

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

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

2 629 459

②1 N° d'enregistrement national :

88 04405

⑤1 Int Cl⁴ : C 07 K 15/12, 15/00; G 01 N 33/68.

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 1^{er} avril 1988.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 40 du 6 octobre 1989.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *INSTITUT PASTEUR, Fondation privée
reconnue d'utilité publique et CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE, établissement public. — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : Luc Montagnier ; Hervé Rochat ; El Mus-
tapha Bahraoui ; Solange Chamaret ; Stéphane Ferris ;
Claude Granier ; Jurphaar Van Rietschoten ; Jean-Marc
Sabatier.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : S.C. Ernest Gutmann et Yves Plasse-
raud.

⑤4 Peptides PF11 à PF19 d'un rétrovirus HIV - Procédé de synthèse de ces peptides - Leur utilisation notamment pour
le diagnostic.

⑤7 L'invention concerne des peptides capables de former un
complexe immunologique avec des anticorps antiprotéine F
d'un rétrovirus susceptible de provoquer un SLA ou un SIDA,
caractérisés en ce qu'ils comportent au plus 70 aminoacides et
possèdent une séquence d'acides aminés correspondant à la
partie C-terminale de la protéine F d'un HIV ou à une variante
de cette séquence néanmoins telle qu'elle soit immunologique-
ment reconnue par des anticorps antiprotéines F de rétrovirus
HIV.

FR 2 629 459 - A1

PEPTIDES PF11 à PF19 D'UN RETROVIRUS HIV - PROCEDE DE
SYNTHESE DE CES PEPTIDES - LEUR UTILISATION NOTAMMENT
POUR LE DIAGNOSTIC -

5 L'invention concerne des peptides ayant des propriétés immunologiques, le cas échéant immunogènes, en commun avec la protéine F d'un rétrovirus capable de provoquer chez l'homme des syndrômes de lymphadénopathies (SLA) susceptibles d'être relayés par un syndrôme d'immunodéficience acquise (SIDA).

10 Jusqu'à présent, plusieurs rétrovirus ayant une responsabilité dans le développement d'un SLA ou d'un SIDA, ont été isolés et caractérisés. Ainsi un premier virus dénommé LAV-1 ou HIV-1 a été isolé et décrit dans la demande de brevet GB.83/24.800 et une
15 demande EP.84/401.834 du 14/09/84. Ce virus a également été décrit par F.Barre Sinoussi et al. dans Science, 220 n° 45-99, 20, pages 868-871.

20 Des variants de ce virus HIV-1 désignés par LAV ELI et LAV MAL, ont également été isolés, caractérisés et décrits dans la demande de brevet EP. 84/-401.834.

25 L'isolement et la caractérisation de rétrovirus appartenant à une classe distincte et n'ayant qu'une parenté immunologique réduite avec les précédents, ont été décrits dans la demande de brevet européen n° 87/400.151.4 publiée sous le n° 239.425. Ces rétrovirus qui ont été regroupés sous la désignation HIV-2, ont été isolés chez plusieurs malades africains
30 présentant des symptômes d'une lymphadénopathie ou d'un SIDA.

L'étude de ces rétrovirus HIV-1 et HIV-2 a conduit à l'obtention de leurs séquences d'ADN complémentaires puis à la caractérisation des séquences nucléotidiques spécifiques codant pour d'autres protéines
35

que celles décrites précédemment, notamment pour la protéine F de HIV-1 décrite dans la publication Bruno Guy et al. Nature 1987, vol. 33, p. 266 à 269.

5 On connaissait les propriétés antigéniques de la protéine F vis-à-vis d'anticorps contenus dans un sérum de patient infecté par un rétrovirus capable de provoquer un SLA ou un SIDA et plus particulièrement vis-à-vis d'anticorps dirigés contre cette protéine F.

10 Les inventeurs ont constaté que certaines séquences peptidiques sélectionnées à partir de la séquence connue de la protéine F, pour différents isolats de rétrovirus HIV-1 ou HIV-2, présentent un intérêt particulier pour la détection d'une infection par l'un des rétrovirus décrits plus haut.

15 De façon tout à fait intéressante les inventeurs ont remarqué que certains peptides de la protéine F (encore désignés par PF) sont reconnus par des anticorps induits dans un hôte infecté par un rétrovirus du type HIV à un stade très précoce de l'infection par le virus.

20 Cette observation démontre s'il en est besoin l'intérêt que peuvent représenter de tels peptides pour la détection à un stade précoce d'une infection chez l'homme par un rétrovirus des classes HIV-1 ou HIV-2.

25 L'invention concerne à cet égard des peptides de la protéine F d'un rétrovirus capable de provoquer un SLA ou un SIDA, qui présentent des propriétés immunologiques, en commun avec celles de cette protéine F et qui ont la capacité d'être reconnus par des anticorps contre cette protéine, présents dans un échantillon biologique, 30 notamment un tissu ou un liquide biologique, d'un hôte infecté par un rétrovirus HIV notamment de la classe HIV-1 ou de la classe HIV-2.

35 L'invention vise en outre des peptides de la protéine F d'un rétrovirus HIV-1 ou HIV-2, ayant des propriétés immunogènes, ou susceptibles d'être rendus immunogènes in vivo.

Les peptides de l'invention peuvent être obtenus par isolement à partir de la séquence complète de la protéine F d'un rétrovirus déterminé ou encore par synthèse chimique.

5 La figure 1 représente la séquence peptidique de la protéine F pour deux isolats, correspondant l'un au rétrovirus HIV-2, l'autre au rétrovirus HIV-1. Les correspondances entre les acides aminés et leur code à une lettre sont les suivantes :

10	M	Méthionine
	L	Leucine
	I	Isoleucine
	V	Valine
	F	Phénylalanine
15	S	Sérine
	P	Proline
	T	Thréonine
	A	Alanine
	Y	Tyrosine
20	H	Histidine
	Q	Glutamine
	N	Asparagine
	K	Lysine
	D	Acide Aspartique
25	E	Acide glutamique
	C	Cystéine
	W	Tryptophane
	R	Arginine
	G	Glycine

30 Les peptides de l'invention, obtenus éventuellement après modification de l'enchaînement d'acides aminés, à partir d'un isolat d'un rétrovirus ou encore obtenus par synthèse sont tels qu'ils présentent une parenté de séquence ou (homologie) avec la séquence

peptidique correspondante de la protéine F d'un rétrovirus de la classe HIV-1 ou/et d'un rétrovirus de la classe HIV-2, suffisante pour que les propriétés immunologiques de cette séquence vis-à-vis des anticorps formés dans un milieu biologique (notamment un sérum) d'un hôte infecté par l'un ou l'autre des virus HIV-1 ou HIV-2 soient conservées.

A cet égard, les peptides selon l'invention, capables de former un complexe immunologique avec des anticorps anti-protéine F d'un rétrovirus susceptible de provoquer un SLA ou un SIDA, sont caractérisés en ce qu'ils comportent au plus 70 aminoacides formant une séquence correspondant à une partie de la protéine F d'un rétrovirus HIV ou à une variante de cette séquence néanmoins telle qu'elle soit immunologiquement reconnue par des anticorps anti-protéine F de rétrovirus HIV.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, le peptide est sélectionné en fonction de sa capacité à être reconnu par des anticorps anti-protéine F d'un hôte infecté spécifiquement par l'un ou l'autre des rétrovirus HIV-1 ou HIV-2.

Un premier peptide PF16 (HIV-1) conforme à l'invention est caractérisé par tout ou partie de la formule :

XGM-D-E--VL-W-F-S-LA--H-ARE-HPE--K-CZ

dans laquelle :

- les tirets "-" figurent des acides aminés variables choisis de manière à ce que le peptide final conserve sa capacité à être reconnu par des anticorps formés lors d'une infection par l'un des rétrovirus précédents,
- les groupes X représentent soit un groupe NH_2 libre ou amidé, notamment par un ou deux groupes alcoyle comprenant de 1 à 5 atomes de carbone, soit un groupe peptidique comprenant de 1 à 5 aminoacides, dont l'acide-amino N-terminal présente lui-même un groupe NH_2

libre ou amidé comme précédemment indiqué, et les groupes Z représentent, soit un groupe -OH libre ou alcoyle et contenant alors un groupe alcoyle comprenant de 1 à 5 atomes de carbone, soit un groupe peptidique comprenant de 1 à 5 aminoacides, dont l'acide C-terminal présente lui-même un groupe -OH libre ou alcoyle, comme précédemment indiqué, les groupes de 1 à 5 acides aminés le cas échéant contenus dans X ou Z ou dans les deux à la fois ainsi que les acides aminés remplaçant les tirets étant tels, que leur présence n'est pas incompatible avec les propriétés immunologiques, le cas échéant immunogènes, des peptides formés, notamment leur capacité à être reconnus par des sérums humains contenant des anticorps contre la protéine F d'un rétrovirus HIV-1 et plus particulièrement des anticorps monospécifiques contre le peptide ci-dessus.

