PCT ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) **Classification internationale des brevets** 6 : **C12N 15/45, 15/31, C07K 14/135, 14/26, 14/765, A61K 39/155, 47/48**

A1

(11) **Numéro de publication internationale:** **WO 95/27787**

(43) **Date de publication internationale:** 19 octobre 1995 (19.10.95)

(21) **Numéro de la demande internationale:** PCT/FR95/00444

(22) **Date de dépôt international:** 6 avril 1995 (06.04.95)

(30) **Données relatives à la priorité:**
94/04009 6 avril 1994 (06.04.94) FR

(71) **Déposant** *(pour tous les Etats désignés sauf US)*: PIERRE FABRE MEDICAMENT [FR/FR]; 45, place Abel-Gance, F-92100 Boulogne (FR).

(72) **Inventeurs; et**
(75) **Inventeurs/Déposants** *(US seulement)*: BINZ, Hans [CH/FR]; Les Crêts, F-74160 Beaumont (FR). N'GUYEN, Ngoc, Thien [FR/FR]; 7, Les Petits Hutins, Lathoy, F-74160 Saint-Julien-en-Genevois (FR). BAUSSANT, Thierry [FR/FR]; 35, rue Jean-Jaurès, F-01200 Bellegarde (FR). TRUDEL, Michel [CA/CA]; 88, Val d'Ajol, Lorraine, Québec J6Z 3Y3 (CA).

(74) **Mandataire:** AHNER, Francis; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).

(81) **Etats désignés:** AU, CA, JP, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée
Avec rapport de recherche internationale.
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.

(54) **Title:** PEPTIDE FRAGMENT OF THE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS G PROTEIN, IMMUNOGENIC AGENT, PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING SAME, AND PREPARATION METHOD

(54) **Titre:** FRAGMENT PEPTIDIQUE DE LA PROTEINE G DU VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL, AGENT IMMUNOGENE, COMPOSITION PHARMACEUTIQUE LE CONTENANT ET PROCEDE DE PREPARATION

(57) **Abstract**

A polypeptide useful as an immunogen element and characterised in that it is carried on the peptide sequence between amino acid residues 130-230 of the G protein sequence of the human respiratory syncytial virus of sub-groups A and B, or of the bovine respiratory syncytial virus, or on a sequence at least 80 % homologous thereto. An immunogenic agent or pharmaceutical composition containing said polypeptide, and a method for preparing same, are also disclosed.

(57) **Abrégé**

La présente invention concerne un polypeptide utilisable comme élément d'immunogène, caractérisé en ce qu'il est porté par la séquence peptidique comprise entre les résidus d'acides aminés 130 et 230 de la séquence de la protéine G du virus respiratoire syncytial humain du sous-groupe A et du sous-groupe B, ou du virus respiratoire syncytial bovin, ou par une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec ladite séquence peptidique. L'invention concerne également un agent immunogène ou une composition pharmaceutique contenant le polypeptide et leur procédé de préparation.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	**GB**	Royaume-Uni	**MR**	Mauritanie
AU	Australie	**GE**	Géorgie	**MW**	Malawi
BB	Barbade	**GN**	Guinée	**NE**	Niger
BE	Belgique	**GR**	Grèce	**NL**	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	**HU**	Hongrie	**NO**	Norvège
BG	Bulgarie	**IE**	Irlande	**NZ**	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	**IT**	Italie	**PL**	Pologne
BR	Brésil	**JP**	Japon	**PT**	Portugal
BY	Bélarus	**KE**	Kenya	**RO**	Roumanie
CA	Canada	**KG**	Kirghizistan	**RU**	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	**KP**	République populaire démocratique de Corée	**SD**	Soudan
CG	Congo			**SE**	Suède
CH	Suisse	**KR**	République de Corée	**SI**	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	**KZ**	Kazakhstan	**SK**	Slovaquie
CM	Cameroun	**LI**	Liechtenstein	**SN**	Sénégal
CN	Chine	**LK**	Sri Lanka	**TD**	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	**LU**	Luxembourg	**TG**	Togo
CZ	République tchèque	**LV**	Lettonie	**TJ**	Tadjikistan
DE	Allemagne	**MC**	Monaco	**TT**	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	**MD**	République de Moldova	**UA**	Ukraine
ES	Espagne	**MG**	Madagascar	**US**	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	**ML**	Mali	**UZ**	Ouzbékistan
FR	France	**MN**	Mongolie	**VN**	Viet Nam
GA	Gabon				

FRAGMENT PEPTIDIQUE DE LA PROTEINE G DU VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL, AGENT IMMUNOGENE, COMPOSITION PHARMACEUTIQUE LE CONTENANT ET PROCEDE DE PREPARATION

La présente invention se rapporte à des polypeptides utilisables notamment dans la préparation d'immunogènes et l'obtention de vaccin contre le virus respiratoire syncytial (VRS) et à des séquences nucléotidiques permettant de les obtenir. L'invention se rapporte également à une protéine adjuvante d'immunité extraite de Klebsiella pneumoniae, à des compositions contenant les polypeptides immunogènes, éventuellement associés à une telle protéine adjuvante, ainsi qu'à leur procédé de préparation.

Le virus respiratoire syncytial (VRS) est la cause la plus fréquente de maladies respiratoires chez le nouveau-né : bronchopneumopathies (bronchiolites). L'OMS estime chaque année 50 millions de cas atteints du VRS, dont 160 000 décès dans le monde entier. Il existe deux sous groupes du virus (sous groupes A et B).

Le VRS est classé dans la famille des Paramyxoviridae, genre pneumovirus comportant un génome ARN non segmenté, de polarité négative, codant pour 10 protéines spécifiques.

Il n'existe pas actuellement de vaccin disponible, contre le VRS. Les vaccins à virus inactivé se sont montrés inefficaces et ont même parfois aggravé les infections des nourrissons. Dans les années 60, les tentatives de vaccination avec le VRS inactivé à la formaline ont conduit à l'échec : au lieu de conférer une protection lors de la réinfection due au VRS, le vaccin a eu pour effet d'aggraver la maladie chez l'enfant.

La demande WO 87/04185 a proposé d'utiliser des protéines structurales du VRS en vue d'un vaccin, comme les protéines d'enveloppe appelées protéine F (protéine de fusion) ou protéine G, une glycoprotéine de 22 Kd, une protéine de 9,5 Kd, ou la protéine majeure de capside (protéine N).

La demande WO 89/02935 décrit les propriétés de protection de la protéine F entière du VRS, éventuellement modifiées sous forme monomériques ou désacétylée.

Une série de fragments de la protéine F a été clonée en vue de rechercher leurs propriétés neutralisantes.

Toutefois les vaccins immunitaires testés à ce jour se sont montrés inefficaces ou ont induit une pathologie pulmonaire (bronchiolite ou péribronchite).

A l'heure actuelle il n'existe pas de traitement de fond des infections dues au VRS.

Les infections au VRS des voies aériennes supérieures : le traitement repose essentiellement sur les médications symptomatiques identiques à celles des autres infections virales.

Les infections au VRS des voies aériennes inférieures : le traitement chez les nourrissons repose sur le maintien d'une hydratation correcte, l'aspiration des sécrétions et l'administration d'oxygène si besoin. Un effet positif a été observé avec la ribavirine, nucléotide actif in vitro contre le VRS.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un polypeptide utile notamment dans la production d'immunogène, caractérisé en ce qu'il est porté par la séquence peptidique comprise entre les résidus d'acides aminés 130 et 230 de la séquence de la protéine G du virus respiratoire syncytial, ou par une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec ladite séquence peptidique. Cette séquence diffère légèrement pour les sous-groupes A et B du VRS humain, ou pour le VRS bovin. L'invention comprend les séquences provenant des VRS humain sous-groupe A et B, ou bovin

La protéine G est une glycoprotéine d'enveloppe du VRS, de poids moléculaire compris entre 84 et 90 Kd, pauvre en méthionine.

La Demanderesse a mis en évidence que la séquence comprise entre les acides aminés 130 et 230 de la protéine G naturelle est particulièrement appropriée pour induire une protection efficace contre l'infection par le VRS. L' invention comprend les séquences provenant des VRS humain sous-groupe A ou B, ou bovin.

Plus particulièrement la présente invention concerne des polypeptides, utiles notamment comme élément d'immunogène compris dans le précédent et qui comportent la séquence peptidique comprise entre les résidus aminoacides numérotés 174 et 187 de la protéine G du VRS (humain, sous-groupes A et B, ou bovin) ou une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec la séquence correspondante.

D'autres séquences peptidiques adaptées à la préparation d'un immunogène comprises dans ladite séquence de la protéine G du VRS sont constituées par la séquence comprise entre les résidus aminoacides numérotés 171 et 187 de la protéine G du VRS humain ou bovin, ou une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec la séquence correspondante. D'autres peptides d'intérêt selon la présente invention sont portées par la séquence comprise entreles nucléotides numérotés 158 et 190 de la protéine G du VRS ou une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec la séquence correspondante.

Selon un autre de ses modes de réalisation l'invention a pour objet des peptides utiles pour la préparation d'un immunogéne et qui présentent une séquence correspondant à la séquence comprise entre les résidus aminoacides numérotés 140 et 200 de la protéine G du VRS humain ou bovin, ou une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec la séquence correspondante. Des séquences débutant à l'aminoacidè 140 de ladite protéine G du VRS et dont l'extrémité C-terminale correspond respectivement à l'aminoacide 198, 196, 194, 192, ou 190 ,ainsi,que des séquences présentant au moins 80% d'homologie avec les séquences portées par ces fragments sont particulièrement avantageuses.

Parmi les variants des séquences précédentes, il faut citer les polypeptides qui comportent une séquence dans laquelle :

a) l'acide aminé Cys en positions 173 et/ou 186 a été remplacé par un aminoacide ne formant pas de pont disulfure en particulier la serine, et/ou

b) les acides aminés en positions 176 et 182 sont susceptibles de former un pont covalent autre qu'un pont disulfure notamment l'acide aspartique et l'ornithine.

Ainsi, la séquence polypeptidique 130-230 du VRS sous-groupe A peut être utilisée complète, sous sa forme native. Cette séquence correspond à la séquence notée Seq id n° 1 (ou G2A).

De même, on peut utiliser la séquence polypeptidique complète 130-230 du VRS sous groupe B, sous sa forme native. Cette séquence correspond à la séquence notée Seq id n° 2 (G2B).

La sequence id n° 1 sera notée G2A dans la suite de la demande.

La séquence id n° 2 sera notée G2B dans la suite de la demande.

Des séquences présentant au moins 80% d'homologie avec G2A ou G2B sont également appropriées.

La séquence comprise entre les acides aminés 130 et 230, peut être modifiée par le remplacement des résidus cystéine en positions 173 et 186 par des résidus sérine pour obtenir un peptide conservant de bonnes propriétés immunogènes, grâce au maintien de la boucle formée par les résidus Cys en positions 176 et 182. Les séquences en acides aminés et nucléotides de ce polypeptide pour le sous-groupe A sont représentées sur la seq id n° 3 (G2AδCys).

Pour le sous-groupe B, les séquences en acides aminés et en nucléotides sont représentées sur la seq id n° 4 (G2BδCys).

Les séquences peptidiques seront notées G2AδCys et G2BδCys.

Selon un autre aspect, l'invention a pour objet un polypeptide utile pour la préparation d'immunogène, caractérisé en ce qu'il consiste en la séquence peptidique comprise entre les résidus aminoacides numérotés 174 et 187 de la protéine G du VRS ou une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec ladite séquence peptidique.

Dans cette dernière séquence le peptide 174-187 sous-groupe A peut présenter la séquence :

Seq id n° 5 :

Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys.

Le peptide 174-187 sous-groupe B peut présenter la séquence :

Seq id n° 6 :

Ser-Ile-Cys-Gly-Asn-Asn-Gln-Leu-Cys-Lys-Ser-Ile-Cys-Lys.

Le résidu Cys en position 186 peut également être remplacé par un résidu sérine, de manière à obtenir la séquence suivante :

Seq id n° 7 pour le sous-groupe A :

Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Ser Lys.

Seq id n° 8 pour le sous-groupe B :

Ser-Ile-Cys-Gly-Asn-Asn-Gln-Leu-Cys-Lys-Ser-Ile-Ser-Lys.

Dans la séquence comprise entre les résidus 174 et 187 du peptide immunogène, selon l'une des variantes de l'invention, les résidus aminoacides en positions 176 et 182 sont respectivement remplacés par un acide aspartique et une ornithine, de manière à obtenir l'une des séquences suivantes :

Seq id n° 9 pour le sous-groupe A :

Ser Ile Asp Ser Asn Asn Pro Thr Orn Trp Ala Ile Cys Lys

Seq id n° 10 pour le sous-groupe B

Ser-Ile-Asp-Gly-Asn-Asn-Gln-Leu-Orn-Lys-Ser-Ile-Cys-Lys.

Seq id n° 11 pour le sous-groupe A :

Ser Ile Asp Ser Asn Asn Pro Thr Orn Trp Ala Ile Ser Lys.

Seq id n° 12 pour le sous-groupe B :

Ser-Ile-Asp-Gly-Asn-Asn-Gln-Leu-Orn-Lys-Ser-Ile-Ser-Lys.

Le maintien des propriétés immunogènes est obtenu grâce au remplacement du pont disulfure (entre les Cys naturelles) par un pont amide entre les positions 176 et 182.

D'autres séquences selon l'invention telles que définies précédemment figurent en annexe de la présente demande sous les désignations SEQ ID N°14 à SEQ ID N°73.

L'invention a également pour objet un polypeptide utilisable comme agent immunogène présentant l'une des séquences précédentes et qui comporte en outre au moins un résidu cystéine en position N-terminale ou C- terminale.

L'invention comprend également un polypeptide qui consiste en la séquence peptidique comprise entre les résidus aminoacides numérotés 130 et 230 de la séquence de la protéine G du VRS sous-groupe A et sous-groupe B, ou en une séquence présentant 80% d'homologie avec ladite séquence peptidique et qui est sous forme d'une protéine de fusion avec le récepteur de la serumalbumine humaine, nommée BBG2AδC ou BBG2BδC, ou une autre protéine de liaison. La séquence de la protéine BB complète figure en annexe (Seq ID n° 74).

L'invention comprend également les variants par exemple glycosylés ou sulfatés des différents peptides, que ces fonctions soient naturelles ou non.

Les polypeptides peuvent être préparés par synthèse peptidique ou par les techniques d'ADN recombinant, qui sont connues de l'homme du métier.

En particulier, les séquences du gène codant pour l'épitope d'environ 100 acides aminés peuvent être préparées par assemblage de gènes en phase solide, et la protéine correspondante exprimée par exemple dans E. coli par voie intracellulaire.

Les séquences nucléotidiques (ARN ou ADN) codant pour les protéines ou les polypeptides définis ci-dessus font partie de l'invention.

Un autre objet de l'invention est un agent immunogène qui comporte un polypeptide tel que défini précédemment couplé à une protéine porteuse, en particulier à une protéine adjuvante d'immunité.

De préférence, le polypeptide selon l'invention est couplé à une protéine porteuse de type OmpA de la membrane externe d'une bactérie du genre Klebsiella, de préférence sous forme d'un conjugué soluble.

La Demanderesse a pu montrer qu'alors que les variants de la séquence 174-187 de la protéine G du VRS sont faiblement immunogènes, leur couplage avec une telle protéine induit une réponse immunitaire spécifique.

L'intensité de la réponse immunitaire a été comparée avec celle obtenue avec des adjuvants classiques, tel que le couplage au porteur KLH (keyhole limpet hemocyanin) coadministré avec l'adjuvant de Freund, ou le couplage à la protéine porteuse TT (tetanus toxoid).

Des résultats particulièrement avantageux sont obtenus pour des compositions contenant un polypeptide immunogène selon l'invention couplé à la protéine p40 de Klebsiella pneumoniae ou une protéine présentant 80% d'homologie avec la protéine p40.

Plus particulièrement, ledit polypeptide est couplé à une protéine comportant la séquence peptidique notée **Seq id n° 13.**

La séquence nucléotidique (ADN ou ARN) codant pour la protéine comportant la séquence id n° 13 est comprise dans l'invention.

Le polypeptide immunogène peut être couplé à la protéine adjuvante d'immunité par des méthodes connues de l'homme du métier telles que :

- Glutaraldéhyde
- Carbodiimide (ex : EDC : 1-(3diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide).
- Bis imido esters (ex : diméthyladipimidate).
- N-hydroxysuccinimidyl esters (ex : disuccinimidyl subérate).
- Pour les peptides comportant une cystéine supplémentaire en position N terminale ou C terminale :
  * Maléimido-N-hydroxysuccinimide esters (ex : MBS : maléimido benzoyl-N-hydroxy-succinimide ester).
  * N- succinimidyl Bromoacétate.

Le polypeptide peut être conjugué à la protéine porteuse par une protéine de liaison, par exemple le récepteur de la sérumalbumine humaine (BB).

