



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 1990/05/11
 (87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 1990/11/15
 (45) Date de délivrance/Issue Date: 2003/07/22
 (85) Entrée phase nationale/National Entry: 1991/01/11
 (86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 1990/000337
 (87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 1990/013312
 (30) Priorité/Priority: 1989/05/12 (89 06321) FR

(51) Cl.Int.⁵/Int.Cl.⁵ A61K 39/10, A61K 38/51
 (72) Inventeur/Inventor:
 GUIZO-MACLOUF, NICOLE, FR
 (73) Propriétaire/Owner:
 INSTITUT PASTEUR, FR
 (74) Agent: GOUDREAU GAGE DUBUC

(54) Titre : UTILISATION DE PREPARATIONS VACCINANTES A BASE D'ADENYL CYCLASE OU DE BACTERIES LES
 PRODUISANT EN TANT QU'ANTIGENES PROTECTEURS CONTRE LES EFFETS DES BORDETELLA
 (54) Title: USE OF VACCINE PREPARATIONS CONTAINING ADENYL CYCLASE OR ADENYL CYCLASE
 PRODUCING BACTERIA AS PROTECTING ANTIGENS AGAINST BORDETELLA EFFECTS

(57) **Abrégé/Abstract:**

L'invention se rapporte à l'utilisation d'une préparation vaccinnante bactérienne élaborée à partir d'une bactérie donnée du genre Bordetella, pour la préparation d'un antigène protecteur pour l'homme ou l'animal contre les infections et les effets toxiques causés par une bactérie du genre Bordetella mais différente de celle de la préparation vaccinnante.



P R E C I S

L'invention se rapporte à l'utilisation d'une préparation vaccinnante bactérienne élaborée à partir d'une bactérie donnée du genre Bordetella, pour la préparation d'un antigène protecteur pour l'homme ou l'animal contre les infections et les effets toxiques causés par une bactérie du genre Bordetella mais différente de celle de la préparation vaccinnante.

2033085

1

UTILISATION D'ADENYL CYCLASE OU DE BACTERIES
LE PRODUISANT, COMME VACCINS CONTRE
BORDETELLA.

5

L'invention concerne des vaccins capables de protéger l'homme ou l'animal contre les infections létales provoquées par les Bordetella. Elle vise en particulier l'utilisation de préparations vaccinales élaborées à partir de Bordetella ou plus particulièrement d'adényl cyclase produite par ces bactéries en tant qu'antigènes protecteurs contre les effets toxiques des infections dues aux Bordetella.

On sait que les Bordetella, plus particulièrement Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis et Bordetella bronchiseptica, sont responsables de pathologies respiratoires chez les vertébrés.

Ainsi, chez l'homme, B.pertussis est responsable de la coqueluche, maladie infantile très répandue à travers le monde.

La vaccination contre la coqueluche est à ce jour le plus généralement réalisée à l'aide de bactéries entières inactivées.

Cependant, ces vaccins ne sont pas toujours dépourvus de toxicité étant donné que les facteurs de virulence sont constitués par les protéines sécrétées par les bactéries et non par ces bactéries elles-mêmes. Les protéines, même après la mort des bactéries, peuvent donc exercer des effets pathologiques graves.

Parmi les déterminants de virulence de B.pertussis, on citera les adhésines tels les agglutinogènes (AGG), l'hémagglutinine filamenteuse (FHA) et la toxine de pertussis (PTx), une toxine cytotrachéale (TCT), une toxine dermonécrotique (DNT) et une adényl cyclase-hémolysine (AC). Cette dernière est synthétisée sous

forme d'un large précurseur de 1706 résidus. La partie aminoterminal de la molécule porte l'activité adényl cyclase et la partie carboxyterminale présente une forte
5 homologie avec le produit du gène Hly d'E.coli (hémolysine). Cette adényl cyclase a la propriété d'être activée par la calmoduline.

La recherche de méthodes de prévention mieux adaptées a conduit les inventeurs à étudier le rôle de
10 chacun des déterminants de virulence et à mettre au point un modèle d'infection expérimental mimant le processus de la maladie naturelle.

Ces travaux ont permis de constater le rôle de l'adényl cyclase en tant que cytotoxine et en tant
15 qu'antigène protecteur et à développer une nouvelle utilisation des préparations vaccinales à base d'adényl cyclase ou de préparations bactériennes produisant de l'adényl cyclase.

L'invention concerne plus spécialement l'utilisation
20 d'une préparation vaccinale bactérienne élaborée à partir d'une bactérie donnée du genre Bordetella, cette utilisation étant caractérisée en ce qu'elle est mise en oeuvre pour protéger l'homme ou l'animal contre les infections et les effets toxiques causés par une bactérie
25 du genre Bordetella mais différente de celle de la préparation vaccinale.

Selon un autre aspect, l'invention vise également l'utilisation d'une préparation vaccinale élaborée à partir d'une adényl cyclase d'une bactérie donnée du
30 genre Bordetella, pour protéger l'homme ou l'animal contre les infections et les effets toxiques causés par une bactérie du genre Bordetella différente de celle dont provient l'adényl cyclase.

Les bactéries du genre Bordetella sont choisies
35 parmi B.pertussis, B.parapertussis, et B.bronchiseptica.

Dans un mode préféré de réalisation de l'invention, la préparation vaccinnante est élaborée à partir de B.bronchiseptica ou d'adényl cyclase de B.bronchiseptica et est mise en oeuvre pour protéger contre les infections et les effets toxiques causés par B.pertussis ou B.parapertussis.

On notera que cette protection croisée obtenue à partir de souches de B.bronchiseptica présente l'avantage d'utiliser des souches à croissance plus rapide que B.pertussis ou B.parapertussis pour élaborer des vaccins contre les infections provoquées par B.pertussis ou B.parapertussis.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la préparation vaccinnante est élaborée à partir de B.pertussis ou d'adényl cyclase de B.pertussis et est mise en oeuvre pour protéger contre les infections et les effets toxiques causés par B.bronchiseptica ou B.parapertussis.

Selon encore un autre mode de réalisation de l'invention, la préparation vaccinnante utilisée est élaborée à partir de B.parapertussis ou d'adényl cyclase de B.parapertussis et est mise en oeuvre pour protéger contre les infections et les effets toxiques causés par B.pertussis ou B.bronchiseptica.

Selon encore un autre mode de réalisation de l'invention, la préparation vaccinnante utilisée est élaborée à partir de B.parapertussis ou d'adényl cyclase de B.parapertussis et est mise en oeuvre pour protéger contre les infections et les effets toxiques causés par B.pertussis ou B.bronchiseptica.

