



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 1993/06/15  
 (87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 1993/12/23  
 (45) Date de délivrance/Issue Date: 2005/12/27  
 (85) Entrée phase nationale/National Entry: 1994/12/02  
 (86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 1993/000575  
 (87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 1993/025689  
 (30) Priorité/Priority: 1992/06/15 (92/07206) FR

(51) Cl.Int.<sup>7</sup>/Int.Cl.<sup>7</sup> C12N 15/30, A61P 33/02, A61K 39/002,  
 C12N 15/62, C12P 21/00, C07K 14/45, C12N 15/11,  
 C07K 7/08, C07K 7/06, G01N 33/569

(72) Inventeurs/Inventors:  
 CESBRON, MARIE-FRANCE, FR;  
 MERCIER, CORINNE, FR;  
 CAPRON, ANDRE, FR;  
 TARTAR, ANDRE, FR;  
 MAES, PIERRETTE, FR

(73) Propriétaires/Owners:  
 INSTITUT PASTEUR DE LILLE, FR;  
 INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA  
 RECHERCHE MEDICALE, FR

(74) Agent: BORDEN LADNER GERVAIS LLP

(54) Titre : CLONAGE DU GENE CODANT POUR LA PROTEINE GP28.5 DE TOXOPLASMA GONDII; FRAGMENTS PEPTIDIQUES DE CETTE PROTEINE ET LEURS APPLICATIONS

(54) Title: CLONING OF GENE ENCODING THE GP28.5 PROTEIN OF TOXOPLASMA GONDII; PEPTIDE FRAGMENTS OF SAID PROTEIN AND THEIR APPLICATIONS

(57) Abrégé/Abstract:

L'invention est relative au clonage du gène codant pour l'antigène GP28.5 de toxoplasme. L'invention englobe également, les fragments d'acide nucléique, les acides nucléique, les fragments peptidique, et des préparations antigéniques purifiées de l'antigène GP28.5, ainsi que des polypeptides antigéniques dérivés de cet antigène, et leurs applications.

## ABRÉGÉ

L'invention est relative au clonage du gène codant pour l'antigène GP28.5 de toxoplasme. L'invention englobe également, les fragments d'acide nucléique, les acides nucléique, les fragments peptidique, et des préparations antigéniques purifiées de l'antigène GP28.5, ainsi que des polypeptides antigéniques dérivés de cet antigène, et leurs applications.

## 5 a. NOM DE L'INVENTION

CLONAGE DU GENE CODANT POUR LA PROTEINE GP28.5 DE T. GONDII;  
FRAGMENTS PEPTIDIQUES ISSUS DE LADITE PROTEINE ET LEURS  
APPLICATIONS.

10

## b. DOMAINE TECHNIQUE PERTINENT À L'INVENTION

La présente Invention est relative au clonage du gène  
codant pour un antigène d'excrétion-sécrétion de 28,5 kDa de  
toxoplasme, et à l'obtention de fragments peptidiques  
15 représentant des épitopes de celui-ci, ainsi qu'à des  
préparations du antigène et de ses fragments, et à leurs  
utilisations.

## c. ILLUSTRATIONS D'ARRIÈRE-PLAN

20 La toxoplasmose est une des infections à protozoaires les  
plus répandues, aussi bien chez l'homme que chez l'animal.  
Elle est responsable d'environ 25% des décès chez les patients  
atteints du SIDA. L'infection congénitale, cause d'avortements  
ou de malformations néonatales sévères chez l'homme et les  
25 animaux domestiques, pourrait être prévenue. En effet, on sait  
que la primo-infection induit une immunité de longue durée.

Dans la recherche d'antigènes protecteurs permettant le  
développement d'un vaccin contre la toxoplasmose, différents  
antigènes ont été étudiés. L'équipe des inventeurs s'est en  
particulier intéressée aux antigènes d'excrétion-sécrétion  
30 (ESA) des tachyzoïtes. Il a en effet été établi, au cours  
d'expérimentations aussi bien chez l'homme que chez l'animal,  
que les antigènes ESA étaient immunogènes. Il a également été  
montré que certains des ESA possèdent des épitopes communs  
35 avec des antigènes des bradyzoïtes. Or, les bradyzoïtes sont la  
forme résistante du parasite.

Différentes approches, comprenant en particulier la  
production d'anticorps monoclonaux, le marquage à l'or  
colloïdal, et la biologie moléculaire, ont conduit l'équipe  
40 des Inventeurs à la caractérisation de quatre antigènes communs  
[CHARIF et al. Exp. Parasitol, 71:117(1990)] [CESBRON-DELAUW

5 et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:7537 (1989)], [DARCY et  
al., Parasitol. Res. 76:478, (1990)]. Le principal, dénommé  
Gra2 ou GP28.5, est une glycoprotéine de 28.5 kDa, et il a été  
montré qu'il était un constituant de la matrice des granules  
denses des tachyzoïtes, et qu'il était associé avec le réseau  
10 de microvillosités de la vacuole parasitophore du parasite,  
après invasion de l'hôte.

Un antigène de 28 kDa (P28), considéré comme similaire à  
l'antigène GP28.5, a été décrit par SIBLEY et SHARMA [SIBLEY  
et al. Infect. Immun. 55:2137 (1987)], et une séquence d'ADN  
15 codant pour cet antigène a été publiée par PRINCE et al.  
[Molec. Biochem. Parasitol. 34.3 (1989)].

#### d. DESCRIPTION DE L'INVENTION

La présente l'invention s'est fixé pour but l'obtention de  
20 préparations purifiées de l'antigène GP28.5, ainsi que  
l'obtention de cet antigène sous forme recombinante, et sa  
caractérisation immunologique. En particulier, la présente  
invention a pour but la localisation et la caractérisation  
d'épitopes spécifiques de l'antigène GP28.5.

25 Les inventeurs sont parvenus à obtenir une préparation  
purifiée de l'antigène GP28.5, et ont démontré l'effet  
protecteur d'une immunisation par cette préparation contre  
l'infection par *Toxoplasma gondii* chez la souris.

Les inventeurs ont également cloné l'ensemble du gène  
30 codant pour l'antigène GP28.5, et ont localisé les introns et  
les exons, ainsi que les régions non-codantes en 5' et 3'.

La présente invention a pour objet un fragment d'acide  
nucléique, codant pour l'antigène GP28.5 de toxoplasme. Il est  
choisi dans le groupe constitué par un fragment d'acide  
35 nucléique codant pour le polypeptide constitué par 1 à 129  
acides aminés de la séquence SEQ.ID.NO:2; un fragment d'acide  
nucléique codant pour un polypeptide constitué par 24 à 124  
acides aminés de la séquence SEQ.ID.NO2; un fragment d'acide  
nucléique codant pour un polypeptide constitué par les  
40 aminoacides 55 à 70 de la séquence SEQ.ID.NO:2; et un fragment

5 d'acide nucléique codant pour un polypeptide constitué par les aminoacides 140 à 160 de la séquence SEQ.ID.NO:2.

Les inventeurs ont également montré que l'antigène GP28.5 contient plusieurs épitopes majeurs spécifiques des cellules B; l'un d'entre eux, qui est reconnu par un anticorps  
10 monoclonal de souris dénommé TG17-179 [CHARIF et al., Exp. Parasitol., 71:117 (1990)] est localisé à l'extrémité C-terminale de la molécule.

Les inventeurs ont caractérisé cet épitope et ont montré qu'il comprenait au moins les 5 acides aminés C-terminaux de  
15 GP28.5. En outre, ils ont montré que cet épitope est également un épitope majeur reconnu par es anticorps polyclonaux humains dirigés contre *T. gondii*.

L'invention englobe également des fragments d'acide nucléique qui codent pour des polypeptides représentant des  
20 épitopes de l'antigène GP28.5. Il est choisi dans le groupe constitué par un fragment peptidique constitué par 1 à 129 acides aminés de la séquence SEQ.ID.NO:2; un fragment peptidique essentiellement constitué par les acides aminés 24 à 129 de la séquence SEQ.ID.NO:2; un fragment peptidique  
25 essentiellement constitué par les acides aminés 55 à 70 de la séquence SEQ.ID.NO:2; et un fragment peptidique essentiellement constitué par les acides aminés 140 à 160 de la séquence SEQ.ID.NO:2. Le fragment peptidique est caractérisé en ce qu'il est essentiellement constitué par 8 à  
30 15 acides aminés C-terminaux de la séquence SEQ.ID.NO:2. Selon un mode de réalisation préféré d'un aspect de cet invention, le fragment peptidique est essentiellement fragment peptidique conforme à un aspect de l'invention caractérisé en ce qu'il est essentiellement constitué par 8 à 15 acides aminés C-  
35 terminaux de la séquence SEQ.ID.NO:2.

L'invention a également pour objet des acides nucléique condant pour un polypeptide comprenant un fragment de  
l'antigène GP28.5 de toxoplasme, comprenant au moins un  
épitope de l'antigène GP28.5 fusionée avec un autre séquence  
40 polypeptidique, caractérisé en ce qu'elle fragment de l'antigène GP28.5 de toxoplasme est choisie dans le groupe

5 constitué par un fragment comprenant 1 à 129 acides amine de  
la séquence SEQ.ID.NO:2; un fragment comprenant 24 à 129  
acides amine de la séquence SEQ.ID.NO:2; un fragment  
comprenant 55 à 70 acides amine de la séquence SEQ.ID.NO:2; et  
un fragment comprenant 140 à 160 acides amine de la séquence  
10 SEQ.ID.NO:2.

