



(11) **EP 1 694 829 B1**

(12) **FASCICULE DE BREVET EUROPEEN**

- (45) Date de publication et mention de la délivrance du brevet: **04.08.2010 Bulletin 2010/31**
- (21) Numéro de dépôt: **04805625.3**
- (22) Date de dépôt: **02.12.2004**
- (51) Int Cl.: **C12N 7/00^(2006.01)**
- (86) Numéro de dépôt international: **PCT/FR2004/003106**
- (87) Numéro de publication internationale: **WO 2005/056584 (23.06.2005 Gazette 2005/25)**

(54) **NOUVELLE SOUCHE DE CORONAVIRUS ASSOCIE AU SRAS ET SES APPLICATIONS.**]
NEUER MIT SARS VERBUNDEN CORONAVIRUS STAMM UND SEINE VERWENDUNGEN
NOVEL STRAIN OF SARS-ASSOCIATED CORONAVIRUS AND APPLICATIONS THEREOF

- (84) Etats contractants désignés:
AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IS IT LI LT LU MC NL PL PT RO SE SI SK TR
- (30) Priorité: **02.12.2003 FR 0314151**
02.12.2003 FR 0314152
- (43) Date de publication de la demande: **30.08.2006 Bulletin 2006/35**
- (60) Demande divisionnaire: **10005885.8**
- (73) Titulaires:
• **INSTITUT PASTEUR**
75724 Paris Cedex 15 (FR)
• **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)**
75794 Paris Cedex 16 (FR)
• **UNIVERSITE PARIS VII**
75251 Paris Cedex 05 (FR)
- (72) Inventeurs:
• **VAN DER WERF, Sylvie**
F-91190 Gif-sur-yvette (FR)
• **ESCRIOU, Nicolas**
F-75014 Paris (FR)
• **CRESCENZO-CHAIGNE, Bernadette**
F-92200 Neuilly-sur-seine (FR)
• **MANUGUERRA, Jean-Claude**
F-75018 Paris (FR)
• **KUNST, Frederik,**
Inst. Pasteur
Bureau des Brevets et Inventions
75724 Paris Cedex 15 (FR)
• **CALLENDRET, Benoît**
F- 92000 Nanterre (FR)
- **BETTON, Jean-Michel**
75014 Paris (FR)
• **LORIN, Valérie**
92120 Montrouge (FR)
• **GERBAUD, Sylvie**
94100 Saint Maur Des Fosses (FR)
• **BURGUIERE, Ana Maria**
92140 Clamart (FR)
• **AZEBI, Saliha**
94400 Vitry-sur-seine (FR)
• **CHARNEAU, Pierre**
75005 Paris (FR)
• **TANGY, Frédéric**
93260 Les Lilas (FR)
• **COMBREDT, Chantal**
75017 Paris (FR)
• **DELAGNEAU, Jean-François**
78170 La Celle Saint Cloud (FR)
• **MARTIN, Monique**
92290 Chatenay Malabry (FR)
- (74) Mandataire: **Marcadé, Véronique et al**
Cabinet Ores
36, rue de St Pétersbourg
75008 Paris (FR)
- (56) Documents cités:
• **DATABASE EMBL 22 avril 2003 (2003-04-22),**
XP002294758 Database accession no. AY278489
• **DATABASE EMBL 10 juin 2003 (2003-06-10),**
XP002294760 Database accession no. AY290752
• **DATABASE UNIPROT 10 octobre 2003**
(2003-10-10), XP002294761 Database accession
no. P59595

Il est rappelé que: Dans un délai de neuf mois à compter de la publication de la mention de la délivrance du brevet européen au Bulletin européen des brevets, toute personne peut faire opposition à ce brevet auprès de l'Office européen des brevets, conformément au règlement d'exécution. L'opposition n'est réputée formée qu'après le paiement de la taxe d'opposition. (Art. 99(1) Convention sur le brevet européen).