L'adényl cyclase des Bordetella à laquelle il est fait référence ci-dessus est une adényl cyclase telle qu'obtenue par mise en contact d'un surnageant d'une

2033085

4

culture bactérienne de Bordetella avec un gel Affigel-calmoduline®.

Il s'agit plus spécialement d'une préparation
5 d'adényl cyclase telles que décrites dans la demande FR 2606789 déposée le 17.11.86.

On rappelle que ces préparations sont caractérisées en ce qu'elles possèdent une pureté élevée et sont pratiquement totalement dépourvues de produits
10 contaminants bactériens, notamment de pertussis toxines, de lipopolysaccharide (ou LPS) et d'hémagglutinine filamenteuse (ou FHA).

L'adényl cyclase de ces préparations se présente sous une forme homogène sédimentant sur un gradient de
15 densité en saccharose avec un coefficient S égal à 3,6. Elle existe sous deux formes moléculaires de 45 et 43 kDa respectivement, structurellement apparentées.

De telles préparations d'adényl cyclase possèdent une activité pouvant atteindre et même dépasser 1600
20 $\mu\text{mole de CAMP min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

Ces préparations peuvent être élaborées à partir de cultures de bactéries exprimant l'AC (adényl cyclase), plus spécialement de bactéries pathogènes dont l'AC est capable d'interférer avec l'AC des cellules eucaryotes,
25 par mise en contact d'un surnageant préalablement concentré de cultures de bactéries exprimant l'adénylate cyclase, ou d'un extrait de ces bactéries avec de la calmoduline.

Pour obtenir l'enzyme sous forme libre, on utilise
30 de la calmoduline fixée à un support, puis on récupère l'enzyme adsorbée à l'aide d'un agent dénaturant qui est à son tour éliminé, et on recueille la préparation avec l'enzyme libre.

Le support est plus spécialement constitué par un
35 matériau inerte vis-à-vis de la préparation renfermant

2033085

5

l'enzyme, et capable de retenir les molécules de poids moléculaire élevé, tel qu'un gel ou un matériau filtrant.

5 Le matériau filtrant est avantageusement en nitrocellulose ou en une matière plastique et présente une porosité de 0,45-0,22 μm .

L'agent dénaturant est de préférence de l'urée, de préférence 4 à 8,8 M.

10 Le surnageant concentré de la culture bactérienne est obtenu en soumettant un surnageant de cultures bactériennes exprimant l'AC, à une ou plusieurs opérations de filtrations, à l'aide de filtres de nitrocellulose ou de matière plastique de porosité
15 avantageusement de 0,45 à 0,22 μm , puis, en incubant les filtres avec un agent détergent afin de libérer l'AC et en éliminant de la préparation d'AC les matériaux insolubles présents.

L'agent détergent est par exemple du Triton® ou du
20 NP40®.

L'extrait bactérien est obtenu par traitement des cellules bactériennes exprimant l'adénylate cyclase avec de l'urée et récupération du surnageant.

25 En variante, on utilise une adényl cyclase telle qu'exprimée par la séquence nucléotidique donnée sur la figure unique avec en correspondance la séquence d'acides aminés.

30 Il va de soi que les bases de la séquence nucléotidique considérée peuvent être dans un ordre différent de celui trouvé dans les gènes et/ou que ces bases peuvent être, le cas échéant, substituées dès lors qu'une sonde élaborée à partir d'une telle séquence donne une réponse caractéristique et non équivoque quant à la capacité de reconnaître la présence d'un gène codant pour
35 une protéine à activité adénylate cyclase.

2033085

6

Toute séquence nucléotidique hybridable avec celle de l'enchaînement de cette séquence telle qu'obtenue par transcription enzymatique inverse de l'ARN correspondant
5 ou encore par synthèse chimique entre également dans le cadre de l'invention.

Les préparations vaccinales utilisées ci-dessus, peuvent être associées avec de la FHA et/ou de la PTx dans le même inoculum ou non.

10 Dans ce dernier cas, la FHA est administrée en même temps que la préparation vaccinale ou à un temps différent. Les préparations de FHA sont avantageusement obtenues selon, par exemple, la méthode de SATO et al dans Infect. Immun, 1983, 41, 310-320 ou celle d'IMAIZUMI
15 et al dans Journal of Microbiol. Methods, 2, 334-347 (1984).

Selon un autre aspect, l'invention vise en tant que vaccins capables d'induire une protection contre les effets toxiques et les infections causées par les
20 Bordetella, des vaccins moléculaires renfermant au moins la partie active de la séquence d'acides aminés représentée sur la figure unique, le cas échéant associée, dans le même inoculum ou non, à de la FHA et/ou de la PTx.

25 Ces vaccins sont avantageusement utilisés conformément à l'invention pour effectuer des protections croisées.

Dans la mise en oeuvre de l'invention, les préparations vaccinales à base de bactéries ou d'adényl
30 cyclase produite par ces bactéries, avantageusement purifiée, ainsi que les vaccins élaborés à partir d'adényl cyclase recombinante sont utilisés aux doses et sous les formes d'administration habituelle, en particulier sous les formes classiques administrables par
35 voie intranasale, orale ou parentérale.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans la description des exemples qui suivent et en se reportant à la figure unique qui
5 représente la séquence de nucléotide de la partie active du gène de B.pertussis codant pour l'adényl cyclase et la séquence correspondante d'acides aminés.

Le modèle d'infection respiratoire utilisé dans les essais rapportés dans les exemples est un modèle
10 d'infection par voie intranasale. La sélection in vivo à partir d'un poumon de souris infectée par B.pertussis d'un dérivé hyperpathogène de la souche virulente de B.pertussis 18323S (souche de référence internationale pour les épreuves d'évaluation des vaccins), a permis
15 d'observer chez la souris adulte, après injection des bactéries, par voie intranasale, une alvéolite oedémateuse hémorragique aiguë (AOHA), létale en 48-72h.

Les analyses des produits des exemples sont effectuées comme suit.

20 L'activité de l'AC est mesurée selon la méthode de White A.A. dans *Methods Enzymol.*, 38C, 41-46, 1974, telle que modifiée par Hanoune et al (*J. Biol. Chem.*, 252, 2039-2046, 1977).

Les activités de PTx et de FHA sont mesurées selon
25 la méthode de TUOMANON S. et WEISS A. dans *J. Inf. Dis.*, 152, 118-125, 1985.

