatre microlitres d'Ig anti-souris lapin (Zymed Laboratories, So. San Francisco, Californie) furent ajoutés à chaque échantillon et incubés pendant 30 minutes. De l'immunoprécipitine (100 µl; Bethesda Research Laboratory, Bethesda, Maryland) remise en suspension dans un tampon P-RIPA contenant 1% d'ovalbumine fut ajoutée à chaque échantillon et incubée pendant 30 minutes supplémentaires. Les complexes liés furent lavés et séparés par électrophorèse sur gel polyacrylamide-SDS (15% acrylamide; gel OATD). A la suite de l'électrophorèse, les gels furent fixés, trempés dans le produit "Enhance" (New England Nuclear, Boston, MA), 35

séchés et exposés à un film Kodak XR-5. Un sérum positif de référence qui immunoprécipitait toutes les protéines virales HIV fut mis en réaction avec des surnageants de cellules CEM faussement infectées et infectées par virus
5 comme témoins négatifs et positifs.

Les résultats ont montré que tous les six anticorps monoclonaux immunoprécipitaient spécifiquement gp110 et gp150.

Test d'immunoabsorbant lié par enzyme

10 Pour établir que les épitopes gp110 étaient reconnus par les anticorps monoclonaux de la présente invention, des surnageants de culture à partir de lignées cellulaires hybrides ou fluides ascites furent en outre caractérisés par réactivité dans le test ELISA avec des protéines de
15 fusion biologiquement exprimées et des peptides de synthèse. Les processus étaient les mêmes que ceux décrits ci-dessus à l'exception que les protéines de fusion ou les peptides de synthèse remplaçaient le virus purifié comme l'antigène adsorbé sur la surface des puits de microtitrage.

20 Lorsque des peptides furent utilisés comme antigène, le protocole de mise sur plaque était le suivant. Le peptide lyophilisé fut dissous dans de la guanidine 6M HCl. Juste avant la mise sur plaque dans des plaques de 96 puits, la solution de guanidine fut diluée dans un tampon de bicarbonate/
25 carbonate 0,05 M (pH 9,6) jusqu'à une concentration finale de peptide allant jusqu'à 100 µg/ml. Un volume de 50 µl du peptide dilué fut placé dans chaque puits de microtitrage et les plaques furent ensuite incubées toute la nuit à 4°C. La solution de peptide en excès fut "secouée", les plaques
30 fermées ou bloquées Blotto, et le processus décrit ci-dessus fut suivi pour le reste du test ELISA. De manière similaire, une protéine recombinante fut diluée jusqu'à une concentration finale d'environ 2 µg/ml dans un tampon bicarbonate/carbonate
0,05 M (pH 9,6) avant que le même processus soit suivi.

35 Les résultats sont donnés dans le Tableau II. Les

anticorps monoclonaux produits par les lignées de cellules HIV-gp110-1 et HIV-gp110-2 réagissaient avec ENV3, ENV5, le peptide 36 et le virus disloqué. Les anticorps provenant des lignées de cellules HIV-gp110-3, HIV-gp110-4, HIV-gp110-5 et HIV-gp110-6 réagissaient avec ENV2 et le peptide 29 aussi bien que le virus disloqué ou rompu.

TABLEAU II

Test ELISA montrant la réactivité des anticorps monoclonaux avec des protéines recombinantes et des peptides de synthèse

10

	<u>Protéine de fusion recombinante</u>				<u>Peptide de synthèse</u>			<u>LAV</u> <u>té-</u> <u>moin</u>	<u>CEM</u> <u>té-</u> <u>moin</u>
	<u>ENV2</u>	<u>ENV3</u>	<u>ENV4</u>	<u>ENV5</u>	<u>29</u>	<u>36</u>	<u>39</u>		
110-1	0,077	3,000	0,113	3,000	ND	2,421	0,054	0,908	0,125
110-2	-0,003	3,000	0,000	3,000	ND	2,305	-0,005	1,214	0,009
15 110-3	3,000	0,011	ND	ND	3,000	ND	0,017	0,363	0,046
110-4	3,000	0,020	ND	ND	3,000	ND	0,016	0,383	0,067
110-5	3,000	0,014	ND	ND	3,000	ND	0,016	0,368	0,025
110-6	3,000	0,033	ND	ND	1,937	ND	0,017	0,486	0,032

Les résultats dans le Tableau II montrent que les anticorps monoclonaux 110-1 et 110-2 reconnaissent un déterminant antigénique codé par une séquence ADN dans la région pENV3, plus particulièrement par la région du génome de HIV définie par une séquence d'acides aminés dans le peptide 36. Autrement dit, les anticorps monoclonaux gp110-1 et 110-2 se lient à une région de peptide de gp110 codée dans 7246 bp à 7317, comme cela est mis en évidence par la formation de complexes immuns avec le peptide 36 et ENV3. Cette région du génome de HIV a précédemment été identifiée comme conservée, c'est-à-dire peu de changement dans la séquence d'ADN dans la région codée par le peptide 36 parmi différents isolats viraux à partir de divers lieux géographiques. Voir Starcich et autres, Cell 46:637 (1986). Par contraste, les anticorps monoclonaux gp110-3, -4, -5 et -6 se lient à des peptides de

20
25
30

HIV définis par la région codée par le peptide 39 de 6688 pb à environ 6750 bp. La région dans gp110 définie par le peptide 29 a été identifiée comme contenant plusieurs substitutions de nucléotide parmi différents isolats de virus. Les anticorps monoclonaux qui se lient sélectivement aux polypeptides gp110 qui contiennent des épitopes conservés, tels que les anticorps 110-1 et 110-2 peuvent posséder une utilité renforcée dans différentes circonstances, telles que dans la chromatographie d'affinité etc. Egalement, dans un test ELISA, le peptide 110-2-2 réagissait avec des sérums de l'individu à partir duquel LAV-2 fut isolé.

Test immunofluorescent indirect

Des tests immunofluorescents indirects utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre l'antigène gp110 de HIV furent réalisés sur des cellules vivantes et fixées par l'acétone. Des cadres ou châssis fixés par acétone, préparés à partir de cellules CEM infectées par LAV furent incubés avec un surnageant de culture dilué ou un fluide ascite pendant une heure à 37°C, tandis que des cellules vivantes furent incubées avec un surnageant de culture ou un fluide ascite pendant une heure à 4°C avant que les cellules soient placées sur des cadres ou analogues et fixées par l'acétone. Les deux méthodes utilisaient de l'IgG anti-souris marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine pour détecter les cellules portant l'antigène gp110 réactif. L'anticorps monoclonal HIV-gp110-1 a donné des résultats positifs en utilisant soit des cellules vivantes soit des cellules infectées par LAV fixées par l'acétone.

EXEMPLE II

30 Neutralisation du pouvoir infectieux de HIV par
des anticorps monoclonaux anti-gp110

Cet exemple décrit et caractérise la neutralisation du pouvoir infectieux de HIV en utilisant des anticorps monoclonaux qui se lient à gp110 et des peptides dans gp110. Les résultats indiquent que les anticorps monoclonaux Gp110-3,

-4, -5 et -6 possèdent une activité neutralisante, et que gp110-3 et -4 possèdent des niveaux particulièrement élevés d'activité neutralisante.