L'invention a également pour objet des vecteurs  
recombinants (plasmides, virus, etc...) caractérisés en ce  
qu'ils comprennent au moins un fragment d'acide nucléique tel  
que défini ci-dessus, codant pour l'antigène GP28.5 de  
15 toxoplasme, ou pour un fragment peptidique représentant un  
épitope de celui-ci, qui conforme à un aspect de l'invention.

Les vecteurs sont en particulier des vecteurs  
d'expression, comprenant des séquences de type promoteur,  
terminateur, etc...

20 La présente invention a également pour objet des cellules  
eucaryotes ou procaryotes transformées (et en particulier des  
microorganismes), caractérisés en ce qu'elles contiennent au  
moins un vecteur recombinant conforme à un aspect de  
l'invention.

25 L'invention a également pour objet un polypeptide de 185  
acides aminés dont la séquence qui est représentée à la liste  
des séquences en annexe sous le numéro SEQ.ID.NO:2, est celle  
de l'antigène GP28.5 de toxoplasme conforme à un aspect de  
l'invention.

30 L'invention également pour objet en protéine recombinant,  
comprenant une séquence polypeptidique de l'antigène GP28.5 de  
toxoplasme, fusionnée avec une autre séquence polypeptidique,  
et caractérisé en ce qu'elle est choisie dans le groupe  
constitué par une protéine recombinante dans laquelle la  
35 séquence polypeptidique de l'antigène GP28.5 de toxoplasme est  
constitué par les amino-acides 1 à 129 de la séquence  
SEQ.ID.NO:2; une protéine recombinante dans laquelle la séquence  
polypeptidique de l'antigène GP28.5 de toxoplasme est  
constituée par les amino-acides 24 à 129 de la séquence  
40 SEQ.ID.NO:2; une protéine recombinant dans laquelle la  
séquence polypeptidique de l'antigène GP28.5 de toxoplasme est

5 constituée par les amino-acides 55 à 70 de la séquence SEQ.ID.NO:2; et une protéine recombinante dans laquelle la séquence polypeptidique de l'antigène GP28.5 de toxoplasme est constituée par les amino-acides 140 à 160 de la séquence SEQ.ID.NO:2.

10 L'invention englobe également les polypeptides dont la séquence ne diffère de la séquence mentionnée cidessus que par quelques acides aminés, en particulier des polypeptides représentant des variants alléliques ou des isoformes de l'antigène GP 28.5 conforme à un aspect de l'invention.

15 L'invention a également pour objet à un composition antigénique caractérisé en ce qu'elle comprend au moins un antigène pris dans le groupe constitué par a un polypeptide de séquence SEQ.ID.NO:2 conforme à un aspect de l'invention; un fragment peptidique conforme à un aspect de l'invention; et  
20 une protéine recombinante conforme à un aspect de l'invention.

L'invention concerne également un procédé de production d'un polypeptide conforme à un aspect de l'invention, le procédé est caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture d'une cellule transformée conforme à un aspect de  
25 l'invention, produire la polypeptide, dans la culture cellule, et isoler la polypeptide de la culture cellule..

L'invention concerne également un procédé de production d'une protéine recombinante tel que définie ci-dessus, le procédé est caractérisé en ce qu'il comprend une étape au  
30 cours de laquelle on procédé à la mise en culture de cellules transformées telles que définies plus haut, comprenant au moins un fragment d'ADN conforme à un aspect de l'invention, produire la protéine recombinante dans la culture cellule, et isoler lad polypeptide de la culture cellule.

35 Selon un mode de réalisation préféré, le procédé est caractérisé en ce qu'il comprend une étape au cours de laquelle on immunise un animal avec une composition antigénique conforme à un aspect de l'invention.

40

5 L'invention concerne également l'utilisation d'une composition antigénique conforme à un aspect de l'invention pour l'obtention de réactifs de diagnostic de la toxoplasmose.

10 Selon un mode de réalisation préféré, l'utilisation est pour l'obtention de vaccins anti-toxoplasme.

15 Les polypeptides recombinants conformes à un aspect de l'invention, exprimés chez *E. coli*, conservent des épitopes majeurs impliqués dans la réponse polyclonale à l'antigène GP28.5, et ce, bien que l'expression chez *E. coli* ne maintienne pas l'intégrité structurale de la protéine GP28.5 qui est une protéine glycosylée.

20 Si l'on souhaite toutefois obtenir d'autres épitopes tels que des épitopes de nature glucidique, ou des épitopes correspondant à des structures tertiaires et quaternaires, on choisira de produire la GP28.5 recombinante dans des systèmes eucaryotes tels que par exemple, les levures ou les baculovirus.

25 Les inventeurs ont en outre montré que la séquence C-terminale de quinze acides aminés de l'antigène GP 28.5 représente un épitope reconnu par un certain nombre de sérums de patients atteints d'infections aiguës ou chroniques, et ont également localisé d'autres épitopes B majeurs dans le fragment correspondant aux amino-acides 127-176 de la séquence  
30 SEQ.ID.NO:2. En outre, les Inventeurs ont localisé d'autres régions comprise entre les acides aminés 24 et 129, et en particulier les régions correspondant aux acides aminés 55-70 et aux acides aminés 140-160 de la séquence SEQ.ID.NO:2, qui comprennent des épitopes de l'antigène GP28.5 reconnus par les  
35 sérums humains.

L'invention a également pour objet des peptides comprenant au moins un épitope de l'antigène GP28.5.

40 Selon un mode de réalisation préféré conforme à un aspect de l'invention, le peptide comprend les 5 acides aminés C-terminaux de la séquence SEQ.ID.NO:2.

5            Selon une disposition préférée de ce mode de réalisation, le peptide comprend entre 5 et 15 acides aminés C-terminaux de la séquence SEQ.ID.NO:2.

          Selon une modalité préférée de cette disposition, le peptide comprend les 8 acides aminés C-terminaux de la séquence  
10        SEQ.ID.NO:2.

          Selon un autre mode de réalisation préféré conforme à un aspect de l'invention, le peptide comprend les acides aminés 24-129 de la séquence SEQ.ID.NO:2.

          Selon un autre mode de réalisation préféré conforme à un aspect de l'invention, le peptide comprend les acides aminés  
15        55 à 70 de la séquence SEQ.ID.NO:2.

          Selon encore un autre mode de réalisation préféré conforme à un aspect de l'invention, le peptide comprend les acides aminés 140 à 160 de la séquence SEQ.ID.NO:2.

20            La séquence des 5 acides aminés C-terminaux de l'antigène GP28.5 est reconnue en immuntransfert par l'anticorps monoclonal de souris TG 17-179. Un ELISA compétitif avec des peptides plus longs a montré que l'immunoréactivité était conservée pour des peptides de 8 résidus ou plus, et perdue  
25        quand le peptide était réduit aux 6 derniers résidus C-terminaux ou moins. Des expériences avec l'octapeptide dépourvu du résidu glutamine C-terminal ont montré qu'il était alors 20 fois moins actif. En revanche, ni l'addition de résidus à l'extrémité C-terminale, ni la substitution de la fonction  
30        COOH terminale ne changent l'immunoréactivité de l'épitope. En outre, des expériences de compétition entre l'anticorps monoclonal TG 17-179 et des sérums de patients infectés ont montré que l'épitope défini par cet anticorps monoclonal est également un épitope majeur pour les anticorps polyclonaux  
35        humains.

5 L'invention englobe également un procédé de préparation d'anticorps anti-GP28.5, polyclonaux ou monoclonaux, caractérisé en ce qu'il comprend une étape au cours de laquelle on immunise un animal avec une composition antigénique conforme à un aspect de l'invention.

10 Les compositions antigéniques conformes à aspects de l'invention permettent également la préparation de réactifs de diagnostic, ou de vaccins anti-toxoplasmes. L'invention englobe également ces réactifs et ces vaccins.

15 La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples concernant le clonage du gène codant pour l'antigène GP28.5 de *Toxoplasma gondii*, et l'identification des épitopes spécifiques de cet antigène.

#### 20 e. DESCRIPTION DES ILLUSTRATIONS

La figure 1 représente la carte de restriction partielle sur 5 kb du clone génomique Gra2-EMBL3, ainsi que la carte de restriction partielle d'une région de 2040 pb de celui-ci, qui comprend la totalité du gène GP28.5.

25 La figure 2 représente le pourcentage de souris survivantes après l'infection.

La figure 3 représente les construction dans pGEX de 185 acides aminés.

#### 30 f. AU MOINS UNE MÉTHODE DE RÉALISER L'INVENTION

##### I) CLONAGE ET EXPRESSION DU GENE CODANT POUR LA GP28.5 DE *T. gondii*

35 Sauf précision contraire, les techniques de manipulation des acides nucléiques et de clonage moléculaire utilisées dans les exemples qui suivent sont celles décrites par SAMBROOK et al. [A Laboratory Manual (second edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. (1989)].

40 L'anticorps TG 17-179 a été obtenu à partir de souris BALB/C immunisées avec des antigènes ESAs comme décrit par CHARIFF et al. [Exp. Parasitol. 71:114 (1990)].

7b

5 EXEMPLE 1: CLONAGE DU GENE CODANT POUR LA GP28.5 de *T. gondii*

1) Obtention des toxoplasmes.