EXEMPLE 1 : CULTURE DE B.BRONCHISEPTICA ET OBTENTION D'UN SURNAGEANT A CONCENTRATION ELEVEE EN ADENYLATE CYCLASE

30 On effectue une préculture de B.bronchiseptica 9.73, phase I et d'un variant avirulent, phase IV, spontanément, stable de cette souche, pendant 48 heures à 36°C, sur un milieu d'agar modifié Stainer-Scholte supplémenté avec de la cyclodextrine (selon IMAIZUIMI et
35 al dans *J. Chim. Microbiol.*, 17, 781-786, 1983). On

2033085

8

transfère ensuite la préculture dans un milieu liquide modifié de Stainer-Scholte sans cyclodextrine. La souche de B.bronchiseptica 9.73 a été isolée à partir des nasaux d'un lièvre.

Les cultures liquides sont soumises à agitation à 150 t/min. pendant 15 heures à 36°C, dans un erlenmeyer de 1 litre contenant 250 ml de milieu. On poursuit la culture jusqu'à l'obtention d'une densité optique $DO_{650} = 1,2 \pm 0,2$. Les bactéries sont alors éliminées par centrifugation à 5000 x g durant 25 min.

Les surnageants de culture sont conservés à -30°C jusqu'à utilisation ou concentrés directement.

Aux fins de concentration, on filtre, sur des filtres de type Millipore^R HAWP de 0,45 μm , 3 litres de surnageant de culture contenant environ 10 μg de protéines et 0,1 unité d'enzyme par ml. On retient ainsi plus de 90% de l'activité enzymatique sur les filtres. 80% environ de cette activité peuvent être récupérés par incubation des filtres dans 40 ml d'un tampon A constitué par du Tris.HCL, 50 mM, pH 8 contenant 6 mM de MgCl_2 et 0,1% de Triton X.100^R. Le matériau insoluble est éliminé par centrifugation durant 30 min. à 15000 x g à 4°C. L'activité spécifique du surnageant de culture concentré est de 115 unités par milligramme de protéine.

Une suspension bactérienne de la souche 9.73 a été injectée par voie intranasale à une souris ; 48 heures après les poumons ont été prélevés et broyés et un clone hémolytique isolé, à savoir le clone 9.73S. Ce clone a été déposé le 12 mai 1989 à la CNCM sous le n° I-858. Ce clone est hémolytique, et synthétise de grandes quantités d'adényl cyclase. Une suspension bactérienne de ce clone provoque un oedème hémorragique au niveau du poumon chez la souris.

2033085

9

EXEMPLE 2 : PROCEDURE D'OBTENTION D'ADENYL CYCLASE
EXTRACYTOPLASMIQUE PURIFIEE SOUS FORME LIBRE

On ajoute 40 ml de surnageant de culture concentré à
5 0,8 à 1 ml d'Affigel-calmoduline^R et on agite lentement
le mélange à 4°C pendant 18 heures. Plus des 2/3 de
l'activité enzymatique sont retenus sur le gel.

On fait sédimenter l'Affigel-calmoduline par
centrifugation à 300 x g pendant 1 minute, on lave à
10 plusieurs reprises avec NaCl 0,5 M dans le tampon A. On
récupère l'adényl cyclase à partir du gel à l'aide de 2,5
ml d'urée 8,8 M dans le tampon A. On élimine l'urée par
filtration sur une colonne de Séphadex G-25^R, équilibrée
avec le tampon A.

15 Cette préparation enzymatique possède une activité
spécifique de 1100 unités/mg de protéine.

On peut la conserver à -80°C sans perte d'activité
sur plusieurs semaines.

EXEMPLE 3 : PROCEDURE D'OBTENTION D'ADENYL CYCLASE
20 PURIFIEE A PARTIR D'EXTRAITS BACTERIENS

On soumet une culture de bactéries exprimant de l'AC
activable par de la calmoduline à un traitement avec de
l'urée 8M durant environ 2 heures à température ambiante.
On récupère le surnageant qui constitue l'extrait
25 bactérien et on le met en contact avec le gel Affigel-
calmoduline dans les conditions rapportées ci-dessus.

On obtient une préparation enzymatique de pureté
élevée présentant sensiblement la même activité
spécifique.

30 EXEMPLE 4 : ETUDE DE LA SECRETION DE AC, de PTx et de
FHA, ET DE LA DL50 DE SOUCHES DE BORDETELLA

Dans le tableau 1 ci-après, on indique les résultats
obtenus en dosant les facteurs de virulence AC, PTx et
FHA et en mesurant la DL50 (dose tuant 50% des souris
35 dans un lot) de différentes souches de Bordetella.

2033085

10

Il s'agit de souches de B.pertussis (BP),
B.parapertussis (BPP) et B.bronchiseptica (BB)
 correspondant soit aux souches hyperpathogènes, qui
 5 secrètent de grandes quantités d'adényl cyclase (ces
 souches portent la référence S dans le tableau), soit aux
 souches parentales des souches hyperpathogènes.

TABLEAU 1

10

	AC	PTx	FHA	DL50	
	BP18323	20	1	2	$3 \cdot 10^8$
	BP18323S	180	4	2	10^7
15	BP8144	2	(+)		
	BP8144S	6	(+)		
	BP8132	1	(+)	32	$3,2 \cdot 10^8$
20	BP8132S	3	(+)	32	$<1,2 \cdot 10^8$

	BPP632	8	-	64	$2 \cdot 10^8$
	BPP632S	35	-	64	$<10^8$

25	BB973S	110	-	16	$4 \cdot 10^6$

30

35

2033085

11

Ces résultats mettent en évidence la production élevée d'adényl cyclase par des souches hyperpathogènes, plus spécialement par B.bronchiseptica 973S et
5 B.pertussis 18323S.

La sécrétion de la PTx est également augmentée chez les dérivés hyperpathogènes comme le montrent les résultats relatifs à B.pertussis alors que la sécrétion de la FHA reste la même chez les deux souches.

10 B.bronchiseptica et B.parapertussis, qui synthétisent les mêmes facteurs que B.pertussis à l'exception de la PTx, induisent chez la souris une alvéolite oedémateuse hémorragique semblable à celle induite par B.pertussis. En revanche, une souche dérivée
15 de la souche virulente B.pertussis 8132, la souche B.P.348 et hébergeant un transposon Tn5 dans le gène de structure de l'AC, inactivant celui-ci, est incapable d'induire une AOHA chez la souris. Ce mutant sécrète, cependant, tous les autres facteurs de virulence, en
20 particulier la PTx.

L'ensemble de ces résultats désigne l'AC comme facteur responsable de l'alvéolite oedémateuse hémorragique chez la souris.