Test de neutralisation

5 Un test de neutralisation sensible fut développé pour quantifier l'effet des anticorps monoclonaux sur le pouvoir infectieux de HIV. Une lignée cellulaire CD4+ hautement susceptible ou sensible à l'infection HIV, CEM fut choisie comme cible pour des comparaisons du pouvoir infectieux. Un
10 fluide ascite préparé comme décrit dans l'Exemple I, ou sa fraction IgG purifiée en utilisant une précipitation de sulfate d'ammonium, fut désactivé à la chaleur à 56°C pendant 30 minutes, puis dilué comme requis dans un milieu RPMI contenant 10% de sérum de veau foetal . Une suspension de
15 LAV_{BRU} souche HIV fut moissonnée depuis des cultures d'environ 4 jours de CEM dans une phase de croissance logarithmique, filtrée au travers de filtres de 0,2 ou 0,45 micron, mise sous forme d'aliquotes et congelées à -70°C. Un aliquote fut décongelé, titré pour déterminer le TCID₅₀, et des tests
20 subséquents ont été réalisés avec des aliquotes fraîchement décongelés, dilué à 1:500 dans un milieu de culture jusqu'à une concentration d'approximativement dix fois la quantité requise pour infecter 50% de cellules CEM dans la culture (10 TCID₅₀). La suspension de virus fut mélangée avec un
25 volume égal (250 µl) d'une préparation d'anticorps monoclonal selon cinq dilutions depuis 1:5 à 1:9,765,625. Le mélange virus/anticorps fut incubé pendant 45 minutes à 37°C et ensuite dupliqué de 1:5 à 1:9,765,625. Le mélange virus/
30 anticorps fut incubé pendant 45 minutes à 37°C et ensuite des échantillons dupliqués de 200 µl furent utilisés pour inoculer des puits contenant 1 ml d'approximativement 2×10^5 cellules CEM par puits. Les cultures furent incubées à 37°C dans une atmosphère de 5% de CO₂ humidifiée pendant 14 jours. Les cellules furent récoltées, mises en comprimés, et lysées avec
35 1% de Triton X-100 dans PBS pendant environ 10 minutes. La

- quantité de virus (ou d'antigène viral) présente dans les cellules lysées fut quantifiée en utilisant un immunotest enzyme "sandwich" à capture d'antigène HIV sensible. Le titrage de l'activité neutralisante, s'il y en a, fut déterminé comme la réciproque de la dilution d'anticorps monoclonal qui inhibait la production d'antigène sur plus de 50% de cultures témoin de virus incubées sans anticorps, ou avec un anticorps monoclonal du même isotype qui avait précédemment été montré comme manquant d'activité neutralisante.
- 10 Le test de capture antigénique HIV décrit ci-dessus utilisait deux anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes p25 comme réactifs de capture. Ces lignées de cellules hybridomes furent produites par les méthodes décrites ci-dessus avec des modifications mineures, y compris en utilisant une protéine de fusion recombinante de gag purifiée comme l'immunogène et caractérisant les anticorps monoclonaux résultants en ce qui concerne la spécificité et la réactivité utilisant les protéines de fusion recombinantes précédemment appelées GAG-1 , GAG-2 et GAG-3 , et le peptide synthèse 141.
- 20 La protéine GAG-1 est exprimée à partir de pGAG-1 (ATCC N° 53379), GAG-2 est exprimée à partir de pGAG-2 (ATCC N° 53111) et GAG-3 est exprimée à partir de pGAG-3 (ATCC N° 53112). Le peptide de synthèse 141 est codé par la région de génome LAV_{BRU} correspondant aux résidus d'acides aminés 198-242.
- 25 Des anticorps monoclonaux produits par des lignées de cellules hybridomes p25-2 et p25-3 ont été trouvés comme réagissant avec des protéines de fusion recombinantes GAG-1, GAG-2 et GAG-3 et le monoclonal de p25-3 est également réactif avec le peptide de synthèse 141.
- 30 Pour réaliser le test de capture d'antigène, les réactifs de capture furent d'abord adsorbés sur un support solide. Un fluide ascite dérivant des lignées de cellules hybridomes p25-2 et p25-3 fut dilué 1:5.000 dans un tampon Tris 25 mM, pH 8,5 et 200 µl furent placés dans des puits de
- 35 plaques à micropuits. Les puits furent fermés de manière

étanche et incubés pendant environ 16 heures à 4°C. La solution fut éliminée des puits par aspiration avant d'ajouter une solution de blocage de 0,3% Blotto dans BBS. Le blocage fut réalisé pendant 15 minutes à la température ambiante.

5 La solution de blocage fut aspirée et l'échantillon fut ajouté. Deux cents microlitres de la suspension cellulaire lysée et 5 µl de conjugat de détection, préparé comme décrit ci-dessous, furent ajoutés à chaque puits. Les plaques ou

10 bandes de puits furent incubées pendant 2 heures à 37°C, après quoi la suspension fut aspirée et les puits lavés quatre fois avec du tampon (0,05% Tween 20 dans PBS). Le produit conjugué de détection fut préparé comme suit. Les anticorps monoclonaux p25-6 et p25-7 furent conjugués avec

15 la peroxydase de radis noir (HRP) suivant un rapport molaire 3:1 (Ab:HRP) pendant trois heures en utilisant une méthode d'oxydation au périodate (Nakane et autres, J. Histochem. Cytochem. 22:1084 (1974). Les produits conjugués furent dilués 1:1500 dans 2,5% (poids/volume) de lait sec non gras, 0,01% de thimérosal et 0,05% d'anti-mousse A dans du citrate

20 de sodium 20 mM. Le restant du test ELISA fut réalisé comme décrit dans l'Exemple I.

Les résultats de l'essai de l'activité neutralisante avec les anticorps gp110-3, -4, -5 et -6 sont les suivants. Les titres les plus élevés qui retenaient l'activité neutralisante furent déterminés comme étant : gp110-3 = 15,625;

25 gp110-4 = 9,765,625; gp110-5 = 125; et gp110-6 = 625.

Etant donné la variabilité génétique prédite de la région définie par le peptide 29, le pouvoir de l'anticorps monoclonal gp110-4 à reconnaître d'autres isolats de HIV fut

30 examiné. Les tests d'immunofluorescence furent réalisés comme décrit ci-dessus. L'anticorps gp110-4 détectait un antigène dans des cultures d'au moins 3 à 16 isolats HIV testés.

L'anticorps gp110-4 était capable de neutraliser des

35 virus isolés sur quinze semaines à partir d'un chimpanzé

inoculé avec du LAV_{BRU} comme animal témoin dans un essai de vaccin SIDA. L'anticorps monoclonal était capable de neutraliser les isolats même si l'animal avait des anticorps de sérum qui neutralisaient HIV in vitro, et avait développé
5 une réponse mesurable immunitaire engendrée par les cellules, à l'infection HIV. Ceci indique un défaut de mouvement antigénique in vivo pour l'épitope reconnu par l'anticorps gp110-4.