Selon un autre aspect, l'invention a également pour objet un procédé de préparation d'un peptide conjugué entrant dans une composition utile pour prévention ou traitement des affections à VRS, caractérisé en ce que :

a) on précipite les lipopolysaccharides de membranes de bactéries du genre Klebsiella, en présence d'un sel de cation divalent et de détergents, pour récupérer les protéines membranaires totales dans le surnageant,

b) on soumet les protéines à une chromatographie par échange d'anions pour séparer la fraction contenant la protéine adjuvante d'immunité,

c) on concentre la fraction contenant la protéine adjuvante d'immunité,

d) on conjugue la protéine adjuvante d'immunité avec un polypeptide immunogène tel que définis ci-dessus pour former un conjugué soluble.

Le sel de cation divalent utilisé dans l'étape a) est de préférence un sel de calcium ou de magnésium. Après centrifugation, les protéines du surnageant peuvent être récupérées avec un bon rendement par deux précipitations à l'éthanol.

Les protéines membranaires, après remise en suspension, sont séparées sur une colonne échangeuse d'anions, utilisable en conditions industrielles. Ce support chromatographique est très stable et compatible avec les traitements de dépyrogénation drastiques, ce qui n'était pas le cas des supports chromatographiques déjà décrits. D'autre part, l'élution de la protéine peut être réalisée en conditions isocratiques et non par application d'un gradient de NaCl (comme décrit précédemment), ce qui est particulièrement avantageux en conditions industrielles.

Selon un mode de réalisation préféré, après l'étape c), on procède à une seconde étape de chromatographie, sur échangeur de cations, et on récupère les fractions contenant la protéine adjuvante, qui sont concentrées. Cette étape supplémentaire permet une meilleure élimination des lipopolysaccharides. La protéine adjuvante est ensuite conjuguée avec un polypeptide immunogène selon l'invention.

Selon un autre aspect, l'invention a pour objet une composition utile pour la prévention et/ou le traitement des affections provoquées par le VRS, caractérisée en ce qu'elle contient un polypeptide caractérisé ci-avant.

Plus particulièrement les compositions contiennent en outre des excipients pharmaceutiquement acceptables adaptés à l'administration par voie injectable.

En effet, la Demanderesse a mis en évidence que l'injection de telles compositions entraîne une protection, non par un effet neutralisant, mais par une réponse immunitaire systémique de l'organisme.

Les réponses humorales et cellulaire (IgM, IgG, IgA et cellules T) sont provoquées par le produit qui induit également une protection à long terme et une mémoire immunologique contre les VRS sous groupes a et b.

En vue de l'administration des compositions vaccinales par voie sous-cutanée, il est souhaitable de disposer de conjugué soluble, ce qui est difficile par les méthodes conventionnelles.

C'est pourquoi l'invention concerne également un procédé de préparation d'un conjugué entre un peptide immunogène et une protéine de membrane de Klebsiella, en particulier la protéine p40 de K. pneumoniae, dans lequel le couplage est effectué en présence de glutaraldéhyde à des concentrations inférieures ou égales à 0,05%.

Ce procédé de couplage diminue considérablement les concentrations en glutaraldéhyde en comparaison de celles habituellement utilisées (2 fois 0,01% au lieu de 1% environ) ; le glutaraldéhyde est ajouté en 2 fois sur une période de cinq jours alors que les protocoles décrits mentionnent des temps de 24 heures.

Ces modifications ont permis l'obtention d'un conjugué soluble, sous une forme adaptée à l'administration sous cutanée.

Les protocoles usuels (concentrations en glutaraldéhyde plus élevées et temps courts) se traduisent par la formation d'un gel dense (dû à des réactions de conjugaison P40-P40, très probablement), forme impropre à l'administration et à la manipulation en général.

Le peptide conjugué peut être congelé et utilisé tel quel ou lyophilisé.

Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

Dans ces exemples on se réfèrera aux figures suivantes :

- Figure 1 : intensité de la réponse immunitaire induite contre G1A sous différentes formes,
- Figure 2 : Cinétique de la réponse immunitaire induite contre G1A présentée sous différentes formes,
- Figure 3 : Cinétique de la réponse immunitaire induite contre le porteur seul,
- Figure 4 : Stratégie de clonage par amplification génique de p40.

Exemple 1 : Synthèse et Purification du G_1A

Le polypeptide de séquence

Ser-Ile-Cys-Ser-Asn-Asn-Pro-Thr-Cys-Trp-Ala-Ile-Ser-Lys
|_____ S-S _____|

noté G_1A, est préparé par synthèse en phase solide en utilisant la chimie Boc.

Assemblage

L'assemblage du peptide est effectué par synthèse peptidique en phase solide sur polystyrène (divinylbenzène 1%), en commençant avec un agent de liaison Boc-Lys(2-cl-Z)-phénylacétamidométhyl.

On a utilisé la stratégie chimique Boc-Benzyle avec la procédure de déprotection-couplage suivante :

1.	55 % TFA dans DCM	(1 x 5 min)
2.	55 % TFA dans DCM	(1 x 25 min)
3.	DCM	(2 x 1 min)
4.	Isopropylalcool	(1 x 1 min)
5.	DMF	(2 x 1 min)
6.	10 % DIEA en DMF	(2 x 2 min)
7.	Couplage	
8.	DMF	(2 x 1 min)
9.	DCM	(2 x 1 min)

A chaque étape on utilise 20 ml de solvant par gramme de peptide-résine.

Le couplage est effectué dans du DMF avec un ester hydroxybenzotriazole préformé pendant 30 min. On vérifie à chaque étape du couplage, si des fonctions aminé libres résiduelles sont présentes, par le test à la ninhydrine. Si nécessaire, un double couplage est effectué.

Pour la synthèse du peptide G_1A, on a utilisé les groupes de protection de la chaîne latérale suivants :

- 2-chlorobenzyloxycarbonyl pour la Lysine,
- Benzyl pour la Sérine et la Thréonine,
- 4-méthylbenzyl pour la Cystéine,
- Formyl pour le Tryptophane.

Avant l'étape finale de déprotection/cleavage, le groupe formyl est éliminé par traitement 30 min par une solution de piperidine à 25 % dans du DMF. La résine peptidique est lavée par du DCM et de l'éther, et séchée sous pression réduite.

Clivage

Le peptide est clivé de la résine et complètement déprotégé par un traitement au Fluorure d'Hydrogène liquide. 10 ml de Fluorure d'Hydrogène par gramme de peptide-résine sont utilisés classiquement à 0°C pendant 45 min en présence de p-cresol et d'éthanedithiol comme piège. Après évaporation du Fluorure d'Hydrogène, le mélange de réaction brut est lavé à l'éther, dissout dans du TFA, précipité à l'éther et séché.

Cyclisation et purification

Conditions générales de purification par HPLC :

Phase stationnaire :	silice en C_{18}, 15-25 µm, 100 Å
Phase mobile :	solvant A : eau 0,1 % TFA
	solvant B : acétonitrile/A, 60/40% (v/v)
Gradient linéaire :	20 à 50 % B en 30 min (première étape de purification)
	15 à 40 % B en 30 min (seconde étape de purification)
Vitesse du flux :	40 ml/min
Détection :	UV (210 nm)

Le peptide brut obtenu après clivage est purifié dans les conditions décrites ci-dessus (gradient de 20 à 50 % B). Les fractions ayant une pureté supérieure à 70-80 % (HPLC) sont réunies et lyophilisées. Le peptide est ensuite purifié dans un mélange acétonitrile eau et DMSO (1mg/ml) et laissé sous agitation jusqu'à ce que la cyclisation soit complète (4 à 6 jours). L'évolution de la réaction est contrôlée par HPLC. Le mélange de réaction est finalement concentré sur la colonne d'HPLC préparative et un gradient de 15 à 40 % de B est appliqué en 30 min afin de purifier le peptide.

Généralement, après lyophilisation, une seconde purification dans les mêmes conditions, est effectuée pour atteindre le degré de pureté requis.

La pureté et l'identité du produit final sont contrôlées par HPLC analytique, analyse des amino acides et analyse de masse FAB.

Dans le peptide ainsi obtenu, le résidu sérine en treizième position remplace le résidu Cys du peptide naturel, évitant ainsi une hétérogénéité dans la formation des ponts disulfures, pouvant être nuisible à l'immunogénicité.

Exemple 2 : Préparation de l'épitope $G_2A\delta Cys$

Construction de gène : matériels et méthodes

Dans un microtube Eppendorf, on rince 300 µg de billes avec du tampon washing/binding (1M NaCl, 10mM Tris-HCl pH7,5, 1 mM EDTA) avant d'ajouter 0,2 pmole de l'oligo biotinylé, 15 minutes d'incubation à température ambiante pour le binding. Les billes avec l'oligo fixé sont rincées et sédimentées. 0,2 pmole de l'oligo phosphorylé en 5' suivant est ajouté dans 60 µl de tampon hybridation/ligation (50mM Tris-HCl pH7,6, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, 1mM 1,4-dithiothreitol [DTT], 5% polyéthylène glycol [PEG] 8000). Le mélange d'hybridation est incubé à 70° C pendant 5 mn et laissé revenir à 37° C avant d'ajouter 3 unités de T4 DNA ligase (BRL)

suivi de 15 mn d'incubation à 37° C. Le mélange réactionnel est rincé avant d'ajouter 0,2 pmole d'oligo suivant. La procédure d'hybridation/ligation est répétée autant de fois qu'on ajoute un nouveau oligo complémentaire phosphorylé en 5'. A la fin, le duplex d'ADN fixé sur billes magnétiques peut être séparé du support en coupant avec les enzymes de restriction appropriées.

On prépare l'ADN correspondant à la séquence G2AδCys et à la séquence G2AδCys liée à la protéine de liaison à la serumalbumine humaine(BB) notée BB-G2AδCys.

La séquence nucléotidique est exprimée chez E. coli pour récupérer les protéines correspondantes.

Vecteur d'expression :

pVABBG2AδC est un vecteur d'expression de type intracellulaire, il contient un promoteur d'origine *E. coli*, l'opération tryptophane (Trp), suvi du gène codant pour le récepteur de la sérum albumine humaine BB (P-Å Nygrén et col, J. Mol. Recognit., 1988, 1, 60) et enfin le gène codant pour G2AδC du VRS. L'expression du gène hétérologue peut être induite en présence de l'IAA (acide-3-ß-indolacrylique). Le produit de fusion BBG2AδC peut être purifié par affinité sur colonne HSA-sépharose, après avoir libéré les protéines cytoplasmiques de *E. coli.*

Exemples de purification de protéines à partir de culture de 500 ml :

La souche *E. coli* RV 308 (Maurer et col., J. Mol. Biol., 1980, 139, 147) transfectée par le plasmide pVABBG2AδC, a été sélectionnée sur gélose renfermant de l'ampicilline (100 µg/ml) et de la tétracycline (8 µg/ml). On inocule la souche dans un Erlenmeyer contenant 100 ml de milieu de culture TSB (Tryptic Soy broth, Difco) (30g/l), supplémenté avec de la levure (Yeast Extract, Difco) (5 g/l), de l'Ampicilline (100 µg/ml), de la tétracycline (8 µg/ml) et du Tryptophane (100 µg/ml). Incuber à 32°C pendant 12 heures sous agitation (190 rpm). Transvaser la culture dans un autre erlenmeyer (5 litres) contenant quatre fois le volume initial (400 ml TSB + levure + les mêmes antibiotiques à la même concentration). Lorsque

la densité optique du milieu (à 550 nm) atteint environ une D.O. de 1,5, on induit la production des protéines en ajoutant dans le milieu de l'IAA à la concentration finale de 25 µg/ml. On arrête la culture après 5 heures d'incubation, sous agitation (190 rpm) à 32°C. Après centrifugation, le culot bactérien est resuspendu dans un récipient contenant environ 60 ml de solution de TST (50 mM TrisHC1, pH 8,0, 200mM NaC1, 0,05 % Tween 20, 0,5 mM EDTA) à froid.

On introduit dans le récipient une sonde standard de sonicateur (VIBRA-CELL, Somics Mat, USA). On fait la sonication à la puissance 5 pendant deux minutes environ. Le surnageant de solution après centrifugation est filtré à 0,45 µm, et passé dans une colonne contenant environ 3 ml de gel de HSA-sépharose (STÅHL et col, J. Immunol. Meth.,1989, 124, 43).

Les protéines purifiées sont analysées par SDS-PAGE sur l'appareil Phast System (PHARMACIA) ou sur Mini Protean BIORAD. Les gels sont révélés par le bleu de Coomassie. La protéine BBG2AδC, représentant plus de 90 % de pureté, correspond bien à la taille attendue (39,3 Kda) par rapport aux standards de poids moléculaires connus.

L'immunotransfert de cette protéine sur membrane Problott (ABI) permet de l'identifier avec des anticorps spécifiques, anti-BB et/ou anti-protéine G du VRS (ss-groupe A). Le rendement de protéines solubles purifiées à partir du cytoplasme de *E. coli* est environ 50 mg/litre de culture.

En fermenteur de 2 litres, on peut obtenir de 500 à 800 mg de protéines BBG2AδC par litre de culture, dans les conditions optimales de culture.

Exemple 3 : isolement et purification de la proteine p40 naturelle

Le procédé de purification de la protéine P40 à partir de la biomasse de Klebsiella pneumoniae, souche I-145, a été mis au point avec un objectif principal : mettre au point un procédé permettant la transposition àgrande échelle et l'extrapolation industrielle. Ce procédé met en jeu successivement la préparation d'une fraction enrichie en protéines membranaires et la purification de la protéine P40 par chromatographie.

MATERIEL ET METHODES

La biomasse de Klebsiella pneumoniae (souche I-145, 40 g de cellules sèches) est ajustée à pH 2,5 à l'aide d'acide acétique pur.

Après addition de 1/2 volume d'une solution contenant 6 % cétrimide, 60 % éthanol, 1,5 M CaCl2 dont le pH est ajusté à 2,5 avec de l'acide acétique, le mélange est placé sous agitation pendant 16 heures à température ambiante.

Après centrifugation 20 mn à 15000 g à 4°C, les protéines du surnageant sont précipitées à l'éthanol. Deux précipitations successives avec centrifugation intermédiaire (10 mn, 10000 g, 4 °C) sont réalisées : de 20 à 50 % puis de 50 à 80 %.

Les culots obtenus après la seconde précipitation sont remis en suspension dans une solution de zwittergent 3-14, 1 %.

Après agitation 4 heures à température ambiante, le pH est ajusté à 6,5 à l'aide de NaOH1 N.

Une centrifugation du mélange pendant 20 mn à 10000 g à 4 °C permet d'obtenir une fraction enrichie en protéines membranaires (fraction MP).

Les protéines de la fraction MP sont dialysées contre un tampon Tris/HCl 20 mM pH 8,0 ; zwittergent 3-14, 0,1 %. Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type échangeur d'anions forts (colonne de diamètre = 50 mm x H = 250 mm, gel Biorad Macroprep High Q) équilibrée dans le tampon décrit ci-dessus. La protéine P40 est éluée pour une concentration de 50 mM en NaCl dans le tampon d'équilibration.

Les fractions contenant la P40 sont rassemblées et dialysées contre un tampon citrate 20 mM pH 3,0 ; zwittergent 3-14, 0,1 %. Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type échangeur de cations forts (dimensions de la colonne : diamètre = 25 mm x H = 160 mm, gel Biorad Macroprep High S) équilibrée dans le tampon citrate 20 mM pH 3,0, zwittergent 3-14, 0,1 %. La protéine P40 est éluée pour une concentration 0,7 M en NaCl. Les fractions contenant la P40 sont rassemblées et concentrées par ultrafiltration à l'aide d'un système de filtration à flux tangentiel Minitan Millipore utilisé avec des plaques de membranes possédant un seuil de coupure 10 kDa.

RESULTATS

Les fractions obtenues après chaque étape chromatographique sont analysées par SDS-PAGE afin de rassembler celles contenant la protéine P40.

Les quantités de protéines sont mesurées par la méthode de Lowry (tableau I). La pureté et l'homogénéité de la protéine P40 sont estimées par SDS-PAGE, en présence de standards de masse moléculaire.

Après l'étape de chromatographie d'échange de cations, la protéine P40 est dépourvue du contaminant majeur présent dans la fraction MP (la protéine présentant une masse moléculaire apparente de 18 kDa) et présente un degré de pureté supérieur à 95 %.

Le profil électrophorétique de la P40 révèle plusieurs bandes. Ces bandes sont reconnues après immunoblot par des anticorps monoclonaux P40 obtenus chez la souris. La bande majeure supérieure correspond à la protéine dénaturée (par le traitement à 100°C, 15 min. en présence de SDS), et la bande mineure inférieure à la protéine sous sa forme native.

La P40 est en effet une protéine dite "heat-modifiable", et nous avons pu vérifier cette propriété à l'aide d'une cinétique de chauffage à 100°C en présence de SDS. Sans chauffage la protéine sous forme native présente une structure en hélices α qui fixe plus de SDS et migre donc plus loin vers l'anode que la forme dénaturée (dénaturation complète après 5 min. à 100°C) qui présente une structure en feuillets ß (K.B KELLER (1978) J. Bacteriol. 134, 1181-1183).

La contamination par les lipopolysaccharides (LPS) est estimée par dosage par chromatographie en phase gazeuse de l'acide ß-hydroxymyristique, acide gras marqueur des LPS de Klebsiella pneumoniae (tableau I).

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des quantités de protéine et LPS des fractions obtenues pour les différentes étapes du procédé de purification de la protéine p40 (n.d. = non déterminé).