Des peptides préférés répondant à la structure précédente sont les suivants :

XGMDDPEREVLEWRFSRLAFHHVARELHPEYFKNCZ
 XGMEDAEEVLEWRFSRLAFHHVARELHPEYFKNCZ
 XGMEDAEREVLKWKFDSSLALRHRAREQHPEYKDCZ
 XGMEDPERQVLKWRFSRLAFEHKAREMHPEFYKNZ

Des peptides particulièrement préférés sont donnés par les enchainements d'acides aminés suivants :

GMDDPEREVLEWRFSRLAFHHVARELHPEYFKNC
 GMEDAEEVLEWRFSRLAFHHVARELHPEYKDC
 GMEDAEREVLKWKFDSSLALRHRAREQHPEYKDC
 GMEDPERQVLKWRFSRLAFEHKAREMHPEFYKN

D'autres peptides appartenant à la protéine F couverts par l'invention caractérisés par leur capacité à former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre la protéine F contenus dans un sérum humain infecté par un rétrovirus HIV-1 sont les peptides suivants :

35

6

PF11 : XMGGKWSKSSVVGWPTVRERMRAEPAADGVGAYCZ

PF12 :

XGGKWSKSSVVGWPTVRERMRAEPAADGVGAASRDLEKHGAITSSNTAATNAA
CAWLEAQEEEEVGZ

5 PF13 : XASRDLEKHGAITSSNTAATNAACAWLEAQEEEEZ

PF14 : XCVGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILZ

PF15 :

XCGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCYKLPVPEPKVEEANKGENTSLLHPVZ

PF17 :

10 XCYKLPVPEPKVEFANKGENTSLLHPVSLHGMDPEREVLEWRFSRLAFHHVAR
ELHPEYFKNCZ

PF18 : XCKGGLEGLIHSQRRQDILDWIVHTQGYFPDZ

L'invention englobe encore des variants de ces peptides, dans la mesure où ils conservent leurs propriétés immunologiques vis-à-vis des anticorps dirigés contre la protéine F, présents dans un sérum humain infecté par un rétrovirus HIV-1. Des variants de ces peptides sont plus particulièrement les peptides obtenus en mettant les peptides ci-dessus en alignement avec ceux des peptides qui leur correspondent pour les autres isolats de HIV-1 décrits dans la figure 3.

Cette figure 3 représente les alignements des séquences de la protéine F pour 4 isolats du virus du SIDA. L'isolat LAV_{BRU} est pris comme référence et les seules différences de ARV₂, LAV_{MAL} et LAV_{ELI} avec LAV_{BRU} sont notées.

Les tirets correspondent à des délétions introduites dans les alignements.

D'autres peptides conformes à l'invention sont aptes à être reconnus par des anticorps formés chez un hôte infecté par un rétrovirus de la classe HIV-2 et sont caractérisés en ce qu'ils présentent des propriétés immunologiques, le cas échéant immunogènes, en commun avec la séquence PF16 (HIV-1) suivante :

35 XKFDDPHGETLVWFEFDPLLAYSIEAFIRYPEEFGHKZ
dans laquelle X et Z ont des significations analogues

aux précédentes à condition toutefois que leur choix permette la conservation de la capacité du peptide ci-dessus à être reconnu par des sérums humains contenant des anticorps contre la protéine F d'un rétrovirus HIV-2 et plus particulièrement des anticorps monospécifiques dirigés contre le peptide ci-dessus.

Un autre peptide conforme à l'invention apte à être reconnu par des anticorps formés chez un hôte infecté par un rétrovirus HIV-2 est caractérisé en ce qu'il présente des propriétés immunologiques, le cas échéant immunogène, en commun avec la séquence PF19 suivante :

XCRGGLEGMFYSERRHKILNIYLEKEEGIIADZ

dans laquelle X et Z ont des significations analogues aux précédentes à condition toutefois que leur choix permette la conservation de la capacité du peptide ci-dessus à être reconnu par des sérums humains contenant des anticorps contre la protéine F d'un rétrovirus HIV-2 et plus particulièrement des anticorps monospécifiques dirigés contre le peptide ci-dessus.

D'autres modifications des différentes séquences d'acides aminés décrites pour la composition des peptides de l'invention, éventuellement des délétions au niveau de certains acides aminés peuvent être envisagées dès lors que la séquence modifiée formée reste capable d'être reconnue par des anticorps monospécifiques contre l'un ou l'autre des peptides concernés, présents dans un milieu biologique, notamment un sérum humain à la suite d'une infection par un rétrovirus susceptible de provoquer un SLA ou un SIDA.

On peut notamment mettre en oeuvre une partie seulement des peptides précédemment décrits dans la mesure où une séquence de plus petite taille formée conserve des propriétés immunologiques, le cas échéant immunogènes, vis-à-vis des anticorps dirigés contre la protéine F d'un rétrovirus HIV.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, certains des peptides PF11 à PF18 ci-dessus sont mis en oeuvre dans des mélanges capables d'être reconnus par des anticorps présents dans un sérum humain infecté par un rétrovirus de la classe HIV-1.

Dans un autre mode de réalisation ou réalisera un mélange des peptides PF10 et PF19, capable d'être reconnu par des anticorps présents dans un sérum humain infecté par un rétrovirus HIV-2.

On peut également réaliser des mélanges de peptides reconnus par des anticorps dirigés contre un rétrovirus du type HIV-1 d'une part et des peptides reconnus par un rétrovirus du type HIV-2 d'autre part.

L'invention a trait également à des compositions comprenant de tels peptides seuls ou en mélange avec d'autres protéines ou peptides codés par le génome d'un rétrovirus capable de causer un SLA ou un SIDA et à leur utilisation dans un procédé de détection in vitro dans un échantillon biologique, de l'infection par un rétrovirus du type HIV-1 ou HIV-2.

L'invention est également relative à la synthèse des peptides intéressants de la protéine F.

Un principe de synthèse est par exemple de mettre en présence une phase solide dans laquelle s'assemble la séquence du peptide et une phase liquide contenant solvants et réactifs. A chaque étape la séparation entre le peptide en croissance et les réactifs se fait par simples filtrations et lavages.

Initialement, le support solide qui porte un groupement réactif réagit avec le carboxyle d'un acide aminé introduit avec son α -NH₂ bloqué (protégé par exemple par le t-butyloxy carbonyle), pour établir une liaison covalente. Après déprotection de la fonction aminée (par exemple en lavant avec un acide tel que l'acide trifluoroacétique), un deuxième acide aminé

protégé est introduit pour former par couplage la première liaison peptidique. Le deuxième acide aminé, qui fournit le deuxième amino-acyle de la séquence, est couplé à partir du résidu amino-acyle C-terminal sur la fonction amine déprotégée du premier acide aminé C-terminal de la chaîne. De préférence la fonction carboxyle de ce deuxième acide aminé est activée, par exemple par dicyclohexylcarbodiimide. Par une suite de réactions, déprotections et couplages, la synthèse progresse du résidu C- vers le résidu N- terminal. Lorsque la séquence voulue a été assemblée le peptide est décroché de la phase solide, par une réaction spécifique de coupure de la liaison peptide-résine établie initialement. Le protocole détaillé de cette synthèse est décrit dans l'exemple 1.