Des tachyzoites ont été obtenus à partir du fluide péritonéal de souris infectées trois jours aupara-

10

2137280

8

vant avec la souche RH de *Toxoplasma gondii*. Les parasites ont été récoltés dans du milieu RPMI 1640 (GIBCO BRL), filtrés à travers des membranes de polycarbonate (diamètre de pores 3 microns) (NUCLEPORE.) et lavés deux  
5 fois dans le même milieu.

2\*) Préparation d'acide nucléique de *Toxoplasma gondii*. L'ARN total a été isolé de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* de la souche RH par extraction au lithium/urée, et l'ARN poly (A+) a été purifié par  
10 passage sur une colonne d'oligo (DT)-cellulose.

3\*) Construction de la banque d'ADNc de tachyzoïtes.

a) Construction dans  $\lambda$ gt11

La construction de la banque d'ADNc de toxoplasme dans le phage lambda gt11 a été décrite par  
15 CESBRON-DELAUW et al. [CESBRON-DELAUW et al. Proc. Natl. acad. Sci. USA, 86:7537 (1989)]. La banque, après amplification, a été étalée sur des cellules de *E. coli* Y1090 et criblée en utilisant l'anticorps monoclonal TG 17-179.  
20 Les clones positifs ont été détectés par incubation avec des anticorps anti IgG de souris conjugués à la peroxydase, suivis d'un marquage au 4-chloro-1 naphthol.

Trois clones de  $\lambda$ gt11 ont été sélectionnés : il s'agit des clones FM3, FM1, et FM16, contenant respectivement des inserts de 450, 550, et 650 paires de base.  
25 Des fragments de restriction EcoRI de ces clones ont été sous-clonés dans les vecteurs M13, mp18, et mp19, et séquencés par la méthode de SANGER [FEINBERG et al. Anal. Biochem. 137:266 (1984)].

30 Le séquençage a montré que ces trois clones codent tous pour l'extrémité C-terminale de GP28.5.

b) Construction dans  $\lambda$ ZapII

La banque d'ADNc de tachyzoïtes a été construite dans le vecteur  $\lambda$ ZapII, en utilisant le "ZAP  
35 cDNA SYNTHESIS KIT" (STRATAGENE). L'ADNc a été synthétisé en utilisant comme matrice 5  $\mu$ g d'ARN poly-A des tachy-

zoïtes, à l'aide de la transcriptase inverse (MMLVRT) pour la synthèse du premier brin, et de l'ADN polymérase I et la RNase H pour la synthèse du second brin. Après ligature en 3' d'un adaptateur EcoRI, et après digestion  
5 en 5' par XhoI, l'excès d'adaptateur a été éliminé par chromatographie sur acrylamide-agarose (Ac-A 34, IBF). Les ADNc ont ensuite été ligaturés dans le gène LacZ de λZapII ("UNI ZAP XR", STRATAGENE) et encapsidés in vitro ("GIGAPAC II GOLD" PACKAGING EXTRACT", STRATAGENE). Avant  
10 amplification, la librairie comprend 10<sup>6</sup> phages recombinants.

Après amplification, les phages ont été étalés sur E. coli XLI-Blue et la banque a été criblée avec d'une part, le sérum polyclonal de souris dirigé contre  
15 l'antigène GP28.5 purifié (dilution au 1/100) et, d'autre part, l'anticorps monoclonal TG17-179 (dilution au 1/500), tous deux dilués dans du tampon TBS (10 mM TRIS HCl pH 8, 15mM NaCl). La co-infection des bactéries par λZapII et un phage auxiliaire (R408, Stratagène) a permis  
20 d'exciser le phagemide pBluescript contenant les inserts d'ADNc clonés. L'ADN simple brin obtenu à partir du phagemide en présence du même phage auxiliaire a été directement employé pour séquencer les inserts d'ADNc par la méthode des di-déoxynucléotides.

25 Le criblage de la banque d'ADNc construite dans le vecteur d'expression λZapII a permis l'obtention d'ADNc plus longs. Le plus long de ceux-ci, dénommé "LcDNA" comprend 1100 pb ; sa séquence en 3' est homologue à celle de la P28 de PRINCE et al., mais est plus  
30 courte d'au moins 121 bp en 5'.

4\*) Construction d'une banque génomique de *Toxoplasma gondii* dans le phage EMBL 3 :  
Après digestion partielle de l'ADN génomique des tachyzoïtes avec MboI, la banque génomique a été construite  
35 comme décrit par CESBRON-DELAUW et al. [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86:7537 (1989)].

\* Trade-mark

2137280

10

La banque construite dans le phage EMBL3 a été étalée sur *E. coli* P2392, et criblée à l'aide d'un fragment de restriction de l'ADNc (fragment EcoRI-SalI de 195 pb), utilisé comme sonde, après marquage préalable au  $^{32}\text{P}$ . Les hybridations ont été effectuées à 65 °C, dans du tampon 5X DENHARDT [le tampon 50X DENHARDT contient 1% de SAB, 1% de PVP, 1% de Ficoll (w/v)] et 6,6X SSC (10X SSC comprend 3M NaCl, 0,3M  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ , 2 H<sub>2</sub>O, pH 7,2).

Un clone génomique dénommé Gra2-EMBL3 a été sélectionné ; à partir de ce clone, un fragment de 2040 pb, comprenant l'ensemble du gène ainsi que 780 pb de séquence flanquante 5' et 32 pb de séquence flanquante 3', a été sous-cloné.

La figure 1 représente la carte de restriction partielle sur 5 kb du clone génomique Gra2-EMBL3, ainsi que la carte de restriction partielle d'une région de 2040 pb de celui-ci, qui comprend la totalité du gène GP28.5. Cette figure montre également la région transcrite et la région codant pour la protéine GP28.5.

L'analyse en Southern blot d'ADN génomique de tachyzoïte hybridé avec une sonde d'ADNc de 1100 pb (clone LcDNA) confirme cette carte de restriction. Elle indique également que le gène codant pour GP28.5 n'est probablement pas répété dans le génome des toxoplasmes.

La ligne du haut est une carte de restriction partielle du clone génomique Gra2-EMBL3 contenant le gène GP28.5 (ce gène est indiqué par une boîte). Le reste de la figure est un agrandissement d'une région de 2040 pb qui représente un sous-clone du clone génomique GP28.5, et qui contient le gène codant pour GP28.5 ainsi que les séquences flanquantes de 780 pb en 5' et de 32 pb en 3'. Le cadre ouvert de lecture de GP28.5 est indiqué. Le fragment EcoRI-SalI de 195 paires de base qui a été utilisé comme sonde pour le criblage des banques est indiqué sous les cartes de restriction ainsi que les clones de cDNA: LcDNA, FM16, FMI, FM3. La séquence AAAA indique la

## 2137280

11

queue poly-A des transcrits. Les régions codantes sont hachurées. Les sites de restriction sont indiqués par les abréviations suivantes : AI = AccI, AII = AvaII ; B = BglI ; E = EcoRV ; H = HindIII ; N = NaeI ; ND = NdeI ;  
5 PI = PstI ; PII = PvuII ; S = SalI ; SM = SmaI.

La séquence complète du gène GP28.5 et des régions 5' et 3' non codantes est montrée dans la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ.ID.NO:1. Pour déterminer l'organisation du gène GP28.5, la séquence de  
10 la banque génomique a été comparée avec la séquence du clone LcDNA.

Cette comparaison montre que le gène GP28.5 est constitué de deux exons (exon 5':251 pb ; exon 3':800 pb) séparés par un intron de 239 pb.

15 Un codon ATG initiateur de traduction est présent à la position 886, et le cadre ouvert de lecture se termine à la position 1682 avec un codon TAA. Ce cadre ouvert de lecture code potentiellement pour une protéine de 185 acides aminés dont le poids moléculaire théorique  
20 est de 19,8 KDa. Un site potentiel de clivage d'une séquence signal est situé entre les alanines 23 et 24. Le cadre ouvert de lecture est bordé en 3' par une séquence non codante de 32 pb. Un transfert de Northern réalisé sur l'ARN total de tachyzoïtes révèle une seule popula-  
25 tion d'ARNm codant pour la protéine GP28.5. La taille du messenger est estimée approximativement à 1100 pb, ce qui correspond à la taille du clone LcDNA.

Pour définir plus précisément le site d'initiation de la transcription, une extension d'amorces a  
30 été effectuée avec l'ARN total de tachyzoïtes, en utilisant comme amorce un oligo-nucléotide (CM10), correspondant aux positions 888 à 867 de la séquence. Par cette méthode, trois sites potentiels différents d'initiation de la transcription ont été localisés,  
35 respectivement à 105, 103 et 102 pb en amont du signal d'initiation de la traduction. Les deux premiers peuvent

correspondre à des sites de transcription mineurs alors que le troisième est sans doute le site majeur d'initiation de la transcription.

La séquence d'acides aminés de GP28.5 est plus  
5 courte de 67 acides aminés à son extrémité N-terminale que la séquence supposée de l'antigène P28 précédemment publiée par PRINCE et al. Pour vérifier le fait que la séquence SEQ.ID.NO:1 est bien celle qui code pour l'antigène GP28.5, la séquence en acides aminés  
10 correspondante a été comparée à celle de cinq peptides résultants du clivage par la trypsine de l'antigène GP28.5 purifié par HPLC comme décrit ci-dessous. La séquence de ces cinq peptides a été entièrement retrouvée dans la séquence en acides aminés déduite de celle du  
15 cadre ouvert de lecture du gène cloné.

