

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
13 mars 2003 (13.03.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/020962 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12Q 1/48

(74) Mandataire : **BOUVET, Philippe**; Aventis Pharma S.A.,
Direction Brevets, 20, Avenue Raymond Aron, F-92165
Antony Cedex (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/02989

(22) Date de dépôt international :
2 septembre 2002 (02.09.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
01/11469 5 septembre 2001 (05.09.2001) FR

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : **AVEN-
TIS PHARMA S.A.** [FR/FR]; 20, avenue Raymond Aron,
F-92160 Antony (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **BITON,
Jacques** [FR/FR]; 9, impasse Dagobert, F-60610 Lacroix
Saint Ouen (FR). **MICHOUX, François** [FR/FR]; 14, rue
de Coeuilly, F-94350 Villiers sur Marne (FR). **VELTZ,
Jean-Noël** [FR/FR]; 38, avenue Montaigne, F-77270
Villeparisis (FR). **DUMAS, Jacques** [FR/FR]; Chemin de
la Croix Blanche, F-77600 Bussy Saint Martin (FR).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.*

(54) Title: METHOD OF IDENTIFYING GLYCOSYL TRANSFERASE BINDING COMPOUNDS

(54) Titre : PROCEDE D'IDENTIFICATION DE COMPOSES LIANT UNE GLYCOSYL TRANSFERASE

(57) Abstract: The invention relates to a method of identifying, screening or selecting a compound that binds to the transglycosylation site of a recombinant glycosyl transferase. The inventive method consists in: a) bringing the compound into contact with the recombinant protein before, after or at the same time as said recombinant protein is brought into contact with a transglycosylation activity inhibitor, said inhibitor being marked by a marker that generates a direct or indirect signal; b) examining the signal linked to said recombinant protein, the link between the compound and the transglycosylation site being deduced from the difference between the signal obtained in step (b) and the signal obtained in the absence of said compound.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé d'identification, de criblage ou de sélection d'un composé se liant au site de transglycosylation d'une glycosyl transférase recombinante, comprenant les étapes consistant: a) mettre ledit composé en contact avec ladite protéine recombinante, avant, après, ou de façon concomitante à la mise en contact de ladite protéine recombinante avec un inhibiteur de l'activité de transglycosylation, ledit inhibiteur étant marqué par un marqueur générant un signal direct ou indirect, b) étudier ledit signal lié; ladite protéine recombinante, la liaison dudit composé au site de transglycosylation étant déduite de la différence de signal obtenu dans l'étape b) par rapport au signal obtenu en l'absence dudit composé.

WO 03/020962 A2

PROCEDE D'IDENTIFICATION DE COMPOSES LIANT UNE GLYCOSYL TRANSFERASE

La présente invention se rapporte à un procédé d'identification de composés pouvant se lier à une glycosyltransférase bactérienne, au site de transglycosylation.

5 L'invention se rapporte aussi aux composés obtenus par un tel procédé, et à leurs utilisations.

Le peptidoglycane est un polymère synthétisé par la bactérie et indispensable à sa survie. Les enzymes impliquées dans la synthèse et l'organisation de ce peptidoglycane bactérien, propre au monde procaryote, constituent ainsi des
10 cibles potentielles très intéressantes pour la recherche de nouveaux antibiotiques.

Parmi celles-ci les PBP (Penicillin Binding Proteins, protéines liant la pénicilline), qui font partie des étapes membranaires, font l'objet de nombreux travaux. Cet intérêt est lié principalement à la présence d'une activité transpeptidase
15 qui est inhibée par les pénicillines (van Heijenoort, J. 1996, p. 1025-1034. *In* Neidhardt *et al.* (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*, 2nd ed.: cellular and molecular biology, ASM Press, Washington, D.C.).

Les plus étudiées sont les PBP de classe A qui sont des protéines modulaires possédant deux activités enzymatiques: l'activité transpeptidase (représentée par une
20 séquence d'environ 340 amino-acides) et une activité glycosyltransférase (environ 300 amino-acides dans la région N-terminale).

Cette activité glycosyltransférase est encore peu connue, tant par la difficulté à suivre la réaction enzymatique que par l'absence totale de données cristallographiques. On connaît cependant un inhibiteur de cette activité, la
25 moénomycine dont le mécanisme exact d'action reste à élucider (Wasielewski et al, 1965, *Antimicrob. Agents and Chem.*, 743-748).

Il est important de noter qu'à ce jour, aucune PBP de classe A n'a été entièrement cristallisée.

A côté de ces PBP bi-fonctionnelles cohabitent deux systèmes mono-
30 fonctionnels:

- d'une part, les PBP mono-fonctionnelles, qui possèdent uniquement une activité transpeptidase : Une de ces PBP a été récemment cristallisée (Gordon et al, 2000, *J. Mol. Biol.*, 299, 477-485).

- d'autre part, des enzymes possédant la seule activité glycosyltransférase, dénommées MgtA (également appelées MtgA) (Di Berardino et al, 1996, *FEBS Lett.*, 392, 184-188)

5 Il est important de pouvoir disposer de nouveaux inhibiteurs de l'activité glycosyltransférase, qui pourraient ainsi être utilisés en tant que nouveaux agents antibiotiques.

La présente invention concerne donc un nouveau procédé d'identification, détection et/ou criblage de composés se liant au site de transglycosylation d'une glycosyl transférase, ce procédé étant simple à mettre en œuvre, et ladite glycosyl transférase étant soit une protéine PBP de classe A, soit une protéine de type MgtA (également appelées MtgA), sensible à la moénomycine (par exemple une MgtA de staphylocoque et de streptocoque, tel *S. aureus* ou *S. pneumoniae*). Le procédé selon l'invention permet également de pratiquer un criblage à haut débit, c'est-à-dire de pouvoir tester aisément plusieurs composés en même temps. Ce procédé permet donc un gain de temps et une économie substantielle pour la détection de nouveaux partenaires de liaison de la glycosyl transférase, et un mode de réalisation est schématisé en figure 1.

Un certain nombre de procédé de détection de composés pouvant, entre autres, se lier au site de transglycosylation d'une glycosyltransférase ont été publiés (Branstrom A., Midha S., Goldman R. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000., 191, 187-190 ; Barbosa M., Yang G., Fang G., Kurilla M., Pompliano D, *Antimicrob Agents. Chemother.*, 2002, 46, 4, 943-946 ; Vollmer W, Holtje, JV, *Antimicrob Agents. Chemother.*, 2000, 44, 5, 1181-1185). Ces méthodes présentent toutes un certain nombre de désavantages par rapport au procédé objet de la présente demande. Ainsi, ces techniques ne ciblent pas spécifiquement l'activité transglycosylase de la sytnhèse du peptidoglycane bactérien et ne sont pas du tout adaptées aux méthodes de criblage à haut débit de découverte de molécules d'intérêt pharmaceutique.

30 Dans un premier mode de réalisation, l'invention concerne un procédé d'identification et/ou de criblage et/ou de sélection d'un composé se liant au site de transglycosylation d'une glycosyl transférase recombinante, comprenant les étapes consistant à :

a) mettre ledit composé en contact avec ladite protéine recombinante, avant, après, ou de façon concomitante à la mise en contact de ladite protéine recombinante avec un inhibiteur de l'activité de transglycosylation, ledit inhibiteur étant marqué par un marqueur générant un signal direct ou indirect,

b) étudier ledit signal lié à ladite protéine recombinante, la liaison dudit composé au site de transglycosylation étant déduite de la différence de signal obtenu dans l'étape b) par rapport au signal obtenu en l'absence dudit composé.