Le procédé de synthèse d'un peptide conforme à ce qui est décrit plus haut est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a/ mise en contact d'un support solide portant un groupement réactif apte à réagir avec une fonction carboxyle, avec le premier acide aminé C-terminal de la chaîne à synthétiser, protégé au niveau de la fonction amine devant ultérieurement intervenir dans le couplage avec un autre acide aminé, pour éviter l'auto-condensation ;

b/ déprotection de la fonction amine de l'acide aminé précédemment fixé ;

c/ couplage de la fonction amine déprotégée de l'acide aminé à l'issue de l'étape b/ avec la fonction carboxyle d'un deuxième acide aminé, protégé au niveau de sa fonction amine et qui fournit le deuxième résidu aminoacyle alors couplé au résidu aminoacyle C-terminal du peptide à synthétiser ;

d/ déprotection de la fonction amine du deuxième acide aminé ajouté et répétition des étapes c/ de couplage et d/ de protection, successivement avec les

acides aminés correspondant respectivement aux résidus aminoacyle successifs jusqu'à aboutir au résidu aminoacyle N-terminal dudit peptide ;

5 e/ séparation du peptide formé, par traitement de la phase solide portant le peptide synthétisé, notamment au moyen de l'acide fluorhydrique, une fois obtenu l'acide-aminé N-terminal ;

f/ récupération de la séquence peptidique à partir de la solution.

10 Dans un mode de réalisation préféré du procédé précédent, l'étape b/ de déprotection est suivie par une étape de neutralisation destinée à rendre la fonction amine nucléophile.

15 Dans un autre mode de réalisation particulier, on peut encore avoir recours à une seconde étape de couplage réalisée après lavage et neutralisation du peptide obtenu à l'issue de l'étape c/, au moyen d'un agent de couplage, afin de permettre la réaction des fonctions amine qui n'avaient pas réagi lors du premier
20 couplage.

Pour certains acides aminés tels que le triptophane ou la cystéine, la déprotection des fonctions réactives sera obtenue après la séparation du peptide, de la résine respectivement au moyen d'une base ou
25 avec un traitement avec l'acétate mercurique.

Il est entendu que le procédé de synthèse des peptides selon l'invention n'est pas limité au procédé précédemment décrit mais englobe au contraire toutes les variantes dans la mesure où la séquence peptidique ainsi
30 synthétisée conserve les propriétés immunologiques souhaitées.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, on aura recours à la technique de synthèse en solution homogène décrit par HOUBENWEYL dans l'ouvrage
35 intitulé "Méthode der Organischen Chemie" (Méthode de la Chimie Organique) édité par E. Wunsch, vol. 15-I et II, THIEME, Stuttgart 1974.

Cette méthode de synthèse consiste à condenser successivement deux-à-deux les aminoacyles successifs dans l'ordre requis, ou à condenser des aminoacyles et des fragments préalablement formés et contenant déjà 5 plusieurs aminoacyles dans l'ordre approprié, ou encore plusieurs fragments préalablement ainsi préparés, étant entendu que l'on aura eu soin de protéger au préalable toutes les fonctions réactives portées par ces aminoacyles ou fragments, à l'exception des fonctions amines 10 de l'un et carboxyles de l'autre ou vice-versa, qui doivent normalement intervenir dans la formation des liaisons peptidiques, notamment après activation de la fonction carboxyle, selon les méthodes bien connues dans la synthèse des peptides. En variante, on pourra avoir 15 recours à des réactions de couplage mettant en jeu des réactifs de couplage classique, du type carbodiimide, tels que par exemple la 1-éthyl-3-(3-diméthyl-amino-propyl)-carbodiimide. Lorsque l'aminoacyle mis en oeuvre possède une fonction acide supplémentaire (notamment 20 dans le cas de l'acide glutamique), ces fonctions seront par exemple protégées par des groupes t-butylester.

L'invention est également relative à un procédé de détection in vitro d'une infection par un rétrovirus susceptible de provoquer un SLA ou SIDA, 25 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) la mise en contact d'au moins un peptide selon l'invention avec un échantillon biologique à tester, susceptible de contenir des anticorps contre la protéine F d'un rétrovirus HIV ci-dessus, dans des conditions 30 permettant la formation d'un complexe immunologique peptide-anticorps,
- b) la détection du complexe immunologique formé.

Pour réaliser la détection du complexe immunologique peptide-anticorps et ainsi faire le diagnostic 35 de l'infection, on pourra par exemple avoir recours à un

dosage radioimmunologique. On peut également avoir recours à une méthode d'immunoenzymologie telle que la méthode ELISA.

5 Dans un premier mode de réalisation du test de détection d'une infection par un rétrovirus capable de provoquer un SLA ou un SIDA, le peptide mis en oeuvre pour effectuer le diagnostic de la présence d'anticorps anti-protéine F est reconnu spécifiquement par un rétrovirus HIV-1.

10 Dans un deuxième mode de réalisation de ce test de détection, le peptide mis en oeuvre est reconnu spécifiquement par un rétrovirus HIV-2.

15 Dans un autre mode de réalisation de ce test, on choisit de mettre en oeuvre un mélange de peptides reconnaissant d'une part des anticorps formés contre la protéine F d'un rétrovirus HIV-1 et des peptides reconnaissant d'autre part des anticorps formés contre la protéine F d'un rétrovirus HIV-2. On peut ainsi réaliser un diagnostic non spécifique d'une infection par l'un ou l'autre des rétrovirus HIV-1 ou HIV-2.

20 Pour effectuer le diagnostic le peptide pourra avantageusement être fixé sur une plaque ELISA.

25 L'invention concerne aussi l'utilisation des peptides de la protéine F, pour purifier des anticorps monospécifiques contre la protéine F.

Pour effectuer une telle purification, par exemple par chromatographie d'affinité, on peut opérer comme suit :

- 30 - fixation des peptides utilisés pour la purification sur un support,
- passage sur ce support d'une solution contenant les anticorps que l'on cherche à purifier, pour les amener au contact des peptides fixés, dans des conditions permettant la formation d'un complexe immunologique
- 35 peptide-anticorps ; ladite solution peut être un sérum

polyclonal ou un surnageant ou encore un ascite contenant des anticorps monoclonaux,

- élimination des constituants n'ayant pas réagi,
- récupération des anticorps monospécifiques dirigés contre la protéine F.

5

L'invention concerne également les anticorps monospécifiques dirigés contre la protéine F, caractérisés en ce qu'ils sont reconnus par un ou plusieurs peptides précédemment décrits.

10

L'invention concerne également un kit pour le diagnostic in vitro d'une infection par un rétrovirus capable de provoquer un SLA ou un SIDA, caractérisé en ce qu'il comprend :

- un peptide conforme à l'invention, ou un mélange de ces peptides ;

15

- les réactifs pour la constitution d'un milieu, notamment une solution tamponnée, propice à la formation d'une réaction immunologique entre le ou les peptides et les anticorps éventuellement présents dans un échantillon biologique ;

20

- un ou plusieurs réactifs éventuellement marqué(s) apte(s) à réagir avec le ou lesdits peptides pour la détection du complexe peptide-anticorps formé ;

25

- le cas échéant, un milieu biologique de référence, tel qu'un sérum, semblable au milieu biologique provenant de la personne éventuellement infectée avec un rétrovirus HIV et dépourvu d'anticorps reconnaissant les susdits peptides.

30

Les exemples qui suivent illustrent la synthèse des peptides selon l'invention et leur utilisation dans un test de diagnostic de la présence d'anticorps anti-protéine F contenus dans des sérums humains connus pour avoir été infectés par un virus HIV-1.

35

D'autres caractéristiques apparaissent aussi dans les figures.

- la figure 1 représente l'alignement des séquences

d'acides aminés de la protéine F pour les isolats ROD.P de HIV-2 et LAV.P de HIV-1.

5 - la figure 2 représente les relations entre le rendement global d'incorporation des acides aminés et la pureté des produits obtenus par synthèse en phase solide (d'après Wang, S.S., 1972).

- la figure 3 représente la protéine F de 4 isolats du rétrovirus HIV-1.

EXEMPLE 1

10 SYNTHESE, PURIFICATION ET CARACTERISATION DES PEPTIDES

1/ Nature du support solide :

Pour la réalisation de la synthèse, un bon support solide est choisi de façon à répondre aux conditions suivantes :

- 15 - être insoluble dans les solvants et réactifs de la phase liquide ;
- être inerte vis-à-vis des réactifs de la synthèse ;
- être suffisamment stable physiquement pour être agité et subir les filtrations ;
- 20 - assurer une excellente diffusion des réactifs pour ne pas ralentir la cinétique d'un facteur trop important comparé à celle des réactions en solution.