EXEMPLE 2 : PREPARATION DE PROTEINES RECOMBINANTES  
COMPRENANT DES FRAGMENTS DE LA SEQUENCE DE GP28.5 :

1) Protéines de fusion avec la Glutathion-S-  
Transférase

20 - Deux clones d'ADNc représentant des fragments de la séquence codent pour la protéine GP28.5 ont été sous-clonés dans le plasmide pGEX-2T [SMITH et al. Gene, 67, 31-40 (1988)]. Le premier clone, FM16, code pour les cinquante-neuf acides aminés C-terminaux de  
25 GP28.5, et le deuxième clone, L représente 212 acides aminés de GP28.5.

5 autres fragments (figure 3) codant pour des portions de la protéine GP28.5 ont également été sous-clonés dans les plasmides pGEX-2T et pGEX-3X (SMITH et  
30 al., cité) :

- le premier clone, ptg.Gra2.1, dérivé du clone LcDNA, code pour 212 acides aminés dont les 185 de GP28.5 ;

- le second clone, ptg.Gra2.2, dérivé du clone  
35 cDNA FM16, code pour les 59 acides aminés C-terminaux de la protéine GP28.5 ;

- le troisième clone, ptg.Gra2.3, code pour 50 acides aminés (acide aminé 127 à acide aminé 176 inclus, voir figure 3) ;

5 - le quatrième clone, ptg.Gra2.4, code pour 186 acides aminés ;

- le cinquième clone, ptg.Gra2.5, code pour 129 acides aminés (partie N-terminale de la protéine GP28.5, jusqu'à l'acide aminé 129 inclus) ;

10 - le sixième clone, ptg.Gra2.6, code pour 171 acides aminés (à partir de l'acide aminé 15 inclus) ;

- le septième clone, ptg.Gra2.7, code pour 155 acides aminés (à partir de l'acide aminé 31 inclus).

Les plasmides pGEX-2T et pGEX-3X contenant les inserts d'ADN ont été utilisés pour transformer des bactéries E. coli JM 109. L'expression et la purification des protéines recombinantes ainsi que de la GST seule ont été effectuées selon le protocole décrit par SMITH et JOHNSON (référence précitée). Une culture de E. coli JM 109 au milieu de la phase logarithmique a été stimulée par 0,1 mM de IPTG. Après 1 heure de croissance à 37°, les cellules sont refroidies sur la glace et centrifugées à 4000 rpm pendant 15 minutes. Le culot est re-suspendu dans 0,02 M PBS, 0,5 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1% TRITON X 100.\* Les cellules sont soniquées sur la glace et centrifugées à 10 000 g pendant 5 minutes. Les protéines recombinantes sont purifiées à partir du surnageant, par chromatographie d'affinité sur de l'agarose-glutathion. L'expression des protéines recombinantes a été contrôlée par immunotransfert en utilisant l'anticorps monoclonal TG17-179 ou le sérum polyclonal de souris dirigé contre l'antigène GP28.5 purifié. Les protéines recombinantes correspondant aux clones ptg.Gra2.2 (59 acides aminés) et ptg.Gra2.3 (50 acides aminés) ont été purifiées avec un rendement élevé. En revanche, les protéines recombinantes correspondant aux clones ptg.Gra2.1 (212 acides aminés), ptg.Gra2.4 (186 acides aminés) et ptg.Gra2.5 (129 acides

\* Trade-mark

2137280

14

aminés) n'ont été obtenus qu'avec des rendements faibles qui semblent dûs à la dégradation des protéines d'une part, et d'autre part à la présence de la séquence signal (les 23 premiers acides aminés de la protéine GP28.5) dans les protéines recombinantes.

## 2) Protéines de fusion avec la $\beta$ -galactosidase

Des phages lysogènes recombinants ont été produits à partir du clone original de  $\lambda$ gt11 FM16, chez *E. coli* Y1089, selon le procédé décrit par HUYNH et al. [Glover, D.M. ed. vol. 1, 49-78 IRL Press, Oxford (1985)]. Des lysats bruts contenant la  $\beta$ -galactosidase de type sauvage ou bien la protéine de fusion [GP 28.5/ $\beta$ -galactosidase] ont été préparés par induction de cultures en phase logarithmique, par chauffage à 45°C pendant 20 minutes et addition de isopropyl- $\beta$ -D-thiogalacto-pyranoside à une concentration de 10 mM. Après une incubation supplémentaire à 37°C pendant 1 heure, la culture a été concentrée, dans un tampon 0,01 M Tris, pH8, 0.1 M EDTA, 10 mM NaCl, puis lysée par addition de 0,25 mg de lysozyme, 0,01 M MgCl<sub>2</sub>, et 0,2% TRITON X100, et enfin traitée par la DNaseI à 37°C pendant 30 minutes.

Les clones FM1 et FM16 réagissent beaucoup plus fortement avec l'anticorps TG 17-179 que le clone FM3. La carte de restriction montre que les inserts EcoRI de 450 pb (FM3), 550 pb (FM1) et 650 pb (FM16) contiennent des séquences qui se chevauchent.

Le séquençage de ces clones a révélé que les cadres de lecture en phase avec celui de la  $\beta$ -galactosidase étaient de seulement 17 pb pour FM3, et 95 pb et 172 pb pour FM1 et FM16 respectivement, le reste des inserts correspondant à la région 3' non traduite plus la queue polyA. Il apparaît donc que le peptide correspondant aux 5 amino acides C-terminaux de l'antigène GP28.5 codé par le clone FM3, est suffisant pour obtenir une réaction antigénique.

**II) PURIFICATION DE L'ANTIGENE GP28.5****EXEMPLE 3 : PURIFICATION DE L'ANTIGENE GP28.5 PAR HPLC.**

10<sup>10</sup> tachyzoïtes de la souche RH ont été lavés deux fois avec 10 mM PBS, pH 7,2. Après centrifugation à 1000 g pendant 10 minutes, le culot a été incubé toute la nuit à 4°C sous agitation douce, à une concentration de 10<sup>9</sup> parasites/ml dans du tampon TEN (10 mM TRIS-HCL, pH 7,4 ; 2 mM EDTA ; 150 mM NaCl) additionné de 1% de NONIDET P40, de 100 U/ml d'aprotinine et de 40 µM de PMSF.

Après centrifugation à 3500 g pendant 20 minutes, le surnageant a été récupéré et filtré sur une membrane MILLIPORE\* de 0,22 µm. Les protéines de tachyzoïtes extraites au NP40 ont été purifiées par chromatographie HPLC en phase inverse sur une colonne VYDAC C18\* (300 Å, taille des particules : 7 µm, dimensions de la colonne : 500x9mm). 8 ml d'extrait de protéines brutes ont été chargés sur la colonne C18 à 0% de solvant B [le solvant A est constitué de 0,5% v/v de TFA dans l'eau ; Le solvant B est un mélange 25/75/0,45 (v/v) d'eau/acétonitrile/TFA]. Après 10 minutes d'élution isocratique, les protéines sont éluées avec un gradient de 0 à 100% de solvant B, pendant une durée de 180 minutes, à une vitesse d'élution de 2 ml par minute, et détectées à 215 nanomètres. Pour localiser l'antigène GP28.5, chaque fraction HPLC a été lyophilisée, et le lyophilisat a été dilué dans 100 µl d'un mélange TEN/PBS, [10 mM, pH 8 (v/v)]. 1 µl de chaque fraction a été testé par dot-blot en utilisant l'anticorps monoclonal TG17-179. 10 µl (ce qui correspond à environ 12 µg de protéine purifiée) de chacune des fractions qui ont montré une réaction positive, ont été déposés sur gel d'acrylamide en présence de 2-ME, Une coloration du gel au nitrate d'argent a permis de vérifier leur homogénéité et leur pureté. Un gel similaire a été réalisé et utilisé pour le transfert électrophorétique sur membrane de nitro-cellulose. L'antigénicité des fractions a été évaluée en incubant la membrane

\* Trade-mark

avec l'anticorps monoclonal TG17-179. La détection a été faite avec des anticorps anti-IgG de souris, marqués à la peroxydase.

Le composant majeur de l'éluat est la protéine GP28.5. Le seul contaminant décelé est une protéine de 65 kDa. qui est également reconnue par l'anticorps TG17-179, et qui peut donc représenter soit un dimère de GP28.5, soit un antigène apparenté.

10 **III) PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES DE L'ANTIGENE GP28.5 ET DE SES FRAGMENTS**

**EXEMPLE 4 : IMMUNISATION DES SOURIS ET ESSAIS DE PROTECTION.**

Des souris femelles OF1 âgées de 8 à 10 semaines ont été immunisées de la façon suivante : quarante-deux, trente-cinq, vingt-sept et sept jours avant l'infection, les antigènes suivants :

- ESA correspondant à la sécrétion de  $5.10^7$  tachyzoïtes ; ou bien,
- 15 µg de GP28.5 purifiée par HPLC comme décrit à l'exemple 3 ont été mis en suspension dans 100 µl de PBS, émulsifié avec 100 µl d'adjuvant incomplet de FREUND et administrés par injection sous-cutanée.

Des souris témoin ont été traitées selon le même protocole par du PBS additionné de 100 µl d'adjuvant incomplet de FREUND.

Le jour de l'infection, les sérums ont été collectés, puis une suspension de 1200 kystes dans 0,3 ml de PBS, pH 7,2 a été administrée oralement.