Dans un mode de réalisation préférée, ladite glycosyl transférase recombinante est une PBP de classe A, de façon plus préférée la PBP1b de *Escherichia coli*. Cette protéine est la principale responsable de l'activité glycosyltransférase indispensable à la synthèse de la paroi bactérienne *in vitro*. Par ailleurs, elle possède une importante homologie avec les PBP de classe A observées chez les autres bactéries. Ainsi, on utilise préférentiellement la PBP1b correspondant à SEQ ID N°2, SEQ ID N° 1 représentant une protéine de fusion construite pour la production d'une PBP1b recombinante. La méthode peut toutefois être adaptée en utilisant toute PBP de classe A, provenant d'un micro-organisme possédant un peptidoglycane, qu'il soit Gram + ou Gram -. On utilise de préférence des PBP de classe A provenant de micro-organismes pathogènes pour l'homme, par exemple *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *M. leprae*, *L. pneumophila*, *M. catarrhalis*, *C. jeikeium*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*...

Ainsi, on détecte la liaison au site de transglycosylation par compétition avec l'inhibiteur employé. Ce procédé permet d'obtenir des composés spécifiques de l'activité de transglycosylation, qui présentent aussi une probabilité élevée d'inhiber cette activité. L'intérêt de l'utilisation d'une protéine recombinante permet également de diminuer les risques de liaison des différents composés testés pouvant arriver si l'on utilise une protéine préparée directement à partir de la membrane bactérienne, la préparation ainsi obtenue pouvant contenir alors des protéines contaminantes.

Dans un mode de réalisation particulier, ledit inhibiteur est la moénomycine. Il est toutefois important de noter que l'on pourrait également utiliser des analogues

de la moénomycine, comme ceux décrits dans la demande WO 99/26956, ou tout autre composé inhibant l'activité de transglycosylation.

Dans un mode préféré de réalisation, ladite protéine recombinante est fixée à un support solide. Ce support peut notamment être une colonne ou une surface
5 plane. De préférence, le support solide selon l'invention consiste en des billes, portant un groupement capable de fixer la protéine recombinante, tel que des ions Cuivre ou un résidu Glutathion. En effet, l'utilisation de billes permet la mise en contact en solution de la protéine avec les inhibiteurs et les composés à tester, ce qui permet en général d'améliorer les capacités de liaison, par rapport à une surface
10 plane (bidimensionnel).

Dans un mode de réalisation particulier, ladite protéine recombinante a été modifiée par génie génétique, afin de présenter une modification permettant sa liaison audit support. De telles modifications sont connues de l'homme du métier, et comprennent notamment l'ajout de résidus Histidine à l'extrémité N- ou C-
15 terminale de la protéine, ce qui permet une liaison avec un chélate métallique (Cuivre, par exemple). On peut aussi utiliser les systèmes basés sur le glutathion.

Dans un mode de mise en œuvre du procédé selon l'invention, ledit marqueur est un marqueur radioactif ou fluorescent. Ainsi, on peut utiliser tout type de marquage radioactif, notamment par incorporation de composés radioactifs (de
20 façon préférée ^3H) dans la structure de l'inhibiteur. L'utilisation de tritium est en effet préférée, lorsque l'inhibiteur marqué utilisé dans le procédé selon l'invention est une molécule organique. Toutefois, on peut aussi envisager l'incorporation de ^{13}C ou ^{14}C dans le squelette dudit inhibiteur. Ainsi, on peut utiliser un précurseur marqué au ^{14}C (glucose, propionate...), lors de la synthèse de l'inhibiteur, lorsque
25 celui-ci est préparé par fermentation. Lorsqu'il est préparé par synthèse chimique, on utilise de éléments déjà marqués.

On peut aussi marquer ledit inhibiteur avec un marqueur fluorescent ou d'une autre nature, soit que le signal émis soit détecté directement, soit qu'il ne le soit qu'en cas de contact (ou proximité) entre la protéine et l'inhibiteur (détection
30 indirecte). Ainsi, on peut marquer à la fois l'inhibiteur et la protéine par des composés fluorescent, la liaison entre les deux entités étant alors déterminée par « quenching », ou par d'autres méthodes (par exemple SPA (Scintillation Proximity Assay) ou FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer).

Ainsi, dans un mode de réalisation préféré, la PBP1b est fixée sur des billes SPA (Amersham) qui renferment un scintillant. On met en contact ces billes-PBP avec l'inhibiteur potentiel et la moénomycine marquée. Si la PBP fixe l'inhibiteur on ne voit pas de signal. Si la PBP fixe la Moénomycine marquée la proximité du radioélément et de la bille déclenche l'émission d'un signal (émission de photons par le scintillant contenu dans la bille SPA).

Dans un mode de réalisation, on peut déduire le signal lié à ladite protéine recombinante par mesure du signal non lié à la protéine, en fonction du signal total de départ. En effet, connaissant la quantité d'inhibiteur ajouté dans le procédé selon l'invention, on connaît la quantité de signal initial. Il est alors possible, après passage de l'inhibiteur sur la protéine, et les différents lavages, de déterminer la quantité d'inhibiteur non lié, et d'en déduire ainsi la quantité d'inhibiteur lié à la protéine. Il s'agit ici d'une méthode indirecte.

Toutefois, le mode de réalisation dans lequel on mesure directement la quantité d'inhibiteur lié à la protéine est préféré.

L'invention se rapporte également à un procédé d'identification d'un produit ayant une activité antibactérienne, comportant les étapes de :

- a) mise en œuvre d'un procédé selon l'invention,
- b) modification du produit sélectionné à l'étape a) notamment par greffage de résidus sur le squelette chimique,
- c) test du produit modifié dans l'étape b) dans des procédés *in vitro* et/ou *in vivo*, sur des modèles pertinents de mesure d'activité antibiotique,
- d) identification du produit permettant d'obtenir une activité antibiotique supérieure à l'activité obtenue pour le produit sélectionné à l'étape a).

En effet, le développement d'un médicament est souvent effectué sur le principe suivant :

- criblage de composés ayant une activité voulue par une méthode appropriée,

- sélection des composés répondant au « cahier des charges » (ici, liaison au site d'activité de transglycosylation de la glycosyl transférase),
- 5 - détermination de la structure (notamment la séquence (éventuellement tertiaire) s'il s'agit de peptides, formule et squelette s'il s'agit de composés chimiques) des composés sélectionnés,
- optimisation des composés sélectionnés, par modification de la structure (par exemple par le changement de la conformation stéroéochimique (par exemple passage de L en D des acides aminés dans un peptide), ajout de substituants sur les squelettes peptidiques ou chimiques, notamment par greffage de résidus sur le squelette, modification des peptides (voir notamment Gante "Peptidomimetics", dans Angewandte Chemie-International Edition Engl. 1994, 33. 1699-1720),
- 10 - passage et criblage des composés ainsi obtenus sur des modèles appropriés qui sont souvent des modèles plus proches de la pathologie étudiée. A ce stade, on utilise notamment souvent des modèles animaux, en général chez les rongeurs (souris, rats...) ou chez des chiens, voire des primates.