EP 1 694 829 B1

- MARRA M A ET AL: "The genome sequence of the SARS-associated coronavirus" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 300, no. 5624, 30 mai 2003 (2003-05-30), pages 1399-1404, XP002269483 ISSN: 0036-8075
- CHE X-Y ET AL: "RAPID AND EFFICIENT PREPARATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST SARS-ASSOCIATED CORONAVIRUS NUCLEOCAPSID PROTEIN BY IMMUNIZING MICE" DI YI JUNYI DAXUE XUEBAO - ACADEMIC JOURNAL OF FIRST MEDICAL COLLEGE OF PLA, GAI KAN BIANJISHI, GUANGZHOU, CN, vol. 23, no. 7, juillet 2003 (2003-07), pages 640-642, XP008028243 ISSN: 1000-2588
- WANG J ET AL: "ASSESSMENT OF IMMUNOREACTIVE SYNTHETIC PEPTIDES FROM THE STRUCTURAL PROTEINS OF SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME CORONAVIRUS" CLINICAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY. WINSTON, US, vol. 49, no. 12, 13 novembre 2003 (2003-11-13), pages 1989-1996, XP001182489 ISSN: 0009-9147
- SHI Y ET AL: "DIAGNOSIS OF SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME (SARS) BY DETECTION OF SARS CORONAVIRUS NUCLEOCAPSID ANTIBODIES IN AN ANTIGEN-CAPTURING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 41, no. 12, décembre 2003 (2003-12), pages 5781-5782, XP008028263 ISSN: 0095-1137
- LIU G ET AL: "The C-Terminal Portion of the Nucleocapsid Protein Demonstrates SARS-CoV Antigenicity" GENOMICS, PROTEOMICS AND BIOINFORMATICS, vol. 1, no. 3, 2003, pages 193-197, XP001183377
- POON LEO L M ET AL: "Rapid diagnosis of a coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome (SARS)" CLINICAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY. WINSTON, US, vol. 49, no. 6 Pt 1, juin 2003 (2003-06), pages 953-955, XP002288942 ISSN: 0009-9147