EXEMPLE III

10 Neutralisation du pouvoir infectieux de HIV par
un cocktail d'anticorps monoclonaux anti-gp110
et anti-p25

Cet exemple décrit la neutralisation du pouvoir infectieux HIV en utilisant des anticorps monoclonaux qui se lient
15 à gp110 et aux peptides dans gp110 en combinaison avec des anticorps monoclonaux qui se lient à p25 et des peptides dans p25, lesquels seuls montrent peu ou pas d'activité neutralisante. Les résultats indiquent que l'anticorps monoclonal gp110-2 en combinaison avec soit p25-6 ou p25-7 possède des
20 niveaux particulièrement élevés d'activité neutralisante.

Des lignées de cellules hybridomes p25-6 et p25-7 ont été produites par les méthodes décrites ci-dessus avec des modifications qui comprennent l'utilisation du virus disloqué ou rompu inactivé ou ou une protéine de fusion recombinante de gag purifiée exprimée dans E. Coli, comme immuno-
25 gène, et caractérisant les anticorps monoclonaux résultants en ce qui concerne la spécificité et la réactivité, utilisant les protéines de fusion recombinantes précédemment appelées GAG-1, GAG-2 et GAG-3 et les peptides de synthèse 15, 88,
30 150, 147 et 148. Les peptides de synthèse sont codés par la région de génome LAV_{BRU} correspondant aux résidus d'acides aminés comme suit : peptide 15, résidus d'acides aminés 329 à 350; peptide 88, résidus d'acides aminés 315 à 350; peptide 150, résidus d'acides aminés 318 à 363; peptide 147,
35 résidus d'acides aminés 278 à 319; et peptide 148, résidus

d'acides aminés 290 à 319. Les anticorps monoclonaux produits par les lignées de cellules hybridomes p25-6 et p25-7 réagissent avec la protéine recombinante GAG-3, p25-6 réagit avec les peptides de synthèse 147 et 148, et p25-7 réagit avec
5 les peptides de synthèse 15, 88, et 150.

Des essais de neutralisation furent réalisés comme décrit ci-dessus, sauf lorsque des cocktails ont été utilisés; des anticorps monoclonaux d'individus furent d'abord dilués 1:5 dans un milieu de culture et ensuite mélangés suivant
10 des rapports égaux pour donner une dilution finale de 1:10. Le restant de l'essai fut réalisé comme décrit ci-dessus.

Les anticorps monoclonaux gp110-2, p25-6 et p25-7 montrent moins de 50% d'activité neutralisante lorsqu'ils sont utilisés seuls. Lorsqu'ils sont utilisés dans un cocktail
15 qui comprend les anticorps monoclonaux gp110-2 avec p25-6 ou gp110-2 avec p25-7 suivant une dilution 1:10, il se produit une neutralisation totale. Un cocktail comprenant les anticorps monoclonaux p25-6 en combinaison avec p25-7 a donné un taux d'activité neutralisante de 60-90%.

20

EXEMPLE IV

Immunopotentialité du peptide 29 et ses homologues

Le pouvoir du peptide 29 et des peptides homologues, y compris le peptide 177, à stimuler une réponse immunitaire contre HIV fut d'abord examiné dans deux souches de souris.
25 Les processus pour la préparation des immunogènes de peptide, les protocoles d'immunisation, et pour la caractérisation de la réponse immunitaire engendrée sont donnés en détail ci-dessous.

Le peptide 29 fut préparé pour immunisation par conjugaison avec une thyroglobuline purifiée. La thyroglobuline
30 peut être dérivée avec du N-succinimidyl-4-(N-maléimido-méthyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) pour conjugaison selon le processus souligné dans le brevet américain N° 4 629 783, colonne 10, lignes 28 à 51. Comme second immunogène, la thyro-
35 globuline fut dérivée avec du glutaraldéhyde comme suit.

De la thyroglobuline porcine, 27 mg, fut dissoute dans 1 ml de bicarbonate de sodium 0,1 M, auquel 8,3 μ l d'une solution de glutaraldéhyde 25% furent ajoutés goutte à goutte, et le mélange fut agité toute la nuit à la température ambiante.

5 1 ml de tampon de bicarbonate/carbonate de sodium, pH 9,3, fut ajouté à la solution et ensuite dialysé pendant 8 heures sur 2 litres du même tampon à 4°C, avec un changement complet du dialysat après 4 heures. Le peptide 29 fut ensuite ajouté à la thyroglobuline dérivée suivant approximativement un
10 excès molaire de 100, et le mélange fut agité toute la nuit à la température ambiante. Le glutaraldéhyde qui n'avait pas réagi fut bloqué avec 200 μ l d'une solution de lysine 0,2 M, lequel mélange fut agité pendant plusieurs heures (ou pendant toute la nuit) à la température ambiante. Le conjugat de
15 thyroglobuline-peptide fut ensuite dialysé d'une manière extensive sur du PBS à 4°C.

Deux souches de souris (noire C57 et BALB/c) furent inoculées avec des peptides préparés par chaque méthode de conjugaison. Tous les animaux avaient un âge d'environ
20 2-4 semaines au moment de l'inoculation. Les voies d'inoculation comprennent le bout de la patte, une scarification de la queue, une administration sous-cutanée, intranasale, ou intrapéritonéale. L'inoculum consistait de 25 μ g de peptide conjugué en suspension dans 0,5 ml d'adjuvant de Freund
25 complet, avec des inoculations renforcées et répétées aux semaines 2, 3 et 5, avec le même immunogène en suspension dans un adjuvant de Freund incomplet. Des échantillons de sérum de souris individuelles furent recueillis avant immunisation, 4 jours après l'immunisation renforcée à 3 semaines, et
30 4 jours après l'inoculation renforcée à 5 semaines. Les échantillons de sérum furent analysés pour les anticorps contre les peptides homologues ou le virus entier par "screening" dans le test ELISA. Les sérums présentant une activité d'anticorps pour LAV sont en outre triés pour
35 l'activité de neutralisation, ce après quoi on analyse les

sérums dans des immunoblots pour l'antigène LAV rompu et des tests de radioimmunoprécipitation avec gp110 radiomarqué.

Les résultats des immunisations indiquaient que les souris immunisées avec le peptide 29 développaient des anticorps réactifs avec le peptide 29 et le virus LAV-1 rompu ou brisé dans les tests ELISA. La conjugaison du peptide 29 à travers du glutaraldéhyde révélait généralement un titre plus élevé d'anticorps pour le peptide 29 dans des souris Balb/c, bien que la conjugaison à travers de la maléimide faisait mettre au jour avec succès des anticorps anti-peptide 29 dans quelques souris Balb/c. Des souris immunisées avec le peptide 177 développaient des anticorps pour le peptide, et une conjugaison du peptide 177 à travers du glutaraldéhyde était meilleure pour mettre au jour une réponse immunologique. Des souris C57 étaient plus sensibles à une stimulation immune avec le peptide 177 que les souris Balb/c. Des souris immunisées avec le peptide 110-2-2 de LAV-2 développaient des anticorps contre 110-2-2 et le virus LAV-2 comme montré par les tests ELISA. Un peptide 110-2-2 conjugué à travers du glutaraldéhyde était immunogénique à la fois dans des souris Balb/c et C57, bien que les titres pour le peptide 110-2-2 soient généralement plus élevés dans les souris Balb/c que C57, tandis que les titres au virus LAV-2 étaient généralement plus élevés dans les souris C57 que dans les souris Balb/c.