Les modèles *in vitro* sont facilement mis en œuvre par l'homme du métier. On ajoute, à un milieu de culture pour les bactéries cibles, les composés sélectionnés par les procédés selon l'invention (avec éventuellement les modifications de structure apportées), à des concentrations variables, et on étudie la survie des bactéries par toute méthode appropriée, notamment en les étalant sur des milieux solides et en comptant les colonies formées.

Les modèles animaux qui peuvent être utilisés sont bien connus de l'homme du métier. On utilise par exemple, des modèles basés sur des souris immunodéprimées (par exemple *scid/scid*), que l'on infecte avec des bactéries, ce qui mène au développement d'une infection. On étudie l'efficacité des composés sélectionnés par la méthode selon l'invention par la résolution de l'infection.

L'invention se rapporte également à un composé pouvant se lier au site de transglycosylation d'une glycosyl transférase et possédant de préférence une activité antibiotique, pouvant être obtenu par un procédé selon l'invention, ou directement obtenu par l'un desdits procédés.

5 Un tel composé selon l'invention peut être un composé ayant une structure chimique (du type petite molécule organique), un lipide, un sucre, une protéine, un peptide, un composé hybride protéine-lipide, protéine-sucre, peptide-lipide, ou peptide-sucre, une protéine ou un peptide sur lequel on a ajouté des ramifications chimiques.

10 Parmi les composés organiques envisagés, ils peuvent contenir un ou plusieurs cycles, aromatique(s) ou non; ainsi que plusieurs résidus de toute sorte (notamment alkyle inférieur, c'est-à-dire présentant entre 1 à 6 atomes de carbones). Toutefois, le composé selon l'invention n'est pas la moénomycine, ni les composés de WO 99/26956.

15 L'invention se rapporte également à un composé selon l'invention, à titre de médicament, en tant que tel ou avec un excipient pharmaceutiquement acceptable, ainsi qu'à l'utilisation desdits composés pour la préparation d'un médicament destiné à traiter les infections bactériennes.

L'invention se rapporte ainsi en particulier à l'utilisation de composés
20 pouvant être ou étant obtenus par le procédé selon l'invention et possédant des capacités de liaison au site de transglycosylation d'une glycosyl transférase et/ou d'inhibition de cette activité, pour la préparation d'un médicament destiné à traiter des infections bactériennes. De préférence, le composé préféré possède de plus une activité antibiotique, pouvant facilement être testée sur modèles animaux ou *in*
25 *vitro*, sur milieux de cultures. Ledit composé n'est pas la moénomycine et se comporte comme un compétiteur de ce produit dans le procédé selon la présente invention.

Un inhibiteur intéressant du site de glycosyltransférase est la moénomycine,
30 et dans un mode de réalisation préférée de l'invention, on utilise ce composé après tritiation, ceci permettant une mise en œuvre favorisée de l'invention, dans la mesure où cette modification ne modifie pas radicalement les propriétés de la moénomycine, et permet une détection aisée, notamment par SPA.

Le nombre de liaisons saturées ayant un effet sur le caractère plus ou moins lipophile de la molécule et donc probablement sur le rapport signal / bruit de fond observé lors du test (augmentation du collage avec la lipophilie), il peut être intéressant de chercher à limiter le nombre de liaisons saturées.

- 5 Une hydrogénation en présence de catalyseur de Wilkinson permet d'atteindre ce but avec de l'hydrogène mais donne des résultats décevants avec du tritium.

Ainsi, un procédé alternatif a été développé, consistant en une tritiation en milieu hétérogène, de préférence en mesurant la quantité de tritium absorbé et en
10 arrêtant la réaction à environ deux moles de tritium par mole de moénomycine. Ainsi, on effectue une tritiation contrôlée de la moénomycine.

Le mélange obtenu est ensuite avantageusement séparé par chromatographie de façon à grouper les produits d'activité spécifique identique (donc selon le nombre de doubles liaisons saturées au tritium).

- 15 Ainsi, l'invention se rapporte également à un procédé de préparation de moénomycine tritiée, comprenant une étape de fixation de tritium sur une ou plusieurs doubles liaisons de la chaîne latérale de la moénomycine (figure 2). Ce procédé est réalisé de préférence en milieu hétérogène, en présence d'un catalyseur, notamment le palladium.

- 20 De préférence, ledit catalyseur est du palladium sur charbon, de préférence le palladium à environ 12-25 % sur charbon, de façon plus préférée à environ 18 % sur charbon.

De façon préférée, on dissout la moénomycine dans un solvant organique, et de préférence dans l'éthanol ou le méthanol. Le choix du solvant adapté pour la
25 moénomycine est à la portée de l'homme du métier.

En présence du catalyseur, on pressurise avec du tritium, et on ramène à une température inférieure à environ 45-50 °C, de préférence inférieure à environ 30 °C, de façon plus préférée à température ambiante, soit environ 20 °C.

- 30 On agite à température ambiante, pour faire baisser la pression, puis on filtre le milieu réactionnel, que l'on concentre sous vide, avant de reprendre le résidu. On agite ainsi le temps nécessaire à l'intégration d'une à deux moles de tritium par mole de moénomycine. Ce temps dépend de la température et peut être déterminé

par l'homme du métier, mais on indique que le temps nécessaire est d'environ 15 minutes lorsque l'on travaille à 20 °C.

La filtration du milieu est effectuée après élimination de l'excès de tritium.

On peut ensuite analyser le mélange, par exemple par HPLC, et le purifier
5 sur une colonne préparative, selon des protocoles connus de l'homme du métier.

Le procédé selon l'invention permet d'obtenir de façon reproductible des lots de moénomycine tritiée, et de contrôler la quantité de tritium incorporée, en fonction de la quantité de tritium apportée,

Ainsi, le procédé selon l'invention permet d'obtenir une moénomycine
10 marquée au tritium, de telle sorte que le tritium ne sature qu'un nombre limité (une ou deux) de doubles liaisons, ce qui permet de conserver les caractéristiques et propriétés de la moénomycine.

De plus, la séparation par chromatographie (HPLC) des produits mono et di saturés permet de travailler avec des lots d'activité spécifique reproductible. Ce
15 point peut s'avérer important pour juger de la qualité de l'effet compétiteur des produits que l'on teste dans le procédé selon l'invention. Il convient en effet de disposer de lots parfaitement identifiés et aux propriétés bien définies. Notons que l'on peut mettre en œuvre toute autre méthode de séparation des produits.

L'invention se rapporte également à de la moénomycine tritiée, pouvant
20 éventuellement être ou directement obtenue par le procédé de tritiation selon l'invention, le tritium étant incorporé de préférence par saturation d'une double liaison dans sa chaîne latérale, et/ou étant synthétisée par fermentation en présence de précurseurs radioactifs.