EXEMPLE 5 :

25 1. EXPERIENCES DE PROTECTION ACTIVE A PARTIR DE VACCINS BACTERIENS

Des expériences de protection (contre B.pertussis) ont été réalisées à l'aide de différents vaccins bactériens (généralement 3 injections sous-cutanées de
30 250µl de suspension bactérienne, contenant 10⁹ bactéries/ml, chauffées à 56°C, à une semaine d'intervalle).

On rapporte dans le tableau 2 ci-après les résultats obtenus en utilisant pour l'élaboration des vaccins
35 bactériens des souches de B.bronchispetica 9.73S ainsi

2033085

12

que des souches de B.pertussis 18323S, B.parapertussis 63.25 et B.avium (Blike Hewouet).

La souche de B.pertussis est administrée deux
5 semaines après la dernière immunisation : on injecte 50µl
par voie intranasale de 10⁸ bactéries de la souche de
B.pertussis 18323S vivantes.

	EPREUVE LETALE	
	SOUCHE INJECTEE	<u>(B.pertussis)</u>
10	0	10/10
	B.bronchiseptica	0/10
15	B.pertussis	0/10
	B.parapertussis	3/10
	B.avium	9/10

20 On constate que les souris vaccinées à l'aide de préparations de B.bronchiseptica sont totalement protégées contre une épreuve létale de B.pertussis, (protection croisée), comme celles vaccinées avec B.pertussis.

25 En revanche, les souris vaccinées avec des préparations de B.avium ne sont pas protégées, ce qui joue en faveur du rôle de l'AC dans l'induction de l'alvéolite oedémateuse hémorragique.

30 2. EXPERIENCES DE PROTECTION ACTIVE A PARTIR D'ANTIGENES PURIFIES

On utilise des antigènes purifiés.

Les préparations d'AC sont purifiées, soit à partir du surnageant de culture (70% de l'enzyme sont sécrétés par la bactérie), soit à partir des bactéries en opérant

35

avantageusement selon le procédé de la demande de brevet FR 2606789 du 17.11.86.

Des souris ont été immunisées avec différentes doses
5 d'antigène (3 injections sous-cutanées à une semaine d'intervalle, de 250 μ l d'antigène dans du tampon tris 10mM pH7 contenant 1mg/ml d'Am+++)
avant de faire l'épreuve létale de B.pertussis.

Pour l'épreuve létale, on injecte par voie
10 intranasale 50 μ l de suspension bactérienne de la souche virulente et hyperpathogène 18323S, 2 semaines après la dernière immunisation. La concentration en bactéries de la suspension est de 10⁸ dans l'essai a, 2 x 10⁸ dans l'essai b, et 10⁷ dans l'essai c.

15 Dans le tableau 3 ci-dessous, on a rapporté les résultats de protection obtenus contre une souche de B.pertussis (BP 18323S) à différentes concentrations, après injection d'AC, d'AC recombinante d'un vaccin, de PTx et de FHA.

20 L'AC recombinante est avantageusement telle que décrite dans la demande de brevet FR 2621597 du 24.7.87. Il s'agit d'un fragment correspondant au gène de structure de l'AC qui a pu être exprimé dans E.coli. Ce fragment qui porte l'activité adényl cyclase et le site
25 de fixation de la calmoduline a été purifié à homogénéité (voir figure unique).

2033085

14

	AC	AC _{rec}	VACCIN	PTx	FHA	0
	a : epreuve letale B.P.18323S 10/DL50					
5	3/200	3/150	3/10 ⁸	2/20	2/100	
	9/12	<u>1/10</u>	<u>0/40</u>	<u>9/22</u>	20/22	20/22
	b : epreuve letale B.P.18323S 20/DL50					
	3/20		3/10 ⁸			
10	5/10		<u>3/10</u>			10/10
	c : epreuve letale B.P.18323S 1/DL50					
	3/60	3/60	3/180	3/20	3/100	
15	<u>0/10</u>	<u>0/10</u>	<u>0/10</u>	<u>0/10</u>	5/10	5/10

Les résultats de létalité sont exprimés en nombre de souris mortes sur le nombre de souris totales

Les résultats obtenus montrent l'obtention d'une
 20 synthèse d'anticorps antiAC et une protection des souris,
 après immunisation avec de l'AC (trois immunisations de
 1,5 μ l d'AC). Cette protection est quasi totale lorsque
 l'épreuve létale est réalisée avec une quantité de
 bactéries égale (10^7 bactéries vivantes) ou 10 fois
 25 supérieure à la dose létale 50 (10^8 bactéries vivantes) ;
 elle est de 60% lorsque l'épreuve létale est réalisée
 avec une quantité de bactéries égale à 20 fois la dose
 létale 50 ($2 \cdot 10^8$ bactéries létales).

Une protection totale a été obtenue après
 30 immunisation de souris avec l'AC recombinante, lorsque
 l'épreuve létale est réalisée avec une quantité de
 bactéries égale à la dose létale 50. Les immunisations
 réalisées avec de la FHA n'ont pas montré d'effet
 protecteur de cette toxine malgré la présence d'anticorps
 35 chez les souris immunisées et ceci même lorsque l'épreuve

15

létale est réalisée avec une quantité faible de bactéries.

Les expériences réalisées avec la PTx montre une protection partielle après deux immunisations avec 2 μ g de PTx lorsque l'épreuve létale est 10 fois supérieure à la dose létale 50 mais il faut préciser que, dans ce cas, la synthèse d'anticorps antiPTx est très faible. Lorsque les souris sont immunisées avec 3 fois 2 μ g de PTx, la synthèse d'anticorps est plus importante et nous obtenons une protection totale lorsque l'épreuve létale est réalisée avec une quantité de bactéries égale à la dose létale 50.

D'après l'ensemble de ces résultats, l'adényl cyclase constitue la cytotoxine responsable de l'alvéolite oedémateuse hémorragique observée chez la souris infectée par B.pertussis et constitue un antigène protecteur contre ces lésions. La PTx et la FHA ne joueraient aucun rôle dans l'induction de cette AOHA mais pourraient être des antigènes protecteurs de ces lésions en inhibant l'adhésion des bactéries sur l'épithélium respiratoire.