Généralement, les échantillons de sérum à partir de souris immunisées qui (i) présentent des anticorps vis-à-vis du virus entier; (ii) sont capables de neutraliser HIV, tel que dans les tests décrits dans l'Exemple II; et (iii) réagissent avec le peptide 29 dans le test ELISA, indiquent de manière cumulative l'efficacité de l'utilisation du peptide 29 dans une formulation de vaccin.

EXEMPLE VSéparation d'immunoaffinité d'un anticorps
monoclonal utilisant gp110

Les anticorps monoclonaux vis-à-vis de l'antigène
5 gp110 de HIV peuvent être utilisés dans des processus de
séparation d'immunoaffinité pour purifier sensiblement les
protéines recombinantes d'expression bactérienne. Si la
protéine exprimée est sécrétée par les bactéries, la protéine
peut être isolée du surnageant de la culture; si la protéine
10 n'est pas sécrétée, la rupture des cellules bactériennes
peut être nécessaire.

Le plasmide pENV-5 (ATCC N° 53074) code une fraction
 majeure de l'extrémité carboxyle de gp110 et une fraction du
terminal amino de gp41 de LAV inséré dans le vecteur
15 d'expression trp . E. Coli C600 transformé par ce vecteur
exprime mais ne sécrète pas la protéine gp110.

Des E. Coli C 600 contenant le plasmide pENV-5 sont
soumises à la croissance dans un milieu contenant du
tryptophane (20 µg/ml) et de l'ampicilline (100 µg/ml) pen-
20 dant toute une nuit à 37°C avec aération. Les cultures de
la nuit sont alors inoculées suivant 1:100 dans un milieu
minimal frais contenant de l'ampicilline (100 µg/ml) mais
pas de tryptophane. Ces cultures croissent avec aération
pendant 2-3 heures (jusqu'à la phase logarithmique précoce)
25 à 37°C. L'inducteur, l'acide 3-B-indole-acrylique (Sigma
Chemical Co., Saint-Louis, MO) est ajouté à une concentration
finale de 20 µg/ml à partir de stocks fraîchement obtenus de
20 mg/ml dans 95% d'éthanol. Les cultures induites sont
ensuite soumises à la croissance à 37°C avec une aération
30 pendant 4 à 5 heures puis mises en comprimés et, facultative-
ment, congelées. Les rendements de protéines provenant de
pENV-5 sont typiquement moindres que 1 mg/litre.

Les cellules bactériennes en grains ou pilules sont
lysées en utilisant du tampon P-RIPA (PBS contenant 1% de
35 Triton X-100, 1% de désoxycholate, 0,1% de sulfate de sodium

dodécyle, et 1% d'aprotinine) qui provoquera la lyse des cellules E. Coli. La suspension peut être soumise à des ondes sonores pour cisailer l'ADN et l'ARN, ce après quoi on effectue une centrifugation pour éliminer les particules.

5 Une phase de dilution ou de concentration peut être nécessaire pour standardiser la concentration de protéine.

L'anticorps monoclonal HIV-gp110-1 est précipité initialement à partir de fluides ascites ou de surnageants de culture de cellules à la température ambiante ou dans le

10 froid avec des solutions de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou Na_2SO_4 tamponnées à pH 7,3 jusqu'à saturation finale de 33 ou 18% respectivement. Les protéines précipitées sont éliminées par centrifugation et redissoutes dans PBS et précipitées une seconde

15 fois avec 33% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou 12-15% de Na_2SO_4 . Cette phase peut être répétée si nécessaire. Le comprimé est de nouveau dissous dans PBS et les sels en excès sont enlevés par filtration sur gel à travers une matrice de dessalage ou par dialyse exhaustive sur PBS.

L'anticorps monoclonal purifié 110-1 peut ensuite

20 être couplé à de la Sepharose activée par bromure de cyanogène. La quantité nécessaire de gel est gonflée dans une solution de $\text{HCl } 10^{-3}\text{M}$ sur un filtre de verre (1 g de matériau séché par congélation donne un volume final de gel d'approximativement 3,5 ml) et lavée pendant 15 minutes avec

25 la même solution, et l'anticorps est ajouté immédiatement après. En général, la réaction de couplage a lieu plus efficacement dans un intervalle de pH 8-10, mais un pH plus faible peut être utilisé si nécessaire pour la stabilité de l'anticorps. L'anticorps doit être dissous dans PBS ou un

30 tampon de borate ou bicarbonate/carbonate de force ionique élevée avec du $\text{NaCl } 150\text{ mM}$. La suspension d'anticorps et de Sepharose activée est agitée doucement pendant 2-4 heures à la température ambiante, ou toute la nuit à 4°C , et ensuite lavée sur un filtre de verre fritté avec tampon de couplage.

35 Tous les groupes actifs restants sont bloqués par traitement

avec de l'éthanolamine 1 M à pH 8 pendant 2 heures. Le produit final Sepharose-anticorps est ensuite lavé alternativement avec des solutions tampons à pH élevé et faible (tampon borate, 0,1M, pH 8,5, tampon acétate et NaCl 1M, 0,1M, pH 4, NaCl 1 M, respectivement) quatre ou cinq fois. Ce lavage élimine les traces de matériaux adsorbés de façon non covalente. La matrice de séparation d'immunoaffinité finie est stockée en dessous de 8°C en présence d'un agent bactériostatique convenable, tel que azide 0,01%.

10 L'addition de la suspension de protéine exprimée à la matrice de séparation d'immunoaffinité provoque l'élimination sélective de l'antigène gp110. On laisse le mélange interagir pendant 2 à 24 heures, de préférence 12-18 heures, avec oscillation ou agitation lente. Un système à colonne peut également être utilisé dans lequel la matrice d'immunoaffinité est versée sur une colonne, équilibrée et la suspension de protéine exprimée ajoutée lentement à la colonne. Après que la suspension de protéine a été ajoutée, l'écoulement peut être arrêté pour permettre une formation de complexe immuni-
20 taire maximum.

Le matériau non lié est lavé ou enlevé par séparation par un lavage extensif avec un tampon d'adsorption. Un filtre de verre fritté avec du vide peut être utilisé ou bien on utilise un écoulement au travers de la colonne. Le matériau
25 lié est ensuite élué en utilisant des tampons de pH faible ou élevé (tampon d'acétate, pH 4 ou tampon de borate, pH 8,6) ou bien un agent chaotropique.