	PROTEINES	RENDEMENT	LPS
BIOMASSE	40 g	-	n.d.
FRACTION MP	900 mg	2,25 %	n.d.
FRACTION ENRICHIE EN P40	400 mg	1 %	10 %
PROTEINE P40	130 mg	0,3 %	< 1 %

Cette méthode est utilisée pour approcher la teneur en LPS des échantillons issus des différentes étapes de purification.

La quantité d'acide ß-hydroxymyristique présente dans la fraction P40 après chromatographie d'échange de cations étant inférieure au seuil de quantification du dosage, on peut estimer que la quantité de LPS résiduel est inférieure à 1 %.

Exemple 4 : clonage de la proteine p40 et expression de BBp40

SOUCHES BACTERIENNES

* E. coli : RV 308 : souche ATCC 31608 (MAURER R., MEYER B.J., PTASCHNE M., J. MOL. BIOL, 1980, 139,147-161).

* K. pneumoniae : IP 145 : souche C.I.B.P.F -

VECTEURS

* pRIT 28 (Hultman et Col, 1988,7 : 629-638) : vecteur de clonage et de séquençage possédant le gène de résistance à l'ampicilline, les origines de réplication d'E.coli et du phage F1 ainsi qu'une portion du gène lac-z d'E.coli (ß-galactosidose).

* pVABB : vecteur d'expression de fusion de gène.

SOLUTIONS

* Amplification génique :

Tampon de lyse :	25 mM Taps pH 9.3
	2 mM MgCl2
Tampon d'amplification :	25 mM Taps pH 9.3
	2 mM MgCl2
	tween 20 0.1 %
	200 mM dNTP.

* Purification des protéines :

TST (20X) :	Tris base	0,5 M	
	HCl	0,3 M	
	NaCl	4 M	
	Tween 20	1 %	
	EDTA	20 mM	
Tampon de lavage :	Tris HCl	50 mM	pH 8,5
	MgCl2	5 mM	
Solution de dénaturation :	Gua-HCl	7,8 M	
	Tris-HCl	28 mM	pH 8,5
Solution de renaturation :	Gua-HCl	0,5 M	
	Tris-HCl	25 mM	pH 8,5
	NaCl	150 mM	
	Tween 20	0,05 %.	

MATERIEL ET METHODE

- **Synthèse des oligonucléotides**

Les amorces nucléotidiques ont été déterminées à partir de la partie de la séquence publiée de l'OMPA de Klebsiella pneumoniae (LAWRENCE, G.J., et al, Journal of general microbiology, 1991, 137, 1911-1921) de la séquence conscensus issue de l'alignement des séquences de 5 OMPA d'entérobactéries (E.coli, S.tryphimurium, S.marcescens, S.dysenteriae, E.aeroginosae), ainsi que des séquences de peptides obtenus par séquençage manuel.

Les oligonucléotides ont été synthétisés selon la méthode chimique des phosphoramidites sur l'appareil "Gene Assembler Plus" de Pharmacia.

- **Amplification génique par PCR du gène de P40**

L'ADN de l'OMPA de Klebsiella pneumoniae a été amplifié de la manière suivante.

Une colonie de Klebsiella pneumoniae est lysée dans 10 µl de tampon de lyse par chauffage à 95 °C pendant 5 minutes.

1 µl de cette solution sert de source d'ADN pour les réactions d'amplification.

Celles-ci sont réalisées dans 100 µl de tampon d'amplification (cf.annexe), avec 5 pmoles de chaque amorce et une unité d'enzyme Taq polymérase (Perkin Elmer Cetus). Chaque cycle comprend une étape de dénaturation de 30 secondes à 95°C suivie d'une hybridation de l'amorce à l'ADN et d'une extension d'une minute à 72 °C. 30 cycles sont ainsi effectués à l'aide d'un thermocycleur "Gen Amp PCR" 9000 Perkin Elmer Cetus .

Les PCR suivantes sont réalisées à partir des fragments d'ADN amplifiés précédemment.

Les fragments d'ADN amplifiés sont ensuite digérés, purifiés et liés au vecteur pRIT 28.

SEQUENCAGE

Les fragments ainsi clonés sont séquencés sur un séquenceur automatique 373 DNA Séquenceur d'Applied Biosystem. Les réactions de séquençage sont réalisées à l'aide du kit "dye Terminator" selon les recommandations du fournisseur (Applied Biosystem) soit sur de l'ADN double brin obtenu après amplification génique ou issu de maxiprep soit sur de l'ADN simple brin issu de fragments PCR dénaturés (Hultman et Col, Nucleid acids res. ; 1989, 17 : 4937-4946).

EXPRESSION DE LA PROTEINE

Le gène entier de P40 est cloné dans le vecteur d'expression pVABB. Ce vecteur permet d'adjoindre une queue d'affinité "BB" à P40 ; B étant la partie de la protéine G du streptocoque qui lie la serum albumine (Nygren P.A et Col ; Journal mol. Recognit. 1988 ; 1, 69-74).

Les souches d'E.coli RV308 transformées par le vecteur pVABBP40 sont mises à cultiver une nuit à 37°C sous agitation, dans 100 ml de TSB complémenté en extrait de levure, en ampicilline (200 µg/ml) en tétracycline (8 µg/ml) et en tryptophane (100 µg/ml). Le lendemain, une culture à DO= 1 pour une longueur d'onde de 580 nm est préparée dans du TSB + extraits de levure + ampi + tetra.

Après 10 minutes de culture, l'expression de la protéine est induite par addition d'IAA à (25 µg/ml) dans le milieu . La culture est centrifugée à 4°C à 2460 g pendant 10 minutes.

Le culot est repris par 20ml de TST 1 x pH 7,4, et la solution est alors centrifugée à 4°C à 23000 g pendant 30 minutes.

Le surnageant est passé sur Sépharose ce qui permet d'isoler les protéines dites solubles. Le culot est lavé avec du tampon de lavage puis centrifugé à 23000 g à 4°C pendant 30 minutes. Le culot renfermant les corps d'inclusion est alors repris par 900 µl d'une solution dénaturante + 100 µl de Diothiothreitol 10mM et incubé 2 heures à 37 °C.

La solution est ensuite incubée 1 nuit à température ambiante, sous agitation,dans 100 ml de tampon de renaturation à 2300 g pendant 1 heure.

Le surnageant est passé sur HSA Sépharose.

Dans les deux cas les protéines fixées sont éluées avec de l'acide acétique 0,5 M pH 2,8 et collectées par fraction de 1 ml.

Les fractions collectées sont ensuite annalysées sur gel d'électrophorèse en SDS-PAGE et par Immuno blot.

RESULTATS

Le clonage du gène a été effectué en trois temps selon la stratégie présentée sur la figure 4.

Dans un premier temps, nous avons confirmé la partie de la séquence publiée à l'exception d'un T à la place d'un A en position 103.

Puis nous avons déterminé la séquence en 3 ' du gène et enfin celle en 5 '.

Le gène entier a été obtenu par fusion des deux parties 8/4 et 3/14 puis cloné dans le vecteur pRIT 28. La séquence correspond à SEQ ID N° 13.

La protéine est exprimée sous la forme BBP40.

Elle est essentiellement obtenue à partir des corps d'inclusion. Pour une culture de 200 ml, on purifie une quinzaine de milligrammes de protéine.

Le profil électrophorétique montre que BBP40, obtenue après dénaturation, est d'une grande pureté. Le poids moléculaire apparent, correspond au poids théorique calculé qui est de 63 kDa.

La caractérisation en Immuno blot montre que la protéine purifiée est bien reconnue par un sérum de lapin anti-P40.

Exemple 5 : couplage de la protéine p40 au peptide G_1A

p40 (5 mg/ml, 40 mg) est dialysée contre 300 volumes de tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7, zwittergent 3-14, 0,1%.

Le dialysat est ajusté à une concentration de 2 mg/ml à l'aide d'un tampon carbonate 0,1 M pH 9 ; zwittergent 3-14, 0,1%. Du sodium dodécyl sulfate (SDS) est ajouté pour atteindre une concentration finale de 4%.

Le peptide G_1 (10 mg/10 ml de tampon carbonate 0,1 M pH 9 ; zwittergent 3-14 0,1 %) est ajouté à la solution de p40. La valeur du pH est contrôlée (comprise entre pH 9 et pH 10).

Ajouter 220 µl de glutaraldéhyde (2,5% dans l'eau), agiter 24 heures à 4° C.

Ajouter 5 ml de tampon carbonate 0,1 M pH 9 ; zwittergent 3-14 0,1%; vérifier le pH (compris entre pH 9 et pH 10) ; agiter 72 heures à 4° C.

Ajouter 220 µl de glutaraldéhyde (2,5% dans l'eau), vérifier le pH, agiter 24 heures à + 4° C.

La réaction est stoppée par addition de 100 µl de lysine 1 M. La solution est dialysée 24 heures à 4° C.

Le SDS est éliminé par double précipitation au KCl.

La solution contenant le conjugué p40 est congelée et utilisée telle quelle ou lyophylisée.

Exemple 6 : activité

Matériel et méthodes

Les souris C57BL/6 (N=5) sont immunisées à JO, J10, J20 par voie sous cutanée avec 10 µg de G1, couplé ou non à un porteur, en présence ou non d'un adjuvant. Le sérum est collecté et testé par ELISA. Les Ig anti-G1 ou anti-porteur sont isolées sur support BSA-G1 et sur support "porteur" (KLH ou TT ou P40). Les Ig sont révélées à l'aide d'un conjugué anti-Ig lapin péroxydase. La densité optique est lue à 450 nm et le titre en anticorps anti-G1 est donné par l'inverse de la dernière dilution donnant deux fois le bruit de fond. Les résultats représentent la moyenne ± écart-type des titres des 5 souris.

RESULTATS

Induction d'une réponse immunitaire contre G1A

Les souris sont immunisées avec G1A sous différentes formes selon un schéma d'immunisation identique. Les réponses anticorps induites par les différentes formes de G1A sont comparées 28 jours après le début de l'expérience.

Le peptide synthétique G1A administré pur n'induit pas de réponse immunitaire même s'il est coadministré avec l'adjuvant de Freund. Présenté par le porteur KLH, G1A induit une réponse faible qui est significativement augmentée par la coadministration de l'adjuvant de Freund (AF). Présenté par p40, G1A induit une réponse supérieure à celle obtenue dans le schéma d'immunisation classique KLH/G1+AF, p40 à des propriétés de "self-adjuvant carrier".

Les résultats sont présentés sur la figure 1.

Cinétique de la réponse immunitaire contre G1A

Les souris sont immunisées avec G1A sous différentes formes selon un schéma d'immunisation identique. Les réponses anticorps induites par les différentes formes de G1A sont comparées dans le temps : 7, 17, 28, 35, 42 jours après le début de l'expérience.

La réponse anti-G1A est significativement plus élevée et plus rapide lorsque les souris sont immunisées avec p40/G1A que les immunisations plus classiques TT/G1A et KLH/G1A+AF. Une seule injection de p40/G1A permet d'obtenir, en 7 jours, un titre d'anticorps anti-G1A de 1000. Ce titre est obtenu avec TT/G1A ou KLH/G1A+AF en 28 jours. La réponse maximum (titre = 1/380 000), obtenue après trois injections, en 28 jours, est environ 30 fois supérieure à celle obtenue avec KLH/G1A+AF et 70 fois supérieure à celle obtenue avec TT/G1A. Le titre en anticorps anti-G1A se maintient sans faiblir jusqu'au jour 42.

Les résultats sont présentés sur la figure 2.

Cinétique de la réponse immunitaire contre le porteur

Les souris sont immunisées avec G1A couplé à un porteur selon un schéma d'immunisation identique. Les réponses anticorps induites par lesdifférents porteurs sont comparées dans le temps, 7, 17, 28, 35, 42 jours après le début de l'expérience.

La réponse anti-p40 (titre voisin du 10 000) est supérieure à la réponse anti-KLH mais non significativement différente de la réponse anti-TT.

Les résultats sont présentés sur la figure 3.

CONCLUSION

Le couplage chimique du peptide G1A sur la protéine p40 a permis d'induire une réponse anti-G1A significativement plus importante et plus rapide que celles provoquées par les modèles de référence KLH/G1A+AF ou TT/G1A. Le couplage du peptide G1B devrait induire des réponses similaires.

Exemple 7 : Evaluation du potentiel protecteur des peptides et des protéines recombinantes de la glycoprotéine G du virus respiratoire syncytial (VRS) sous- groupe A couplés à la protéine porteuse p40

Les souris BALB/c ont été immunisées avec les différentes préparations suivantes :

1) peptide de synthèse G1A couplé à KLH (keyhole limpet hemocyanin) = KLH.G1A.
2) peptide de synthèse G1A couplé à la protéine porteuse p40 = p40.G1A.
3) témoin p40 seul.
4) protéine recombinante produite dans E. coli : BBG2AδC couplée à la protéine porteuse p40 = p40.BBG2AδC.
5) peptide de synthèse G1A couplé à la protéine porteuse toxine tétanique (TT) = TT.G1A.
6) témoin TT seul.
7) témoin BB seul.
8) témoin VRS long (sous-groupe A).

Les souris ont reçu 3 doses intramusculaires (200 µg/souris) avec l'hydroxyde d'aluminium comme adjuvant (utilisé couramment chez l'homme). Les résultats des tests de protection ainsi que du profil immunologique des sérums se trouvent dans le tableau 2.

Les préparations suivantes confèrent une protection complète suite au challenge avec le VRS Long (Souche A) : p40.G1A, p40.BBG2AδC, par rapport à TT.G1A qui confère aussi une très bonne protection comparable au peptide KLH.G1A. En test ELISA, tous reconnaissent l'antigène VRS avec un titre le plus fort pour p40.G1A=1/12800.

Quant au test de neutralisation, aucune des préparations ne possède d'activité neutralisante in vitro.

Peptides et Protéines Recombinantes	Protection DICT50 log10/g poumons challenge avec VRS long ($1,5.10^5$/souris) (Sous-Groupe A)		Titre Elisa versus VRS long	Neutralisation log 2/25 µl
	5 - 6 jours	7 - 8 jours		
KLH. G1A (100 à 157 µg)	2,45 2,45 < 1,7 < 1,7 < 1,7 ≤ 2,0 ± 0,4 p< 0,001	2,45 2,15 < 1,7 < 1,7 < 1,7 ≤ 2,0 ± 0,4 p< 0,001	4000	< 3,0
P40. G1A (200 µg)	< 1,7 < 1,7 < 1,7 < 1,7 < 1,7 ± 0 p< 0,001	< 1,7 < 1,7 < 1,7 < 1,7 < 1,7 ± 0 p< 0,001	12 800	< 3,0
Témoins P40 (200 µg)	4,7 4,45 4,45 4,45 4,5 ± 0,1 p< 0,001	4,7 4,45 4,45 4,45 4,5 ± 0,1 p< 0,001	300	< 3,0
P40. BBG2AδC (200 µg)	< 1,7 < 1,7 < 1,7 < 1,7 < 1,7 < 1,7 ± 0 p< 0,001	< 1,7 < 1,7 < 1,7 < 1,7 < 1,7 < 1,7 ± 0 p< 0,001	1700	< 3,0

Tableau 2 : Protection conférée et profil immunologique des sérums après challenge avec VRS Long (A) suite à l'immunisation de souris BALB/c avec différentes protéines recombinantes. (3-4 semaines après 3 doses i.m. avec hydroxide d'Aluminium)

Peptides et Protéines Recombinantes	Protection				Titre Elisa versus VRS long	Neutralisation log 2/25 µl
	DICT50 log10/g poumons challenge avec VRS long ($1,5.10^5$/souris) (Sous-Groupe A)					
	5 - 6 jours		7 - 8 jours			
TT.G1A (200 µg)	< 1,7 < 1,7 < 1,7 < 1,7 2,45	< 1,9 ± 0,3 p < 0,001	< 1,7 < 1,7 < 1,7 < 1,7 2,45	< 1,9 ± 0,3 p < 0,001	7200	< 3,0
TT Témoins (200 µg)	4,45 4,2 4,2 4,45 3,7	4,2 ± 0,3 p=0,022	4,7 4,2 4,2 4,45 3,7	4,2 ± 0,4 p=0,053	250	< 3,0
Témoins BB (200 µg)	2,95 4,2 3,95 3,7 3,7	3,7 ± 0,5 p=0,853	2,95 4,2 4,2 3,7 3,7	3,8 ± 0,5 p=0,760	150	< 3,0

Tableau 2(suite) :Protection conférée et profil immunologique des sérums après challenge avec VRS Long (A) suite à l'immunisation de souris BALB/c avec différentes protéines recombinantes. (3-4 semaines après 3 doses i.m. avec hydroxide d'Aluminium)

Peptides et Protéines Recombinantes	Protection DICT50 log10/g poumons challenge avec VRS long ($1,5.10^5$/souris) (Sous-Groupe A)				Titre Elisa versus VRS long	Neutralisation log 2/25 µl
	5 - 6 jours		7 - 8 jours			
Témoins VRS long	< 1,7 < 1,7 < 1,7 < 1,7 < 1,7	< 1,7 ± 0 p=0,001	< 1,7 < 1,7 < 1,7 < 1,7 < 1,7	< 1,7 ± 0 p=0,001	76 800	6,6
Témoins, non immunisés, challengés	3,95 3,95 3,7 3,45 3,95 3,45	3,7 ± 0,2	3,95 4,2 3,7 3,45 3,95 3,7	3,8 ± 0,3	150	< 3,0
Témoins, non immunisés, non challengés	Pas de virus		Pas de virus		150	< 3,0

Tableau 2 (suite) :
Protection conférée et profil immunologique des sérums après challenge avec VRS Long (A) suite à l'immunisation de souris BALB/c avec différentes protéines recombinantes. (3-4 semaines après 3 doses i.m. avec hydroxide d'Aluminium)

Exemple 8

Evaluation du potentiel protecteur des peptides de la glycoprotéine G du virus respiratoire syncytial (VRS) sous-groupe A et sous-groupe B couplés à la KLH. Protection vis-à-vis d'un challenge réalisé avec les deux sous-groupes du VRS.