25 L'invention utilise également une glycosyl transférase recombinante. Cette protéine membranaire est préparée de préférence de telle sorte qu'elle puisse être solubilisée, de façon à être produite avec une certaine pureté, dans le but d'apporter une plus grande spécificité au procédé objet de la présente invention. Ainsi, l'invention se rapporte à un procédé de préparation d'une glycosyl transférase
30 recombinante à partir d'un vecteur comprenant le gène de ladite glycosyl transférase, comprenant les étapes de :

- a) fermentation d'une cellule dans laquelle est introduit ledit vecteur, dans des conditions permettant la production de la glycosyl transférase recombinante
- b) purification de ladite glycosyl transférase recombinante, en présence d'un détergent de préférence non ionique.

De préférence, ce procédé est appliqué pour la préparation d'une PBP de classe A, et notamment la PBP1b de *E.coli*, principale responsable de l'activité glycosyltransférase indispensable à la synthèse de la paroi bactérienne *in vitro*.

De préférence, le vecteur introduit dans la cellule bactérienne contient le gène de la PBP, à l'extrémité duquel on a inséré, par des méthodes connues de biologie moléculaire, une queue polyhistidine. Ceci permet la liaison de la protéine recombinante avec les billes de type SPA lorsque l'on met en œuvre le procédé selon l'invention. On obtient ainsi une protéine présentant une séquence proche de SEQ ID N° 1, qui est indiquée en illustration, les acides aminés 1-23 correspondant à la queue polyhistidine, les acides aminés 24-822 correspondant à la PBP d'*E. coli* (SEQ ID N° 2).

La fermentation est effectuée selon les méthodes habituelles. Selon que l'on utilise un promoteur particulier, on peut induire la production (voire la surproduction) de protéine, ce qui peut également être effectué en variant la température de fermentation. Tout ceci est bien connu de l'homme du métier.

La protéine PBP est une protéine membranaire hydrophobe. Il est donc nécessaire de la purifier en présence de détergent. Les méthodes de purification utilisées sont quant à elles bien connues de l'homme du métier. On travaille de préférence en présence d'un détergent non ionique, le détergent préféré étant le NOG (N-Octyl Glucopyranoside). On peut également choisir un autre détergent non ionique, comme l'Hecameg, le Triton X-100, le tétraéthylène glycol mono-octyl éther ou le Nonidet P-40. Notons que le détergent est utilisé dans toutes les étapes de la purification.

La mise en œuvre du procédé selon l'invention s'effectue aussi de préférence en présence d'un détergent non ionique, et plus particulièrement du détergent utilisé lors de la purification, c'est-à-dire le NOG. Ceci permet d'observer une bonne activité enzymatique.

DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1 : représentation schématique du procédé selon l'invention. Les billes SPA portant des groupements cuivre sont représentées par des ovales, avec le site de fixation de l'extrémité poly-histidine (His) de la protéine PBP1b de *E. coli*. En présence d'un inhibiteur, la moénomycine marquée ([³H]-Moénomycine) ne peut se lier au site de transglycosylation de la protéine. En l'absence de l'inhibiteur, la liaison s'effectue et un signal est émis.

Figure 2 : représentation de la tritiation de la moénomycine par saturation d'une double liaison sur la chaîne latérale. T : tritium, Ca : catalyseur.

Les exemples ci-dessous illustrent une mise en œuvre de l'invention, mais ne doivent pas être considérés comme limitant l'invention.

15

EXEMPLES

Exemple 1 : Réactifs et matériels

Billes PVT Copper His-Tag AMERSHAM: 200µg / 100 µl / puits

PBP1b *E.coli* purifiée 0,860 mg/ml; PM=89 kDa; 8.31 µM; 5 pmoles / 10 µl/ puits.

20 Moénomycine: PM=1580 Da; 200 pmoles / 10µl / puits pour suivre le niveau non spécifique.

Inhibiteur: Dilution en DMSO; 10 µl/puits.

³H-Moénomycine: 8,5 MBq/ml; 8,9 µM ; 12,5 pmoles / 100ul / puits.

Trizma hydrochloride SIGMA

25 Acide Maléique MERCK

MgCl₂ MERCK

NOG SIGMA (n-octyl β-D glucopyranoside)

NaCl MERCK

Tampon 1: Tris,maléate 10 mM; MgCl₂ 10 mM; NaCl 0,2 M; NOG 1 %; pH 7,2

30 PBS 10x GIBCO BRL

Tween 20 ACROS

Tampon 2: PBS 1x; Tween 20 0,5 %

BSA CALBIOCHEM

Tampon 3: PBS2x; BSA 2%

Compteur de radioactivité WALLAC Microbéta 1450

5 Exemple 2 : Protocole

2.1 Fixation de la PBP1b sur les billes

Prélever la quantité voulue de billes après avoir bien agité la solution.

Diluer au 1/5 en eau Milli-Q.

Diluer une nouvelle fois au 1/2 en tampon 3

10 Préparer la solution de PBP1b en diluant dans le tampon 1.

Dans un tube vacutainer, mélanger (100 µl de billes + 10 µl de solution de PBP1b)
par le nombre de puits à faire

Incuber 30 mn à 37°C à 250 tours / minute.

15 *2.2. Compétition 3H-traceur / Inhibiteur*

Préparer la Moénomycine radioinerte pour la détermination du niveau de liaison non spécifique:

Solution mère à 1,58 mg/ml, soit 1 mM en tampon 2 (conserver à -80°C)

Diluer cette solution mère au 1/10 puis au 1/5 en tampon 2.

20

Préparer la ³H-Moénomycine:

Solution mère à 8,9 µM. Prélever le volume nécessaire pour avoir une solution à 125 nM finale. Evaporer sous un flux d'azote. reprendre par le volume final de tampon 2.

25

Préparer les inhibiteurs:

Les dilutions sont faites en DMSO. Les concentrations initiales sont telles que l'inhibiteur est à la bonne concentration finale en déposant 10µl / puits.

30 Dans une plaque 96 puits translucide Greiner, déposer :

10 µl de Moéno radioinerte dans les puits niveau de liaison non spécifique.

10 µl d'inhibiteur dans les puits tests

100 µl l de ³H-Moéno dans tous les puits.

10 μl de DMSO dans les puits sans protéine, niveau de liaison maximum, niveau de liaison non spécifique.

5 Faire 2 lavages des billes/PBP1b en PBS 1x; Tween20 0,5% pour éliminer la PBP1b non fixée.

Entre chaque lavage/aspiration, centrifuger 5 mn à 1000G à température ambiante. Après la dernière centrifugation reprendre les billes/PBP1b par (110 μl tampon 2) x nombre de puits à faire.

Déposer 110 μl de billes / PBP1b par puits.

10 Couvrir la plaque d'un film plastique autocollant.

Incuber 1 nuit à 4°C sans agitation.

Des incubations de 24 h, 48 h et même 72 h à 4 °C ne donnent pas de résultats significativement différents

15 Comptage

Compter sans lavage ni centrifugation sur un compteur de radioactivité.

Exemple 3 : Calculs

20 Calculer le pourcentage d'inhibition de fixation de la ^3H -Moénomycine avec chaque concentration d'inhibiteur par rapport à la fixation maximale (puits niveau de liaison maximum).

Tracer une courbe % inhibition = f([inhibiteur]) pour déterminer l'IC50.