EXEMPLE VI

Purification d'immunoaffinité de gp110 recombinant à partir d'un système d'expression de mammifère

30 Les anticorps monoclonaux de la présente invention trouvent une utilisation dans la purification d'immunoaffinité de gp110 recombinant exprimé par des cellules de mammifère. Les cellules de mammifère sont infectées avec des vaccins
35 recombinants (Mackett et autres, J. Virol. 49:857 (1984) qui

contiennent des séquences codant au moins la partie de gp110 qui est antigène et met à jour les anticorps de neutralisation.

Les vaccins recombinants sont construits selon la méthode décrite dans la demande de brevet américain N° 842 984 qui est donnée ici à titre de référence. Brièvement parlant, des séquences codant pour la glycoprotéine d'enveloppe de HIV sont insérées dans un vecteur plasmide (pGS20) en aval d'un élément témoin de transcription de vaccin. Ce gène chimérique est flanqué de séquences codant le gène (TK) de la thymidine kinase virale.

Des vecteurs de plasmide chimériques contenant un promoteur de virus de vaccin ligaturé au gène d'enveloppe LAV sont utilisés pour transformer la souche E. Coli MC1000. L'insertion des séquences LAV-env chimériques dans le génome de virus des vaccins fut réalisée par recombinaison in vivo, ce qui est rendu possible par le fait que les gènes chimériques dans les plasmides pv-env5 sont flanqués ou disposés à côté de séquences de virus de vaccin codant pour le gène TK. Ce plasmide est ensuite introduit dans des cellules précédemment infectées par un virus de vaccin du type sauvage et on laisse se produire la recombinaison entre les séquences TK sur le plasmide et les séquences homologues dans le génome viral de vaccin, ce qui assure l'insertion du gène chimérique. Des cellules de rein du Singe Vert d'Afrique (souche BSC-40, lignée dérivée de cellules BSC-1, ATCC N° CCL26) sont utilisées comme cellule hôte dans le système d'expression.

Les cellules BSC-40 confluentes sont infectées suivant un multiple d'infection de 10 par virus de vaccin recombinant. On laisse s'effectuer l'infection pendant 12 heures, auquel moment, les cellules sont récoltées, lavées une fois avec PBS, et recueillies par centrifugation. Les grains cellulaires sont remis en suspension dans un tampon de lyse (1% NP 40, 2,5% désoxycholate de sodium, NaCl 0,1 M, M Tris-HCl 0,01 M, pH 7,4, EDTA 1 mM), et le lysat est ensuite clarifié

par centrifugation. Une séparation d'immunoaffinité de la protéine recombinante exprimée est réalisée comme décrit ci-dessus pour le système d'expression bactérien, en utilisant l'anticorps monoclonal gp110-1. Les protéines produites par ce système d'expression ressemblent plus étroitement au gp110 HIV produit naturellement en raison du traitement et de la glycosylation fournis par les cellules de mammifère.

EXEMPLE VII

Inhibition de l'infection par HIV avec des peptides bloquants

10

L'efficacité des peptides bloquants dans l'inhibition de l'infection des cellules de tissus par la souche LAV_{BRU} de HIV fut étudiée en utilisant une modification du protocole pour l'évaluation du peptide T, comme publié par Pert et autres, voir supra. Les tests d'inhibition préférés de HIV consistent à combiner des volumes égaux de peptide bloquant et de cellules CEM ($2,5 \times 10^5$) dans un milieu (RPMI, 10% FCS et 2 mg/ml polybrène), et à incuber pendant 45 minutes à 37°C. Du virus est ensuite ajouté à des doses différentes (10, 50, 500 TCID 50) le mélange est incubé pendant 14 jours à 37°C et ensuite le supernageant testé pour la production d'antigène du virus (par exemple noyau p25).

Une préincubation des cellules CEM avec les peptides avant l'addition de virus dans les cultures renforce l'effet d'inhibition dans les tests. L'inhibition fut trouvée comme étant dépendante de la dose de virus, et présente une forte activité à des doses moyennes et faibles, mais moins d'effet pour des doses de virus très élevées.

Environ 60% à 90% d'inhibition de la production d'antigène dans les expériences avec doses de virus faibles, furent obtenus avec du peptide T. Des expériences supplémentaires avec des peptides X-XV, typiquement à COOH-terminal amidé et NH₂-terminal acétylé, ont donné des résultats similaires, tandis que le peptide XI était particulièrement efficace sur un large intervalle de dose. Les anticorps

35

neutralisants peuvent être ajoutés soit pendant la période de préincubation ou au moment où le virus est ajouté pour produire une inhibition synergique ou additive de la production d'antigène viral.

5 On comprend de ce qui précède que les anticorps monoclonaux et peptides, comprenant les peptides bloquants, de la présente invention, constituent des méthodes perfectionnées pour neutraliser et/ou inhiber les infections par HIV. Ceci permet à des compositions thérapeutiques et
10 prophylactiques d'être plus facilement développées et qui peuvent être efficaces contre des infections dues pour la plupart, sinon toutes, aux souches HIV. En outre, les nouveaux matériaux de l'invention trouvent des utilisations dans les tests de diagnostic et d'autres processus bien
15 connus.

On donnera ci-après un tableau comportant les références d'un certain nombre de microorganismes qui constituent une partie de la présente invention et qui ont été déposés auprès de l'American Type Culture Collection, 12301 Parklawn
20 Drive, Rockville, Maryland 20852, USA.

	<u>Description scientifique</u>	<u>Ref. Dépositants</u>	<u>Ref. ATCC</u>	<u>Date dépôt</u>
	Hybridome			
	souris			
25	(balb c/NS-1)	HIV-gp 110-1	HB 9175	15 Août 1986
	"	HIV-gp 110-2	HB 9176	15 Août 1986
	"	HIV-gp 110-3	HB 9177	15 Août 1986
	"	HIV-gp 110-6	HB 9404	30 Avril 1987
	"	HIV-gp 110-4	HB 9405	30 Avril 1987
30	"	HIV-gp 110-5	HB 9406	30 Avril 1987
	"	HIV-p 25-2	HB 9407	30 Avril 1987
	"	HIV-p 25-3	HB 9408	30 Avril 1987
	"	HIV-p 25-6	HB 9409	30 Avril 1987
	"	HIV-p 25-7	HB 9410	30 Avril 1987

On notera que les hybridomes HB 9175, HB 9176 et HB 9177 ont été testés et trouvés viables le 26 Août 1986. Les hybridomes restants ont été testés et trouvés viables le 4 Mai 1987.

5 Bien entendu, la présente invention n'est nullement limitée aux exemples donnés qui doivent être considérés comme clarifiant l'invention mais ne la limitant pas.

C'est dire que l'invention comprend tous les équivalents techniques des moyens décrits ainsi que leurs
10 combinaisons si celles-ci sont effectuées suivant son esprit.

R E V E N D I C A T I O N S

5 1.- Composition à utiliser pour le traitement d'infections par HIV, caractérisée en ce qu'elle comprend une dose thérapeutiquement efficace d'au moins un anticorps monoclonal spécifiquement réactif avec une ou plusieurs régions neutralisantes de HIV, et un excipient pharmaceutiquement efficace.