Deux sortes de résines ont été utilisées pour les besoins de la synthèse :

- 25 - une résine obtenue par copolymérisation de styrène en présence de 1% de divinylbenzène, dont la fonction réactive est le groupement benzydrylamine (-O-CHO-NH₂); avec une substitution de 0,2 mmole NH₂/g de résine ;
- une résine polyacrylamide macroporeuse dont la
- 30 fonction réactive est le groupement amino méthyl (-CH₂-NH₂) à 0,5 ou 0,7 mmole NH₂/g).

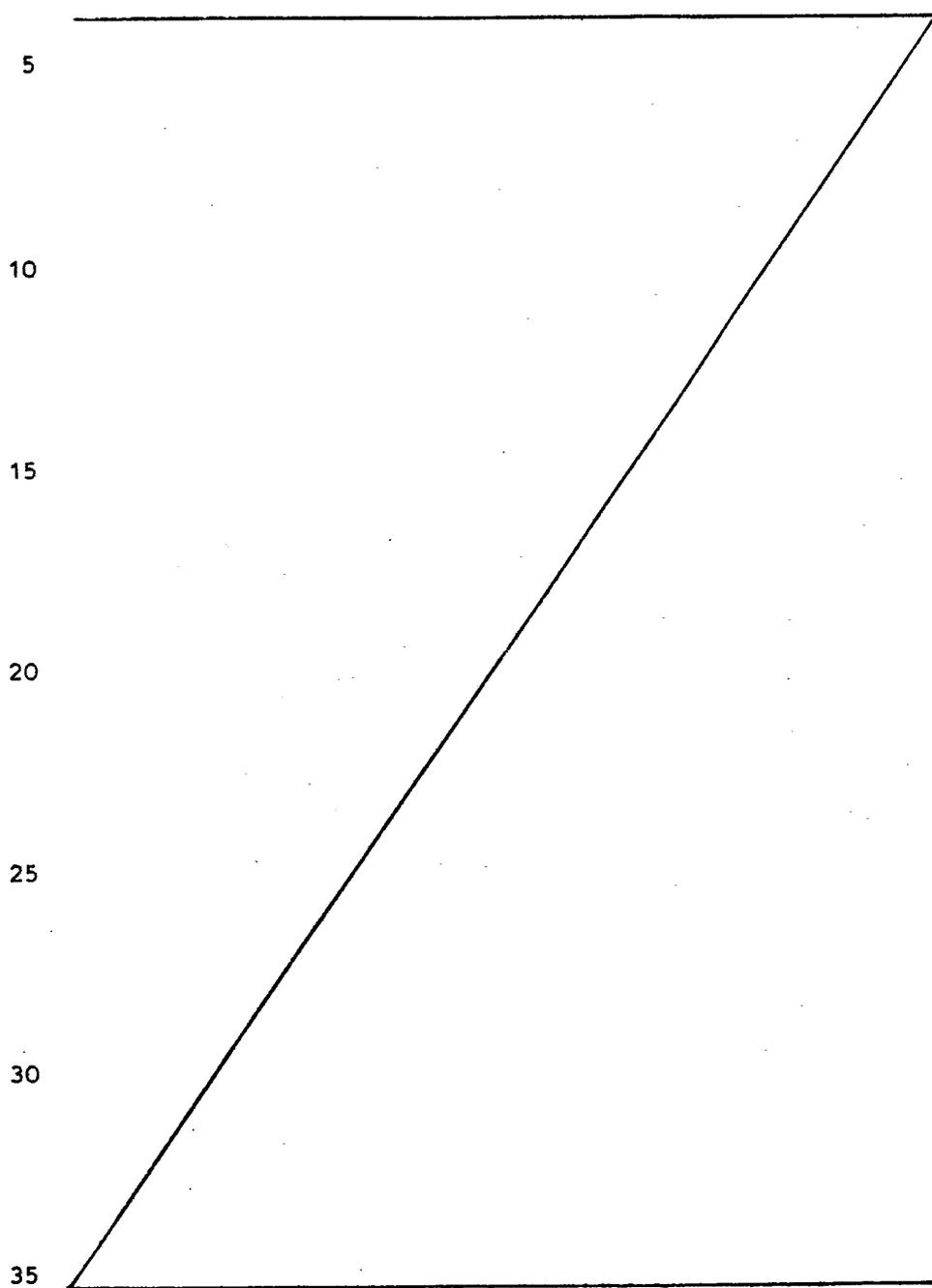
2/ Nature des acides aminés :

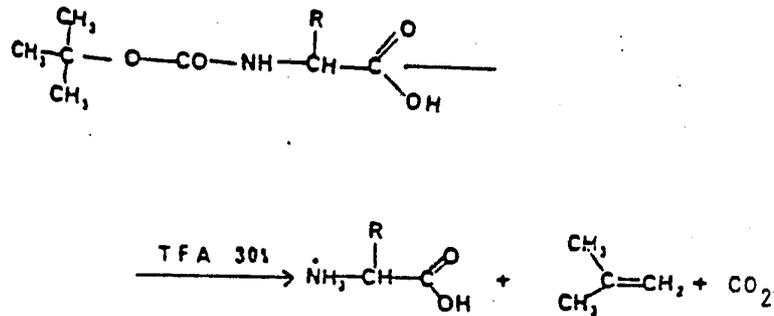
a/ Protection des groupements α-aminés.

35 La fonction α-NH₂ de l'acide aminé ajouté a été protégée pour éviter la réaction d'auto-condensation des acides aminés. Le groupement protecteur utilisé pour

15

cette synthèse est le tertiobutyloxy-carbonyle (Boc) qui est éliminé par l'acide trifluoroacétique (TFA) 30% dans le dichlorométhane (DCM).





b/ Protection des groupements fonctionnels latéraux.

Contrairement à une protection temporaire des fonctions α -aminés, les fonctions portées par les chaînes latérales doivent être maintenues protégées durant toute la synthèse et, par conséquent, les protections doivent être non labiles en milieu TFA 30%. Par contre, elles seront déprotégées, en général, par le réactif utilisé pour couper la liaison peptide-résine, l'acide fluorhydrique. Les différents groupements protecteurs correspondant aux acides aminés utilisés sont représentés dans le tableau 1.

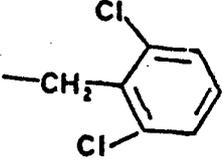
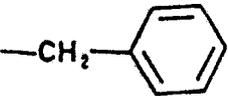
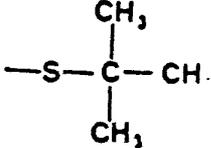
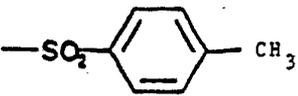
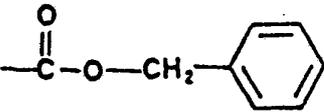
Fonction protégée	Groupement protecteur	
OH de la tyrosine	2,6-dichlorobenzyl	
OH de la thréonine	benzyl	
OH de la sérine		
- COOH de l'aspartate		
- COOH du glutamate		
SH de la cystéine	t. butylmercapto	
imidazole de l'histidine	tosyl	
-NH de l'arginine		
-NH ₂ de la lysine	benzyloxycarbonyl	
Indole du Tryptophane	formyl	-CHO

Tableau 1 : Protection des fonctions tertiaires des acides aminés utilisés dans nos synthèses.

3/ Dispositif expérimental :

L'assemblage des peptides a été réalisé automatiquement dans un synthétiseur (APPLIED BIOSYSTEMS (marque déposée) Peptides Synthétiseur modèle 430A) suivant la méthode générale décrite par MERRIFIELD).