Les sérums des souris immunisées avec les ESA ou la GP28.5 purifiée par HPLC ont été testés par transfert immuno-électrophorétique, contre des antigènes ESA de tachyzoïtes extraits au NP40, afin de déterminer s'ils reconnaissent l'antigène GP28.5.

Il apparaît que le profil d'immuno-réactivité est sensiblement le même que la révélation soit faite avec l'immunsérum de souris ou bien avec l'anticorps

monoclonal TG17-179 : dans les deux cas, trois bandes d'environ 100, 65 et 28 KDa sont révélées. Les deux bandes de poids moléculaire le plus élevé qui sont reconnues par l'anticorps TG17-179 représentent probablement  
5 des polymères de GP28.5

La figure 2 représente le pourcentage de souris survivantes après l'infection. Cette figure montre que, alors que seulement 25% des souris témoin immunisées uniquement avec l'adjuvant incomplet de FREUND survivent  
10 15 jours après l'infection, 75% des souris immunisées avec l'antigène GP28.5 purifié par HPLC sont encore vivantes 50 jours après l'infection. Lorsque les souris sont immunisées avec les antigènes ESA, 45% survivent 50  
jours après l'infection. Ces résultats montrent que  
15 l'immunisation avec l'antigène GP28.5 purifié par HPLC conduit à une protection significative.

EXEMPLE 5 : REACTIVITE DES SERUMS HUMAINS AVEC LES PROTEINES RECOMBINANTES ET RECONNAISSANCE DE L'EPITOPE C-TERMINAL

20 Les sérums humains ont été obtenus à partir de patients porteurs d'une infection chronique par *Toxoplasma gondii* (TG positif). Des sérums de patients sains ont été utilisés comme témoin (TG négatif). Le test a été réalisé par ELISA, et la révélation faite en utilisant  
25 des anticorps anti-IgG humaines biotinylées ; la fixation de ces anticorps a été décelée en utilisant des complexes streptavidine-biotine marqués à la peroxydase. Le substrat de peroxydase utilisé est l'OPD et la densité optique a été mesurée à 492 nm et exprimée par rapport à  
30 un témoin réalisé en utilisant comme antigène la GST, selon la formule suivante :

$$DO = DO \text{ du sérum réagissant avec la protéine recombinante de 59 acides aminés} - DO \text{ du sérum réagissant avec la GST.}$$
  
Dans ces conditions, la moyenne de la densité optique des  
35 sérums TG-négatifs était de 0,23. 74% des cinquante-neuf sérums TG-positifs étaient au dessus de cette densité

2137280

18

optique. La corrélation avec un test conventionnel des anticorps anti-TG est de :  $R = 0,74$  P.

Malgré cette corrélation, des patients possédant de 50 à 100 UI/ml d'IgG anti-TG montrent des valeurs très dispersées de niveaux d'anticorps contre la protéine recombinante FM16 (les densités optiques s'échelonnent entre 0,35 et 1,5). Il semble donc qu'un niveau homogène d'anticorps anti-TG puisse en fait refléter des réponses variées à l'antigène GP28.5.

10 Dix sérums négatifs en ELISA contre la protéine contenant les cinquante-neuf acides aminés ont été testés en immunotransfert contre la protéine de fusion contenant les 212 acides aminés (clone LcDNA). Huit de ces sérums réagissent avec la protéine comprenant les 212  
15 acides aminés, alors que 7 des sérums de contrôle réagissent négativement. Il est probable que ces 8 sérums reconnaissent des épitopes présents sur la protéine de 212 acides aminés, et plus proches de l'extrémité N-terminale que ceux portés par la protéine comprenant les  
20 cinquante-neuf acides aminés.

La fixation de TG 17-179 à l'antigène recombinant FM16 a été testée en ELISA compétitif en présence de sérums de patients infectés ; le sérum a été ajouté à une dilution de 1/100 à la solution de l'anticorps mono-  
25 clonal.

Ces essais de compétition entre TG 17-179 et des sérums de patients infectés montrent que les anticorps polyclonaux humains réagissent avec l'épitope C-terminal de la GP28.5 : parmi les 12 sérums humains  
30 testés, 10 inhibent à des degrés variés la fixation de TG 17-179 à la protéine de fusion FM16.

La réactivité des protéines de fusion produites par les clones FM1 et FM3 avec l'anticorps TG 17-179 a également été testée ; FM1 et FM16 réagissent  
35 beaucoup plus fortement avec l'anticorps TG 17-179 que le clone FM3.

Or, le séquençage de ces clones a révélé que le cadre de lecture en phase avec celui de la  $\beta$ -galactosidase, est de seulement 17 pb pour FM3, et 95 pb et 172 pb pour FM1 et FM16 respectivement. Il apparaît donc que le peptide codé par le clone FM3, et correspondant aux 5 amino acides C-terminaux de l'antigène GP28.5 est suffisant pour obtenir une réaction antigénique.

Cependant, dans la mesure où il est également apparu que la liaison de l'anticorps monoclonal TG 17-179 à ce peptide FM3 est plus faible que la liaison dudit anticorps aux peptides codés par les clones plus longs FM1 et FM16, les Inventeurs ont entrepris de déterminer la longueur optimale de l'épitope.

EXEMPLE 6 : IMMUNOREACTIVITE DE PEPTIDES SYNTHETIQUES CORRESPONDANT A L'EXTREMITÉ C-TERMINALE DE GP28.5

Des peptides se chevauchant et couvrant la séquence carboxy-terminale de GP28.5 (1 à 15 résidus) ont été synthétisés, en utilisant la méthode de MERRIFIELD.

Ils ont été testés par ELISA compétitif avec la protéine de fusion FM16.

Les quinze acides aminés terminaux de GP28.5 contiennent l'épitope réagissant avec l'anticorps monoclonal TG17-179. La capacité de ce peptide à inhiber la réactivité en ELISA contre la protéine recombinante contenant les cinquante-neuf acides aminés, de sérums obtenus à partir de patients atteints d'infections aiguës ou chroniques a été testée. Les deux types de sérums (aigu et chronique) sont inhibés, à un degré varié, par le peptide C-Terminal de quinze acides aminés. Pour les sérums chroniques, le pourcentage d'inhibition varie de 8 à 100% et on n'observe aucune corrélation avec la densité optique de départ. Le faible taux d'inhibition observé pour certains sérums peut être dû à la présence d'anticorps à faible affinité pour ce peptide. Toutefois, même en multipliant par dix la concentration du peptide, le

2137280

20

pourcentage d'inhibition n'est pas augmenté. La spécificité de l'inhibition a été démontrée en utilisant comme témoin un peptide de séquence différente et de longueur similaire. Le pourcentage d'inhibition des sérums aigus  
5 varie de 15 à 90% et est également indépendant de la densité optique de départ.

Les études d'inhibition réalisées montrent donc que le peptide de 15 acides aminés comprend un l'épitope majeur de la région C-Terminale de cinquante-  
10 neuf acides aminés, pour quatre sur douze des sérums obtenus à partir de patients chroniques, et pour trois sur douze des sérums obtenus à partir de patients atteints d'infections aiguës. En outre, trois sur douze des sérums chroniques, et quatre sur douze des sérums  
15 aigus, montrent une inhibition partielle (35-80% d'inhibition).

Il apparaît donc que la réponse polyclonale à l'antigène GP28.5 implique une réactivité avec les quinze acides aminés C-Terminaux, réactivité dont le degré varie  
20 suivant les individus. En revanche, le degré de cette réponse ne varie apparemment pas entre l'infection aiguë et l'infection chronique, aucune différence dans le pourcentage d'inhibition moyen pour chacun des deux groupes n'ayant été observée.

Toutefois, cinq sur douze des sérums chroniques et cinq sur douze des sérums aigus qui réagissent avec la région C-Terminale de cinquante-neuf acides aminés de GP28.5 ne réagissent pas avec le peptide de quinze acides aminés C-terminaux, ce qui montre que d'autres  
30 épitopes B majeurs existent dans cette région de cinquante-neuf acides aminés et notamment dans le fragment correspondant aux amino-acides 127-176 de la séquence de l'antigène GP28.5.

Dans le cas de peptides C-terminaux présentant  
35 moins de 15 acides aminés, les résultats sont les suivants :

2137280

21

L'inhibition la plus forte de la liaison de l'anticorps monoclonal TG 17-179 à la protéine de fusion est obtenue avec des peptides comprenant entre 11 et 15 résidus.

5 L'inhibition est toutefois obtenue avec l'octapeptide comprenant les 8 résidus C-terminaux.

La liaison de TG 17-179 à l'heptapeptide C-terminal est 8 fois moins importante que sa liaison à l'octapeptide. Enfin l'immunoréactivité du peptide syn-  
10 thétique est perdue quand il comprend 6 acides aminés C-terminaux ou moins.

L'octapeptide dépourvu de sa fonction COOH et l'octapeptide comprenant deux résidus C-terminaux additionnels (Alanine) ont été également testés. Ces deux  
15 peptides ont pratiquement la même activité que l'octapeptide C-terminal : ceci montre que la fonction carboxyle n'est pas nécessaire à l'immunoréactivité de l'épitope reconnu par TG 17-179.