10 2.- Composition suivant la revendication 1, caractérisée en ce que les régions neutralisantes contiennent des épitopes codés par les régions env ou gag du génome de HIV.

15 3.- Composition suivant l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que les épitopes sont situés sur les protéines gp110 ou p25 de HIV.

20 4.- Composition suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend aussi un ou plusieurs peptides bloquants capables d'atténuer le pouvoir infectieux de HIV et/ou anticorps monoclonaux réactifs avec des épitopes de ces peptides.

25 5.- Composition suivant la revendication 4, caractérisée en ce que les peptides bloquants comprennent au moins environ 5 acides aminés contigus provenant d'une protéine gp110 de HIV.

30 6.- Composition suivant la revendication 5, caractérisée en ce que les peptides bloquants comprennent des peptides provenant de la séquence d'acides aminés 190 à 197 de LAVBRU, ou des homologues de cette séquence.

35 7.- Composition suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'un anticorps monoclonal est réactif avec au moins un épitope de la séquence d'acides aminés 278 à 319 de p25

de LAV_{BRU} et/ou ses homologues, et un second anticorps monoclonal est réactif avec au moins un épitope de la séquence d'acides aminés 315 à 363 de p25 de LAV_{BRU} et/ou ses homologues.

5 8.- Composition suivant l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'un anticorps monoclonal est réactif avec au moins un épitope de p25 de HIV et un second anticorps monoclonal est réactif avec au moins un épitope de gp110 de HIV.

10 9.- Composition suivant la revendication 8, caractérisée en ce que l'épitope de p25 est situé dans la séquence d'acides aminés 278 à 319 ou 315 à 363 de LAV_{BRU}, ou dans les homologues de ces séquences.

15 10.- Composition suivant l'une quelconque des revendications 8 et 9, caractérisée en ce que l'épitope de gp110 est situé dans les séquences d'acides aminés de l'enveloppe 190 à 197, 301 à 336 ou 308 à 328 de LAV_{BRU}, ou dans des homologues de ces séquences.

20 11.- Composition suivant l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisée en ce qu'elle comprend, en outre, un cocktail d'anticorps monoclonaux réactifs avec ces séquences ou différents homologues de ces séquences.

25 12.- Composition d'anticorps monoclonaux, caractérisée en ce qu'elle est spécifiquement réactive avec une région neutralisante de HIV.

30 13.- Composition suivant la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle comprend, en outre, un anticorps monoclonal réactif avec un peptide bloquant de HIV.

35 14.- Composition suivant l'une quelconque des revendications 12 et 13, caractérisée en ce que la région neutralisante est située sur gp110 de HIV.

15.- Composition suivant la revendication 14, caractérisée en ce que la région comprend la séquence

d'acides aminés d'environ 301 à 336 ou 308 à 328 de gp110 de HIV ou des homologues de ces séquences.

5 16.- Composition suivant la revendication 14, caractérisée en ce que la région neutralisante et le peptide bloquant sont situés sur gp110 de HIV.

17.- Composition suivant la revendication 16, caractérisée en ce que le peptide bloquant comprend la séquence d'acides aminés d'environ 190 à 197 de gp110 de HIV, ou des homologues de cette séquence.

10 18.- Composition suivant l'une quelconque des revendications 12 et 13, caractérisée en ce que la région neutralisante est située sur p25 de HIV.

15 19.- Composition, caractérisée en ce qu'elle comprend (a) au moins un anticorps monoclonal réactif avec une région neutralisante de HIV et, (b) un peptide bloquant contenant au moins environ 5 acides aminés contigus provenant des séquences d'acides aminés de gp110 de HIV ci-après, ou de leurs homologues :

IX (173)

20

Y-Ala-Ser-Thr-Thr-Thr-Asn-Tyr-Thr-Y', ou

XV (191)

Y-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Y'

25 où Y et Y', au cas où ils sont présents, comprennent chacun une séquence d'acides aminés comptant jusqu'à environ 20 acides aminés.

30 20.- Composition, caractérisée en ce qu'elle comprend (a) un anticorps monoclonal spécifique pour une région neutralisante de HIV, et (b) un peptide bloquant contenant au moins l'une des séquences d'acides aminés ci-après ou de leurs homologues :

35

XI (187)

Y-Thr-Thr-Ser-Tyr-Thr-Y', ou

XII (188)

Y-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Y', ou

5

XIII (189)

Y-Asn-Thr-Ser-Tyr-Gly-Y', ou

XIV (190)

Y-Asp-Thr-Asn-Tyr-Ser-Y'

10 où Y et Y', au cas où ils sont présents, comprennent chacun une séquence d'acides aminés comptant jusqu'à environ 20 acides aminés.

21.- Composition suivant l'une quelconque des revendications 19 et 20, caractérisée en ce que le peptide bloquant définit au moins un déterminant antigénique capable de faire apparaître des anticorps par immunisation d'un hôte, les anticorps ainsi apparus étant protecteurs contre des infections par HIV.

20 22.- Composition suivant l'une quelconque des revendications 19 à 21, caractérisée en ce que Y et/ou Y' comprennent un résidu de liaison choisi dans la classe formée essentiellement par la glycine, la tyrosine, la cystéine, la lysine, l'acide glutamique et l'asparagine.

25 23.- Composition suivant l'une quelconque des revendications 19 à 22, caractérisée en ce que le peptide comprend un terminal amino acétylé et/ou un terminal carboxy amidé et/ou un acide aminé d.

30 24.- Peptide, caractérisé en ce qu'il comprend au moins environ 5 acides aminés contigus provenant de la séquence d'acides aminés de gp110 de HIV ci-après, ou de ses homologues :

35

II (29a)

Cys-Thr-Arg-Pro-Asn-Asn-Asn-Thr-Arg-Lys-Ser-Ile-
 Arg-Ile-Gln-Arg-Gly-Pro-Gly-Arg-Ala-Phe-Val-Thr-
 Ile-Gly-Lys-Ile-Gly-Asn-Met-Arg-Gln-Ala-His-Cys.

5

25.- Peptide suivant la revendication 24, caractérisé en ce que les acides aminés contigus définissent au moins un déterminant antigénique capable de faire apparaître des anticorps par immunisation d'un hôte, ces anticorps étant protecteurs contre des infections par HIV.

10

26.- Peptide, caractérisé en ce qu'il comprend l'une des séquences d'acides aminés de gp110 de HIV ci-après ou de leurs homologues :

15

I (29)

Y-Thr-Arg-Lys-Ser-Ile-Arg-Ile-Gln-Arg-Gly-Pro-
 Gly-Arg-Ala-Phe-Val-Thr-Ile-Gly-Lys-Ile-Y',

V (177)

20

Y-Thr-Arg-Lys-Ser-Ile-Tyr-Ile-Gly-Pro-Gly-Arg-
 Ala-Phe-His-Thr-Thr-Gly-Arg-Ile-Gly-Y', ou

VIII (110-2-2)

Y-Lys-Thr-Val-Lys-Ile-Nor-Leu-Nor-Ser-Gly-His-Val-
 Phe-His-Ser-His-Tyr-Gln-Pro-Y',

25

où Y et Y', au cas où ils sont présents, comprennent chacun une séquence d'acides aminés comptant jusqu'à environ 20 acides aminés.