4/ Protocole d'incorporation d'un résidu :

Le protocole expérimental permettant d'effectuer un cycle de synthèse comporte les étapes suivantes :

a/ - Déprotection des fonctions aminées

Elle est obtenue après 2 prétraitements de 2 minutes suivis d'un traitement de 30 minutes avec 30% de TFA/CH₂Cl₂. Les conditions utilisées sont normalement suffisantes pour éliminer complètement les groupements Boc protecteurs des fonctions α-NH₂,

b/ - Lavage

Les produits déprotégés ont été lavés 5 fois 2 minutes avec CH₂Cl₂.

c/ - Neutralisation

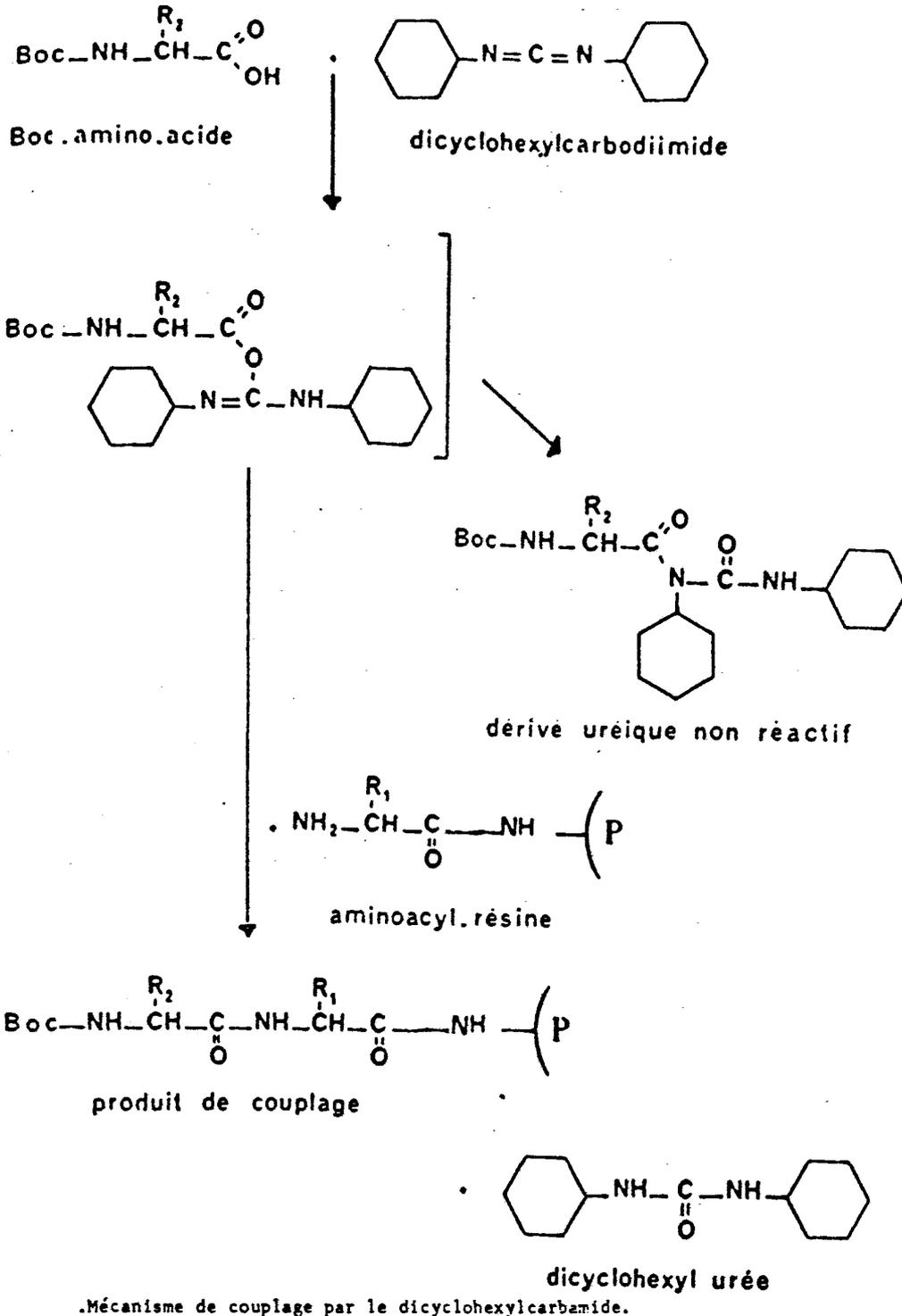
Nécessaire pour désioniser l'amine α-NH₂ du peptide sur la résine et la rendre nucléophile pour participer à la réaction de couplage, la neutralisation est obtenue par 2 prétraitements de 2 minutes suivis d'un traitement de 10 minutes avec 5% de DIEA/CH₂Cl₂ (le DIEA étant le Di-Isopropyl-Ethyl-Amine).

d/ - Premier couplage

Le premier couple est réalisé dans un excès (3 fois) de Boc acide aminé (aa) et du dicyclohexylcarbodiimide (DCC) dans CH₂Cl₂ (2 heures). Lors du couplage dont le mécanisme est représenté ci-après, une réaction secondaire donne un dérivé uréique non réactif qui dépend de la nature du solvant.

Cette réaction est assez faible dans le dichlorométhane et elle est contrebalancée par l'utilisation d'un excès de réactifs (DCC et Boc-a.a).

19



e/ - Lavage

On lave le produit de réaction 5 fois, 2 minutes avec CH_2Cl_2 .

f/ - Nouvelle neutralisation

5 Pour réaliser cette nouvelle neutralisation, on fait 2 prétraitements de 2 minutes suivis d'un traitement de 10 minutes avec 5% de DIEA/ CH_2Cl_2 .

Cette nouvelle neutralisation permet l'activation des α -amines qui auraient échappé au premier traitement basique.

g/ - Lavage

10 On lave le produit 5 fois 2 minutes avec CH_2Cl_2 et 1 fois 2 minutes avec la diméthylformamide (DMF).

h/ - 2ème couplage

Ce deuxième couplage fait intervenir comme réactif l'ester de benzotriazole du Boc acide aminé 1,5 fois en excès dans la DMF (1 heure).

20 L'ester de benzotriazole du Boc (aa) est préparé extemporanément comme suit :

- on prépare un mélange équimoléculaire de DCC et d'hydroxybenzotriazole (HOBt) dans la diméthylformamide (DMF) et on laisse incuber pendant dix minutes à 0°C. Puis, le Boc acide aminé est ajouté et la réaction est poursuivie à 0°C pendant dix minutes. L'ester de benzotriazole du Boc acide aminé ainsi formé est ajouté dans le vase à réaction.

i/ - Lavage

30 On a à nouveau lavé le produit 5 fois 2 minutes avec CH_2Cl_2 .

5/ Contrôles analytiques en cours de synthèse:

Du fait que la synthèse se déroule sans purification des intermédiaires, il est impératif de contrôler que les réactions de couplages sont complètes. Le diagramme de la figure 2 montre l'importance d'avoir

des couplages complets pour la synthèse des grandes séquences ; en effet si l'on synthétise un peptide de 40 résidus avec un rendement global (déprotection, neutralisation et couplage) de 98%, on obtient un mélange
5 contenant 46% du peptide voulu et 54% de différents peptides plus petits. Si le rendement est de 99% en moyenne par étape le peptide entier sera présent à 67%. Si le rendement est de 99,5% le peptide voulu représentera alors 82% et seulement 18% de mélanges de
10 peptides plus petits.

Pour vérifier la bonne réalisation du couplage, trois tests de couplages peuvent être mis en oeuvre :

- Test à la ninhydrine (Kaiser, et coll., 1970) : on
15 prélève une partie aliquote de peptidyl-résine (environ 10mg) qu'on lave bien à l'éthanol dans des petits tubes en verre. Après centrifugation et élimination de l'éthanol, on ajoute une solution de ninhydrine et on laisse réagir pendant 5 minutes à 95°C.

20 L'apparition d'une coloration bleue (test positif) signifie un couplage incomplet. Si la couleur de la résine ne change pas le couplage a eu lieu au moins à 99%.

- Test à la fluorescamine (Felix et Jimenez, 1973) : un
25 peu plus sensible que celui à la ninhydrine, il permet de détecter moins de 1% de NH_2 libre. Une partie aliquote de peptidyl-résine (10 à 20mg) est lavée successivement au DCM, à l'éthanol et au DIEA 5% dans le DCM puis on ajoute la fluorescamine. La réaction a lieu dans
30 un milieu basique (DIEA 5%) pendant 10 minutes. Après lavage et séchage, on regarde la résine sous une lampe UV à une longueur d'onde de 366nm. L'apparition d'une fluorescence signifie la présence de NH_2 libres.