Des mêmes peptides ont été testés en ELISA  
20 direct. Dans ces conditions l'immunoréactivité en fonction de la longueur du peptide décroît plus rapidement : elle en effet perdue pour des peptides de longueur inférieure à 10 résidus. En conséquence, il apparaît qu'en ELISA direct, l'anticorps monoclonal nécessite un peptide  
25 plus long que dans le test par inhibition. Dans ce cas particulier, il est peu probable que ceci soit dû à une mauvaise absorption des peptides les plus courts sur la plaque de microtitration, étant donné la nature hydrophobe des amino-acides desdits peptides.

30 Des peptides dépourvus de résidus C-terminaux ont également été synthétisés : alors que l'incubation de TG 17-179 avec l'octapeptide synthétique couvrant l'ensemble des résidus C-terminaux inhibe la liaison de la protéine de fusion recombinante, l'heptapeptide correspondant dépourvu du résidu glutamine carboxy-terminal  
35 est 64 fois moins actif en tant que compétiteur, et

22

l'hexapeptide dépourvu des deux résidus carboxy-terminaux est 104 fois moins actif.

LISTE DE SEQUENCES :  
NOMBRE DE SEQUENCES: 2

1) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 2152 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Toxoplasma gondii*

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLEMMENT: join(886..1035, 1275..1682)

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:

- (A) NOM/CLE: exon
- (B) EMBLEMMENT: 886..1035

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:

- (A) NOM/CLE: exon
- (B) EMBLEMMENT: 1275..1682

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:

- (A) NOM/CLE: intron
- (B) EMBLEMMENT: 1036..1274

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

```

CTGCAGTCTT AATCATTTCC ACATAGTTTT TGTTCCCCCA GACAATCAAT CCTGGCTGAG      60
CCCCCATGT  ACGCGTTACC ACCTGCCAGT GCATATGGGT TTGCATATTT TTGCTGAAGT      120
CCGAAAGAGG GGCCACGCAA AACGTTACCG GTTTGCTGCA GGCAGCCAGG TAGGTGGAAC      180
AGATCTCCAG CGAGTACGAC CACTGTGCGT GTACTTACGC CAAAAGGAAA ATACACCTGC      240
ACCGCTATTA AGCGGCAGTC GTCTACCTGA ATCGTCTCCC CGGCCTCATC ATTTTGTTCG      300
ACACAAGTTT CCATTAGGAC TTTGTGACAG TCGTCTGCTC TCGACCTTCC AACCGTCTCG      360
TGGACGAAAA ATCCTCGGGT GACTTGCCGT GGACGAACGC CTCCCGTTTG CTTCTACAAG      420
TGACTATGCG ATAGGTTCCG CAGTGCAGCC AGGCTTGCGA AAAACAAGTT CGTCGCAAAA      480
GGTTAATTAC CTACGCACCA CGAAGGAAAA CGCGTATCAC GTCAGTCCTT ACGGTCAATA      540
TACAAATACT TGGCCGTCCA GTGGAGGCAA CGTGCCCGTC GCACGGTGAT ACTGACTGGT      600

```

2137280

24

|                                                                    |             |
|--------------------------------------------------------------------|-------------|
| GACTTGCACG TACGTCTCTC GCCGGCGTCC AAACCAAATT GACCCGGGGC AGCCTACTCC  | 660         |
| CTGTTCGTCCC TTAGGCTAAG TGCGAGCAAC ATCTCTACAC AGAGACGACG CCAGAGACGC | 720         |
| AAAATGAACA GCGGAACCTG CGTCGCTGTC TGTCCTGCGA ACTGATGACA GAAAGGGTCA  | 780         |
| TTAAACGATT TCTTTTGCAA TTCGCGTCGT TATCGCACGT TGTTTCTCTT CCCACGAATA  | 840         |
| GTTGTTTTGA TTAGATATTG CTTCTTCTCC ACATATCGCC TCACA ATG TTC GCC      | 894         |
|                                                                    | Met Phe Ala |
|                                                                    | 1           |
| GTA AAA CAT TGT TTG CTG GTT GTT GCC GTT GGC GCC CTG GTC AAC GTC    | 942         |
| Val Lys His Cys Leu Leu Val Val Ala Val Gly Ala Leu Val Asn Val    |             |
| 5 10 15                                                            |             |
| TCG GTG AGG GCT GCC GAG TTT TCC GGA GTT GTT AAC CAG GGA CCA GTC    | 990         |
| Ser Val Arg Ala Ala Glu Phe Ser Gly Val Val Asn Gln Gly Pro Val    |             |
| 20 25 30 35                                                        |             |
| GAC GTG CCT TTC AGC GGT AAA CCT CTT GAT GAG AGA GCA GTT GGG        | 1035        |
| Asp Val Pro Phe Ser Gly Lys Pro Leu Asp Glu Arg Ala Val Gly        |             |
| 40 45 50                                                           |             |
| TAAGTTGGCA AAAGTAATGA TAGAGGCAGG GGTGAACGA TAGGCGGCTG CAGATTTGTA   | 1095        |
| TAACACAACA TGATGTAGCT GCCACGGTTT TTTTTCGGAG AGTGATGCCG TCTGACTGTC  | 1155        |
| ATCGCACCCA TGGGAGCTAG GGAGGTGCGC TTCTGTGTGA TATGTATTGT CCTAGTCCAA  | 1215        |
| TTTCCCACGC ACTGTAGTGT CTTGAGACTC GGTGCCATGT AGAATTTTGT GTCTGCAGA   | 1274        |
| GGA AAA GGT GAA CAT ACA CCA CCA CTC CCA GAC GAG AGG CAA CAA GAG    | 1322        |
| Gly Lys Gly Glu His Thr Pro Pro Leu Pro Asp Glu Arg Gln Gln Glu    |             |
| 55 60 65                                                           |             |
| CCA GAA GAA CCG GTT TCC CAA CGT GCA TCC AGA GTG GCA GAA CAA CTG    | 1370        |
| Pro Glu Glu Pro Val Ser Gln Arg Ala Ser Arg Val Ala Glu Gln Leu    |             |
| 70 75 80                                                           |             |
| TTT CGC AAG TTC TTG AAG TTC GCT GAA AAC GTC GGA CAT CAC AGT GAG    | 1418        |
| Phe Arg Lys Phe Leu Lys Phe Ala Glu Asn Val Gly His His Ser Glu    |             |
| 85 90 95                                                           |             |
| AAG GCC TTC AAA AAA GCA AAG GTG GTG GCA GAA AAA GGC TTC ACC GCG    | 1466        |
| Lys Ala Phe Lys Lys Ala Lys Val Val Ala Glu Lys Gly Phe Thr Ala    |             |
| 100 105 110                                                        |             |
| GCA AAA ACG CAC ACG GTT AGG GGT TTC AAG GTG GCC AAA GAA GCA GCT    | 1514        |
| Ala Lys Thr His Thr Val Arg Gly Phe Lys Val Ala Lys Glu Ala Ala    |             |
| 115 120 125 130                                                    |             |

25

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| GGA AGG GGC ATG GTG ACC GTT GGC AAG AAA CTC GCG AAT GTG GAG AGT    | 1562 |
| Gly Arg Gly Met Val Thr Val Gly Lys Lys Leu Ala Asn Val Glu Ser    |      |
| 135 140 145                                                        |      |
| GAC AGA AGC ACT ACG ACA ACG CAG GCC CCC GAC AGC CCT AAT GGC CTG    | 1610 |
| Asp Arg Ser Thr Thr Thr Thr Gln Ala Pro Asp Ser Pro Asn Gly Leu    |      |
| 150 155 160                                                        |      |
| GCA GAA ACC GAG GTT CCA GTG GAG CCC CAA CAG CGG GCC GCA CAC GTG    | 1658 |
| Ala Glu Thr Glu Val Pro Val Glu Pro Gln Gln Arg Ala Ala His Val    |      |
| 165 170 175                                                        |      |
| CCC GTC CCA GAC TTT TCG CAG TAATGTTGAC TACGACGAAA GTGATGCGCA       | 1709 |
| Pro Val Pro Asp Phe Ser Gln                                        |      |
| 180 185                                                            |      |
| GGCTGGAAAG CCGCTGAAGG GAGAAGTCTA CAAAGCCGAT CAGTGAAAAA TGTGTGGGGA  | 1769 |
| GGTGGTCTTG TTGCAGGAAT GCAATGTGTT AAGCATCGTG TTCGAATGCA GTGCGTGTAT  | 1829 |
| CAGTTGTGCG CGGAAGGACA CTGCTTCAAT GTTAAGAACC TGTTTTCTCC GTAGAGAGGA  | 1889 |
| CCAAAAGACG ATTGCAAAAC TGGTATGTAC GCAATAGCCC AATGCCGGAC GTCAGTTGGT  | 1949 |
| TGTATGTGAC GCTCCCAGAT GTCATATGCC TTGTGAGTGT GTCTGGGATG CAAGTTTTTG  | 2009 |
| GTGTGCGTTG ATTTCCGCCAG CTTATGACAG TGGCAGACGA ATTATTGACA TGATACAAGG | 2069 |
| ACGCAGAAAG GAACAAACAC CGTAGTTCCA GTCGACACAG AAAGGGAGGG TAAAGAAAGT  | 2129 |
| AATTGAAAGG TGATTTTAGA TAA                                          | 2152 |