30

27.- Peptide suivant la revendication 26, caractérisé en ce que Y et/ou Y' comprennent un résidu de liaison choisi dans la classe formée essentiellement par la glycine, la tyrosine, la cystéine, la lysine, l'acide glutamique et l'asparagine.

35

28.- Séquences d'acides nucléiques, caractérisées en ce qu'elles codent pour les peptides suivant

l'une quelconque des revendications 24 à 27.

29.- Composition, caractérisée en ce qu'elle comprend un segment d'acides nucléiques d'environ 150 nucléotides ou moins codant pour un segment de peptide bloquant de HIV.

30.- Composition suivant la revendication 29, caractérisée en ce que le segment d'acides nucléiques code, en outre, pour un peptide d'une région neutralisante de HIV.

31.- Segment d'acides nucléiques d'environ 150 nucléotides ou moins, caractérisé en ce qu'il code pour un peptide d'une région neutralisante de HIV.

32.- Segment d'acides nucléiques suivant la revendication 31, caractérisé en ce qu'il code aussi pour un peptide bloquant de HIV.

33.- Segment d'acides nucléiques suivant l'une quelconque des revendications 31 et 32, caractérisé en ce que le peptide d'une région neutralisante comprend au moins environ 5 acides aminés provenant des acides aminés 310 à 336 de gp110 de LAV_{BRU}, ou des séquences d'acides aminés 278 à 319 ou 315 à 363 de p25 de LAV_{BRU}, et des homologues de ces séquences.

34.- Jeu de sondes, à utiliser pour des tests de diagnostic par hybridation, caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux séquences d'acides nucléiques codant pour les peptides mentionnés au tableau I.

35.- Vaccin contre une infection par HIV, caractérisé en ce qu'il comprend une dose immunologiquement efficace d'un ou plusieurs peptides de moins d'environ 50 acides aminés contenant des régions neutralisantes de gp110 et/ou de p25, ces peptides étant mélangés avec un excipient physiologiquement acceptable.

36.- Vaccin suivant la revendication 35, caractérisé en ce qu'il comprend, en outre, au moins

environ 5 acides aminés d'un peptide bloquant.

37.- Vaccin suivant l'une quelconque des revendications 35 et 36, caractérisé en ce que les peptides sont conjugués avec un support immunogénique.

5 38.- Lignée cellulaire immortalisée, caractérisée en ce qu'elle produit un anticorps monoclonal capable de réagir avec un déterminant antigénique de la glycoprotéine gp110 de l'enveloppe contenu dans une région neutralisante ou un peptide bloquant de HIV.

10 39.- Les lignées cellulaires HIV-gp110-1, HIV-gp110-2, HIV-gp110-3, HIV-gp110-4, HIV-gp110-5, HIV-gp110-6, HIV-p25-6 et HIV-p25-7.

15 40.- Anticorps monoclonal, caractérisé en ce qu'il est produit par une lignée cellulaire suivant l'une quelconque des revendications 38 et 39.

41.- Anticorps monoclonal, caractérisé en ce qu'il est capable de réagir avec un déterminant antigénique de la glycoprotéine gp110 de l'enveloppe de HIV.

20 42.- Anticorps monoclonal, capable de réagir spécifiquement avec un déterminant antigénique de HIV, caractérisé en ce qu'il bloque la liaison d'un anticorps produit par les lignées cellulaires suivant l'une quelconque des revendications 38 et 39.

25 43.- Procédé pour engendrer des lignées cellulaires qui produisent des anticorps réactifs avec des déterminants antigéniques de gp110 de HIV, caractérisé en ce qu'il comprend :

30 l'administration à un hôte d'une quantité immunogénique d'une préparation antigénique enrichie en protéines de HIV,

l'observation, chez l'hôte, immunisé de la production d'anticorps réactifs avec des déterminants antigéniques de gp110,

35 l'obtention, à partir de l'hôte, de cellules

productrices d'anticorps et l'immortalisation de ces cellules,

la sélection des cellules immortalisées qui produisent des anticorps à l'égard de gp110 de HIV, et
5 le clonage des cellules immortalisées pour produire les lignées cellulaires.

44.- Procédé suivant la revendication 43, caractérisé en ce que les protéines de HIV sont des protéines de fusion recombinantes exprimées par un hôte
10 eucaryote ou bactérien, ou bien les protéines de HIV sont obtenues à partir d'un extrait ou lysat de HIV.

45.- Procédé pour diagnostiquer la présence de HIV dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend :

15 l'incubation d'un anticorps monoclonal capable de réagir avec gp110 de HIV contenu dans le dit échantillon biologique, et

la détection de la présence de complexes immuns formés entre l'anticorps monoclonal et le
20 déterminant antigénique dans l'échantillon biologique, et partant la détermination de la présence ou de l'absence de HIV dans l'échantillon.

46.- Procédé suivant la revendication 45, caractérisé en ce que l'anticorps monoclonal est
25 capable de réagir avec une région neutralisante ou un peptide bloquant de gp110.

47.- Procédé pour diagnostiquer la présence d'anticorps contre HIV dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend :

30 l'incubation d'un peptide provenant d'une région neutralisante de gp110 ou p25 de HIV avec le dit échantillon biologique, et

la détection de la présence de complexes immuns formés entre le peptide et les anticorps de
35 l'échantillon réactifs avec le peptide, et partant la

détermination de la présence ou de l'absence de HIV dans l'échantillon.

48.- Procédé pour diagnostiquer la présence de HIV dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend :

5 l'incubation, dans des conditions d'hybridation, d'un segment d'acide nucléique codant au moins pour une partie d'une région neutralisante de HIV avec l'acide nucléique que contient l'échantillon biologique, et

10 la détection de la présence de complexes hybrides formés entre le segment d'acide nucléique et l'acide nucléique de l'échantillon, et partant la détermination de la présence ou de l'absence de HIV dans l'échantillon.

15 49.- Procédé pour déterminer une souche de HIV chez un hôte infecté, caractérisé en ce qu'il comprend :

20 l'incubation d'un échantillon biologique prélevé chez l'hôte avec un peptide provenant d'une région neutralisante de HIV, et

la détection de la présence de complexes immuns formés entre le peptide et des anticorps de l'échantillon, et partant la détermination de la souche de HIV infectant l'hôte.

25 50.- Composition à utiliser pour le traitement d'un patient suspecté d'avoir été exposé à HIV, caractérisée en ce qu'elle comprend une dose thérapeutiquement ou immunologiquement efficace d'au moins un anticorps monoclonal réactif avec une région neutralisante de HIV.