- Test au chloranyl (Christensen, 1979) : après le
35 couplage d'un acide aminé quelconque sur une proline on

ne peut utiliser les deux premiers tests à cause de leur faible sensibilité dans la détection des amines secondaires. On utilise le chloranyl (2,3,5,6 tétrachloro 1,4 benzoquinone). A une partie aliquote de peptidyl-résine (5 à 10mg) on ajoute 200 μ l d'acétone et 50 μ l d'une solution saturée de chloranyl dans le toluène; le tout est maintenu en agitation pendant 5 minutes. L'apparition d'une coloration verte signifie un couplage incomplet. Selon le résultat du test, s'il demeure positif après un second ou troisième couplage, on bloque par acétylation les fonctions α -NH₂ qui n'ont pas réagi pour éviter la formation de peptide à délétion, ou bien, s'il est négatif un nouveau cycle de déprotection-couplage est entamé. Par ailleurs, on titre à intervalles réguliers (tous les deux ou trois résidus incorporés) la quantité d'amines présentes sur la résine. Cette quantité doit rester constante et égale à la quantité d'acide aminé fixée initialement sur la phase solide. Nous utilisons la méthode des sels d'acide picrique (Gisin, 1972) : 10 à 20 mg de peptidyl-résine séchés sont pesés avec précision dans une seringue et traités de la façon suivante :

- 5 lavages au DCM
- 3 traitements de 3 minutes avec une solution d'acide picrique (0,01 M dans DCM)
- 5 lavages au DCM pour éliminer l'excès d'acide picrique
- 5 traitements de 5 minutes avec la DIEA (5% dans DCM) qui déplacent le picrate lié à la résine. On recueille les filtrats dans une fiole jaugée de 100 ml.
- lavage de la résine avec de l'éthanol puis on complète la fiole à 100 ml avec l'éthanol
- mesure de la densité optique à 358 nm : sachant la valeur de l' ϵ M (coefficient d'extinction molaire) 358 nm (13800) on calcule la concentration des α -NH₂ libres qui

ont pu réagir avec l'acide picrique pour former le sel correspondant.

6/ Acétylation du peptide sur la résine :

Si le couplage d'un acide aminé demeure incomplet après plusieurs tentatives de réaction, ou si la
5 synthèse du peptide est terminée et que l'on désire bloquer l'extrémité α NH_2 du peptide par le groupement acétyl (l'acétylation de l'extrémité N-terminale est
10 faite dans l'objectif d'avoir un peptide qui mime au point de vue de la charge, celle qui existe dans la protéine native), le peptide sur la résine est acétylé dans les conditions suivantes :

- neutralisation par 5% DIEA
- lavages DCM
- 15 - lavages DMF
- acétylation par le mélange d'1ml d'anhydride acétique (10 mmoles) et de 1,7 ml de DIEA (10 mmoles) dans la DMF. La réaction dure 20 à 30 minutes et est considérée comme complète lorsque le test de couplage est négatif.

20 7/ Coupage de la liaison peptide-résine :

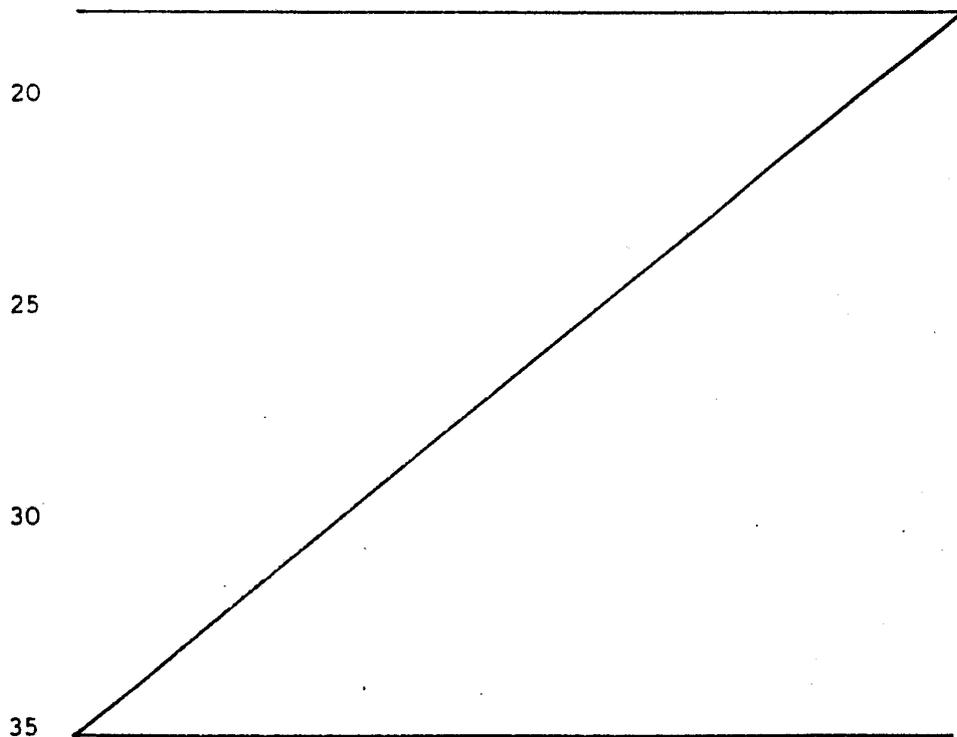
La rupture de la liaison peptide-phase solide est faite par l'acide fluorhydrique anhydre (HF) à 0°C (Lenard et Robinson, 1967 ; Sakakibara et coll., 1967). Elle s'accompagne, si on a choisi des protecteurs labiles dans l'HF, de la déprotection des chaînes latérales.
25 La présence d'anisole (10% en volume) est nécessaire pour piéger les radicaux libres et éviter ainsi l'alkylation de certains résidus, comme la tyrosine, par les groupements protecteurs libérés. En utilisant une résine
30 benzhydrylamine on obtient, à l'issue de la réaction, le peptide sous sa forme C- α amidée. Après évaporation de l'acide fluorhydrique, l'anisole est extraite par l'éther et le peptide est solubilisé par l'acide acétique. Le rendement de la réaction de coupure est
35 calculé à partir des résultats d'analyses d'acides

aminés donnant les quantités de peptide avant (peptide fixé à la résine) et après (peptide brut libre) la coupure par l'acide fluorhydrique. Cependant certains groupements protecteurs des chaînes latérales de quelques acides aminés, comme le formyl tryptophane ne sont enlevés que par un traitement supplémentaire.

8/ Déprotection du tryptophane :

Sous la forme formyl tryptophane, l'acide aminé aromatique est convenablement protégé durant la synthèse contre les risques d'oxydation du groupement indole. Ce groupement indole peut être régénéré par action d'une base (1 M hydroxylamine, pH 9) pendant une heure en milieu aqueux (Ohno et coll., 1972).

Les peptides qui ont été synthétisés sont caractérisés par des propriétés physico-chimiques données dans le tableau 3 suivant :



HIV-1 Localisation dans la séquence de la pro- téine F représentée figure 2	Masse Molaire en g.	Masse Molaire avec grps. de protection en g.	ϵ Théorique à 280 nm, M^{-1} en $cm^{-1}M^{-1}$	Charge nette à pH neutre	Homologie avec la séquence cor- respondante de HIV-2 en %
PF11 1-31	3636	5546	12350	+3	26
PF12 1-66	7015	10333	16650	-1	23
PF13 32-64	3578	5281	5550	-4	18
PF14 65-109	5222	7480	1750	+4	58
PF15 118-167	5886	8610	16600	pour forme réduite -1	56
PF16 171-205	4408	6225	7550	0	40
PF17 141-205	7830	11769	9050	+1	38
PF18 93-122	3735	5564	8300	+1	40
PF19 de HIV-2 125-154	3714	5756	2750	0	avec HIV-1 40%

Tableau 3

EXEMPLE 2ETUDE SEROLOGIQUE AVEC DU PEPTIDE PF 16 DE LA PROTEINE F, OBTENU PAR SYNTHÈSE COMPARATIVE

5 Le peptide a été préalablement synthétisé par la méthode décrite précédemment. Ce peptide couvre la séquence de 35 acides aminés de la partie C-terminale de la séquence d'acides aminés de la protéine F du rétrovirus HIV-1.