25

30

35

REVENDEICATIONS

1. Utilisation pour l'obtention d'un médicament destiné à conférer chez l'homme ou chez l'animal, une protection contre les infections et les effets toxiques causés par une bactérie d'une première espèce du genre *Bordetella*, d'une adényl cyclase d'une bactérie donnée d'une seconde espèce du genre *Bordetella*, lesdites première et seconde espèces du genre *Bordetella* étant différentes et appartenant aux espèces *Bordetella pertussis*, ou *Bordetella bronchiseptica*.
2. Utilisation pour l'obtention d'un médicament destiné à conférer chez l'homme ou chez l'animal, une protection contre les infections et les effets toxiques causés par une bactérie d'une première espèce du genre *Bordetella*, d'une adényl cyclase d'une bactérie donnée d'une seconde espèce du genre *Bordetella*, lesdites première et seconde espèces du genre *Bordetella* étant différentes et appartenant aux espèces *Bordetella parapertussis*, ou *Bordetella bronchiseptica*.
3. Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que l'adényl cyclase est telle qu'obtenue par mise en contact du surnageant d'une culture bactérienne avec un gel Affigel Calmoduline®.
4. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'adényl cyclase provient de *Bordetella bronchiseptica*, le médicament conférant une protection croisée contre les infections et les effets toxiques causés par une bactérie *Bordetella pertussis*.
5. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'adényl cyclase provient de *Bordetella bronchiseptica* souche 9.73 (CNCM I-858).
6. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'adényl cyclase provient d'une bactérie *Bordetella pertussis*, le médicament conférant une

protection croisée contre les infections et les effets toxiques causés par *Bordetella bronchiseptica*.

7. Utilisation selon revendication 1, caractérisée en ce que l'adényl cyclase comporte au moins la partie active de la séquence d'acides aminés représentée sur la figure ou le fragment Gly³⁶¹-Ser⁶⁸⁹ sur la figure.
8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que l'adényl cyclase est associée dans le même inoculum avec de la FHA.
9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que l'adényl cyclase est associée dans le même inoculum avec de la PTx.
10. *Bordetella bronchiseptica* souche 9.73 (CNCM I-858).

1a

GAAGCCTTGTTCTTCTTTTCATTAGAAAGAAATATGCGCTTTGTGTTTAGGATGATTTTC
 -200
 CTGTCCGAGTAGGGTGGATCCAAATTTCCGGATTGGTGGGAATTTGTGCATTTTCACTG

 CGAATGTTGGAATAATTTGCCCCATCGTCATACGACATGCTGGATGTTTGGTTCTTGCAG
 -100
 AAGGATGAGGTTCTGAGCGCTACACACCGGTTGCGTCGGTGC GAATCCGTTCAATCGACT

 MetGlnGlnSerHisGlnAlaGlyTyrAlaAsnAlaAlaAsp
 ACTTATCGACAGATCCACATGCAGCAATCGCATCAGGCTGGTTACGCAAACGCCGCCGAC
 0
 ArgGluSerGlyIleProAlaAlaValLeuAspGlyIleLysAlaValAlaLysGluLys
 CGGGAGTCTGGCATCCCCGCAGCCGTACTCGATGGCATCAAGGCCGTGGCGAAGGAAAA
 100
 AsnAlaThrLeuMetPheArgLeuValAsnProHisSerThrSerLeuIleAlaGluGly
 AACGCCACATTGATGTTCCGCCTGGTCAACCCCCATTCCACCAGCCTGATTGCCGAAGGG

 ValAlaThrLysGlyLeuGlyValHisAlaLysSerSerAspTrpGlyLeuGlnAlaGly
 GTGGCCACCAAAGGATTGGGCGTGCACGCCAAGTCGTCCGATTGGGGGTTGCAGGCGGGC
 200
 TyrIleProValAsnProAsnLeuSerLysLeuPheGlyArgAlaProGluValIleAla
 TACATTCCCGTCAACCCGAATCTTCCAAACTGTTCGGCCGTGCGCCCGAGGTGATCGCG

Soudreau, Hage, Dubois & Martineau Walker

1b

ArgAlaAspAsnAspValAsnSerSerLeuAlaHisGlyHisThrAlaValAspLeuThr
CGGGCCGACAACGACGTCAACAGCAGCCTGGCGCATGGCCATACCGCGGTTCGACCTGACG

300

LeuSerLysGluArgLeuAspTyrLeuArgGlnAlaGlyLeuValThrGlyMetAlaAsp
CTGTCGAAAGAGCGGCTTGACTATCTGCGGCAAGCGGGCCTGGTCACCGGCATGGCCGAT

400

GlyValValAlaSerAsnHisAlaGlyTyrGluGlnPheGluPheArgValLysGluThr
GGCGTGGTCGCGAGCAACCACGCAGGCTACGAGCAGTTCGAGTTTCGCGTGAAGGAAACC

SerAspGlyArgTyrAlaValGlnTyrArgArgLysGlyGlyAspAspPheGluAlaVal
TCGGACGGGCGCTATGCCGTGCAGTATCGCCGCAAGGGCGGCGACGATTCGAGGCGGTC

500

LysValIleGlyAsnAlaAlaGlyIleProLeuThrAlaAspIleAspMetPheAlaIle
AAGGTGATCGGCAATGCCGCCGGTATTCCACTGACGGCGGATATCGACATGTTCCGCCATT

MetProHisLeuSerAsnPheArgAspSerAlaArgSerSerValThrSerGlyAspSer
ATGCCGCATCTGTCCAACCTCCGCGACTCGGGCGCGCAGTTCGGTGACCAGCGGCGATTTCG

600

ValThrAspTyrLeuAlaArgThrArgArgAlaAlaSerGluAlaThrGlyGlyLeuAsp
GTGACCGATTACCTGGCGCGCACGCGGCGGGCCGCCAGCGAGGCCACGGGCGGCCTGGAT

700

ArgGluArgIleAspLeuLeuTrpLysIleAlaArgAlaGlyAlaArgSerAlaValGly
CGCGAACGCATCGACTTGTTGTGAAAATCGCTCGCGCCGGCGCCCGTTCCGCAGTGGGC

Judreau Sage Dubuc & Myriam Walker

2033085

3/12

1c

ThrGluAlaArgArgGlnPheArgTyrAspGlyAspMetAsnIleGlyValIleThrAsp
ACCGAGGCGCGTCGCCAGTTCCGCTACGACGGCGACATGAATATCGGCGTGATCACCGAT

800

PheGluLeuGluValArgAsnAlaLeuAsnArgArgAlaHisAlaValGlyAlaGlnAsp
TTCGAGCTGGAAGTGCGCAATGCGCTGAACAGGCGGGCGCACGCCGTCGGCGCGCAGGAC

ValValGlnHisGlyThrGluGlnAsnAsnProPheProGluAlaAspGluLysIlePhe
GTGGTCCAGCATGGCACTGAGCAGAACAATCCTTTCCCGGAGGCAGATGAGAAGATTTTC

900

ValValSerAlaThrGlyGluSerGlnMetLeuThrArgGlyGlnLeuLysGluTyrIle
GTCGTATCGGCCACCGGTGAAAGCCAGATGCTCACGCGCGGGCAACTGAAGGAATACATT