Les souris BALB/c ont été immunisées avec les différentes préparations suivantes :

1. peptide de synthèse C1A couplé à la KLH (keyhole limpet hemocyanin) = KLH-G1A
2. peptide de synthèse G1B couplé à la KLH (keyhole limpet hemocyanin) = KLH-G1B. Le peptide G1B correspond à la séquence G (174-187)δCys du sous-groupe B dont la séquence est :

   Ser-Ile-Cys-Gly-Asn-Asn-Gln-Leu-Cys-Lys-Ser-Ile-Ser-Lys

   |_____s-s_____|

3. Témoin KLH
4. Témoin VRS long (sous-groupe A)
5. Témoin VRS 8/60 (sous-groupe B)

Les souris ont reçu 3 doses intramusculaires (200 µg/souris) avec l'adjuvant de Freund. Les résultats des tests de protection ainsi que du profil immunologique des sérums se trouvent dans le tableau 3.

La préparation KLH-G1A permet une protection complète vis-à-vis du VRS sous-groupe A mais pas vis-à-vis du VRS sous-groupe B. Par contre, la préparation KLH-G1B permet une protection complète vis-à-vis du VRS sous-groupe B mais pas vis-à-vis du VRS sous-groupe A. Le test ELISA reflète la même situation.

Peptides couplés à la KLH	PROTECTION DICT$_{10}$ log 10/g poumons		Titre ELISA	
	Challenge VRS long (sous-groupe A) 1,5 x 10^5/s (50/μl)	Challenge VRS 8/60 (sous-groupe B) 0,6 x 10^5/s (50/μl)	Versus VRS long (A)	Versus VRS 8/60 (B)
G1A	≤ 1,8 ± 0,3 n = 11 p < 0,001	3,3 ± 0,5 n = 10 p = 0,237	29 866	266
G1B	3,8 ± 0,8 n = 7 p = 0,517	≤ 2,1 ± 0,5 n = 8 p < 0,001	≤ 100	7 200
Témoin KLH	3,7 ± 0,3 n = 11 p = 0,01	3,4 ± 0,3 n = 10 p = 0,6	≤ 200	133
Témoin VRS (A)	≤ 1,7 ± 0 n = 11 p < 0,001	≤ 1,7 ± 0 n = 11 p < 0,001	≥ 68 266	51 200
Témoin VRS (B)	≤ 1,7 ± 0 n = 10 p < 0,001	≤ 1,7 ± 0 n = 10 p < 0,001	≥ 76 800	68 266

Tableau 3 : Protection conférée et profil immunologique des sérums après challenge avec le RS long (sous-groupe A) ou avec le RS 8/60 (sous-groupe B) suite à l'immunisation de souris BALB/c avec les peptides G1A et G1B.

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Exemple 9: Application vétérinaire

Evaluation du potentiel protecteur de peptide G1vΔC dérivé de la protéine G de la souche bovine du Virus Respiratoire Syncytial (VRS) Lerch et al. 1990, J. Virol. 64:5559 couplé à la protéine porteuse KLH.

174 187
Ser Thr Cys Glu Gly Asn Leu Ala Cys Leu Ser Leu Ser His

présentant un pont disulfure en position 176-182.

Le peptide préparé par synthèse en phase solide en utilisant la chimie Boc est couplé au KLH en utilisant la glutaraldéhyde (Schaaper et al. Mol. Immunol. (1989) 26: 81-85).

Deux veaux ont été immunisés par voie intramusculaire avec 500 µg de G1vΔC-KLH avec de l'adjuvant incomplet de Freund 3 fois à intervalle de 3 semaines. Un veau a été immunisé avec KLH sans peptide G1VΔC, avec un adjuvant incomplet de Freund.

Les animaux sont challengés avec la souche Snook, 21 jours après la dernière inoculation, par voie intranasale et intratrachéale avec chacune 1ml de virus titrant à 2x105 /ml.

Le virus titré sur cellules de reins de veau selon la méthode des plaques est déterminé dans les lavages nasopharyngeaux respectivement 3 et 2 jours après le challenge et 7 jours dans les poumons des animaux sacrifiés.

REPONSE EN ANTICORPS CIRCULANTS :

Veau 3432 (KLH + FIA):

Date	Traitement	Titre log10 ELISA			
		Peptide + KLH	Peptide	KLH	BRSV (Snook)
23/11	J0 vaccination	< 1.0	< 1.0	< 1.0	< 1.5
14/12	J21 Vaccination	< 1.0	< 1.0	3.0	< 1.5
04/01	J42 vaccination	< 1.0	< 1.0	4.7	< 1.5
01/02	J70 VRS IN / IT	< 1.0	< 1.0	5.7	< 1.5
08/02	J77 sacrifice	1.5	< 1.0	4.8	< 1.5

Veau 3440 (Peptide - KLH + FIA)

Date	Traitement	Titre log10 ELISA			
		Peptide + KLH	Peptide	KLH	BRSV (Snook)
23/11	J0 vaccination	< 1.0	< 1.0	< 1.0	< 1.5
14/12	J21 Vaccination	1.6	< 1.0	< 1.0	< 1.5
04/01	J42 vaccination	3.8	2.6	1.7	1.9
01/02	J70 VRS IN / IT	2.7	2.8	2.6	3.7
08/02	J77 sacrifice	4.1	2.6	1.7	3.1

Veaux auxquels a été administré 500 µg G1vΔC - KLHen adjuvant incomplet de Freund à trois occasions à 3 semaines d'intervalles.

REPONSE AU CHALLENGE DU VIRUS

Veaux	Vaccination	Relargage nasopharyngéal		J7 Virus du poumon		% pneumoniae
		No jours	Titre max.	Titre LBA (pfu/ml)	Poumon Homog.	
3432	KLH + FIA	3	5.1×10^3	1.4×10^2	3/3	12
3440	Peptide - KLH + FIA	2	5.5×10^2	< 0.7	0/3	< 1

REPONSE EN ANTICORPS CIRCULANTS

Veaux	Vaccination	Titre log10 ELISA (BRSV Snook)				
		J0	J24	J42	J68	J75
4138	KLH + FIA	< 1.5	< 1.5	< 1.5	< 1.5	2.4
4140	* Peptide - KLH + FIA	< 1.5	< 1.5	3.0	2.5 ≈	2.9

* Veau auquel a été administré 500 µg de BP 4006 - KLH en adjuvant incomplet de Freund à trois occasions à trois semaines d'intervalle.

REPONSE AU CHALLENGE DU VIRUS

Veaux	Vaccination	Relargage nasopharyngéal		J7 Virus du poumon		% pneumoniae
		No jours	Titre max.	Titre LBA (pfu/ml)	Poumon Homog.	
4138	KLH + FIA	5	4×10^1	6.5×10^2	2/3	27
4140	Peptide - KLH + FIA	4	2×10^3	7.0×10^1	3/3	2

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:
(A) NOM: PIERRE FABRE MEDICAMENT
(B) RUE: 17, AVENUE JEAN MOULIN
(C) VILLE: CASTRES
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 81106

(ii) TITRE DE L' INVENTION: ELEMENT D'IMMUNOGENE, AGENT IMMUNOGENE, COMPOSITION PHARMACEUTIQUE ET PROCEDE DE PREPARATION.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 75

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:
(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS

(vi) DONNEES DE LA DEMANDE ANTERIEURE:
(A) NUMERO DE LA DEMANDE: FR 94 04009
(B) DATE DE DEPOT: 06-AVRIL-1994

Information pour la SEQ ID N0 : 1 G2A

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 101 acides aminés, 303 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
   130
N - Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser Lys Pro Thr Thr Lys
5'- ACC GTG AAA ACC AAA AAC ACC ACG ACC ACC CAG ACC CAG CCG AGC AAA CCG ACC ACC AAA
150
Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe
CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAC AAA CCG AAC AAC GAT TTC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC
171     173       176                 182           186
Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn
GTG CCG TGC AGC ATC TGC AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC TGC AAA CGT ATC CCG AAC
192
Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe Lys Thr Thr Lys
AAA AAA CCG GGC AAA AAA ACC ACG ACC AAA CCG ACC AAA AAA CCG ACC TTC AAA ACC ACC AAA
213                                                             230
Lys Asp His Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu Val Pro Thr Thr Lys Pro - C
AAA GAT CAT AAA CCG CAG ACC ACC AAA CCG AAA GAA GTG CCG ACC ACC AAA CCG - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 2 G2B

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 101 acides aminés, 303 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
   130
N - Thr Ala Gln Thr Lys Gly Arg Ile Thr Thr Ser Thr Gln Thr Asn Lys Pro Ser Thr Lys
5'- ACC GCG CAG ACC AAA GGC CGT ATC ACC ACC AGC ACC CAG ACC AAC AAA CCG AGC ACC AAA
150                                                                             
Ser Arg Ser Lys Asn Pro Pro Lys Lys Pro Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe
AGC CGT AGC AAA AAC CCG CCG AAA AAA CCG AAA GAT GAT TAC CAC TTC GAA GTG TTC AAC TTC
171     173         176                     182             186                     
Val Pro Cys Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys Thr Ile Pro Ser
GTG CCC TGC AGC ATC TGC GGC AAC AAC CAG CTG TGC AAA AGC ATC TGC AAA ACC ATC CCG AGC
192                                                                             
Asn Lys Pro Lys Lys Lys Pro Thr Ile Lys Pro Thr Asn Lys Pro Thr Thr Lys Thr Thr Asn
AAC AAA CCG AAA AAG AAA CCG ACC ATC AAA CCG ACC AAC AAA CCG ACC ACC AAA ACC ACC AAC
213                                                                     230     
Lys Arg Asp Pro Lys Thr Pro Ala Lys Met Pro Lys Lys Glu Ile Ile Thr Asn - C
AAA CGT GAT CCG AAA ACC CCG GCG AAA ATG CCG AAG AAG GAA ATC ATC ACC AAC - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 3 G2AδCys

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 101 acides aminés, 303 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
   130
N - Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser Lys Pro Thr Thr Lys
5'- ACC GTG AAA ACC AAA AAC ACC ACG ACC ACC CAG ACC CAG CCG AGC AAA CCG ACC ACC AAA
```

150
Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe
CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAC AAA CCG AAC AAC GAT TTC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC
171 173 176 182 186
Val Pro Ser Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Ser Lys Arg Ile Pro Asn
GTG CCG AGC AGC ATC TGC AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC AGC AAA CGT ATC CCG AAC
192
Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe Lys Thr Thr Lys
AAA AAA CCG GGC AAA AAA ACC ACG ACC AAA CCG ACC AAA AAA CCG ACC TTC AAA ACC ACC AAA
213 230
Lys Asp His Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu Val Pro Thr Thr Lys Pro - C
AAA GAT CAT AAA CCG CAG ACC ACC AAA CCG AAA GAA GTG CCG ACC ACC AAA CCG - 3'

Information pour la SEQ ID NO : 4 G2BδCys

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 101 acides aminés, 303 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURRATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

130
N - Thr Ala Gln Thr Lys Gly Arg Ile Thr Thr Ser Thr Gln Thr Asn Lys Pro Ser Thr Lys
5'- ACC GCG CAG ACC AAA GGC CGT ATC ACC ACC AGC ACC CAG ACC AAC AAA CCG AGC ACC AAA
150
Ser Arg Ser Lys Asn Pro Pro Lys Lys Pro Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe
AGC CGT AGC AAA AAC CCG CCG AAA AAA CCG AAA GAT GAT TAC CAC TTC GAA GTG TTC AAC TTC
171 173 176 182 186
Val Pro Ser Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Ser Lys Thr Ile Pro Ser
GTG CCC AGC AGC ATC TGC GGC AAC AAC CAG CTG TGC AAA AGC ATC AGC AAA ACC ATC CCG AGC
192
Asn Lys Pro Lys Lys Lys Pro Thr Ile Lys Pro Thr Asn Lys Pro Thr Thr Lys Thr Thr Asn
AAC AAA CCG AAA AAG AAA CCG ACC ATC AAA CCG ACC AAC AAA CCG ACC ACC AAA ACC ACC AAC
213 230
Lys Arg Asp Pro Lys Thr Pro Ala Lys Met Pro Lys Lys Glu Ile Ile Thr Asn - C
AAA CGT GAT CCG AAA ACC CCG GCG AAA ATG CCG AAG AAG GAA ATC ATC ACC AAC - 3'

Information pour la SEQ ID NO : 5 G1ACys

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 14 acides aminés, 42 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

```
    174     176                 182             186 187
N - Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys - C
5'- AGC ATC TGC AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC TGC AAA - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 6 G1BCys

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 14 acides aminés, 42 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

```
    174     176                 182             186 187
N - Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys - C
5'- AGC ATC TGC GGC AAC AAC CAG CTG TGC AAA AGC ATC TGC AAA - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 7 G1A

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 14 acides aminés, 42 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

174 176 182 186 187
N - Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Ser Lys - C
5'- AGC ATC TGC AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC AGC AAA - 3'

Information pour la SEQ ID NO : 8 GlB

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 14 acides aminés, 42 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

174 176 182 186 187
N - Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Ser Lys - C
5'- AGC ATC TGC GGC AAC AAC CAG CTG TGC AAA AGC ATC AGC AAA - 3'

Information pour la SEQ ID NO : 9 Gl'A

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 14 acides aminés

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

174 176 182 186 187
N - Ser Ile Asp Ser Asn Asn Pro Thr Orn Trp Ala Ile Cys Lys - C

Information pour la SEQ ID NO : 10 Gl'B

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 14 acides aminés

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

174 176 182 186 187
N - Ser Ile Asp Gly Asn Asn Gln Leu Orn Lys Ser Ile Cys Lys - C

Information pour la SEQ ID NO : 11 Gl'AδC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 14 acides aminés

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

174 176 182 186 187
N - Ser Ile Asp Ser Asn Asn Pro Thr Orn Trp Ala Ile Ser Lys - C

Information pour la SEQ ID NO : 12 Gl'BδC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 14 acides aminés

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

174 176 182 186 187
N - Ser Ile Asp Gly Asn Asn Gln Leu Orn Lys Ser Ile Ser Lys - C

Information pour la SEQ ID NO : 13 P40

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 335 acides aminés, 1005 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

P40 = N -Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp Tyr Ala Gly Gly Lys Leu Gly Trp Ser
GCT CCG AAA GAT AAC ACC TGG TAT GCA GGT GGT AAA CTG GGT TGG TCC
17
Gln Tyr His Asp Thr Gly Phe Tyr Gly Asn Gly Phe Gln Asn Asn Asn Gly Pro
CAG TAT CAC GAC ACC GGT TTC TAC GGT AAC GGT TTC CAG AAC AAC AAC GGT CCG
35
Thr Arg Asn Asp Gln Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Gly Tyr Gln Val Asn Pro
ACC CGT AAC GAT CAG CTT GGT GCT GGT GCG TTC GGT GGT TAC CAG GTT AAC CCG
53
Tyr Leu Gly Phe Glu Met Gly Tyr Asp Trp Leu Gly Arg Met Ala Tyr Lys Gly
TAC CTC GGT TTC GAA ATG GGT TAT GAC TGG CTG GGC CGT ATG GCA TAT AAA GGC
71
Ser Val Asp Asn Gly Ala Phe Lys Ala Gln Gly Val Gln Leu Thr Ala Lys Leu
AGC GTT GAC AAC GGT GCT TTC AAA GCT CAG GGC GTT CAG CTG ACC GCT AAA CTG
89
Gly Tyr Pro Ile Thr Asp Asp Leu Asp Ile Tyr Thr Arg Leu Gly Gly Met Val
GGT TAC CCG ATC ACT GAC GAT CTG GAC ATC TAC ACC CGT CTG GGC GGC ATG GTT
107
Trp Arg Ala Asp Ser Lys Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly Val Ser Arg Ser Glu
TGG CGC GCT GAC TCC AAA GGC AAC TAC GCT TCT ACC GGC GTT TCC CGT AGC GAA
125
His Asp Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly Gly Val Glu Trp Ala Val Thr
CAC GAC ACT GGC GTT TCC CCA GTA TTT GCT GGC GGC GTA GAG TGG GCT GTT ACT
143
Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala
CGT GAC ATC GCT ACC CGT CTG GAA TAC CAG TGG GTT AAC AAC ATC GGC GAC GCG

161
Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val Ser Tyr
GGC ACT GTG GGT ACC CGT CCT GAT AAC GGC ATG CTG AGC CTG GGC GTT TCC TAC
179
Arg Phe Gly Gln Glu Asp Ala Ala Pro Val Val Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala
CGC TTC GGT CAG GAA GAT GCT GCA CCG GTT GTT GCT CCG GCT CCG GCT CCG GCT

197
Pro Glu Val Ala Thr Lys His Phe Thr Leu Lys Ser Asp Val Leu Phe Asn Phe
CCG GAA GTG GCT ACC AAG CAC TTC ACC CTG AAG TCT GAC GTT CTG TTC AAC TTC
215
Asn Lys Ala Thr Leu Lys Pro Glu Gly Gln Gln Ala Leu Asp Gln Leu Tyr Thr
AAC AAA GCT ACC CTG AAA CCG GAA GGT CAG CAG GCT CTG GAT CAG CTG TAC ACT
233
Gln Leu Ser Asn Met Asp Pro Lys Asp Gly Ser Ala Val Val Leu Gly Tyr Thr
CAG CTG AGC AAC ATG GAT CCG AAA GAC GGT TCC GCT GTT GTT CTG GGC TAC ACC
251
Asp Arg Ile Gly Ser Glu Ala Tyr Asn Gln Gln Leu Ser Glu Lys Arg Ala Gln
GAC CGC ATC GGT TCC GAA GCT TAC AAC CAG CAG CTG TCT GAG AAA CGT GCT CAG
269
Ser Val Val Asp Tyr Leu Val Ala Lys Gly Ile Pro Ala Gly Lys Ile Ser Ala
TCC GTT GTT GAC TAC CTG GTT GCT AAA GGC ATC CCG GCT GGC AAA ATC TCC GCT
287
Arg Gly Met Gly Glu Ser Asn Pro Val Thr Gly Asn Thr Cys Asp Asn Val Lys
CGC GGC ATG GGT GAA TCC AAC CCG GTT ACT GGC AAC ACC TGT GAC AAC GTG AAA
305
Ala Arg Ala Ala Leu Ile Asp Cys Leu Ala Pro Asp Arg Arg Val Glu Ile Glu
GCT CGC GCT GCC CTG ATC GAT TGC CTG GCT CCG GAT CGT CGT GTA GAG ATC GAA
323 335
Val Lys Gly Tyr Lys Glu Val Val Thr Gln Pro Ala Gly TER - C
GTT AAA GGC TAC AAA GAA GTT GTA ACT CAG CCG GCG GGT TAA - 3'

Information pour la SEQ ID NO : 14 G2AδCF

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 101 acides aminés, 303 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

130
N - Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser Lys Pro Thr Thr Lys
5'- ACC GTG AAA ACC AAA AAC ACC ACG ACC ACC CAG ACC CAG CCG AGC AAA CCG ACC ACC AAA
150 163 165 168 170
Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn Asn Asp Ser His Ser Glu Val Ser Asn Ser
CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAC AAA CCG AAC AAC GAT TCC CAT TCC GAA GTG TCC AAC TCC
171 173 176 182 186
Val Pro Ser Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Ser Lys Arg Ile Pro Asn
GTG CCG AGC AGC ATC TGC AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC AGC AAA CGT ATC CCG AAC
192
Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe Lys Thr Thr Lys
AAA AAA CCG GGC AAA AAA ACC ACG ACC AAA CCG ACC AAA AAA CCG ACC TTC AAA ACC ACC AAA

213 230
Lys Asp His Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu Val Pro Thr Thr Lys Pro - C
AAA GAT CAT AAA CCG CAG ACC ACC AAA CCG AAA GAA GTG CCG ACC ACC AAA CCG - 3'

Information pour la SEQ ID NO : 15 G4A

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 17 acides aminés, 42 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

171 173 176 182 186 187
N - Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys - C
5'- GTG CCG TGC AGC ATC TGC AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC TGC AAA - 3'

Information pour la SEQ ID NO : 16 G4A&C

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 17 acides aminés, 42 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

171 173 176 182 186 187
N - Val Pro Ser Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Ser Lys - C
5'- GTG CCG AGC AGC ATC TGC AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC AGC AAA - 3'

Information pour la SEQ ID NO : 17 G4B

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 17 acides aminés, 42 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