Exemple 4 : Bilan des concentrations

25	[initiale]	pmoles / puit	[finale]
Billes	2 mg/ml	200 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$	0.9 mg/ml
PBP1b	500 nM	5 pmoles/10 μl	#24 nM
^3H -Moénomycine	125 nM	12,5 pmoles/100 μl	57 nM
Inhibiteurs	$\pm 1\text{mM}$	$\pm 10 \text{ nmoles}/10 \mu\text{l}$	$\pm 45 \mu\text{M}$

Exemple 5 : test à haut débit

L'utilisation du procédé selon l'invention a permis de tester environ 500 000 composés en 5 jours, et d'en sélectionner environ 1000. Ainsi, le procédé est rapide, à haut débit, et relativement discriminatif.

5

Exemple 6 : Tritiation de la moénomycine

Dans un ballon à tritiation de 1cm³ on introduit :

6mg de moénomycine soit ~10μmol.

300μl de méthanol.

10 2mg de catalyseur Palladium à 18% sur charbon (Degussa type E10N/D).

On place sur le banc, piège, vide et pressurise avec du tritium.

Après retour à 20° on agite durant 15mn de façon à obtenir une chute de pression de

15 400mBar soit environ 20μmol de tritium (volume total du tritium 1cm³).

Après récupération de l'excès de tritium, le milieu réactionnel est filtré, concentré sous vide et le résidu est repris par 100cm³ d'éthanol et compté.

On obtient : **1,1Ci** (théorie pour 20μmol de tritium : 1,2Ci).

20

Le produit est analysé en HPLC dans les conditions suivantes :

Colonne Symmetry C8 5μ 3.9x150mm

Solvant : Acetonitrile/eau/TFA : 55/45/0,1,

Débit : 1cm³/mn

25 Détection : UV 220nm et radioactivité.

La composition du mélange est la suivante : produit inchangé : 24% (en UV), mono saturé : 29%, di saturé : 28% (complément à 100% en radioactivité: produits polysaturés).

30 **Purification sur colonne préparative :**

Colonne Symmetry C8 7μ, 7.8x300mm.

Solvant : Acetonitrile/eau/TFA : 55/45/0.1 .

Débit : 4cm³/mn.

Détection : UV 220nm et radioactivité.

Caractéristiques de deux lots :

5	Lot A :	Activité totale :	6,56GBq (177mCi)
		Activité Spécifique :	1,9TBq/mmol (~2T/mole)
		Activité volumique :	37MBq /cm ³ (Ethanol à 5% d'eau).
		Stockage :	-80°C sous gaz inerte.
10	Lot B :	Activité totale :	8,28GBq (223mCi).
		Activité Spécifique :	4,92TBq/mmol (~4.5T/mole).
		Activité volumique :	37MBq /cm ³ (Ethanol à 5% d'eau).
		Stockage :	-80°C sous gaz inerte.

Revendications

1. Procédé d'identification d'un composé se liant au site de transglycosylation d'une glycosyl transférase recombinante, comprenant les étapes consistant à :
 - 5 a) mettre ledit composé en contact avec ladite protéine recombinante, avant, après ou de façon concomitante à la mise en contact de ladite protéine recombinante avec un inhibiteur de l'activité de transglycosylation, ledit inhibiteur étant marqué par un marqueur générant un signal direct ou indirect,
 - 10 b) étudier ledit signal lié à ladite protéine recombinante, la liaison dudit composé au site de transglycosylation étant déduite de la différence de signal obtenu dans l'étape b) par rapport au signal obtenu en l'absence dudit composé.
- 15 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit inhibiteur est la moénomycine.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ladite protéine recombinante est fixée à un support solide, de préférence des billes, notamment
20 portant des groupements cuivre.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit marqueur est un marqueur radioactif ou fluorescent.
- 25 5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ledit signal est mesuré de façon directe.
6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ledit signal est mesuré de façon indirecte, par exemple par SPA (Scintillation Proximity
30 Assay) ou FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer).

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'on déduit le signal lié à ladite protéine recombinante par mesure du signal non lié à la protéine, en fonction du signal total de départ.
- 5 8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que ledit inhibiteur est tritié.
9. Procédé d'identification d'un produit ayant une activité antibactérienne, comportant les étapes de :
- 10 a) mise en œuvre d'un procédé selon l'une des revendications 1 à 8,
b) modification du produit sélectionné à l'étape a) notamment par greffage de résidus sur le squelette chimique,
c) test du produit modifié dans l'étape b) dans des procédés *in vitro* et/ou *in vivo*, sur des modèles pertinents de mesure d'activité antibiotique,
- 15 d) identification du produit permettant d'obtenir une activité antibiotique supérieure à l'activité obtenue pour le produit sélectionné à l'étape a).
- 20 10. Utilisation d'un composé pouvant se lier au site de transglycosylation d'une glycosyl transférase et possédant éventuellement une activité antibiotique, pouvant être obtenu par un procédé selon l'une des revendications 1 à 9, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement d'infections bactériennes.
- 25 11. Procédé de préparation de moénomycine tritiée, comprenant une étape de fixation de tritium sur une ou plusieurs doubles liaisons de la chaîne latérale de la moénomycine.
12. Moénomycine présentant une molécule de tritium incorporée dans son squelette.
- 30 13. Procédé de préparation d'une glycosyl transférase recombinante à partir d'un vecteur comprenant le gène de ladite glycosyl transférase, comprenant les étapes de :

- 5
- a) fermentation d'une cellule dans laquelle est introduite ledit vecteur, dans des conditions permettant la production de la glycosyl transférase recombinante
 - b) purification de ladite glycosyl transférase recombinante, en présence d'un détergent de préférence non ionique.