10 Le peptide PF16 a la séquence d'acides aminés suivante, dans laquelle l'acétamide (acm) représente un groupe hautement protecteur des fonctions SH des cystéines :

GMDDPEREVLEWRFSRLAFHHVARELHPEYFKNC(acm)

15 Pour les besoins du test, les différents peptides PF16, PF19, PF13, PF17 utilisés sont dilués à une concentration de 2 mg/ml.

Sur une bande de papier BIORAD pour transblot, on dépose différents spots : 1 μ l, 2 μ l, 5 μ l, 10 μ l.

20 Après séchage on pratique un test Western Blot classique en utilisant comme anticorps des sérums de patients infectés par le virus HIV-1, positifs pour la protéine F, à des dilutions variant de 1/100 à 1/300.

25 Les peptides testés permettent d'aboutir aux résultats résumés dans le tableau 2 avec trois sérums différents anti-F ++ (++ signifiant une réaction plus marquée).

30 Par ailleurs, les inventeurs ont constaté qu'un anticorps, monoclonal anti-protéine F d'un rétrovirus HIV-1 produit chez la souris reconnaît le peptide PF16 de l'invention dans un test ELISA.

Ceci montre bien le caractère immunodominant des peptides selon l'invention.

35

SERUMS POSITIFS, ANTI-PROTEINE F DE HIV-1									
	CHA	1/300	P.6. 1/200	1545 1/200	LOM 1/100				
PEPTIDE	10 μ l	5 μ l	2 μ l	1 μ l	10 μ l	5 μ l	2 μ l	1 μ l	1 μ l
PF 16	++	++	++	++	++	++	++	++	++
PF 19	++	++	-	-	+	-	-	-	-
PF 13	+	+	tr	tr	tr	-	-	-	-
PF 17	-	-	-	-	tr	-	-	-	+

27

TABLEAU 2

REVENDICATIONS

1. Peptide capable de former un complexe immunologique avec des anticorps anti-protéine F d'un rétrovirus susceptible de provoquer un SLA ou un SIDA, caractérisé en ce qu'il comporte au plus 70 aminoacides formant une séquence d'acides aminés correspondant à une partie de la protéine F d'un HIV ou à une variante de cette séquence néanmoins telle qu'elle soit immunologiquement reconnue par des anticorps anti-protéine F de rétrovirus HIV.

2. Peptide selon la revendication 1, caractérisé par tout ou partie de la séquence de formule :

XGM-D-E--VL-W-F-S-LA--H-ARE-HPE--K-CZ

dans laquelle X et Z sont des groupements OH ou NH₂ ou, dans la mesure où les propriétés immunologiques du peptide dépourvu de ces groupes ne s'en trouvent pas essentiellement modifiées, des groupes comportant de 1 à 5 résidus d'acides aminés, et chacun des tirets correspond à un résidu aminoacyle choisi parmi ceux qui permettent de conserver au peptide sus-défini la capacité d'être reconnu par des sérums humains contenant des anticorps contre la protéine F d'un rétrovirus HIV-1 et plus particulièrement des anticorps monospécifiques dirigés contre le peptide ci-dessus.

3. Peptide selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est constitué par tout ou partie d'un peptide choisi parmi les peptides suivants :

GMDDPEREVLEWRFDLSRLAFHHVARELHPEYFKNC

GMEDA EKEVLVWRFDLSKLAFFHHMARELHPEYYKDC

GMEDAEREVLKWKFDSSSLALRHRAREQHPEYYKDC

GMEDPERQVLKWRFDLSRLAFEHKAREMHPEFYKN

4. Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les suivants :

XMGGKWSKSSVVGWPTVRERMRAEPAADGVGAYCZ
 XGGKWSKSSVVGWPTVRERMRAEPAADGVGAASRDLEKHGAITSSNTAATNAAC
 AWLEAQEEEEVG
 XASRDLEKHGAITSSNTAATNAACAWLEAQEEEEZ
 5 XCVGFVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILZ
 XCGYFPDQNYTPGPGVRYPLTFGWCYKLVVPEPDKVEEANKGENTSLHPVZ
 XCYKLVVPEPDKVEFANKGENTSLHPVSLHGMDPEREVLEWRFDLSRLAFHHVAR
 ELHPEYFKNCZ
 XCKGGLEGLIHSQRRQDILDWIVHTQGYFPDZ

10 dans lesquels X et Z sont des groupements OH ou NH₂ ou
 dans la mesure où les propriétés immunologiques du
 peptide dépourvu de ces groupes ne s'en trouvent pas
 essentiellement modifiées, des groupes comportant de 1 à
 5 résidus d'acides aminés, choisis de telle sorte qu'ils
 15 permettent de conserver au peptide sus-défini la capa-
 cité d'être reconnu par des sérums humains contenant des
 anticorps contre la protéine F d'un rétrovirus HIV-1 et
 plus particulièrement des anticorps monospécifiques di-
 rigés contre les peptides ci-dessus.

20 5. Peptide selon la revendication 1, caracté-
 risé en ce qu'il présente des propriétés immunologiques,
 en commun avec celles de la séquence suivante :
 XKFDDPHGETLVWFDPLLAYSYEAFIRYPEEFGHKZ

25 dans laquelle X et Z sont des groupements OH ou NH₂ ou,
 dans la mesure où les propriétés immunologiques du pep-
 tide dépourvu de ces groupes ne s'en trouvent pas essen-
 tiellement modifiées, des groupes comportant de 1 à 5
 résidus d'acides aminés, choisis de telle sorte qu'ils
 permettent de conserver au peptide sus-défini la capa-
 30 cité d'être reconnu par des sérums humains contenant
 des anticorps contre la protéine F d'un rétrovirus HIV-2
 et plus particulièrement des anticorps monospécifiques
 dirigés contre le peptide ci-dessus.

35 6. Peptide selon la revendication 1, caracté-
 risé en ce qu'il présente des propriétés immunologiques

en commun avec celles de la séquence suivante :

XCRGGLEGMFYSEERRHKILNIYLEKEEGIIADZ

5 dans laquelle X et Z sont des groupements OH ou NH₂ ou, dans la mesure où les propriétés immunologiques du peptide dépourvu de ces groupes ne s'en trouvent pas essentiellement modifiées, des groupes comportant de 1 à 5 résidus d'acides aminés, choisis de telle sorte qu'ils permettent de conserver au peptide sus-défini la capacité d'être reconnu par des sérums humains contenant des anticorps contre la protéine F d'un rétrovirus HIV-2 et plus particulièrement des anticorps monospécifiques dirigés contre le peptide ci-dessus.

10 7. Mélange de peptides caractérisé en ce qu'il comprend un mélange d'un peptide selon la revendication 2 ou la revendication 4 et d'un peptide selon la revendication 5 ou la revendication 6.

8. Kit pour le diagnostic in vitro d'une infection par un rétrovirus capable de provoquer un SLA ou un SIDA, caractérisé en ce qu'il comprend :

20 - un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, ou un mélange selon la revendication 7;
- les réactifs pour la constitution d'un milieu, notamment une solution tamponnée, propice à la formation d'une réaction immunologique entre le ou les peptides et les anticorps éventuellement présents dans un échantillon biologique ;

25 - un ou plusieurs réactifs éventuellement marqué(s) aptes(s) à réagir avec le ou lesdits peptides pour la détection du complexe peptide-anticorps formé ;

30 - le cas échéant, un milieu biologique de référence, tel qu'un sérum, semblable au milieu biologique provenant de la personne éventuellement infectée avec un rétrovirus HIV et dépourvu d'anticorps reconnaissant les susdits peptides.

9. Anticorps monospécifiques dirigés contre la protéine F, caractérisés en ce qu'ils sont reconnus immunologiquement par un ou plusieurs peptides selon l'une des revendications 1 à 6.