```
    171     173         176                     182             186 187
N - Val Pro Cys Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys - C
5' -GTG CCC TGC AGC ATC TGC GGC AAC AAC CAG CTG TGC AAA AGC ATC TGC AAA - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 18 G4BδC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 17 acides aminés, 42 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

```
    171     173         176                     182             186 187
N - Val Pro Ser Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Ser Lys - C
5' -GTG CCC AGC AGC ATC TGC GGC AAC AAC CAG CTG TGC AAA AGC ATC AGC AAA - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 19 G4'A

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 17 acides aminés

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

```
    171     173         176                     182             186 187
N - Val Pro Asp Ser Ile Asp Ser Asn Asn Pro Thr Orn Trp Ala Ile Orn Lys - C
```

Information pour la SEQ ID NO : 20 G4'AδC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 17 acides aminés

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

171 173 176 182 186 187
N - Val Pro Ser Ser Ile Asp Ser Asn Asn Pro Thr Orn Trp Ala Ile Ser Lys - C

Information pour la SEQ ID NO : 21 G4'B

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 17 acides aminés

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

171 173 176 182 186 187
N - Val Pro Asp Ser Ile Asp Gly Asn Asn Gln Leu Orn Lys Ser Ile Orn Lys - C

Information pour la SEQ ID NO : 22 G4'BδC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 17 acides aminés

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

171 173 176 182 186 187
N - Val Pro Ser Ser Ile Asp Gly Asn Asn Gln Leu Orn Lys Ser Ile Ser Lys - C

Information pour la SEQ ID NO : 23 G200A

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 61 acides aminés, 183 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Gln Thr Gln Pro Ser Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn
5'- CAG ACC CAG CCG AGC AAA CCG ACC ACC AAA CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAC
158                                                     173         176
Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys
AAA CCG AAC AAC GAT TTC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCG TGC AGC ATC TGC
177                 182             186
Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly
AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC TGC AAA CGT ATC CCG AAC AAA AAA CCG GGC
196             200
Lys Lys Thr Thr Thr - C
AAA AAA ACC ACG ACC - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 24 G198A

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 59 acides aminés, 177 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Gln Thr Gln Pro Ser Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn
5'- CAG ACC CAG CCG AGC AAA CCG ACC ACC AAA CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAC
158                                                     173         176
Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys
AAA CCG AAC AAC GAT TTC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCG TGC AGC ATC TGC
177                 182             186
Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly
AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC TGC AAA CGT ATC CCG AAC AAA AAA CCG GGC
196     198
Lys Lys Thr - C
AAA AAA ACC - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 25 G196A

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 57 acides aminés, 171 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Gln Thr Gln Pro Ser Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn
5'- CAG ACC CAG CCG AGC AAA CCG ACC ACC AAA CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAC
158                                                     173         176
Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys
AAA CCG AAC AAC GAT TTC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCG TGC AGC ATC TGC
177                 182             186
Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly
AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC TGC AAA CGT ATC CCG AAC AAA AAA CCG GGC
196
Lys - C
AAA - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 26 G194A

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 55 acides aminés, 165 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Gln Thr Gln Pro Ser Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn
5'- CAG ACC CAG CCG AGC AAA CCG ACC ACC AAA CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAC
158                                                     173         176
Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys
AAA CCG AAC AAC GAT TTC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCG TGC AGC ATC TGC
177                 182             186                             194
Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro - C
AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC TGC AAA CGT ATC CCG AAC AAA AAA CCG - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 27 G192A

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 52 acides aminés, 156 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Gln Thr Gln Pro Ser Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn
5'- CAG ACC CAG CCG AGC AAA CCG ACC ACC AAA CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAC
158                                                     173         176
Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys
AAA CCG AAC AAC GAT TTC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCG TGC AGC ATC TGC
177                 182             186                 192
Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys - C
AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC TGC AAA CGT ATC CCG AAC AAA - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 28 G6A

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 51 acides aminés, 153 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Gln Thr Gln Pro Ser Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn
5'- CAG ACC CAG CCG AGC AAA CCG ACC ACC AAA CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAC
158                                                     173         176
Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys
AAA CCG AAC AAC GAT TTC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCG TGC AGC ATC TGC
177                 182             186             190
Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro - C
AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC TGC AAA CGT ATC CCG - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 29 G7A

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 33 acides aminés, 99 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
   158                                                  173
N - Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile
5'- AAA CCG AAC AAC GAT TTC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCG TGC AGC ATC
176                  182           186           190
Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro - C
TGC AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC TGC AAA CGT ATC CCG - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 30 G200A&C

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 61 acides aminés, 183 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
   140
N - Gln Thr Gln Pro Ser Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn
5'- CAG ACC CAG CCG AGC AAA CCG ACC ACC AAA CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAC
158                                                  173         176
Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Ser Ser Ile Cys
AAA CCG AAC AAC GAT TTC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCG AGC AGC ATC TGC
177                182           186
Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Ser Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly
AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC AGC AAA CGT ATC CCG AAC AAA AAA CCG GGC
196            200
Lys Lys Thr Thr Thr - C
AAA AAA ACC ACG ACC - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 31 G198ΔC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 59 acides aminés, 177 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Gln Thr Gln Pro Ser Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn
5'- CAG ACC CAG CCG AGC AAA CCG ACC ACC AAA CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAC
158                                                         173         176
Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Ser Ser Ile Cys
AAA CCG AAC AAC GAT TTC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCG AGC AGC ATC TGC
177                 182             186
Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Ser Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly
AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC AGC AAA CGT ATC CCG AAC AAA AAA CCG GGC
196     198
Lys Lys Thr - C
AAA AAA ACC - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 32 G196ΔC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 57 acides aminés, 171 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Gln Thr Gln Pro Ser Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn
5'- CAG ACC CAG CCG AGC AAA CCG ACC ACC AAA CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAC
```

158 173 176
Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Ser Ser Ile Cys
AAA CCG AAC AAC GAT TTC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCG AGC AGC ATC TGC
177 182 186
Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Ser Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly
AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC AGC AAA CGT ATC CCG AAC AAA AAA CCG GGC
196
Lys - C
AAA - 3'

Information pour la SEQ ID NO : 33 G194ASC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 55 acides aminés, 165 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

140
N - Gln Thr Gln Pro Ser Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn
5'- CAG ACC CAG CCG AGC AAA CCG ACC ACC AAA CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAC
158 173 176
Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Ser Ser Ile Cys
AAA CCG AAC AAC GAT TTC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCG AGC AGC ATC TGC
177 182 186 194
Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Ser Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro - C
AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC AGC AAA CGT ATC CCG AAC AAA AAA CCG - 3'

Information pour la SEQ ID NO : 34 G192ASC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 52 acides aminés, 156 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