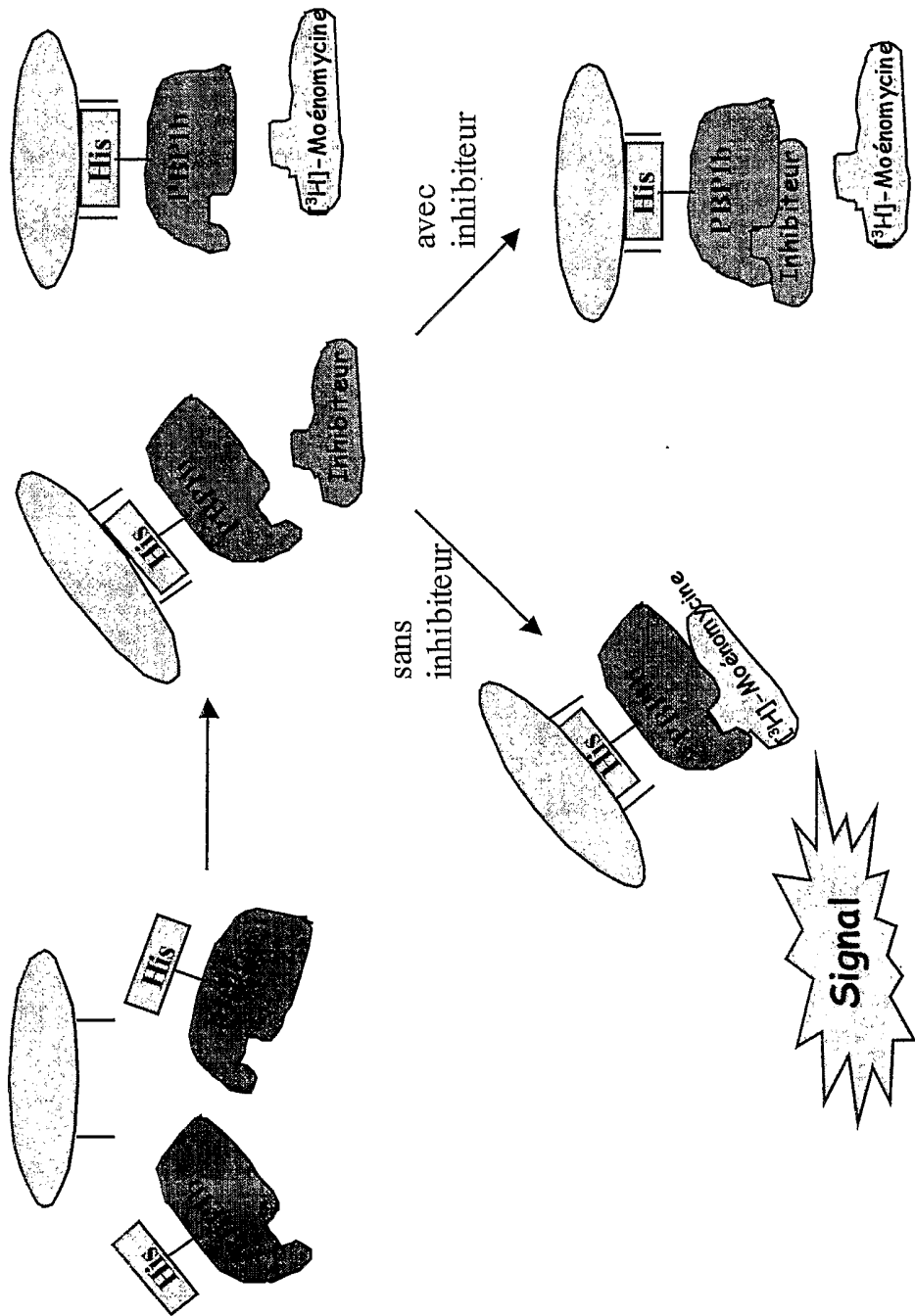


Figure 1

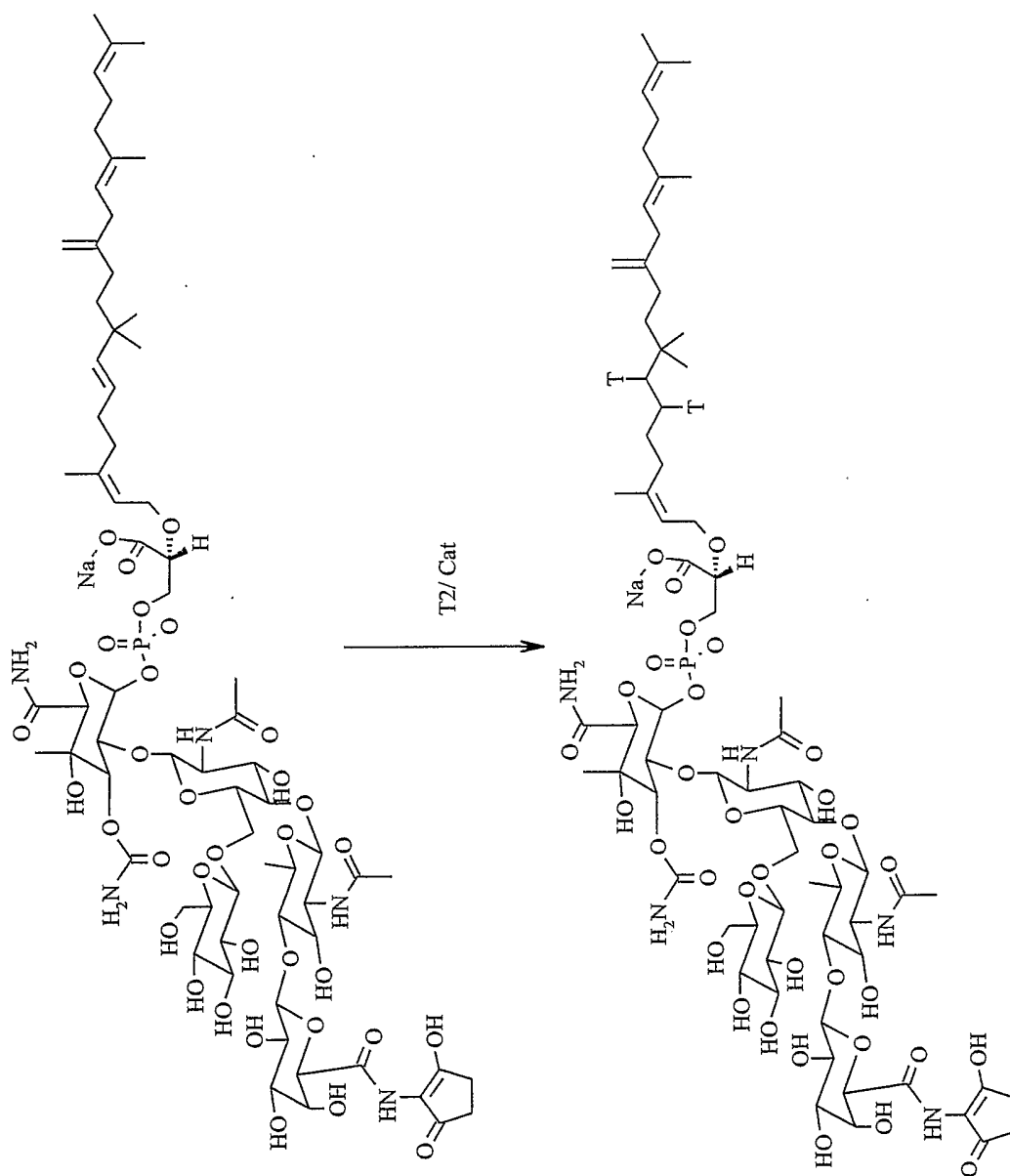


Figure 2

LISTE DE SEQUENCES

<110> Aventis Pharma SA

<120> Procédé d'identification de composés liant une glycosyl transférase

<130> D19421

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 822

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Proteine de fusion, PBPl de E. coli (aa 24-822) + etiquette pour production (aa 1-23)

<400> 1

```

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1              5              10              15

Arg Gly Ser His Met Ala Ser Met Pro Arg Lys Gly Lys Gly Lys Gly
      20              25              30

Lys Gly Arg Lys Pro Arg Gly Lys Arg Gly Trp Leu Trp Leu Leu Leu
      35              40              45

Lys Leu Ala Ile Val Phe Ala Val Leu Ile Ala Ile Tyr Gly Val Tyr
      50              55              60

Leu Asp Gln Lys Ile Arg Ser Arg Ile Asp Gly Lys Val Trp Gln Leu
      65              70              75              80

Ala Ala Ala Val Tyr Gly Arg Met Val Asn Leu Glu Pro Asp Met Thr
      85              90              95

Ile Ser Lys Asn Glu Met Val Lys Leu Leu Glu Ala Thr Gln Tyr Arg
      100             105             110

Gln Val Ser Lys Met Thr Arg Pro Gly Glu Phe Thr Val Gln Ala Asn
      115             120             125

Ser Ile Glu Met Ile Arg Arg Pro Phe Asp Phe Pro Asp Ser Lys Glu
      130             135             140

Gly Gln Val Arg Ala Arg Leu Thr Phe Asp Gly Asp His Leu Ala Thr
      145             150             155             160

Ile Val Asn Met Glu Asn Asn Arg Gln Phe Gly Phe Phe Arg Leu Asp
      165             170             175

Pro Arg Leu Ile Thr Met Ile Ser Ser Pro Asn Gly Glu Gln Arg Leu
      180             185             190

Phe Val Pro Arg Ser Gly Phe Pro Asp Leu Leu Val Asp Thr Leu Leu
      195             200             205