Description

- [0001] La présente invention est relative à une nouvelle souche de coronavirus associé au syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS), issue d'un prélèvement répertorié sous le n° 031589 et prélevé à Hanoi (Vietnam), à des molécules d'acide nucléique issues de son génome, aux protéines et peptides codés par lesdites molécules d'acide nucléique ainsi qu'à leurs applications, notamment en tant que réactifs de diagnostic et/ou comme vaccin.
- [0002] Le coronavirus est un virus à ARN monocaténaire, de polarité positive, d'approximativement 30 kilobases qui se réplique dans le cytoplasme des cellules hôtes ; l'extrémité 5' du génome a une structure en coiffe et l'extrémité 3' comporte une queue polyA. Ce virus est enveloppé et comprend, à sa surface, des structures péplomériques dénommées spicules.
- [0003] Le génome comprend les cadres ouverts de lecture ou ORF suivants, de son extrémité 5' vers son extrémité 3' : ORF1a et ORF1b correspondant aux protéines du complexe de transcription-réplication, et ORF-S, ORF-E, ORF-M et ORF-N correspondant aux protéines structurales S, E, M et N. Il comprend également des ORFs correspondant à des protéines de fonction inconnue codées par : la région située entre l'ORF-S et l'ORF-E et chevauchant cette dernière, la région située entre l'ORF-M et l'ORF-N, et la région incluse dans l'ORF-N.
- [0004] La protéine S est une glycoprotéine membranaire (200-220 kDa) qui se présente sous la forme de spicules ou "Spike" émergeant de la surface de l'enveloppe virale. Elle est responsable de l'attachement du virus aux récepteurs de la cellule hôte et de l'induction de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire.
- [0005] La petite protéine d'enveloppe (E) également dénommée sM (*small membrane*) qui est une protéine transmembranaire non glycosylée d'environ 10 kDa, est la protéine présente en plus faible quantité dans le virion. Elle joue un rôle moteur dans le processus de bourgeonnement des coronavirus qui se produit au niveau du compartiment intermédiaire dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi
- [0006] La protéine M ou protéine de matrice (25-30 kDa) est une glycoprotéine membranaire plus abondante qui est intégrée dans la particule virale par une interaction M/E, tandis que l'incorporation de S dans les particules est dirigée par une interaction S/M. Elle semble être importante pour la maturation virale des coronavirus et pour la détermination du site au niveau duquel les particules virales sont assemblées.
- [0007] La protéine N ou protéine de nucléocapside (45-50 kDa) qui est la plus conservée parmi les protéines structurales des coronavirus, est nécessaire pour encapsider l'ARN génomique puis pour diriger son incorporation dans le virion. Cette protéine est vraisemblablement également impliquée dans la réplication de l'ARN.
- [0008] Lorsqu'une cellule hôte est infectée, le cadre de lecture (ORF) situé en 5' du génome viral est traduit en une polyprotéine qui est clivée par les protéases virales et libère alors plusieurs protéines non-structurales telles que l'ARN-polymérase ARN dépendante (Rep) et l'ATPase hélicase (Hel). Ces deux protéines sont impliquées dans la réplication du génome viral ainsi que dans la génération de transcrits qui sont utilisés dans la synthèse des protéines virales. Les mécanismes par lesquels ces ARNms sub-génomiques sont produits, ne sont pas complètement compris ; cependant des faits récents indiquent que les séquences de régulation de la transcription à l'extrémité 5' de chaque gène représentent des signaux qui régulent la transcription discontinue des ARNms sub-génomiques.
- [0009] Les protéines de la membrane virale (protéines S, E et M) sont insérées dans le compartiment intermédiaire, alors que l'ARN répliqué (brin +) s'assemble avec la protéine N (nucléocapside). Ce complexe protéine-ARN s'associe ensuite avec la protéine M incluse dans les membranes du réticulum endoplasmique et les particules virales se forment lorsque le complexe de la nucléocapside bourgeonne dans le réticulum endoplasmique. Le virus migre ensuite à travers le complexe du Golgi et éventuellement sort de la cellule, par exemple par exocytose. Le site de l'attachement du virus à la cellule hôte se trouve au niveau de la protéine S.
- [0010] Les coronavirus sont responsables de 15 à 30 % des rhumes chez l'Homme et d'infections respiratoires ou digestives chez les animaux, notamment le chat (FIPV : *Feline infectious peritonitis virus*), la volaille (IBV : *Avian Infectious bronchitis virus*), la souris (MHV : *Mouse Hepatitis virus*), le porc (TGEV : *Transmissible gastroenteritis virus*, PEDV : *Porcine Epidemic Diarrhea virus*, PRCoV : *Porcine Respiratory Coronavirus*, HEV : *Hemagglutinating encephalomyelitis Virus*) et les bovins (BcoV : *Bovine coronavirus*).
- [0011] En général, chaque coronavirus n'affecte qu'une seule espèce ; chez les individus immunocompétents, l'infection induit des anticorps éventuellement neutralisants et une immunité cellulaire, capables de détruire les cellules infectées.
- [0012] Une épidémie de pneumonie atypique, dénommée syndrome respiratoire aigu sévère (SARS ou *Severe acute respiratory syndrome*, SRAS en français) s'est propagée dans différents pays (Vietnam, Hong-Kong, Singapour, Thaïlande et Canada) au cours du premier trimestre 2003, à partir d'un foyer initial apparu en Chine dans le dernier trimestre de 2002. La sévérité de cette maladie est telle que son taux de mortalité est d'environ 3 à 6 %. La détermination de l'agent causatif de cette maladie a été entreprise par de nombreux laboratoires, à travers le monde.
- [0013] En mars 2003, un nouveau coronavirus (SARS-CoV, SARS virus ou virus SRAS, en français) a été isolé, en association avec des cas de syndrome respiratoire aigu sévère (T.G.KSIAZEK et al., *The New England Journal of Medicine*, 2003, 348, 1319-1330 ; C. DROSTEN et al., *The New England Journal of Medicine*, 2003, 348, 1967-1976 ;