2137280

26

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 185 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Phe | Ala | Val | Lys | His | Cys | Leu | Leu | Val | Val | Ala | Val | Gly | Ala | Leu | 1   | 5   | 10  | 15  |
| Val | Asn | Val | Ser | Val | Arg | Ala | Ala | Glu | Phe | Ser | Gly | Val | Val | Asn | Gln | 20  | 25  | 30  |     |
| Gly | Pro | Val | Asp | Val | Pro | Phe | Ser | Gly | Lys | Pro | Leu | Asp | Glu | Arg | Ala | 35  | 40  | 45  |     |
| Val | Gly | Gly | Lys | Gly | Glu | His | Thr | Pro | Pro | Leu | Pro | Asp | Glu | Arg | Gln | 50  | 55  | 60  |     |
| Gln | Glu | Pro | Glu | Glu | Pro | Val | Ser | Gln | Arg | Ala | Ser | Arg | Val | Ala | Glu | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Gln | Leu | Phe | Arg | Lys | Phe | Leu | Lys | Phe | Ala | Glu | Asn | Val | Gly | His | His | 85  | 90  | 95  |     |
| Ser | Glu | Lys | Ala | Phe | Lys | Lys | Ala | Lys | Val | Val | Ala | Glu | Lys | Gly | Phe | 100 | 105 | 110 |     |
| Thr | Ala | Ala | Lys | Thr | His | Thr | Val | Arg | Gly | Phe | Lys | Val | Ala | Lys | Glu | 115 | 120 | 125 |     |
| Ala | Ala | Gly | Arg | Gly | Met | Val | Thr | Val | Gly | Lys | Lys | Leu | Ala | Asn | Val | 130 | 135 | 140 |     |
| Glu | Ser | Asp | Arg | Ser | Thr | Thr | Thr | Thr | Gln | Ala | Pro | Asp | Ser | Pro | Asn | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Gly | Leu | Ala | Glu | Thr | Glu | Val | Pro | Val | Glu | Pro | Gln | Gln | Arg | Ala | Ala | 165 | 170 | 175 |     |
| His | Val | Pro | Val | Pro | Asp | Phe | Ser | Gln | 180 | 185 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

**REVENDEICATIONS:**

1. Fragment d'acide nucléique codant pour un polypeptide comprenant au moins un épitope de l'antigène GP28.5 de toxoplasme, caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe constitué par:
  - a) un fragment d'acide nucléique codant pour le polypeptide constitué par les acides aminés 1 à 129 de la séquence SEQ ID NO: 2;
  - b) un fragment d'acide nucléique codant pour le polypeptide constitué par les acides aminés 24 à 129 de la séquence SEQ ID NO: 2;
  - c) un fragment d'acide nucléique codant pour le polypeptide constitué par les acides aminés 55 à 70 de la séquence SEQ ID NO: 2;
  - d) un fragment d'acide nucléique codant pour le polypeptide constitué par les acides aminés 140 à 160 de la séquence SEQ ID NO: 2; et
  - e) un fragment d'acide nucléique codant pour le polypeptide constitué par les 8 à 15 acides aminés C-terminaux de la séquence SEQ ID NO: 2.
2. Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment d'acide nucléique selon la revendication 1.
3. Cellule eucaryote ou procaryote transformée, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un vecteur recombinant selon la revendication 2.
4. Acide nucléique codant pour une protéine recombinante comprenant un fragment de l'antigène GP28.5 de toxoplasme, comprenant au moins un épitope de l'antigène GP28.5 de toxoplasme fusionné avec une autre séquence polypeptidique, caractérisé en ce que le fragment de l'antigène GP28.5 de toxoplasme est choisi dans le groupe constitué par:
  - a) un fragment d'acide nucléique codant pour le polypeptide constitué par les acides aminés 1 à 129 de la séquence SEQ ID NO: 2;

b) un fragment d'acide nucléique codant pour le polypeptide constitué par les acides aminés 24 à 129 de la séquence SEQ ID NO: 2;

c) un fragment d'acide nucléique codant pour le polypeptide constitué par les acides aminés 55 à 70 de la séquence SEQ ID NO: 2;

d) un fragment d'acide nucléique codant pour le polypeptide constitué par les acides aminés 140 à 160 de la séquence SEQ ID NO: 2; et

e) un fragment d'acide nucléique codant pour le polypeptide constitué par les 8 à 15 acides aminés C-terminaux de la séquence SEQ ID NO: 2.

5. Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend au moins un acide nucléique selon la revendication 4.

6. Cellule eucaryote ou procaryote transformée, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un vecteur recombinant selon la revendication 5.

7. Protéine recombinante, comprenant une séquence polypeptidique de l'antigène GP28.5 de toxoplasme, fusionnée avec une autre séquence polypeptidique, et caractérisée en ce qu'elle est choisie dans le groupe constitué par:

a) une protéine recombinante dans laquelle la séquence polypeptidique de l'antigène GP28.5 de toxoplasme est constituée par les acides aminés 1 à 129 de la séquence SEQ ID NO: 2;

b) une protéine recombinante dans laquelle la séquence polypeptidique de l'antigène GP28.5 de toxoplasme est constitué par les acides aminés 24 à 129 de la séquence SEQ ID NO: 2;

c) une protéine recombinante dans laquelle la séquence polypeptidique de l'antigène GP28.5 de toxoplasme est constituée par les acides aminés 55 à 70 de la séquence SEQ ID NO:2;

d) une protéine recombinante dans laquelle la séquence polypeptidique de l'antigène GP28.5 de toxoplasme est constituée par les acides aminés 140 à 160 de la séquence SEQ ID NO: 2; et

e) une protéine recombinante dans laquelle la séquence polypeptidique de l'antigène GP28.5 de toxoplasme est constituée par les 8 à 15 acides aminés C-terminaux de la séquence SEQ ID NO: 2.

8. Un polypeptide constituant un épitope de l'antigène GP28.5 de toxoplasme, caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe constitué par:

a) un fragment peptidique constitué par les acides aminés 1 à 129 de la séquence SEQ ID NO: 2;

b) un fragment peptidique constitué par les acides aminés 24 à 129 de la séquence SEQ ID NO: 2;

c) un fragment peptidique constitué par les acides aminés 55 à 70 de la séquence SEQ ID NO: 2;

d) un fragment peptidique constitué par les acides aminés 140 à 160 de la séquence SEQ ID NO: 2; et

e) un fragment peptidique constitué par les 8 à 15 acides aminés C-terminaux de la séquence SEQ ID NO: 2.

9. Composition antigénique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un antigène pris dans le groupe constitué par:

a) une protéine recombinante selon la revendication 7; et

b) un polypeptide selon la revendication 8;

et un ingrédient inerte d'un point de vue pharmaceutique.

10. Procédé de production d'un polypeptide selon la revendication 8, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture d'une cellule transformée selon la

revendication 3, la production du polypeptide dans la culture cellulaire, et l'isolement du polypeptide de la culture cellulaire.

11. Procédé de production d'une protéine recombinante selon la revendication 7, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture d'une cellule transformée selon la revendication 6, la production de la protéine recombinante dans la culture cellulaire, et l'isolement de la protéine recombinante de la culture cellulaire.

12. Procédé de préparation d'anticorps anti-GP28.5, caractérisé en ce qu'il comprend une étape au cours de laquelle on immunise un animal avec une composition antigénique selon la revendication 9.

13. Utilisation d'une composition antigénique selon la revendication 9, pour l'obtention de réactifs de diagnostic de la toxoplasmose.