```

Ala	Thr	Glu	Asp	Arg	His	Phe	Tyr	Glu	His	Asp	Gly	Ile	Ser	Leu	Tyr	210	215	220
Ser	Ile	Gly	Arg	Ala	Val	Leu	Ala	Asn	Leu	Thr	Ala	Gly	Arg	Thr	Val	225	230	235
Gln	Gly	Ala	Ser	Thr	Leu	Thr	Gln	Gln	Leu	Val	Lys	Asn	Leu	Phe	Leu	245	250	255
Ser	Ser	Glu	Arg	Ser	Tyr	Trp	Arg	Lys	Ala	Asn	Glu	Ala	Tyr	Met	Ala	260	265	270
Leu	Ile	Met	Asp	Ala	Arg	Tyr	Ser	Lys	Asp	Arg	Ile	Leu	Glu	Leu	Tyr	275	280	285
Met	Asn	Glu	Val	Tyr	Leu	Gly	Gln	Ser	Gly	Asp	Asn	Glu	Ile	Arg	Gly	290	295	300
Phe	Pro	Leu	Ala	Ser	Leu	Tyr	Tyr	Phe	Gly	Arg	Pro	Val	Glu	Glu	Leu	305	310	315
Ser	Leu	Asp	Gln	Gln	Ala	Leu	Leu	Val	Gly	Met	Val	Lys	Gly	Ala	Ser	325	330	335
Ile	Tyr	Asn	Pro	Trp	Arg	Asn	Pro	Lys	Leu	Ala	Leu	Glu	Arg	Arg	Asn	340	345	350
Leu	Val	Leu	Arg	Leu	Leu	Gln	Gln	Gln	Gln	Ile	Ile	Asp	Gln	Glu	Leu	355	360	365
Tyr	Asp	Met	Leu	Ser	Ala	Arg	Pro	Leu	Gly	Val	Gln	Pro	Arg	Gly	Gly	370	375	380
Val	Ile	Ser	Pro	Gln	Pro	Ala	Phe	Met	Gln	Leu	Val	Arg	Gln	Glu	Leu	385	390	395
Gln	Ala	Lys	Leu	Gly	Asp	Lys	Val	Lys	Asp	Leu	Ser	Gly	Val	Lys	Ile	405	410	415
Phe	Thr	Thr	Phe	Asp	Ser	Val	Ala	Gln	Asp	Ala	Ala	Glu	Lys	Ala	Ala	420	425	430
Val	Glu	Gly	Ile	Pro	Ala	Leu	Lys	Lys	Gln	Arg	Lys	Leu	Ser	Asp	Leu	435	440	445
Glu	Thr	Ala	Ile	Val	Val	Val	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Glu	Val	Arg	Ala	450	455	460
Met	Val	Gly	Gly	Ser	Glu	Pro	Gln	Phe	Ala	Gly	Tyr	Asn	Arg	Ala	Met	465	470	475
Gln	Ala	Arg	Arg	Ser	Ile	Gly	Ser	Leu	Ala	Lys	Pro	Ala	Thr	Tyr	Leu	485	490	495
Thr	Ala	Leu	Ser	Gln	Pro	Lys	Ile	Tyr	Arg	Leu	Asn	Thr	Trp	Ile	Ala	500	505	510
Asp	Ala	Pro	Ile	Ala	Leu	Arg	Gln	Pro	Asn	Gly	Gln	Val	Trp	Ser	Pro	515	520	525
Gln	Asn	Asp	Asp	Arg	Arg	Tyr	Ser	Glu	Ser	Gly	Arg	Val	Met	Leu	Val	530	535	540

3/6

Asp Ala Leu Thr Arg Ser Met Asn Val Pro Thr Val Asn Leu Gly Met
 545 550 555 560
 Ala Leu Gly Leu Pro Ala Val Thr Glu Thr Trp Ile Lys Leu Gly Val
 565 570 575
 Pro Lys Asp Gln Leu His Pro Val Pro Ala Met Leu Leu Gly Ala Leu
 580 585 590
 Asn Leu Thr Pro Ile Glu Val Ala Gln Ala Phe Gln Thr Ile Ala Ser
 595 600 605
 Gly Gly Asn Arg Ala Pro Leu Ser Ala Leu Arg Ser Val Ile Ala Glu
 610 615 620
 Asp Gly Lys Val Leu Tyr Gln Ser Phe Pro Gln Ala Glu Arg Ala Val
 625 630 635 640
 Pro Ala Gln Ala Ala Tyr Leu Thr Leu Trp Thr Met Gln Gln Val Val
 645 650 655
 Gln Arg Gly Thr Gly Arg Gln Leu Gly Ala Lys Tyr Pro Asn Leu His
 660 665 670
 Leu Ala Gly Lys Thr Gly Thr Thr Asn Asn Asn Val Asp Thr Trp Phe
 675 680 685
 Ala Gly Ile Asp Gly Ser Thr Val Thr Ile Thr Trp Val Gly Arg Asp
 690 695 700
 Asn Asn Gln Pro Thr Lys Leu Tyr Gly Ala Ser Gly Ala Met Ser Ile
 705 710 715 720
 Tyr Gln Arg Tyr Leu Ala Asn Gln Thr Pro Thr Pro Leu Asn Leu Val
 725 730 735
 Pro Pro Glu Asp Ile Ala Asp Met Gly Val Asp Tyr Asp Gly Asn Phe
 740 745 750
 Val Cys Ser Gly Gly Met Arg Ile Leu Pro Val Trp Thr Ser Asp Pro
 755 760 765
 Gln Ser Leu Cys Gln Gln Ser Glu Met Gln Gln Gln Pro Ser Gly Asn
 770 775 780
 Pro Phe Asp Gln Ser Ser Gln Pro Gln Gln Gln Pro Gln Gln Gln Pro
 785 790 795 800
 Ala Gln Gln Glu Gln Lys Asp Ser Asp Gly Val Ala Gly Trp Ile Lys
 805 810 815
 Asp Met Phe Gly Ser Asn
 820