US 20070128224A1

(19) **United States**

(12) **Patent Application Publication** (10) **Pub. No.: US 2007/0128224 A1**

Van Der Werf et al. (43) **Pub. Date: Jun. 7, 2007**

(54) **NOVEL STRAIN OF SARS-ASSOCIATED CORONAVIRUS AND APPLICATIONS THEREOF**

(76) Inventors: **Sylvie Van Der Werf**, Gif-Sur-Yvette (FR); **Nicolas Escriou**, Paris (FR); **Bernadette Crescenzo-Chaigne**, Neuilly-Sur-Seine (FR); **Jean-Claude Manuguerra**, Paris (FR); **Frederick Kunst**, Paris (FR); **Benoit Callendret**, Nanterre (FR); **Jean-Michel Betton**, Paris (FR); **Valerie Lorin**, Montrouge (FR); **Sylvie Gerbaud**, Saint-Maur-Des-Fosses (FR); **Ana Maria Burguiere**, Clamart (FR); **Saliha Azebi**, Vitry-Sur-Seine (FR); **Pierre Charneau**, Paris (FR); **Frederic Tangy**, Les Lilas (FR); **Chantal Combredet**, Paris (FR); **Jean-Francois Delagneau**, La Celle Saint Cloud (FR); **Monique Martin**, Chatenay Malabry (FR)

Correspondence Address:
**FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW,
GARRETT & DUNNER
LLP
901 NEW YORK AVENUE, NW
WASHINGTON, DC 20001-4413 (US)**

(21) Appl. No.: **10/581,356**

(22) PCT Filed: **Dec. 2, 2004**

(86) PCT No.: **PCT/FR04/03106**

§ 371(c)(1),
(2), (4) Date: **Feb. 8, 2007**

(30) **Foreign Application Priority Data**

Dec. 2, 2003 (FR)..... 0314151
Dec. 2, 2003 (FR)..... 0314152

Publication Classification

(51) **Int. Cl.**
A61K **39/215** (2006.01)
C12Q **1/70** (2006.01)
C07H **21/04** (2006.01)
C07K **14/165** (2006.01)
C07K **16/10** (2006.01)
C12N **5/06** (2006.01)
(52) **U.S. Cl.** **424/221.1; 435/5; 435/69.3; 435/326; 435/456; 530/350; 530/388.3; 536/23.72; 977/802**

(57) **ABSTRACT**

The invention relates to a novel strain of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus, resulting from a sample collected in Hanoi (Vietnam), reference number 031589, nucleic acid molecules originating from the genome of same, proteins and peptides coded by said nucleic acid molecules and, more specifically, protein N and the applications thereof, for example, as diagnostic reagents and/or as a vaccine.



US008343718B2

(12) **United States Patent**
Van Der Werf et al.

(10) **Patent No.:** **US 8,343,718 B2**
(45) **Date of Patent:** **Jan. 1, 2013**

(54) **STRAIN OF SARS-ASSOCIATED
CORONAVIRUS AND APPLICATIONS
THEREOF**

(75) Inventors: **Sylvie Van Der Werf**, Gif-Sur-Yvette (FR); **Nicolas Escriou**, Paris (FR); **Bernadette Crescenzo-Chaigne**, Neuilly-Sur-Seine (FR); **Jean-Claude Manuguerra**, Paris (FR); **Frederik Kunst**, Paris (FR); **Benoit Calendret**, Nanterre (FR); **Jean-Michel Betton**, Paris (FR); **Valérie Lorin**, Montrouge (FR); **Sylvie Gerbaud**, Saint-Maur-Des-Fosses (FR); **Ana Maria Burguiere**, Clamart (FR); **Saliha Azebi**, Vitry-Sur-Seine (FR); **Pierre Charneau**, Paris (FR); **Frédéric Tangy**, Les Lilas (FR); **Chantal Combredet**, Paris (FR); **Jean-François Delagneau**, La Celle Saint Cloud (FR); **Monique Martin**, Chatenay Malabry (FR)

(73) Assignees: **Institut Pasteur**, Paris (FR); **Centre National de la Recherche Scientifique**, Paris (FR); **Universite Paris 7**, Paris (FR)

(*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 0 days.

(21) Appl. No.: **12/754,908**

(22) Filed: **Apr. 6, 2010**

(65) **Prior Publication Data**
US 2011/0065089 A1 Mar. 17, 2011

Related U.S. Application Data
(60) Division of application No. 10/581,356, filed on Feb. 8, 2007, now Pat. No. 7,736,850, which is a continuation of application No. PCT/FR2004/003106, filed on Dec. 2, 2004.

(30) **Foreign Application Priority Data**
Dec. 2, 2003 (FR) 03 14151
Dec. 2, 2003 (FR) 03 14152

(51) **Int. Cl.**
C12Q 1/70 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/542 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)
(52) **U.S. Cl.** **435/5; 435/7.1; 435/7.9; 435/7.92; 435/7.94; 435/7.95**

(58) **Field of Classification Search** None
See application file for complete search history.