140
N - Gln Thr Gln Pro Ser Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn
5'- CAG ACC CAG CCG AGC AAA CCG ACC ACC AAA CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAC

```
158                                                     173         176
Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Ser Ser Ile Cys
AAA CCG AAC AAC GAT TTC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCG AGC AGC ATC TGC
177                 182             186                     192
Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Ser Lys Arg Ile Pro Asn Lys - C
AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC AGC AAA CGT ATC CCG AAC AAA - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 35 G6AδC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 50 acides aminés, 150 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Gln Thr Gln Pro Ser Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn
5'- CAG ACC CAG CCG AGC AAA CCG ACC ACC AAA CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAC
158                                                     173         176
Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Ser Ser Ile Cys
AAA CCG AAC AAC GAT TTC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCG AGC AGC ATC TGC
177                 182             186             190
Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Ser Lys Arg Ile Pro - C
AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC AGC AAA CGT ATC CCG - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 36 G7AδC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 33 acides aminés, 99 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    158                                                     173
N - Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Ser Ser Ile
5'- AAA CCG AAC AAC GAT TTC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCG AGC AGC ATC
```

```
176                    182            186            190
Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Ser Lys Arg Ile Pro - C
TGC AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC AGC AAA CGT ATC CCG - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 37 G200B

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 61 acides aminés, 183 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Ser Thr Gln Thr Asn Lys Pro Ser Thr Lys Ser Arg Ser Lys Asn Pro Pro Lys Lys Pro
5'- AGC ACC CAG ACC AAC AAA CCG AGC ACC AAA AGC CGT AGC AAA AAC CCG CCG AAA AAA CCG
160                                                 173        176
Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln
AAA GAT GAT TAC CAC TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCC TGC AGC ATC TGC GGC AAC AAC CAG
    182            186                                                      200
Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys Thr Ile Pro Ser Asn Lys Pro Lys Lys Lys Pro Thr Ile- C
CTG TGC AAA AGC ATC TGC AAA ACC ATC CCG AGC AAC AAA CCG AAA AAG AAA CCG ACC ATC- 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 38 G198B

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 59 acides aminés, 177 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Ser Thr Gln Thr Asn Lys Pro Ser Thr Lys Ser Arg Ser Lys Asn Pro Pro Lys Lys Pro
5'- AGC ACC CAG ACC AAC AAA CCG AGC ACC AAA AGC CGT AGC AAA AAC CCG CCG AAA AAA CCG
160                                                 173        176
Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln
AAA GAT GAT TAC CAC TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCC TGC AGC ATC TGC GGC AAC AAC CAG
    182            186                                                  198
Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys Thr Ile Pro Ser Asn Lys Pro Lys Lys Lys Pro - C
CTG TGC AAA AGC ATC TGC AAA ACC ATC CCG AGC AAC AAA CCG AAA AAG AAA CCG - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 39 G196B

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 57 acides aminés, 171 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Ser Thr Gln Thr Asn Lys Pro Ser Thr Lys Ser Arg Ser Lys Asn Pro Pro Lys Lys Pro
5'- AGC ACC CAG ACC AAC AAA CCG AGC ACC AAA AGC CGT AGC AAA AAC CCG CCG AAA AAA CCG
160                                             173         176
Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln
AAA GAT GAT TAC CAC TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCC TGC AGC ATC TGC GGC AAC AAC CAG
    182             186                                 196
Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys Thr Ile Pro Ser Asn Lys Pro Lys Lys - C
CTG TGC AAA AGC ATC TGC AAA ACC ATC CCG AGC AAC AAA CCG AAA AAG - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 40 G194B

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 55 acides aminés, 165 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Ser Thr Gln Thr Asn Lys Pro Ser Thr Lys Ser Arg Ser Lys Asn Pro Pro Lys Lys Pro
5'- AGC ACC CAG ACC AAC AAA CCG AGC ACC AAA AGC CGT AGC AAA AAC CCG CCG AAA AAA CCG
160                                             173         176
Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln
AAA GAT GAT TAC CAC TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCC TGC AGC ATC TGC GGC AAC AAC CAG
    182             186                                 194
Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys Thr Ile Pro Ser Asn Lys Pro - C
CTG TGC AAA AGC ATC TGC AAA ACC ATC CCG AGC AAC AAA CCG - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 41 G192B

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 53 acides aminés, 159 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Ser Thr Gln Thr Asn Lys Pro Ser Thr Lys Ser Arg Ser Lys Asn Pro Pro Lys Lys Pro
5'- AGC ACC CAG ACC AAC AAA CCG AGC ACC AAA AGC CGT AGC AAA AAC CCG CCG AAA AAA CCG
160                                                 173         176
Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln
AAA GAT GAT TAC CAC TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCC TGC AGC ATC TGC GGC AAC AAC CAG
    182             186                 192
Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys Thr Ile Pro Ser Asn - C
CTG TGC AAA AGC ATC TGC AAA ACC ATC CCG AGC AAC - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 42 G6B

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 51 acides aminés, 153 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Ser Thr Gln Thr Asn Lys Pro Ser Thr Lys Ser Arg Ser Lys Asn Pro Pro Lys Lys Pro
5'- AGC ACC CAG ACC AAC AAA CCG AGC ACC AAA AGC CGT AGC AAA AAC CCG CCG AAA AAA CCG
160                                                 173         176
Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln
AAA GAT GAT TAC CAC TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCC TGC AGC ATC TGC GGC AAC AAC CAG
    182             186             190
Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys Thr Ile Pro - C
CTG TGC AAA AGC ATC TGC AAA ACC ATC CCG - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 43 G7B

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 33 acides aminés, 99 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
   158                                                  173         176
N - Lys Pro Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Gly
5'- AAA CCG AAA GAT GAT TAC CAC TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCC TGC AGC ATC TGC GGC
              182           186           190
Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys Thr Ile Pro - C
AAC AAC CAG CTG TGC AAA AGC ATC TGC AAA ACC ATC CCG - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 44 G200BdC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 61 acides aminés, 183 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
   140
N - Ser Thr Gln Thr Asn Lys Pro Ser Thr Lys Ser Arg Ser Lys Asn Pro Pro Lys Lys Pro
5'- AGC ACC CAG ACC AAC AAA CCG AGC ACC AAA AGC CGT AGC AAA AAC CCG CCG AAA AAA CCG
160                                             173         176
Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Ser Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln
AAA GAT GAT TAC CAC TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCC AGC AGC ATC TGC GGC AAC AAC CAG
   182           186                                                   200
Leu Cys Lys Ser Ile Ser Lys Thr Ile Pro Ser Asn Lys Pro Lys Lys Lys Pro Thr Ile- C
CTG TGC AAA AGC ATC AGC AAA ACC ATC CCG AGC AAC AAA CCG AAA AAG AAA CCG ACC ATC- 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 45 G198BδC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 59 acides aminés, 177 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Ser Thr Gln Thr Asn Lys Pro Ser Thr Lys Ser Arg Ser Lys Asn Pro Pro Lys Lys Pro
5'- AGC ACC CAG ACC AAC AAA CCG AGC ACC AAA AGC CGT AGC AAA AAC CCG CCG AAA AAA CCG
160                                                 173         176
Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Ser Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln
AAA GAT GAT TAC CAC TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCC AGC AGC ATC TGC GGC AAC AAC CAG
    182             186                                         198
Leu Cys Lys Ser Ile Ser Lys Thr Ile Pro Ser Asn Lys Pro Lys Lys Lys Pro - C
CTG TGC AAA AGC ATC AGC AAA ACC ATC CCG AGC AAC AAA CCG AAA AAG AAA CCG - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 46 G196BδC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 57 acides aminés, 171 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Ser Thr Gln Thr Asn Lys Pro Ser Thr Lys Ser Arg Ser Lys Asn Pro Pro Lys Lys Pro
5'- AGC ACC CAG ACC AAC AAA CCG AGC ACC AAA AGC CGT AGC AAA AAC CCG CCG AAA AAA CCG
160                                                 173         176
Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Ser Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln
AAA GAT GAT TAC CAC TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCC AGC AGC ATC TGC GGC AAC AAC CAG
    182             186                                 196
Leu Cys Lys Ser Ile Ser Lys Thr Ile Pro Ser Asn Lys Pro Lys Lys - C
CTG TGC AAA AGC ATC AGC AAA ACC ATC CCG AGC AAC AAA CCG AAA AAG - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 47 G194BδC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 55 acides aminés, 165 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Ser Thr Gln Thr Asn Lys Pro Ser Thr Lys Ser Arg Ser Lys Asn Pro Pro Lys Lys Pro
5'- AGC ACC CAG ACC AAC AAA CCG AGC ACC AAA AGC CGT AGC AAA AAC CCG CCG AAA AAA CCG
160                                                 173         176
Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Ser Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln
AAA GAT GAT TAC CAC TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCC AGC AGC ATC TGC GGC AAC AAC CAG
    182             186                             194
Leu Cys Lys Ser Ile Ser Lys Thr Ile Pro Ser Asn Lys Pro - C
CTG TGC AAA AGC ATC AGC AAA ACC ATC CCG AGC AAC AAA CCG - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 48 G192BδC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 53 acides aminés, 159 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Ser Thr Gln Thr Asn Lys Pro Ser Thr Lys Ser Arg Ser Lys Asn Pro Pro Lys Lys Pro
5'- AGC ACC CAG ACC AAC AAA CCG AGC ACC AAA AGC CGT AGC AAA AAC CCG CCG AAA AAA CCG
160                                                 173         176
Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Ser Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln
AAA GAT GAT TAC CAC TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCC AGC AGC ATC TGC GGC AAC AAC CAG
    182             186                     192
Leu Cys Lys Ser Ile Ser Lys Thr Ile Pro Ser Asn - C
CTG TGC AAA AGC ATC AGC AAA ACC ATC CCG AGC AAC - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 49 G6B&C

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 51 acides aminés, 153 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Ser Thr Gln Thr Asn Lys Pro Ser Thr Lys Ser Arg Ser Lys Asn Pro Pro Lys Lys Pro
5'- AGC ACC CAG ACC AAC AAA CCG AGC ACC AAA AGC CGT AGC AAA AAC CCG CCG AAA AAA CCG
160                                                 173         176
Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Ser Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln
AAA GAT GAT TAC CAC TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCC AGC AGC ATC TGC GGC AAC AAC CAG
    182             186             190
Leu Cys Lys Ser Ile Ser Lys Thr Ile Pro - C
CTG TGC AAA AGC ATC AGC AAA ACC ATC CCG - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 50 G7B&C

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 33 acides aminés, 99 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    158                                                 173         176
N - Lys Pro Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Ser Ser Ile Cys Gly
5'- AAA CCG AAA GAT GAT TAC CAC TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCC AGC AGC ATC TGC GGC
                182             186             190
Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Ser Lys Thr Ile Pro - C
AAC AAC CAG CTG TGC AAA AGC ATC AGC AAA ACC ATC CCG - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 51 G2V

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 101 acides aminés, 303 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
     130
N - Gln Asn Arg Lys Ile Lys Gly Gln Ser Thr Leu Pro Ala Thr Arg Lys Pro Pro Ile Asn
5'- CAA AAC AGA AAA ATC AAA GGT CAA TCA ACA CTA CCA GCC ACA AGA AAA CCA CCA ATT AAT
150
Pro Ser Gly Ser Ile Pro Pro Glu Asn His Gln Asp His Asn Asn Phe Gln Thr Leu Pro Tyr
CCA TCA GGA AGC ATC CCA CCA GAA AAC CAT CAA GAC CAC AAC AAC TTC CAA ACA CTC CCC TAT
171     173         176                 182             186
Val Pro Cys Ser Thr Cys Glu Gly Asn Leu Ala Cys Leu Ser Leu Cys His Ile Glu Thr Glu
GTT CCC TGC AGT ACA TGT GAA GGT AAT CTT GCA TGC TTA TCA CTC TGC CAT ATT GAG ACG GAA
192
Arg Ala Pro Ser Arg Ala Pro Thr Ile Thr Leu Lys Lys Thr Pro Lys Pro Lys Thr Thr Lys
AGA GCA CCA AGC AGA GCA CCA ACA ATC ACC CTC AAA AAG ACA CCA AAA CCA AAA ACC ACA AAA
213                                                                 230
Lys Pro Thr Lys Thr Thr Ile His His Arg Thr Ser Pro Glu Thr Lys Leu Gln - C
AAG CCA ACC AAG ACA ACA ATC CAT CAC AGA ACC AGC CCA GAA ACC AAA CTG CAA - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 52 G2VδC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 101 acides aminés, 303 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
     130
N - Gln Asn Arg Lys Ile Lys Gly Gln Ser Thr Leu Pro Ala Thr Arg Lys Pro Pro Ile Asn
5'- CAA AAC AGA AAA ATC AAA GGT CAA TCA ACA CTA CCA GCC ACA AGA AAA CCA CCA ATT AAT
```

```
150
Pro Ser Gly Ser Ile Pro Pro Glu Asn His Gln Asp His Asn Asn Phe Gln Thr Leu Pro Tyr
CCA TCA GGA AGC ATC CCA CCA GAA AAC CAT CAA GAC CAC AAC AAC TTC CAA ACA CTC CCC TAT
171     173         176                 182             186
Val Pro Ser Ser Thr Cys Glu Gly Asn Leu Ala Cys Leu Ser Leu Ser His Ile Glu Thr Glu
GTT CCC AGC AGT ACA TGT GAA GGT AAT CTT GCA TGC TTA TCA CTC AGC CAT ATT GAG ACG GAA
192
Arg Ala Pro Ser Arg Ala Pro Thr Ile Thr Leu Lys Lys Thr Pro Lys Pro Lys Thr Thr Lys
AGA GCA CCA AGC AGA GCA CCA ACA ATC ACC CTC AAA AAG ACA CCA AAA CCA AAA ACC ACA AAA
213                                                                 230
Lys Pro Thr Lys Thr Thr Ile His His Arg Thr Ser Pro Glu Thr Lys Leu Gln - C
AAG CCA ACC AAG ACA ACA ATC CAT CAC AGA ACC AGC CCA GAA ACC AAA CTG CAA - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 53 G200V

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 61 acides aminés, 183 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Leu Pro Ala Thr Arg Lys Pro Pro Ile Asn Pro Ser Gly Ser Ile Pro Pro Glu Asn His
5'- CTA CCA GCC ACA AGA AAA CCA CCA ATT AAT CCA TCA GGA AGC ATC CCA CCA GAA AAC CAT
160                                             173         176
Gln Asp His Asn Asn Phe Gln Thr Leu Pro Tyr Val Pro Cys Ser Thr Cys Glu Gly Asn Leu
CAA GAC CAC AAC AAC TTC CAA ACA CTC CCC TAT GTT CCC TGC AGT ACA TGT GAA GGT AAT CTT
    182             186                                                 200
Ala Cys Leu Ser Leu Cys His Ile Glu Thr Glu Arg Ala Pro Ser Arg Ala Pro Thr Ile - C
GCA TGC TTA TCA CTC TGC CAT ATT GAG ACG GAA AGA GCA CCA AGC AGA GCA CCA ACA ATC - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 54 G198V

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 59 acides aminés, 177 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Leu Pro Ala Thr Arg Lys Pro Pro Ile Asn Pro Ser Gly Ser Ile Pro Pro Glu Asn His
5'- CTA CCA GCC ACA AGA AAA CCA CCA ATT AAT CCA TCA GGA AGC ATC CCA CCA GAA AAC CAT
160                                             173         176
Gln Asp His Asn Asn Phe Gln Thr Leu Pro Tyr Val Pro Cys Ser Thr Cys Glu Gly Asn Leu
CAA GAC CAC AAC AAC TTC CAA ACA CTC CCC TAT GTT CCC TGC AGT ACA TGT GAA GGT AAT CTT
    182             186                                         198
Ala Cys Leu Ser Leu Cys His Ile Glu Thr Glu Arg Ala Pro Ser Arg Ala Pro - C
GCA TGC TTA TCA CTC TGC CAT ATT GAG ACG GAA AGA GCA CCA AGC AGA GCA CCA - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 55 G196V

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 57 acides aminés, 171 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Leu Pro Ala Thr Arg Lys Pro Pro Ile Asn Pro Ser Gly Ser Ile Pro Pro Glu Asn His
5'- CTA CCA GCC ACA AGA AAA CCA CCA ATT AAT CCA TCA GGA AGC ATC CCA CCA GAA AAC CAT
160                                             173         176
Gln Asp His Asn Asn Phe Gln Thr Leu Pro Tyr Val Pro Cys Ser Thr Cys Glu Gly Asn Leu
CAA GAC CAC AAC AAC TTC CAA ACA CTC CCC TAT GTT CCC TGC AGT ACA TGT GAA GGT AAT CTT
    182             186                                     196
Ala Cys Leu Ser Leu Cys His Ile Glu Thr Glu Arg Ala Pro Ser Arg - C
GCA TGC TTA TCA CTC TGC CAT ATT GAG ACG GAA AGA GCA CCA AGC AGA - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 56 G194V

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 55 acides aminés, 165 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Leu Pro Ala Thr Arg Lys Pro Pro Ile Asn Pro Ser Gly Ser Ile Pro Pro Glu Asn His
5'- CTA CCA GCC ACA AGA AAA CCA CCA ATT AAT CCA TCA GGA AGC ATC CCA CCA GAA AAC CAT
160                                                 173         176
Gln Asp His Asn Asn Phe Gln Thr Leu Pro Tyr Val Pro Cys Ser Thr Cys Glu Gly Asn Leu
CAA GAC CAC AAC AAC TTC CAA ACA CTC CCC TAT GTT CCC TGC AGT ACA TGT GAA GGT AAT CTT
    182             186                             194
Ala Cys Leu Ser Leu Cys His Ile Glu Thr Glu Arg Ala Pro - C
GCA TGC TTA TCA CTC TGC CAT ATT GAG ACG GAA AGA GCA CCA - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 57 G192V

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 52 acides aminés, 156 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Leu Pro Ala Thr Arg Lys Pro Pro Ile Asn Pro Ser Gly Ser Ile Pro Pro Glu Asn His
5'- CTA CCA GCC ACA AGA AAA CCA CCA ATT AAT CCA TCA GGA AGC ATC CCA CCA GAA AAC CAT
160                                                 173         176
Gln Asp His Asn Asn Phe Gln Thr Leu Pro Tyr Val Pro Cys Ser Thr Cys Glu Gly Asn Leu
CAA GAC CAC AAC AAC TTC CAA ACA CTC CCC TAT GTT CCC TGC AGT ACA TGT GAA GGT AAT CTT
    182             186                     192
Ala Cys Leu Ser Leu Cys His Ile Glu Thr Glu Arg - C
GCA TGC TTA TCA CTC TGC CAT ATT GAG ACG GAA AGA - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 58 G6V

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 51 acides aminés, 153 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Leu Pro Ala Thr Arg Lys Pro Pro Ile Asn Pro Ser Gly Ser Ile Pro Pro Glu Asn His
5'- CTA CCA GCC ACA AGA AAA CCA CCA ATT AAT CCA TCA GGA AGC ATC CCA CCA GAA AAC CAT
160                                                 173         176
Gln Asp His Asn Asn Phe Gln Thr Leu Pro Tyr Val Pro Cys Ser Thr Cys Glu Gly Asn Leu
CAA GAC CAC AAC AAC TTC CAA ACA CTC CCC TAT GTT CCC TGC AGT ACA TGT GAA GGT AAT CTT
    182             186             190
Ala Cys Leu Ser Leu Cys His Ile Glu Thr - C
GCA TGC TTA TCA CTC TGC CAT ATT GAG ACG - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 59 G7V

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 33 acides aminés, 99 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    158                                                 173         176
N - Asn His Gln Asp His Asn Asn Phe Gln Thr Leu Pro Tyr Val Pro Cys Ser Thr Cys
5'- AAC CAT CAA GAC CAC AAC AAC TTC CAA ACA CTC CCC TAT GTT CCC TGC AGT ACA TGT
                    182             186             190
Glu Gly Asn Leu Ala Cys Leu Ser Leu Cys His Ile Glu Thr - C
GAA GGT AAT CTT GCA TGC TTA TCA CTC TGC CAT ATT GAG ACG - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 60 G200VδC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 61 acides aminés, 183 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Leu Pro Ala Thr Arg Lys Pro Pro Ile Asn Pro Ser Gly Ser Ile Pro Pro Glu Asn His
5'- CTA CCA GCC ACA AGA AAA CCA CCA ATT AAT CCA TCA GGA AGC ATC CCA CCA GAA AAC CAT
160                                                 173         176
Gln Asp His Asn Asn Phe Gln Thr Leu Pro Tyr Val Pro Ser Ser Thr Cys Glu Gly Asn Leu
CAA GAC CAC AAC AAC TTC CAA ACA CTC CCC TAT GTT CCC AGC AGT ACA TGT GAA GGT AAT CTT
    182             186                                                     200
Ala Cys Leu Ser Leu Ser His Ile Glu Thr Glu Arg Ala Pro Ser Arg Ala Pro Thr Ile - C
GCA TGC TTA TCA CTC AGC CAT ATT GAG ACG GAA AGA GCA CCA AGC AGA GCA CCA ACA ATC - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 61 G198VδC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 59 acides aminés, 177 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Leu Pro Ala Thr Arg Lys Pro Pro Ile Asn Pro Ser Gly Ser Ile Pro Pro Glu Asn His
5'- CTA CCA GCC ACA AGA AAA CCA CCA ATT AAT CCA TCA GGA AGC ATC CCA CCA GAA AAC CAT
160                                                 173         176
Gln Asp His Asn Asn Phe Gln Thr Leu Pro Tyr Val Pro Ser Ser Thr Cys Glu Gly Asn Leu
CAA GAC CAC AAC AAC TTC CAA ACA CTC CCC TAT GTT CCC AGC AGT ACA TGT GAA GGT AAT CTT
    182             186                                                 198
Ala Cys Leu Ser Leu Ser His Ile Glu Thr Glu Arg Ala Pro Ser Arg Ala Pro - C
GCA TGC TTA TCA CTC AGC CAT ATT GAG ACG GAA AGA GCA CCA AGC AGA GCA CCA - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 62 G196VôC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 57 acides aminés, 171 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Leu Pro Ala Thr Arg Lys Pro Pro Ile Asn Pro Ser Gly Ser Ile Pro Pro Glu Asn His
5'- CTA CCA GCC ACA AGA AAA CCA CCA ATT AAT CCA TCA GGA AGC ATC CCA CCA GAA AAC CAT
160                                                 173         176
Gln Asp His Asn Asn Phe Gln Thr Leu Pro Tyr Val Pro Ser Ser Thr Cys Glu Gly Asn Leu
CAA GAC CAC AAC AAC TTC CAA ACA CTC CCC TAT GTT CCC AGC AGT ACA TGT GAA GGT AAT CTT
    182             186                                 196
Ala Cys Leu Ser Leu Ser His Ile Glu Thr Glu Arg Ala Pro Ser Arg - C
GCA TGC TTA TCA CTC AGC CAT ATT GAG ACG GAA AGA GCA CCA AGC AGA - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 63 G194VôC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 55 acides aminés, 165 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Leu Pro Ala Thr Arg Lys Pro Pro Ile Asn Pro Ser Gly Ser Ile Pro Pro Glu Asn His
5'- CTA CCA GCC ACA AGA AAA CCA CCA ATT AAT CCA TCA GGA AGC ATC CCA CCA GAA AAC CAT
160                                                 173         176
Gln Asp His Asn Asn Phe Gln Thr Leu Pro Tyr Val Pro Ser Ser Thr Cys Glu Gly Asn Leu
CAA GAC CAC AAC AAC TTC CAA ACA CTC CCC TAT GTT CCC AGC AGT ACA TGT GAA GGT AAT CTT
    182             186                             194
Ala Cys Leu Ser Leu Ser His Ile Glu Thr Glu Arg Ala Pro - C
GCA TGC TTA TCA CTC AGC CAT ATT GAG ACG GAA AGA GCA CCA - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 64 G192VδC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 52 acides aminés, 156 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Leu Pro Ala Thr Arg Lys Pro Pro Ile Asn Pro Ser Gly Ser Ile Pro Pro Glu Asn His
5'- CTA CCA GCC ACA AGA AAA CCA CCA ATT AAT CCA TCA GGA AGC ATC CCA CCA GAA AAC CAT
160                                                 173         176
Gln Asp His Asn Asn Phe Gln Thr Leu Pro Tyr Val Pro Ser Ser Thr Cys Glu Gly Asn Leu
CAA GAC CAC AAC AAC TTC CAA ACA CTC CCC TAT GTT CCC AGC AGT ACA TGT GAA GGT AAT CTT
    182             186                 192
Ala Cys Leu Ser Leu Ser His Ile Glu Thr Glu Arg - C
GCA TGC TTA TCA CTC AGC CAT ATT GAG ACG GAA AGA - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 65 G6VδC

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 51 acides aminés, 153 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    140
N - Leu Pro Ala Thr Arg Lys Pro Pro Ile Asn Pro Ser Gly Ser Ile Pro Pro Glu Asn His
5'- CTA CCA GCC ACA AGA AAA CCA CCA ATT AAT CCA TCA GGA AGC ATC CCA CCA GAA AAC CAT
160                                                 173         176
Gln Asp His Asn Asn Phe Gln Thr Leu Pro Tyr Val Pro Ser Ser Thr Cys Glu Gly Asn Leu
CAA GAC CAC AAC AAC TTC CAA ACA CTC CCC TAT GTT CCC AGC AGT ACA TGT GAA GGT AAT CTT
    182             186             190
Ala Cys Leu Ser Leu Ser His Ile Glu Thr - C
GCA TGC TTA TCA CTC AGC CAT ATT GAG ACG - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 66 G7VδC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 33 acides aminés, 99 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
    158                                                                 173         176
N - Asn His Gln Asp His Asn Asn Phe Gln Thr Leu Pro Tyr Val Pro Ser Ser Thr Cys
5'- AAC CAT CAA GAC CAC AAC AAC TTC CAA ACA CTC CCC TAT GTT CCC AGC AGT ACA TGT
                    182             186             190
Glu Gly Asn Leu Ala Cys Leu Ser Leu Ser His Ile Glu Thr - C
GAA GGT AAT CTT GCA TGC TTA TCA CTC AGC CAT ATT GAG ACG - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 67 G4V

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 17 acides aminés, 51 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