<210> 2

<211> 799

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

Met Pro Arg Lys Gly Lys Gly Lys Gly Lys Gly Arg Lys Pro Arg Gly
 1 5 10 15

Lys Arg Gly Trp Leu Trp Leu Leu Leu Lys Leu Ala Ile Val Phe Ala
 20 25 30
 Val Leu Ile Ala Ile Tyr Gly Val Tyr Leu Asp Gln Lys Ile Arg Ser
 35 40 45
 Arg Ile Asp Gly Lys Val Trp Gln Leu Ala Ala Ala Val Tyr Gly Arg
 50 55 60
 Met Val Asn Leu Glu Pro Asp Met Thr Ile Ser Lys Asn Glu Met Val
 65 70 75 80
 Lys Leu Leu Glu Ala Thr Gln Tyr Arg Gln Val Ser Lys Met Thr Arg
 85 90 95
 Pro Gly Glu Phe Thr Val Gln Ala Asn Ser Ile Glu Met Ile Arg Arg
 100 105 110
 Pro Phe Asp Phe Pro Asp Ser Lys Glu Gly Gln Val Arg Ala Arg Leu
 115 120 125
 Thr Phe Asp Gly Asp His Leu Ala Thr Ile Val Asn Met Glu Asn Asn
 130 135 140
 Arg Gln Phe Gly Phe Phe Arg Leu Asp Pro Arg Leu Ile Thr Met Ile
 145 150 155 160
 Ser Ser Pro Asn Gly Glu Gln Arg Leu Phe Val Pro Arg Ser Gly Phe
 165 170 175
 Pro Asp Leu Leu Val Asp Thr Leu Leu Ala Thr Glu Asp Arg His Phe
 180 185 190
 Tyr Glu His Asp Gly Ile Ser Leu Tyr Ser Ile Gly Arg Ala Val Leu
 195 200 205
 Ala Asn Leu Thr Ala Gly Arg Thr Val Gln Gly Ala Ser Thr Leu Thr
 210 215 220
 Gln Gln Leu Val Lys Asn Leu Phe Leu Ser Ser Glu Arg Ser Tyr Trp
 225 230 235 240
 Arg Lys Ala Asn Glu Ala Tyr Met Ala Leu Ile Met Asp Ala Arg Tyr
 245 250 255
 Ser Lys Asp Arg Ile Leu Glu Leu Tyr Met Asn Glu Val Tyr Leu Gly
 260 265 270
 Gln Ser Gly Asp Asn Glu Ile Arg Gly Phe Pro Leu Ala Ser Leu Tyr
 275 280 285
 Tyr Phe Gly Arg Pro Val Glu Glu Leu Ser Leu Asp Gln Gln Ala Leu
 290 295 300
 Leu Val Gly Met Val Lys Gly Ala Ser Ile Tyr Asn Pro Trp Arg Asn
 305 310 315 320
 Pro Lys Leu Ala Leu Glu Arg Arg Asn Leu Val Leu Arg Leu Leu Gln
 325 330 335
 Gln Gln Gln Ile Ile Asp Gln Glu Leu Tyr Asp Met Leu Ser Ala Arg
 340 345 350

Pro	Leu	Gly	Val	Gln	Pro	Arg	Gly	Gly	Val	Ile	Ser	Pro	Gln	Pro	Ala
		355					360					365			
Phe	Met	Gln	Leu	Val	Arg	Gln	Glu	Leu	Gln	Ala	Lys	Leu	Gly	Asp	Lys
	370					375					380				
Val	Lys	Asp	Leu	Ser	Gly	Val	Lys	Ile	Phe	Thr	Thr	Phe	Asp	Ser	Val
385					390					395					400
Ala	Gln	Asp	Ala	Ala	Glu	Lys	Ala	Ala	Val	Glu	Gly	Ile	Pro	Ala	Leu
				405					410					415	
Lys	Lys	Gln	Arg	Lys	Leu	Ser	Asp	Leu	Glu	Thr	Ala	Ile	Val	Val	Val
		420						425					430		
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Glu	Val	Arg	Ala	Met	Val	Gly	Gly	Ser	Glu	Pro
	435						440					445			
Gln	Phe	Ala	Gly	Tyr	Asn	Arg	Ala	Met	Gln	Ala	Arg	Arg	Ser	Ile	Gly
	450					455					460				
Ser	Leu	Ala	Lys	Pro	Ala	Thr	Tyr	Leu	Thr	Ala	Leu	Ser	Gln	Pro	Lys
465					470					475					480
Ile	Tyr	Arg	Leu	Asn	Thr	Trp	Ile	Ala	Asp	Ala	Pro	Ile	Ala	Leu	Arg
				485					490					495	
Gln	Pro	Asn	Gly	Gln	Val	Trp	Ser	Pro	Gln	Asn	Asp	Asp	Arg	Arg	Tyr
		500						505					510		
Ser	Glu	Ser	Gly	Arg	Val	Met	Leu	Val	Asp	Ala	Leu	Thr	Arg	Ser	Met
	515						520					525			
Asn	Val	Pro	Thr	Val	Asn	Leu	Gly	Met	Ala	Leu	Gly	Leu	Pro	Ala	Val
	530					535					540				
Thr	Glu	Thr	Trp	Ile	Lys	Leu	Gly	Val	Pro	Lys	Asp	Gln	Leu	His	Pro
545					550					555					560
Val	Pro	Ala	Met	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Asn	Leu	Thr	Pro	Ile	Glu	Val
				565					570					575	
Ala	Gln	Ala	Phe	Gln	Thr	Ile	Ala	Ser	Gly	Gly	Asn	Arg	Ala	Pro	Leu
			580					585					590		
Ser	Ala	Leu	Arg	Ser	Val	Ile	Ala	Glu	Asp	Gly	Lys	Val	Leu	Tyr	Gln
	595						600					605			
Ser	Phe	Pro	Gln	Ala	Glu	Arg	Ala	Val	Pro	Ala	Gln	Ala	Ala	Tyr	Leu
	610					615					620				
Thr	Leu	Trp	Thr	Met	Gln	Gln	Val	Val	Gln	Arg	Gly	Thr	Gly	Arg	Gln
625					630					635					640
Leu	Gly	Ala	Lys	Tyr	Pro	Asn	Leu	His	Leu	Ala	Gly	Lys	Thr	Gly	Thr
				645					650					655	
Thr	Asn	Asn	Asn	Val	Asp	Thr	Trp	Phe	Ala	Gly	Ile	Asp	Gly	Ser	Thr
			660					665					670		
Val	Thr	Ile	Thr	Trp	Val	Gly	Arg	Asp	Asn	Asn	Gln	Pro	Thr	Lys	Leu
		675					680					685			

Tyr	Gly	Ala	Ser	Gly	Ala	Met	Ser	Ile	Tyr	Gln	Arg	Tyr	Leu	Ala	Asn
690						695					700				
Gln	Thr	Pro	Thr	Pro	Leu	Asn	Leu	Val	Pro	Pro	Glu	Asp	Ile	Ala	Asp
705					710					715					720
Met	Gly	Val	Asp	Tyr	Asp	Gly	Asn	Phe	Val	Cys	Ser	Gly	Gly	Met	Arg
				725					730					735	
Ile	Leu	Pro	Val	Trp	Thr	Ser	Asp	Pro	Gln	Ser	Leu	Cys	Gln	Gln	Ser
			740					745					750		
Glu	Met	Gln	Gln	Gln	Pro	Ser	Gly	Asn	Pro	Phe	Asp	Gln	Ser	Ser	Gln
		755					760					765			
Pro	Gln	Gln	Gln	Pro	Gln	Gln	Gln	Pro	Ala	Gln	Gln	Glu	Gln	Lys	Asp
	770					775						780			
Ser	Asp	Gly	Val	Ala	Gly	Trp	Ile	Lys	Asp	Met	Phe	Gly	Ser	Asn	
785					790					795					