5 10. Procédé de synthèse d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend par les étapes suivantes :

10 a/ mise en contact d'un support solide portant un groupement réactif apte à réagir avec une fonction carboxyle, avec le premier acide aminé C-terminal de la chaîne à synthétiser, protégé au niveau de la fonction amine devant ultérieurement intervenir dans le couplage avec un autre acide aminé, pour éviter l'auto-condensation ;

15 b/ déprotection de la fonction amine de l'acide aminé précédemment fixé ;

20 c/ couplage de la fonction amine déprotégée de l'acide aminé à l'issue de l'étape b/ avec la fonction carboxyle d'un deuxième acide aminé, protégé au niveau de sa fonction amine et qui fournit le deuxième résidu aminoacyle alors couplé au résidu aminoacyle C-terminal du peptide à synthétiser ;

25 d/ déprotection de la fonction amine du deuxième acide aminé ajouté et répétition des étapes c/ de couplage et d/ de protection, successivement avec les acides aminés correspondant respectivement aux résidus aminoacyle successifs jusqu'à aboutir au résidu aminoacyle N-terminal dudit peptide ;

30 e/ séparation du peptide formé, par traitement de la phase solide portant le peptide synthétisé, notamment par exemple au moyen de l'acide fluorhydrique, une fois obtenu l'acide-aminé N-terminal ;

f/ récupération de la séquence peptidique à partir de la solution.

11. Procédé de synthèse selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'étape b/ de déprotection est suivie par une étape de neutralisation destinée à rendre la fonction amine nucléophile.

5 12. Procédé de synthèse selon la revendication 10 ou 11, caractérisé en ce que l'étape de couplage fait intervenir un agent de couplage capable d'activer la fonction carboxyle, de préférence le dicyclohexylcarbodiimide.

10 13. Procédé de synthèse selon l'une quelconque des revendications 10 à 12, caractérisé par une seconde étape de couplage réalisée après lavage et neutralisation du peptide obtenu après l'étape c/, au moyen d'un agent de couplage, afin de permettre la réaction des
15 fonctions amines qui n'avaient pas réagi lors du premier couplage.

14. Procédé de synthèse selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, caractérisé en ce que la protection des fonctions tertiaires des acides aminés
20 est réalisée par le 2,6-dichlorobenzyle pour la fonction OH de la tyrosine, le benzyle pour la fonction OH de la thréonine ou de la sérine ou pour la fonction COOH de l'aspartate ou du glutamate, le t-butylmercapto pour la fonction SH de la cystéine, le tosylé pour l'imidazole
25 de l'histidine ou la fonction NH de l'arginine, le benzyloxycarbonyle pour la fonction NH₂ de la lysine, le formyle pour la fonction indole du tryptophane;

15. Procédé de détection in vitro, d'une infection par un rétrovirus HIV susceptible de provoquer
30 un SLA ou un SIDA, caractérisé en ce qu'il comprend :

a/ la mise en contact d'au moins un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 avec un échantillon biologique à tester, susceptible de contenir des anticorps contre la protéine F d'un rétrovirus HIV,
35 dans des conditions permettant la formation d'un

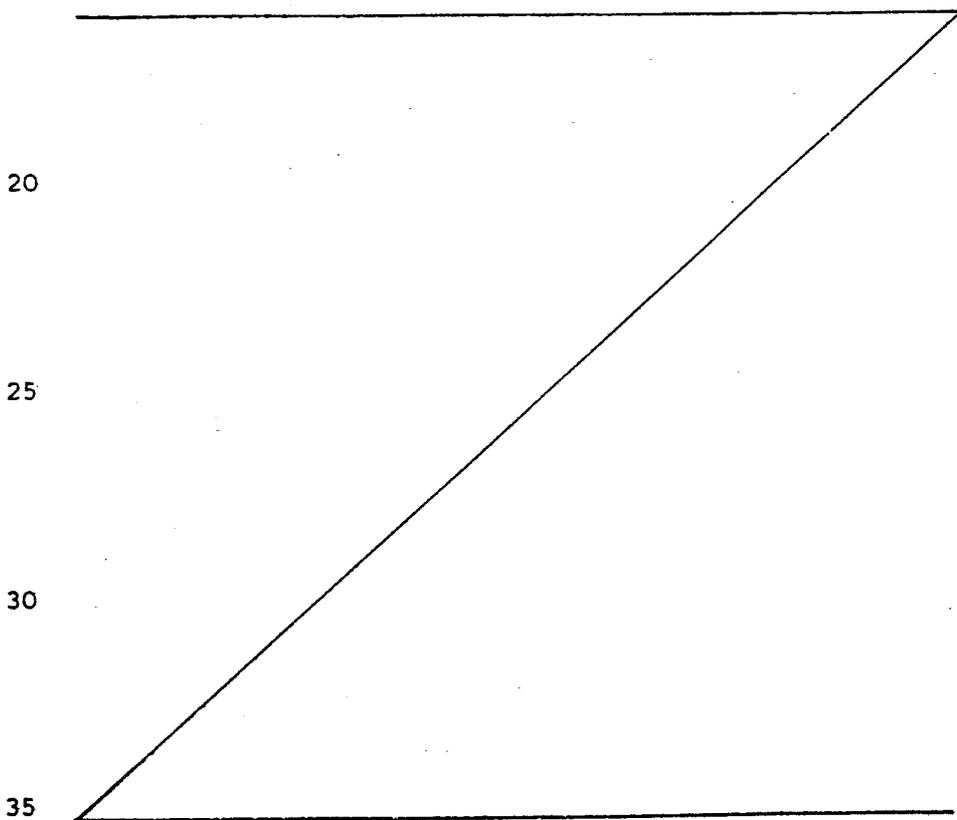
complexe immunologique peptide-anticorps,

b/ la détection du complexe immunologique formé.

5 16. Procédé de détection selon la revendication 14, caractérisé en ce que le peptide mis en oeuvre reconnaît spécifiquement des anticorps formés contre la protéine F d'un rétrovirus HIV-1.

10 17. Procédé de détection selon la revendication 15, caractérisé en ce que le peptide mis en oeuvre reconnaît spécifiquement des anticorps formés contre la protéine F d'un rétrovirus HIV-2.

15 18. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'on met en oeuvre un mélange de peptides, capable de détecter une infection par un rétrovirus HIV-1 ou HIV-2.



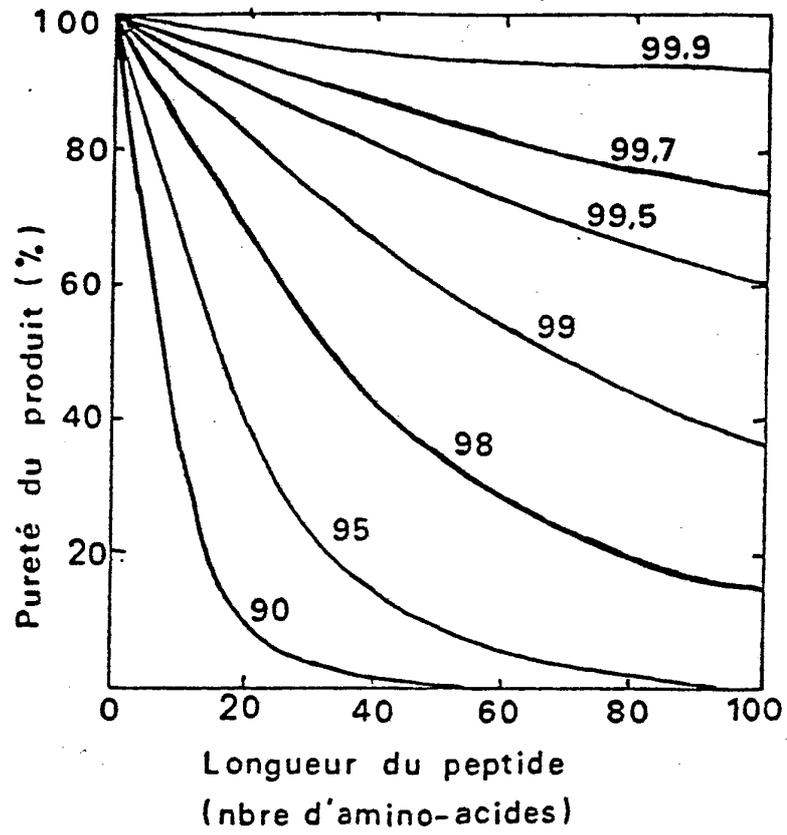


Figure 2