30 51.- Trousse à utiliser pour le traitement d'un patient suspecté d'avoir été exposé à HIV, caractérisée en ce qu'elle comprend une dose thérapeutiquement ou prophylactiquement efficace d'un ou

35

plusieurs anticorps monoclonaux réactifs avec une région neutralisante de HIV, des peptides bloquants capables d'atténuer le pouvoir infectieux de HIV et/ou des anticorps monoclonaux réactifs avec les peptides bloquants.

5
10
15
20
25
30
35

52.- Trousse suivant la revendication 51, caractérisée en ce que l'anticorps monoclonal réactif avec la région neutralisante de HIV est produit par une lignée cellulaire portant la désignation ATCC HB 9405 et un peptide bloquant est le peptide T ou un dérivé, ou analogue de celui-ci.

53.- Composition à utiliser pour le traitement d'un patient infecté par HIV après détermination de la souche de HIV par le procédé suivant la revendication 49, caractérisée en ce qu'elle comprend un anticorps monoclonal spécifiquement réactif avec une région neutralisante de la souche de HIV.

54.- Composition à utiliser pour vacciner un patient contre des infections par HIV, caractérisée en ce qu'elle comprend une dose immunologiquement efficace d'un anticorps monoclonal anti-idiotypique, l'anticorps étant spécifiquement réactif avec un idiotype d'un second anticorps monoclonal capable de se fixer sur une région neutralisante de HIV.



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numero de la demande
nationale

BE 8700922
BO 516

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
X	WO-A-8 602 383 (INSTITUT PASTEUR) * Revendications 1,8,14,15; page 11, lignes 17-24; page 13, lignes 31-35; page 14, lignes 23-31; page 23, lignes 10-19; page 27, ligne 27 - page 28, ligne 5; page 29, lignes 18-20; page 38, lignes 9-14,31-34; page 43, ligne 33 - page 44, ligne 12; page 45, ligne 23 - page 46, ligne 22 *	1-3,7- 12,14- 16,18, 24-35, 37-54	A 61 K 39/42 C 07 K 7/10 C 07 H 21/00 C 12 Q 1/68 A 61 K 39/21 C 12 N 5/00 C 12 P 21/00 C 12 N 15/00
Y	---	4-6,13, 17,19- 23,36	G 01 N 33/569 G 01 N 33/577// (A 61 K 39/42 A 61 K 37:02) (C 12 P 21/00 C 12 R 1:91)
A	EP-A-0 181 150 (CHIRON CORP.) * Revendications 1-11; page 13, lignes 6-19 *	1-3,7- 12,14- 16,18, 24-35, 37-54	
A	WO-A-8 604 336 (INSTITUT PASTEUR) * Revendications 1-11; page 8, lignes 1-17 *	1-3,7- 12,14- 16,18, 24-35, 37-54	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
A	EP-A-0 185 444 (CENTOCOR) * Revendications 1-27; page 21, ligne 10 - page 23, ligne 20; page 10, ligne 10 - page 11, ligne 28 *	1-3,7- 12,14- 16,18, 24-35, 37-54	A 61 K C 12 P C 12 N G 01 N
D,P A	WO-A-8 606 099 (GENETIC SYSTEMS CORP.) * Revendications 1-21; page 8, ligne 34 *	1-3,7- 12,14- 16,18, 24-35, 37-54	
	---	-/-	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
31-08-1988		RYCKEBOSCH A.O.A.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

EPO FORM 1503 01.82 (P0448)

ABSENCE D'UNITE D'INVENTION

La présente demande ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir

1. Revendications :
2. Revendications :
3. Revendications :
4. Revendications :

Le présent rapport de recherche a été établi de façon complète pour les parties de la demande qui se rapportent à l'invention ou pluralité d'inventions mentionnée dans les revendications:

ETENDUE DE LA RECHERCHE

Compte tenu des documents considérés comme pertinents, le présent rapport de recherche a été établi de façon complète pour les parties de la demande qui se rapportent à l'invention ou pluralité d'inventions mentionnée en premier lieu dans les revendications, à savoir les revendications :
Les éléments figurant dans les

1. Revendications :
2. Revendications :
3. Revendications :
4. Revendications :

n'ont pas été pris en considération que dans le cadre de la recherche relative aux caractéristiques de l'invention ou de la pluralité d'inventions mentionnée en premier lieu dans les revendications



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numero de la demande
nationale Page 2

BE 8700922
BO 516

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
P,X	EP-A-0 199 301 (HOFFMANN-LA ROCHE) * Revendications 1-42; exemples 6,7 *	1-3,7- 12,14- 16,18, 24-35, 37-54	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
P,X	WO-A-8 702 775 (SOUTHWEST FOUNDATION FOR BIOMEDICAL RESEARCH) * Revendications 1-9,11,15-30; pages 3,4; page 11, ligne 23 - page 12, ligne 12 *	1-3,7- 12,14- 16,18, 24-35, 37-54	
D,P Y	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 83, décembre 1986, pages 9254-9258; C.B. PERT et al.: "Octapeptides deduced from the neuropeptide receptor-like pattern of antigen T4 in brain potently inhibit human immunodeficiency virus receptor binding and T-cell infectivity" * Page 9254, résumé, colonne de droite, lignes 8-10; page 9258, lignes 10-13,27-40 *	4-6,13, 17,19- 23,36	
E	EP-A-0 273 716 (THE UNITED STATES OF AMERICA DEPARTMENT OF COMMERCE) * Revendications 1-13; page 9, lignes 8-10 *	24-27, 35,37	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
31-08-1988		RYCKEBOSCH A.O.A.	
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.

BE 8700922
BO 516

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 23/09/88
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A- 8602383	24-04-86	FR-A- 2571968	25-04-86
		AU-A- 5061785	02-05-86
		EP-A- 0201540	20-11-86
		JP-T- 62500592	12-03-87
		WO-A- 8604336	31-07-86
		AU-A- 5320086	13-08-86
		EP-A- 0211022	25-02-87
		JP-T- 62502095	20-08-87
EP-A- 0181150	14-05-86	JP-A- 61173782	05-08-86
WO-A- 8604336	31-07-86	WO-A- 8602383	24-04-86
		AU-A- 5061785	02-05-86
		AU-A- 5320086	13-08-86
		EP-A- 0201540	20-11-86
		EP-A- 0211022	25-02-87
		JP-T- 62502095	20-08-87
EP-A- 0185444	25-06-86	JP-A- 62026300	04-02-87
WO-A- 8606099	23-10-86	EP-A- 0201716	20-11-86
		AU-A- 5572786	16-10-86
		AU-A- 5669086	05-11-86
		EP-A- 0220234	06-05-87
		JP-A- 62239992	20-10-87
		JP-T- 62502723	22-10-87
		AU-B- 571128	31-03-88
EP-A- 0199301	29-10-86	AU-A- 5636386	23-10-86
		JP-A- 62012799	21-01-87
WO-A- 8702775	07-05-87	EP-A- 0245362	19-11-87
		JP-T- 63501716	14-07-88
EP-A- 0273716	06-07-88	WO-A- 8805051	14-07-88
		AU-A- 1365788	27-07-88

EPO FORM P0463

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82