1000

GlyGlnGlnArgGlyGluGlyTyrValPheTyrGluAsnArgAlaTyrGlyValAlaGly
GGCCAGCAGCGCGGCGAGGGCTATGTCTTCTACGAGAACCGTGCATACGGCGTGCGGGG

LysSerLeuPheAspAspGlyLeuGlyAlaAlaProGlyValProSerGlyArgSerLys
AAAAGCCTGTTCGACGATGGGCTGGGAGCCGCGCCCGGCGTGCCGAGCGGACGTTCTGAAG

1100

PheSerProAspValLeuGluThrValProAlaSerProGlyLeuArgArgProSerLeu
TTCTCGCCGGATGTACTGGAAACGGTGCCGGCGTCACCCGGATTGCGGCGGCCGTCGCTG

GlyAlaValGluArgGlnAspSerGlyTyrAspSerLeuAspGlyValGlySerArgSer
GGCGCAGTGGAACGCCAGGATTCCGGCTATGACAGCCTTGATGGGGTGGGATCGCGATCG

1200

Judreau Sage Dubuc & Marion Walker

Id

PheSerLeuGlyGluValSerAspMetAlaAlaValGluAlaAlaGluLeuGluMetThr
TTCTCGTTGGGCGAGGTGTCCGACATGGCCGCCGTGGAAGCGGCGGAACTGGAAATGACC

1300

ArgGlnValLeuHisAlaGlyAlaArgGlnAspAspAlaGluProGlyValSerGlyAla
CGGCAAGTCTTGCACGCCGGGGCGCGGCAGGACGATGCCGAGCCGGGCGTGAGCGGTGCG

SerAlaHisTrpGlyGlnArgAlaLeuGlnGlyAlaGlnAlaValAlaAlaAlaGlnArg
TCGGCGCACTGGGGGCAGCGGGCGCTGCAGGGCGCCAGGCGGTGGCGGCGGCGCAGCGG

1400

LeuValHisAlaIleAlaLeuMetThrGlnPheGlyArgAlaGlySerThrAsnThrPro
CTGGTTCATGCCATTGCCCTGATGACGCAATTCGGCCGGGCCGGTTCACCAACACGCCG

GlnGluAlaAlaSerLeuSerAlaAlaValPheGlyLeuGlyGluAlaSerSerAlaVal
CAGGAAGCGGCCTCGTTGTCGGCGGCCGTGTTTCGGCTTGGGCGAGGCCAGCAGCGCCGTG

1500

AlaGluThrValSerGlyPhePheArgGlySerSerArgTrpAlaGlyGlyPheGlyVal
GCCGAAACCGTGAGCGGTTTTTCCGCGGGTCTTCGCGCTGGGCGGCGGTTTCGGCGTG

1600

AlaGlyGlyAlaMetAlaLeuGlyGlyIleAlaAlaAlaValGlyAlaGlyMet Ser
GCTGGCGGCGCGATGGCGCTGGGAGGCGGCATCGCCGCGGCCGTTGGCGCCGGGATGTCC

LeuThrAspAspAlaProAlaGlyGlnLysAlaAlaAlaGlyAlaGluIleAlaLeuGln
TTGACCGATGACGCGCCGGCCGACAGAAGGCCGCCGCGCCGCGCCGAGATCGCGCTGCAG

1700

Judreaa Sage Dubuc & Marianne Walker

5/12

2033085

le

LeuThrGlyGlyThrValGluLEuAlaSerSerIleAlaLeuAlaLeuAlaAlaAlaArg
 TTGACAGGTGGAACGGTTCGAGCTGGCTTCTTCCATCGCGTTGGCGCTGGCCCGGGCGCGC

GlyValThrSerGlyLeuGlnValAlaGlyAlaSerAlaGlyAlaAlaAlaGlyAlaLeu
 GGCGTGACCAGCGGCTTGCAGGTGGCCGGGGCGTCGGCCGGGGCGGCTGCCGGCGCATTG

1800

AlaAlaAlaLeuSerProMetGluIleTyrGlyLkuValGlnGlnSerHisTyrAlaAsp
 GCCGCGGCGCTCAGTCCCATGGAGATCTACGGCCTGGTGCAGCAATCGCACTATGCCGAT

1900

GlnLeuAspLysLeuAlaGlnGluSerSerAlaTyrGlyTyrGluGlyAspAlaLeuLeu
 CAGCTGGACAAGCTGGCGCAGGAATCGAGCGCATACGGTTACGAGGGCGACGCCTTGCTG

AlaGlnLeuTyrArgAspLysThrAlaAlaGluGlyAlaValAlaGlyValSerAlaVal
 GCCCAGCTGTATCGCGACAAGACGGCCGCCGAGGGCGCCGTCGCCGGCGTCTCCGCCGTC

2000

LeuSerThrValGlyAlaAlaValSerIleAlaAlaAlaAlaSerValValGlyAlaPro
 CTGAGCACGGTGGGGGCGGCGGTGTCGATCGCCGCGGCGGCCAGCGTGGTAGGGGCCCCG

ValAlaValValThrSerLeuLeuThrGlyAlaLeuAsnGlyIleLeuArgGlyValGln
 GTGGCGGTGGTCACTTCCTTGCTGACCGGGGCTCTCAACGGCATCCTGCGCGGCGTGACG

2100

GlnProIleIleIluLysLeuAlaAsnAspTyrAlaArgLysIleAspGluLeuGlyGly
 CAGCCCATCATCGAAAAGCTGGCCAACGATTACGCTCGCAAGATCGACGAGCTGGGCGGG

2200

Sudran Jaya Dubua & Yvonne Walker

6/12

2033085

1 f

ProGlnAlaTyrPheGluLysAsnLeuGlnAlaArgHisGluGlnLeuAlaAsnSerAsp
CCGCAAGCGTACTTCGAGAAAAACCTGCAGGCGCGTCACGAACAACCTGGCCAATTCGGAC

GlyLeuArgLysMetLeuAlaAspLeuGlnAlaGlyTrpAsnAlaSerSerValIleGly
GGCCTACGGAAAATGCTGGCCGACCTGCAGGCCGGTTGGAACGCCAGCAGCGTGATCGGG

2300

ValGlnThrThrGluIleSerLysSerAlaLuuGluLeuAlaAlaIleThrGlyAsnAla
GTGCAGACGACAGAGATCTCCAAGTCGGCGCTCGAACTGGCCGCCATTACCGGCAACGCG