14. Utilisation d'une composition antigénique selon la revendication 9, pour l'obtention de vaccins anti-toxoplasme.

2137280

1/3

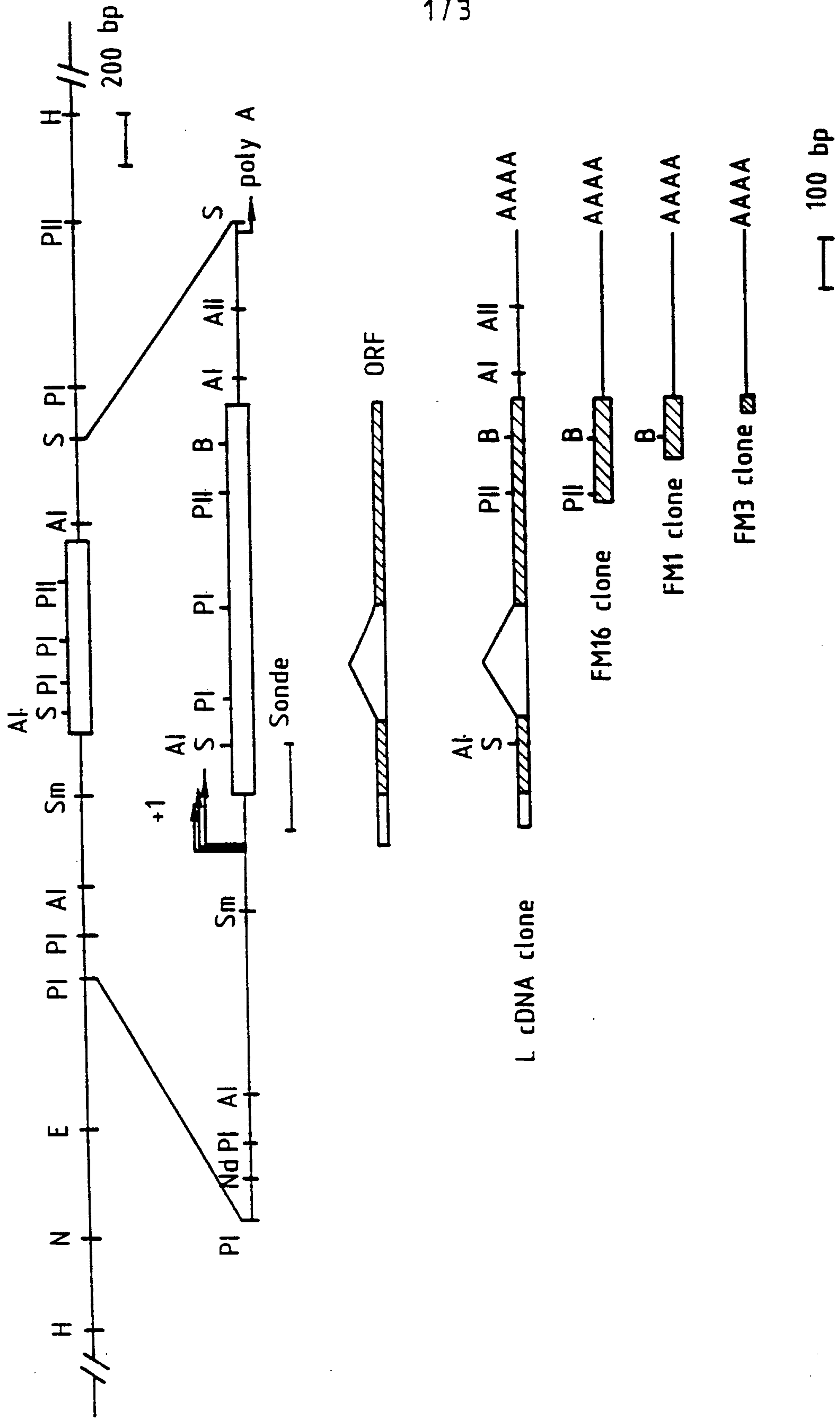


FIG.1

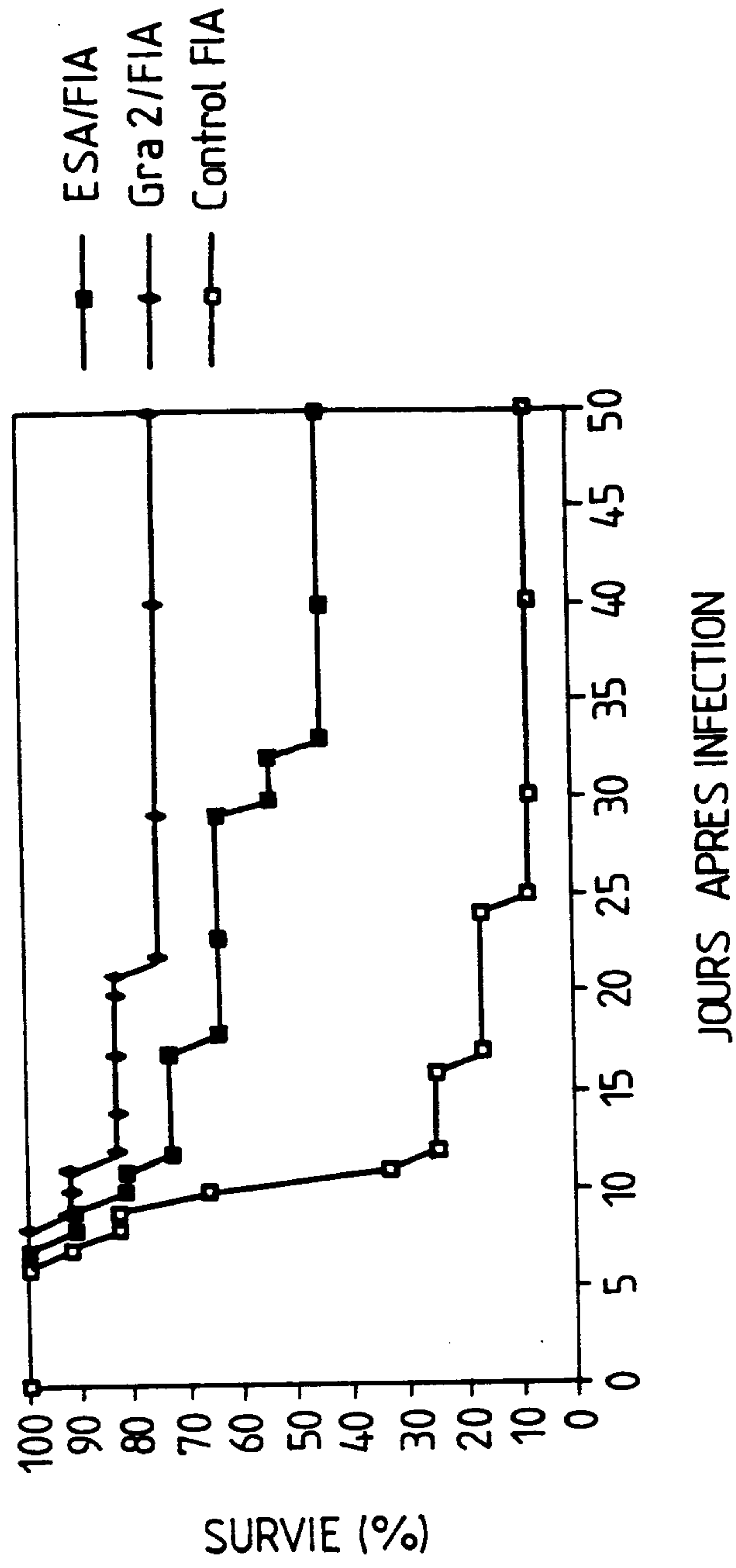
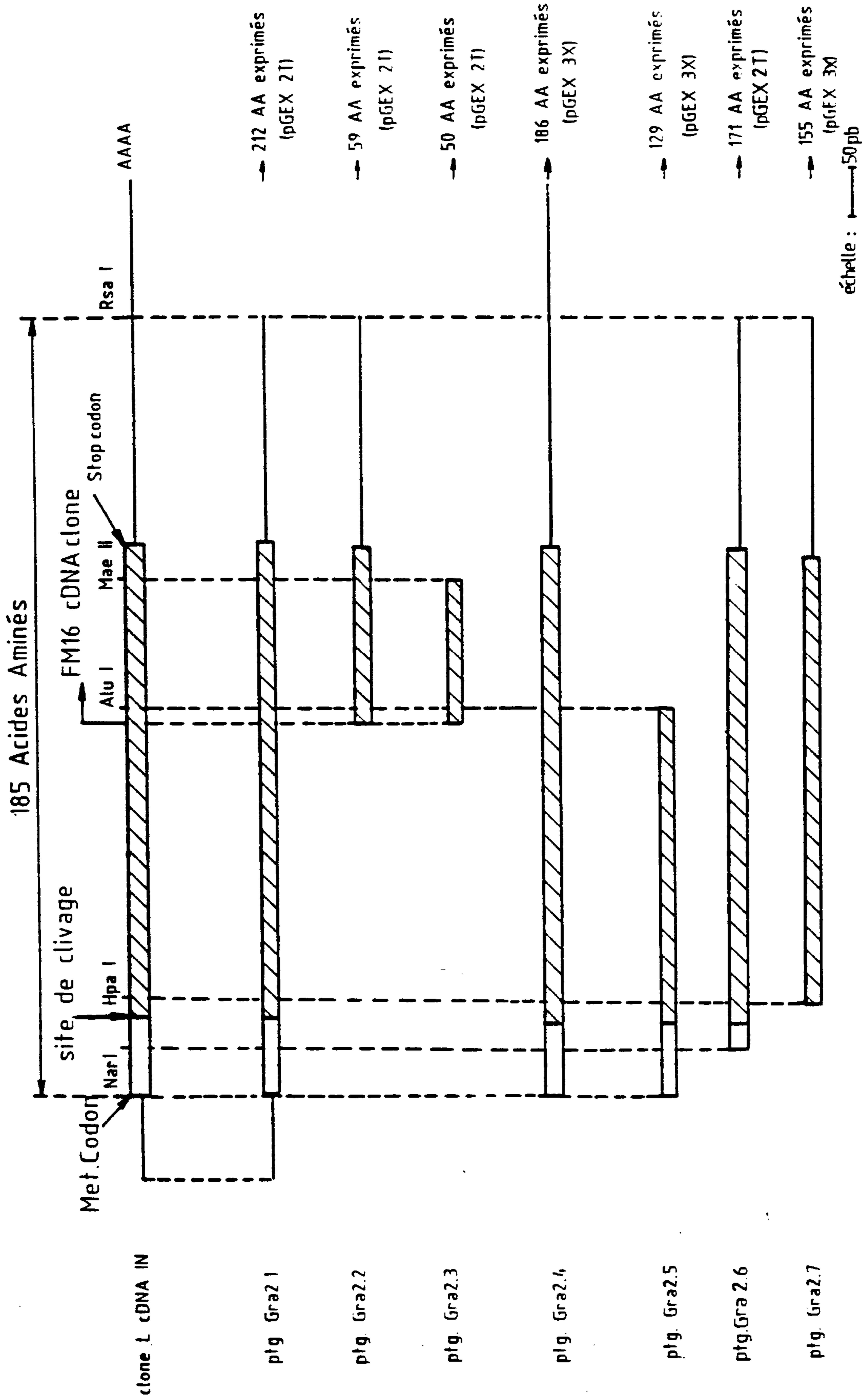


FIG.2



**FIG. 3** CONSTRUCTIONS dans pGEX