```
    171     173         176                     182             186 187
N - Val Pro Cys Ser Thr Cys Glu Gly Asn Leu Ala Cys Leu Ser Leu Cys His - C
5'- GTT CCC TGC AGT ACA TGT GAA GGT AAT CTT GCA TGC TTA TCA CTC TGC CAT - 3'
```

Information pour la SEQ ID NO : 68 G4VôC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 17 acides aminés, 51 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

171 173 176 182 186 187
N - Val Pro Ser Ser Thr Cys Glu Gly Asn Leu Ala Cys Leu Ser Leu Ser His - C
5'- GTT CCC AGC AGT ACA TGT GAA GGT AAT CTT GCA TGC TTA TCA CTC AGC CAT - 3'

Information pour la SEQ ID NO : 69 G4'V

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 17 acides aminés

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

171 173 176 182 186 187
N - Val Pro Asp Ser Thr Asp Glu Gly Asn Leu Ala Orn Leu Ser Leu Orn His - C

Information pour la SEQ ID NO : 70 G4'VôC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 17 acides aminés

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

171 173 176 182 186 187
N - Val Pro Ser Ser Thr Asp Glu Gly Asn Leu Ala Orn Leu Ser Leu Ser His - C

Information pour la SEQ ID NO : 71 GLV

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 14 acides aminés, 42 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

174 176 182 186 187
N - Ser Thr Cys Glu Gly Asn Leu Ala Cys Leu Ser Leu Cys His - C
5'- AGT ACA TGT GAA GGT AAT CTT GCA TGC TTA TCA CTC TGC CAT - 3'

Information pour la SEQ ID NO : 72 GLVδC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 14 acides aminés

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

174 176 182 186 187
N - Ser Thr Cys Glu Gly Asn Leu Ala Cys Leu Ser Leu Ser His - C
5'- AGT ACA TGT GAA GGT AAT CTT GCA TGC TTA TCA CTC AGC CAT - 3'

Information pour la SEQ ID NO : 73 Gl'VôC

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 14 acides aminés

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

```
    174     176                     182             186 187
N - Ser Thr Asp Glu Gly Asn Leu Ala Orn Leu Ser Leu Ser His - C
```

Information pour la SEQ ID NO : 74 BB

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 219 acides aminés, 657 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
         1
BB = N - Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys
     5'- AAA TAT GGA GTA AGT GAC TAT TAC AAG AAT CTA ATC AAC AAT GCC AAA

 17
Thr Val Glu Gly Val Lys Asp Leu Gln Ala Gln Val Val Glu Ser Ala Lys Lys
ACT GTT GAA GGC GTA AAA GAC CTT CAA GCA CAA GTT GTT GAA TCA GCG AAG AAA

 35
Ala Arg Ile Ser Glu Ala Thr Asp Gly Leu Ser Asp Phe Leu Lys Ser Gln Thr
GCG CGT ATT TCA GAA GCA ACA GAT GGC TTA TCT GAT TTC TTG AAA TCA CAA ACA

 53
Pro Ala Glu Asp Thr Val Lys Ser Ile Glu Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala
CCT GCT GAA GAT ACT GTT AAA TCA ATT GAA TTA GCT GAA GCT AAA GTC TTA GCT
```

71
Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr His Lys Asn Leu Ile Asn
AAC AGA GAA CTT GAC AAA TAT GGA GTA AGT GAC TAT CAC AAG AAC CTA ATC AAC

89
Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Asp Leu Gln Ala Gln Val Val Glu Ser
AAT GCC AAA ACT GTT GAA GGT GTA AAA GAC CTT CAA GCA CAA GTT GTT GAA TCA

107
Ala Lys Lys Ala Arg Ile Ser Glu Ala Thr Asp Gly Leu Ser Asp Phe Leu Lys
GCG AAG AAA GCG CGT ATT TCA GAA GCA ACA GAT GGC TTA TCT GAT TTC TTG AAA

125
Ser Gln Thr Pro Ala Glu Asp Thr Val Lys Ser Ile Glu Leu Ala Glu Ala Lys
TCA CAA ACA CCT GCT GAA GAT ACT GTT AAA TCA ATT GAA TTA GCT GAA GCT AAA

143
Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn
GTC TTA GCT AAC AGA GAA CTT GAC AAA TAT GGA GTA AGT GAC TAT TAC AAG AAC

161
Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile
CTA ATC AAC AAT GCC AAA ACT GTT GAA GGT GTA AAA GCA CTG ATA GAT GAA ATT

179
Leu Ala Ala Leu Pro Lys Thr Asp Thr Tyr Lys Leu Ile Leu Asn Gly Lys Thr
TTA GCT GCA TTA CCT AAG ACT GAC ACT TAC AAA TTA ATC CTT AAT GGT AAA ACA

197
Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Arg Ser Phe
TTG AAA GGC GAA ACA ACT ACT GAA GCT GTT GAT GCT GCT ACT GCA AGA TCT TTC

215 219
Asn Phe Pro Ile Leu - C
AAT TTC CCT ATC CTC - 3'

Information pour la SEQ ID NO : 75 δBB = fragment de BB

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 108 acides aminés, 324 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

```
        1
δBB = N -Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr His Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys
     5'- AAA TAT GGA GTA AGT GAC TAT CAC AAG AAC CTA ATC AAC AAT GCC AAA
 17
 Thr Val Glu Gly Val Lys Asp Leu Gln Ala Gln Val Val Glu Ser Ala Lys Lys
 ACT GTT GAA GGT GTA AAA GAC CTT CAA GCA CAA GTT GTT GAA TCA GCG AAG AAA
 35
 Ala Arg Ile Ser Glu Ala Thr Asp Gly Leu Ser Asp Phe Leu Lys Ser Gln Thr
 GCG CGT ATT TCA GAA GCA ACA GAT GGC TTA TCT GAT TTC TTG AAA TCA CAA ACA
 53
 Pro Ala Glu Asp Thr Val Lys Ser Ile Glu Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala
 CCT GCT GAA GAT ACT GTT AAA TCA ATT GAA TTA GCT GAA GCT AAA GTC TTA GCT
 71
 Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn
 AAC AGA GAA CTT GAC AAA TAT GGA GTA AGT GAC TAT TAC AAG AAC CTA ATC AAC
 89
 Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala
 AAT GCC AAA ACT GTT GAA GGT GTA AAA GCA CTG ATA GAT GAA ATT TTA GCT GCA
 107 108
 Leu Pro - C
 TTA CCT - 3'
```

REVENDICATIONS

1. Polypeptide utilisable comme élément d'immunogène, caractérisé en ce qu'il est porté par la séquence peptidique comprise entre les résidus d'acides aminés 130 et 230 de la séquence de la protéine G du virus respiratoire syncytial humain du sous-groupe A et du sous-groupe B, ou du virus respiratoire syncytial bovin, ou par une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec ladite séquence peptidique.

2. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comporte la séquence peptidique comprise entre les résidus aminoacides numérotés 174 et 187 de la protéine G du VRS ou une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec la séquence correspondante.

3. Polypeptide selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence dans laquelle :

a) l'acide aminé Cys en positions 173 et/ou 186 à été remplacé par un aminoacide ne formant pas de pont disulfure en particulier la serine, et/ou

b) les acides aminés en positions 176 et 182 sont susceptibles de former un pont covalent autre qu'un pont disulfure notamment l'acide aspartique et l'ornithine.

4. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il consiste en une séquence peptidique comprise entre les résidus aminoacides numérotés 140 et 200 de la séquence de la protéine G du VRS ou en une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec ladite séquence peptidique.

5. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il consiste en une séquence peptidique comprise entre les résidus aminoacides numérotés 158 et 190 de la séquence de la protéine G du virus VRS ou en une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec ladite séquence peptidique.

6. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il consiste en la séquence peptidique comprise entre les résidus aminoacides numérotés 130 et 230 de la séquence de la protéine G du VRS humain, sous-groupe A et sous-groupe B ou du VRS bovin, ou en une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec ladite séquence peptidique.

7. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il présente l'une des séquences suivantes :

Seq id n° 5 :

Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys.

Seq id n° 6 :

Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys.

Seq id n° 7 :

Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Ser Lys.

Seq id n° 8 :

Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Ser Lys.

Seq id n° 9 :

Ser Ile Asp Ser Asn Asn Pro Thr Orn Trp Ala Ile Cys Lys.

Seq id n° 10 :

Ser Ile Asp Gly Asn Asn Gln Leu Orn Lys Ser Ile Cys Lys.

Seq id n° 11 :

Ser Ile Asp Ser Asn Asn Pro Thr Orn Trp Ala Ile Ser Lys.

Seq id n° 12 :

Ser Ile Asp Gly Asn ASn Gln Leu Orn Lys Ser Ile Ser Lys.

8. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il présente l'une des séquences ID n° 14 à 73.

9. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il comporte en outre au moins un résidu cystéine en position N-terminale ou C- terminale.

10. Agent immunogène, caractérisé en ce qu'il comporte un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 9 couplé à une protéine porteuse.

11. Agent immunogène selon la revendication 10, caractérisée en ce que la protéine porteuse est une protéine adjuvante d'immunité.

12. Agent immunogène selon l'une des revendications 10 et 11, caractérisé en ce que la protéine porteuse est une protéine OmpA.

13. Agent selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisé en ce que le polypeptide est sous forme d'un conjugué soluble avec une protéine de la membrane externe d'une bactérie du genre Klebsiella.

14. Agent selon l'une des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que la protéine adjuvante d'immunité est la protéine p40 de Klebsiella pneumoniae ou une protéine présentant 80% d'homologie avec la protéine p40.

15. Agent selon l'une des revendications 10 à 14, caractérisé en ce que le polypeptide est conjugué à la protéine porteuse par une protéine de liaison.

16. Agent selon la revendication 15, caractérisé en ce que la protéine de liaison est le récepteur de la sérumalbumine humaine.

17. Agent selon l'une des revendications 10 à 16, caractérisée en ce que ledit polypeptide est couplé à une protéine comportant la séquence id n° 13.

18. Agent selon l'une des revendications 10 à 17, caractérisé en ce que le couplage est un couplage covalent.

19. Agent selon l'une des revendications 10 à 18, caractérisé en ce qu'il est obtenu par voie biologique.

20. Composition utile pour la prévention et/ou le traitement des affections provoquées par le VRS humain, sous-groupe A et/ou sous-groupe B, ou le VRS bovin caractérisée en ce qu'elle contient un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 9 ou un agent selon l'une des revendications 10 à 19.

21. Composition selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'elle contient en outre des excipients pharmaceutiquement acceptables adaptés à l'administration par voie injectable.

22. Composition selon l'une des revendications 20 ou 21, caractérisée en ce qu'elle comporte un adjuvant d'immunité non spécifique.

23. Séquence nucléotidique, caractérisée en ce qu'elle code pour un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 9.

24. Séquence nucléotidique, caractérisée en ce qu'elle code pour une protéine comportant la séquence id n° 13.

25. Procédé de préparation d'un peptide conjugué entrant dans une composition selon l'une des revendications 20 ou 21, caractérisé en ce que :

a) on précipite les lipopolysaccharides de membranes de bactéries du genre Klebsiella, en présence d'un sel de cation divalent et de détergents, pour récupérer les protéines membranaires totales dans le surnageant,

b) on soumet les protéines à une chromatographie par échange d'anions pour séparer la fraction contenant la protéine adjuvante d'immunité,

c) on concentre la fraction contenant la protéine adjuvante d'immunité,

d) on conjugue la protéine adjuvante d'immunité avec un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 9 pour former un conjugué soluble.

26. Procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce que l'étape d) est effectuée en présence de glutaraldéhyde à des concentrations inférieures ou égales à 0,05% et durant une période supérieure ou égale à 5 jours.

27. Utilisation d'une protéine présentant la séquence id n° 13 ou une séquence présentant au moins 80% d'homologie, pour améliorer l'immunogénicité d'un antigène.

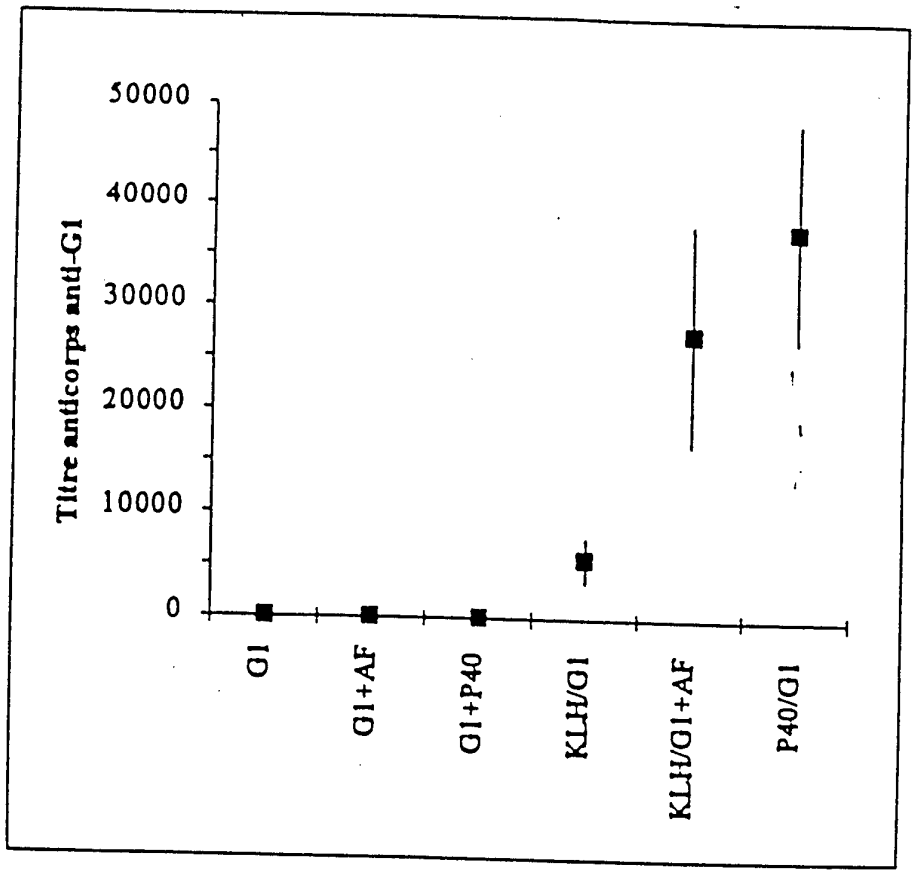
Titre anticorps anti-G1
50000
40000
30000
20000
10000
0
G1
G1+AF
G1+P40
KLH/G1
KLH/G1+AF
P40/G1