AspAsnLeuLysSerValAspValPheValAspArgPheValGlnGlyGluArgValAla
GACAACCTGAAATCCGTCGACGTGTTTCGTGGACCGCTTCGTCCAGGGCGAGCGGGTGGCC

2400

GlyGlnProValValLeuAs-ValAlaAlaGlyGlyIleAspIleAlaSerArgLysGly
GGCCAGCCGGTGGTCCTCGACGTCGCCGCCGGCGGCATCGATATCGCCAGCCGCAAGGGC

2500

GluArgProAlaLeuThrPneIleThrProLeuAlaAlaProGlyGluGluGlnArgArg
GAGCGGCCGGCGCTGACGTTTCATCACGCCGCTGGCCGCGCCAGGAGAAGAGCAGCGCCGG

ArgThrLysThrGlyLysSerGluPheThrThrPheValGluIleValGlyLysGlnAsp
CGCACGAAAACGGGCAAGAGCGAATTCACCACATTCGTTCGAGATCGTGGGCAAGCAGGAC

2600

ArgTrpArgIleArgAspGlyAlaAlaAspThrThrIleAspLeuAlaLysValValSer
CGCTGGCGCATCCGGGACGGCGCGGCCGACACCACCATCGATCTGGCCAAGGTGGTGTCG

Sandra Laga Dubuc & Myriam Walker

2033085

7/12

18

GlnLeuValAspAlaAsnGlyValLeuLysHisSerIleLysLeuAspValIleGlyGly
CAACTGGTCGACGCCAATGGCGTGCTCAAGCACAGCATCAAACCTGGATGTGATCGGCGGA

2700

AspGlyAspAspValValLeuAlaAsnAlaSerArgIleHisTyrAspGlyGlyAlaGly
GATGGCGATGACGTCGTGCTTGCCAATGCTTCGCGCATCCATTATGACGGCGGCGCGGGC

2800

ThrAsnThrValSerTyrAlaAlaLeuGlyArgGlnAspSerIleThrValSerAlaAsp
ACCAACACGGTCAGCTATGCCGCCCTGGGTCGACAGGATTCCATTACCGTGTCCGCCGAC

GlyGluArgPheAsnValArgLysGlnLeuAsnAsnAlaAsnValTyrArgGluGlyVal
GGGGAACGTTTCAACGTGCGCAAGCAGTTGAACAACGCCAACGTGTATCGCGAAGGCGTG

2900

AlaThrGlnThrThrAlaTyrGlyLysArgThrGluAsnValGlnTyrArgHisValGlu
GCTACCCAGACAACCGCCTACGGCAAGCGCACGGAGAATGTCCAATACCGCCATGTCGAG

LeuAlaArgValGlyGlnValValGluValAspThrLeuGluHisValGlnHisIleIle
CTGGCCCGTGTGCGGCAAGTGGTGGAGGTCGACACGCTCGAGCATGTGCAGCACATCATC

3000

GlyGlyalaGlyAsnAspSerIleThrGlyAsnAlaHisAspAsnPheLeuAlaGlyGly
GGCGGGGCCGCAACGATTCGATCACCGGCAATGCGCAGGACAACTTCTAGCCGGCGGG

3100

SerGlyAspAspArgLeuAspGlyGlyAlaGlyAsnAspThrLeuValGlyGlyGluGly
TCGGGCGACGACAGGCTGGATGGCGGCGCCGGCAACGACACCCTGGTTGGCGGCGAGGGC

Judreau Sage Dubuc & Martine Walker

8/12

2033085

lh

GlnAsnThrValIleGlyGlyAlaGlyAspAspValPheLeuGlnAspLeuGlyValTrp
CAAACACGGTCATCGGCGGCGCCGGCGACGACGTATTCCTGCAGGACCTGGGGGTATGG

3200

SerAsnGlnLeuAspGlyGlyAlaGlyValAspThrValLysTyrAsnValHisGlnPro
AGCAACCAGCTCGATGGCGGCGCGGGCGTCGATACCGTGAAGTACAACGTGCACCAGCCT

SerGluGluArgLeuGluArgMetGlyAspThrGlyIleHisAlaAspLeuGlnLysGly
TCCGAGGAGCGCCTCGAACGCATGGGCGACACGGGCATCCATGCCGATCTTCAAAGGGC

3300

ThrValGluLysTrpProAlaLeuAsnLeuPheSerValAspHisValLysAsnIleGlu
ACGGTCGAGAAGTGGCCGGCCCTGAACCTGTTCAGCGTCGACCATGTCAAGAATATCGAG

3400

AsnLeuHisGlySerArgLeuAsnAspArgIleAlaGlyAspAspGlnAspAsnGluLeu
AATCTGCACGGCTCCCGCCTAAACGACCGCATCGCCGGCGACGACCAGGACAACGAGCTC

TrpGlyHisAspGlyAsnAspThrIleArgGlyArgGlyGlyAspAspIleLeuArgGly
TGGGGCCACGATGGCAACGACACGATACGCGGCCGGGGCGGCGACGACATCCTGCGCGGC

3500

GlyLeuGlyLeuAspThrLeuTyrGlyGluAspGlyAsnAspIlePheLeuGlnAspAsp
GGCCTGGGCCTGGACACGCTGTATGGCGAGGACGGCAACGACATGTTCTGCAGGACGAC

GluThrValSerAspAspIleAspGlyGlyAlaGlyLeuAspThrValAspTyrSerAla
GAGACCGTCAGCGATGACATCGACGGCGGCGGGGGCTGGACACCGTCGACTACTCCGCC

3600

Sudreau Sage Debus & Martine Walker

9/12

2033085

li

MetIleHisProGlyArgIleValAlaProHisGluTyrGlyPheGlyIleGluAlaAsp
 ATGATCCATCCAGGCAGGATCGTTGCGCCGCATGAATACGGCTTCGGGATCGAGGCGGAC

3700

LeuSerArgGluTrpValArgLysAlaSerAlaLeuGlyValAspTyrTyrAspAsnVal
 CTGTCCAGGGAATGGGTGCGCAAGGCGTCCGCGCTGGGCGTGGACTATTACGATAATGTC

ArgAsnValGluAsnValIleGlyThrSerMetLysAspValLeuTleGlyAspAlaGln
 CGCAATGTGAAAACGTCATCGGTACGAGCATGAAGGATGTGCTCATCGGCGACGCGCAA

3800

AlaAsnThrLeuMetGlyGlnGlyGlyAspAspThrValArgGlyGlyAspGlyAspAsp
 GCCAATACCCTGATGGGCCAGGGCGGCGACGATACCGTGCGCGGGCGGCGACGGCGATGAT