(56) **References Cited**
U.S. PATENT DOCUMENTS
2003/0008332 A1* 1/2003 Ryan et al. 435/7.22
2005/0100883 A1* 5/2005 Wang et al. 435/5

OTHER PUBLICATIONS

Azcona-Olivera et al. Generation of Antibodies Reactive with Fumonisin B1, B2, and B3 by Using Cholera Toxin as the Carrier-Adjuvant. *Applied and Environmental Microbiology*, Jan. 1992, vol. 58, No. 1, pp. 169-173.*
Li et al. The Epitope Study on the SARS-CoV Nucleocapsid Protein. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, Aug. 2003, vol. 1, No. 3, pp. 198-206.*
Wirtz et al. Comparative testing of monoclonal antibodies against Plasmodium falciparum sporozoites for ELISA development. *Bulletin of the World Health Organization* 1987, vol. 65, No. 1, pp. 39-45.*
Voller et al. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *Journal of Clinical Pathology* 1978, vol. 31, p. 507-520.*
Kemeny et al. Development of a semi-quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human IgG subclass antibodies. *Journal of Immunological Methods* 1987, Vol.*
Li et al. Detection and analysis of SARS coronavirus-specific antibodies in sera from non-Sars children. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao (Journal of the First Military Medical University)* Oct. 2003, vol. 23, No. 10, pp. 1085-1087.*
Database EMBL, XP002294758, Database accession No. AY278489, "EMBL Sequence Version Archive", pp. 1-7, (Apr. 22, 2003).
Database EMBL, XP002294760, Database accession No. AY290752, "EMBL Sequence Version Archive", pp. 1-2, (Jun. 10, 2003).
Database UNIPROT, XP002294761, Database accession No. P59595, pp. 1-4, "Human Coronavirus", (Oct. 10, 2003).
Marra, et al., "The Genome Sequence of the SARS-Associated Coronavirus", *Science, American Association for the Advancement of Science*, vol. 300, No. 5624, pp. 1399-1404, (May 30, 2003).
Che, et al., "Rapid and Efficient Preparation of Monoclonal Antibodies Against SARS-Associated Coronavirus Nucleocapsid Protein By Immunizing Mice", *Di Yi Junyi Daxue Xuebao—Academic Journal of First Medical College of PLA, Gain Kan Bianjishi, Guangzhou, CN*, vol. 23, No. 7, pp. 640-642, (Jul. 2003).
Wang, et al., "Assessment of Immunoreactive Synthetic Peptides from the Structural Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus", *Clinical Chemistry, American Association for Clinical Chemistry, Winston, US*, vol. 49, No. 12, pp. 1989-1996, (Nov. 13, 2003).
Shi, et al., "Diagnosis of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) by Detection of SARS Coronavirus Nucleocapsid Antibodies in an Antigen-Capturing Enzyme-Linked Immunosorbent Assay", *Journal of Clinical Microbiology, Washington, DC, US*, vol. 41, No. 12, pp. 5781-5782, (Dec. 2003).
Liu, et al., "The C-Terminal Portion of the Nucleocapsid Protein Demonstrates SARS-CoV Antigenicity", *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, vol. 1, No. 3, pp. 193-197, (Aug. 2003).
Poon, et al., "Rapid Diagnosis of a Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)", *Clinical Chemistry, American Association for Clinical Chemistry, Winston, US*, vol. 49, No. 6, Pt. 1, pp. 953-955, (Jun. 2003).

* cited by examiner
Primary Examiner — Louise Humphrey
(74) *Attorney, Agent, or Firm* — Finnegan, Henderson, Farabow, Garrett & Dunner L.L.P.

(57) **ABSTRACT**
The invention relates to a novel strain of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus, resulting from a sample collected in Hanoi (Vietnam), reference number 031589, nucleic acid molecules originating from the genome of same, proteins and peptides coded by said nucleic acid molecules and, more specifically, protein N and the applications thereof, for example, as diagnostic reagents and/or as a vaccine.

8 Claims, 116 Drawing Sheets