Figure 1

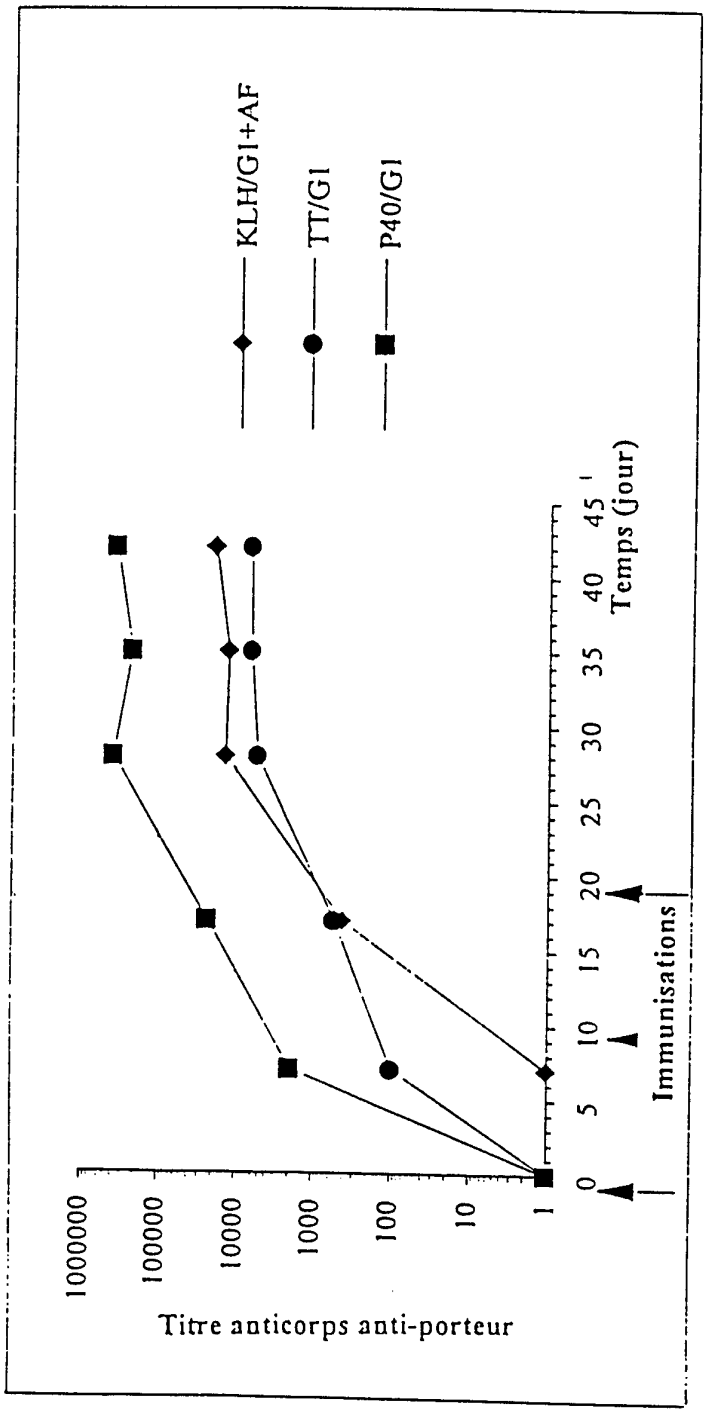
KLH/G1+AF
TT/G1
P40/G1
Titre anticorps anti-porteur
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Temps (jour)
Immunisations

FIG. 2

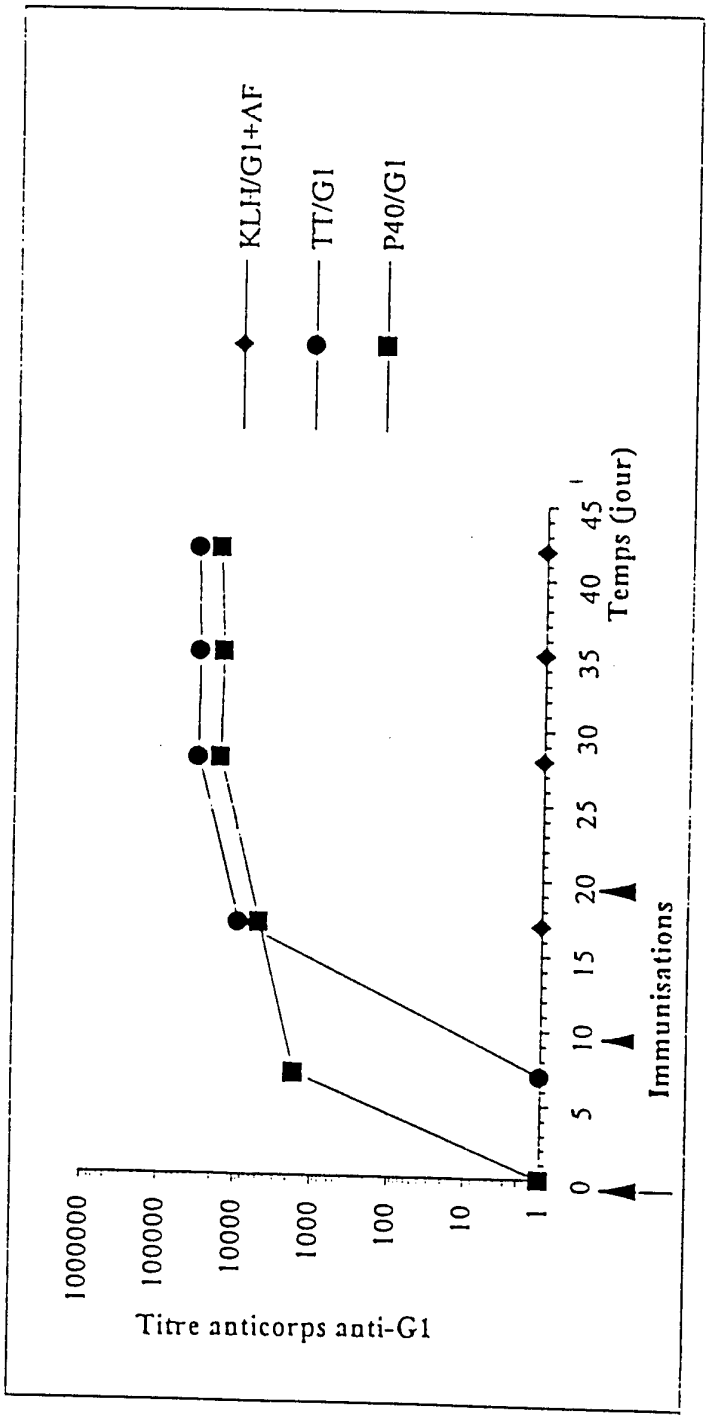
KLH/G1+AF
TT/G1
P40/G1
Temps (jour)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Immunisations
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
Titre anticorps anti-G1

FIG. 3

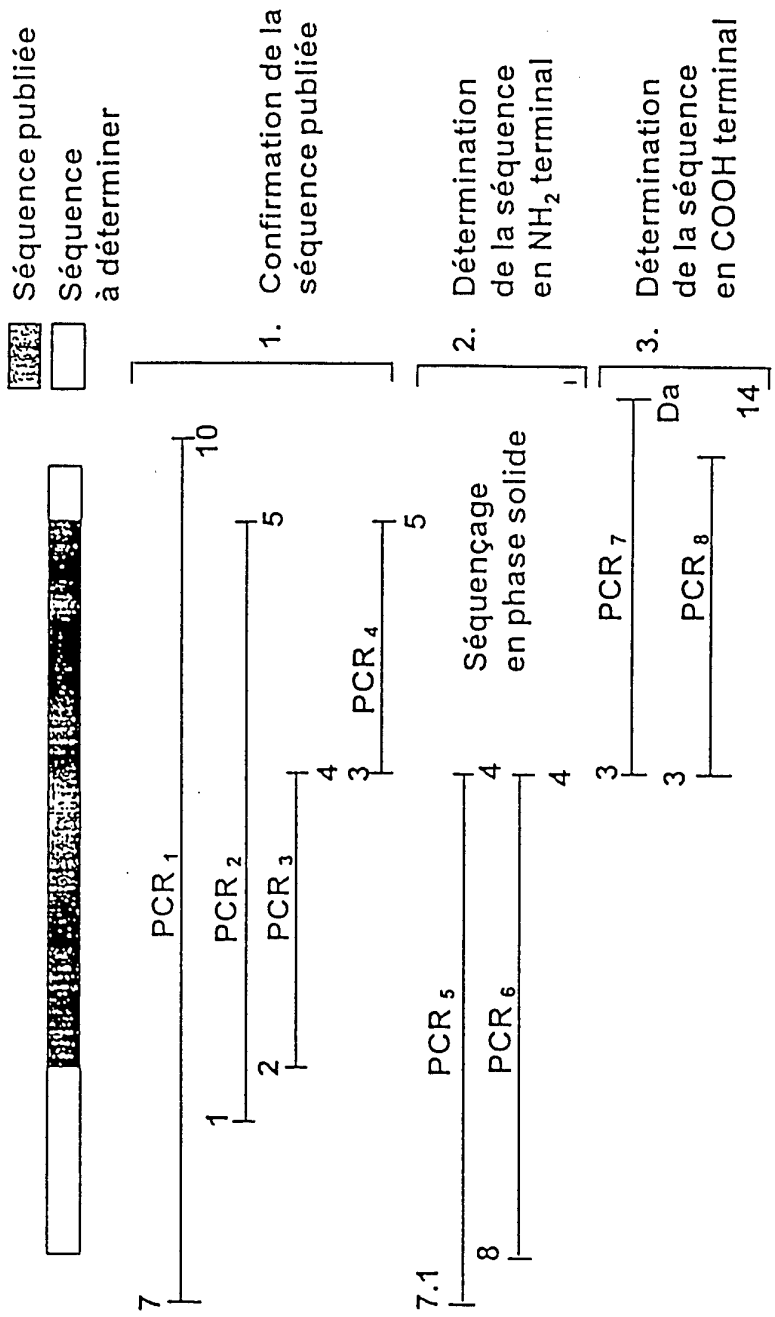
Séquence publiée
Séquence à déterminer
1. Confirmation de la séquence publiée
2. Détermination de la séquence en NH_2 terminal
3. Détermination de la séquence en COOH terminal
Séquençage en phase solide
PCR 1
PCR 2
PCR 3
PCR 4
PCR 5
PCR 6
PCR 7
PCR 8
Da
7
10
1
5
2
4
3
5
7.1
8
4
4
3
3
14

FIG. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter ›nal Application No
PCT/FR 95/00444

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/45 C12N15/31 C07K14/135 C07K14/26 C07K14/765
A61K39/155 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO-A-92 20805 (PIERRE FABRE MEDICAMENT) 26 November 1992 see claims; example III	1-16, 18-23
X	WO-A-89 05823 (THE UPJOHN COMPANY) 29 June 1989 see page 5, line 21 - line 26 see page 13, line 1 - line 15 see page 13, line 25 - page 14, line 9; claims; examples	1-6,10, 18-21,23
X	WO-A-93 14207 (CONNAUGHT LABORATORIES LIMITED) 22 July 1993 see claims; figures 7,8; examples 1,15-18	1,2,10, 11,18-23

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

3

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 August 1995	11.09.95
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Fuhr, C

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A. (1987), 84(18), 6572-6 CODEN: PNASA6;ISSN: 0027-8424, 1987 NORRBY, ERLING ET AL 'Site-directed serology with synthetic peptides representing the large glycoprotein G of respiratory syncytial virus' see peptide 12 see page 6576, left column, paragraph 3 - paragraph 4; figure 1; table 1	1-9
X	JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, vol. 137, no. 8, August 1991 pages 1911-1921, J.G. LAWRENCE ET AL. 'Molecular and evolutionary relationship among enteric bacteria' see figure 1	24,27
A	WO-A-92 04375 (THE UPJOHN COMPANY) 19 March 1992 see claims; examples	1-8,10, 11,20-23
A	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 63, no. 2, February 1989 pages 925-932, B. GARCIA-BARRENO ET AL. 'Marked Differences in the Antigenic Structure of Human Respiratory Syncytical Virus F and G Glycoproteins' * Discussion page 931 *	1-8
A	EP-A-0 355 737 (BEHRINGWERKE) 28 February 1990 see the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR95/00444

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.: 27
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Remark: Although Claim 27 is directed to a method for treatment of the human or animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the product (composition).

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inte onal Application No
PCT/FR 95/00444

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9220805	26-11-92	AU-A-	1789992	30-12-92
		CA-A-	2103021	01-12-92
		EP-A-	0584167	02-03-94
		JP-T-	7502640	23-03-95
		OA-A-	9866	15-08-94
WO-A-8905823	29-06-89	AU-A-	2785089	19-07-89
		CA-A-	1320163	13-07-93
		DE-A-	3878468	25-03-93
		EP-A,B	0396563	14-11-90
		US-A-	5194595	16-03-93
		US-A-	5288630	22-02-94
WO-A-9314207	22-07-93	AU-B-	3340293	03-08-93
		CA-A-	2126863	22-07-93
		EP-A-	0621898	02-11-94
		FI-A-	943211	02-09-94
		JP-T-	7501707	23-02-95
		NO-A-	942530	05-09-94
WO-A-9204375	19-03-92	AT-T-	107661	15-07-94
		AU-A-	8298291	30-03-92
		DE-D-	69102649	28-07-94
		DE-T-	69102649	03-11-94
		EP-A-	0545951	16-06-93
		ES-T-	2055610	16-08-94
		JP-T-	6500536	20-01-94
EP-A-0355737	28-02-90	DE-A-	3828666	01-03-90
		AU-B-	614174	22-08-91
		AU-A-	4016089	01-03-90
		JP-A-	2135095	23-05-90

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der e Internationale No
PCT/FR 95/00444

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/45 C12N15/31 C07K14/135 C07K14/26 C07K14/765
A61K39/155 A61K47/48

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12N C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO-A-92 20805 (PIERRE FABRE MEDICAMENT) 26 Novembre 1992 voir revendications; exemple III ---	1-16, 18-23
X	WO-A-89 05823 (THE UPJOHN COMPANY) 29 Juin 1989 voir page 5, ligne 21 - ligne 26 voir page 13, ligne 1 - ligne 15 voir page 13, ligne 25 - page 14, ligne 9; revendications; exemples ---	1-6,10, 18-21,23
X	WO-A-93 14207 (CONNAUGHT LABORATORIES LIMITED) 22 Juillet 1993 voir revendications; figures 7,8; exemples 1,15-18 --- -/--	1,2,10, 11,18-23

[X] Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

[X] Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
28 Août 1995	11. 09. 95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Fuhr, C

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A. (1987), 84(18), 6572-6 CODEN: PNASA6;ISSN: 0027-8424, 1987 NORRBY, ERLING ET AL 'Site-directed serology with synthetic peptides representing the large glycoprotein G of respiratory syncytial virus' see peptide 12 voir page 6576, colonne de gauche, alinéa 3 - alinéa 4; figure 1; tableau 1	1-9
X	JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, vol. 137, no. 8, Août 1991 pages 1911-1921, J.G. LAWRENCE ET AL. 'Molecular and evolutionary relationship among enteric bacteria' voir figure 1	24,27
A	WO-A-92 04375 (THE UPJOHN COMPANY) 19 Mars 1992 voir revendications; exemples	1-8,10, 11,20-23
A	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 63, no. 2, Février 1989 pages 925-932, B. GARCIA-BARRENO ET AL. 'Marked Differences in the Antigenic Structure of Human Respiratory Syncytical Virus F and G Glycoproteins' * la Discussion page 931 *	1-8
A	EP-A-0 355 737 (BEHRINGWERKE) 28 Février 1990 voir le document en entier	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR95/00444

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. [X] Les revendications n°s 27
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:

Remarque: Bien que le revendication 27 pour autant qu'elle concernet une methode de traitement du corps humain/animal, la recherche a ete effect uee et basee sur les effets imputes au produit (a la composition)

2. [ ] Les revendications n°s
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:

3. [ ] Les revendications n°s
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. [ ] Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.

2. [ ] Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.

3. [ ] Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s:

4. [ ] Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couvertes par les revendications n°s:

Remarque quant à la réserve

[ ] Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.

[ ] Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs a... membres de familles de brevets

De ie Internationale No
PCT/FR 95/00444

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO-A-9220805	26-11-92	AU-A-	1789992	30-12-92
		CA-A-	2103021	01-12-92
		EP-A-	0584167	02-03-94
		JP-T-	7502640	23-03-95
		OA-A-	9866	15-08-94
WO-A-8905823	29-06-89	AU-A-	2785089	19-07-89
		CA-A-	1320163	13-07-93
		DE-A-	3878468	25-03-93
		EP-A,B	0396563	14-11-90
		US-A-	5194595	16-03-93
		US-A-	5288630	22-02-94
WO-A-9314207	22-07-93	AU-B-	3340293	03-08-93
		CA-A-	2126863	22-07-93
		EP-A-	0621898	02-11-94
		FI-A-	943211	02-09-94
		JP-T-	7501707	23-02-95
		NO-A-	942530	05-09-94
WO-A-9204375	19-03-92	AT-T-	107661	15-07-94
		AU-A-	8298291	30-03-92
		DE-D-	69102649	28-07-94
		DE-T-	69102649	03-11-94
		EP-A-	0545951	16-06-93
		ES-T-	2055610	16-08-94
		JP-T-	6500536	20-01-94
EP-A-0355737	28-02-90	DE-A-	3828666	01-03-90
		AU-B-	614174	22-08-91
		AU-A-	4016089	01-03-90
		JP-A-	2135095	23-05-90