LeuLeuP xGly-lyAspGlyAsnAspMetLeuTyrGlyAspAlaGlyAsnAspThrLeu
 CTGCTGTTCGGCGGCGACGGCAACGACATGCTGTATGGCGACGCCGGCAACGACACCCTC

3900

TyrGlyGlyLeuGlyAspAspThrLeuGluGlyGlyAlaGlyAsnAspTrpPheGlyGly
 TACGGGGGGCTGGGCGACGATACCCTTGAAGGCGGCGCGGGCAACGATTTGGTTCGGCCAG

4000

ThrGlnAlaArgGluHisAspValLeuArgGlyGlyAspGlyValAspThrValAspTyr
 ACGCAGGCGCGGAGCATGACGTGCTGCGCGGCGGAGATGGGGTGGATAACCGTCGATTAC

SerGlnThrGlyAlaHisAlaGlyIleAlaAlaGlyArgIleGlyLeuGlyIleLeuAla
 AGCCAGACCGGCGCGCATGCCGGCATTGCCGCGGGTTCGCATCGGGCTGGGCATCCTGGCT

4100

Soudreau Sage Dubuc & Mestras Walker

10/12

1j

ApLeuGlyAlaGlyArgValAspLysLeuGlyGluAlaGlySerSerAlaTyrAspThr
 GACCTGGGCGCCGGCCGCGTCGACAAGCTGGGCGAGGCCGGCAGCAGCGCCTACGATACG

ValSerGlyIleGluAsnValValGlyThrGluLeuAlaAspArgIleThrGlyAspAla
 GTTCCGGTATCGAGAACGTGGTGGGCACGGAACTGGCCGACCGCATCACGGGCGATGCG

4200

GlnAlaAsnValLeuArgGlyAlaGlyGlyAlaAspValLeuAlaGlyGlyGluGlyAsp
 CAGCCAACGTGCTGCGCGGCGCGGGTGGCGCCGACGTGCTTGCGGGCGGCGAGGGCGAC

4300

AspValLeuLeuGlyGlyAspGlyAspAspGlnLeuSerGlyAspAlaGlyArgAspArg
 GATGTGCTGCTGGGCGGCGACGGCGACGACCAGCTGTGCGGGCGACGCCGGACGCGATCGC

LeuTyrGlyGluAlaGlyAspAspTrpPhePheGlnAspAlaAlaAsnAlaGlyAsnLeu
 TTGTACGGCGAAGCCGGTGACGACTGGTTCTTCCAGGATGCCGCAATGCCGGCAATCTG

4400

LeuAspGlyGlyAspGlyArgAspThrValAspPheSerGlyProGlyArgGlyLeuAsp
 CTCGACGGCGGCGACGGCCGCGATACCGTGGATTTCAGCGGCCCGGGCCGGGGCCTCGAC

AlaGlyAlaLysGlyValPheLeuSerLeuGlyLysGlyPheAlaSerLeuMetAspGlu
 GCCGGCGCAAAGGGCGTATTCCTGAGCTTGGGCAAGGGGTTCGCCAGCCTGATGGACGAA

4500

ProGluThrSerAsnValLeuArgAsnIleGluAsnAlaValGlySerAlaArgAspAsp
 CCCGAAACCAGCAACGTGTTGCGCAATATCGAGAACGCCGTGGGCAGCGCGCGTGATGAC

4600

Soudreau Serge Dubois & Justine Walker

2033085

11/12

Ik

ValLeuIleGlyAspAlaGlyAlaAsnValLeuAsnGlyLeuAlaGlyAsnAspValLeu
GTGCTGATCGGCGACGCAGGCGCCAACGTCTCAATGGCCTGGCGGGCAACGACGTGCTG

SerGlyGlyAlaGlyAspAspValLeuLeuGlyAspGlyLysSerAspLeuLeuSerGly
TCCGGCGGCGCTGGCGACGATGTGCTGCTGGGCGACGAGGGCTCGGACCTGCTCAGCGGC

4700

AspAlaGlyAsnAspAspLeuPheGlyGlyGlnGlyAspAlaThrTyrLeuPheGlyVal
GATGCGGGCAACGACGATCTGTTCGGCGGGCAGGGCGATGATACTTATCTGTTCGGGGTC

GlyTyrGlyHisAspThrIleTyrGluSerGlyGlyGlyHisAspThrIleArgIleAsn
GGGTACGGGCACGACACGATCTACGAATCGGGCGGCGGCCATGACACCATCCGCATCAAC

4800

AlaGlyAlaAspGlnLeuTrpPheAlaArgGlnGlyAsnAspLeuGluIleArgIleLeu
GCGGGGGCGGACCAGCTGTGGTTCGCGCGCCAGGGCAACGACCTGGAGATCCGCATTCTC

4900

GlyThrAspAspAlaLeuThrValHisAspTrpTyrArgAspAlaAspHisArgValGlu
GGCACCAGCATGCACTTACCGTGCACGACTGGTATCGCGACGCCGATCACCGGGTGGAA

IleIleHisAlaAlaAsnGlnAlaValAspGlnAlaGlyIleGluLysLeuValGluAla
ATCATCCATGCCGCAACCAGGCGGTAGACCAGGCAGGCATCGAAAAGCTGGTCGAGGCA

5000

MetAlaGlyTyrProAspProGlyAlaAlaAlaAlaAlaProProAlaAlaArgValPro
ATGGCGCAGTATCCGGACCCCGGCGCGGCGGGCTGCCCCGCCGGCGGCGCGGTGCCG

Sandra Page Dubuc & Patricia Walker

12/12

11

2033085

AspThrLeuMetGlnSerLeuAlaValAsnTrpArg***

GACACGCTGATGCAGTCCCTGGCTGTCAACTGGCGCTGAAGCGCCGTGAATCACGGCCCG

5100

CCTGCCTCGCGCGGGCGGCCGTCTCTTTGCGTTCTTCTCCGAGGTATTTCCCATCATGA

5200

CGTCGCCCCGCGGCGCAATGCGCCAGCGTGCCCGATTCCGGGTTGCTCTGCCTGGTCATGC

TGGCTCGCTATCACGGATTGGCAGCCGATCCCGAGCAGTTGCGGCATGAGTTCGCCGAGC

5300

AGGCATTCTGTAGCGAAACGATACAGCCTGGCGGCGCGCCGGGTCGGCCTGAAAGTGCGG

CGGCACCGACCCGCGCCGGCGCGGCTGCCACGCGCGCCGCTGCCGGCCATCGCGCTGGAC

5400

CGGCAGGGCGGCTACTTTGTT

Sudran Sage Dubuc & Martina Walker