

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
22 juin 2006 (22.06.2006)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2006/064121 A2

(51) Classification internationale des brevets :  
C07K 16/28 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2005/003123

(22) Date de dépôt international :  
14 décembre 2005 (14.12.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
0413320 15 décembre 2004 (15.12.2004) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES** [FR/FR]; 3, avenue des Tropiques, ZA de Courtaboeuf, F-91940 Les Ulis (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **DE ROMEUF, Christophe** [FR/FR]; 14, avenue de l'amiral Courbet, F-59130 Lambersart (FR). **GAUCHER, Christine** [FR/FR]; 32, rue des mésanges, F-59320 Sequedin (FR). **TEILLAUD, Jean-Luc** [FR/FR]; 41, rue des Archives, F-75004 Paris (FR). **PROST, Jean-François** [FR/FR]; 20, rue Albert Joly, F-78000 Versailles (FR).

(74) Mandataire : **CABINET LEPEUDRY**; 43, rue de la Brèche aux Loups, F-75012 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport
- avec une (des) indication(s) relative(s) à du matériel biologique déposé, fournie(s) selon la règle 13bis, séparément, et non avec la description

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

(54) Title: CYTOTOXIC ANTIBODY DIRECTED AGAINST TYPE B LYMPHOID HEMATOPOIETIC PROLIFERATIONS

(54) Titre : ANTICORPS CYTOTOXIQUE DIRIGÉ CONTRE LES PROLIFÉRATIONS HEMATOPOÏÉTIQUES LYMPHOÏDES DE TYPE B

(57) Abstract: The invention concerns a monoclonal antibody directed against the CD20 antigen, whereof the variable region of each of the light chains is encoded by a sequence having at least 70 % identity with the murine nucleic acid sequence SEQ ID NO: 5, the variable region of each of the heavy chains is encoded by a sequence having at least 70 % identity with the murine nucleic acid sequence SEQ ID NO: 7 and the constant regions of light chains and of heavy chains are constant regions derived from a non-murine species. The invention also concerns the use of said antibody to activate FcγRIII receptors of immune effector cells, and for making a drug, in particular for treating leukemia or a lymphoma.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène CD20, dont la région variable de chacune des chaînes légères est codée par une séquence possédant au moins 70% d'identité avec la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 5, la région variable de chacune des chaînes lourdes est codée par une séquence possédant au moins 70% d'identité avec la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 7 et les régions constantes des chaînes légères et des chaînes lourdes sont des régions constantes provenant d'une espèce non-murine, ainsi qu'à l'utilisation de cet anticorps pour activer les récepteurs FcγRIII de cellules immunitaires effectrices, et pour la fabrication d'un médicament, notamment destiné au traitement d'une leucémie ou d'un lymphome.

WO 2006/064121 A2

**ANTICORPS CYTOTOXIQUE DIRIGE CONTRE LES PROLIFERATIONS  
HEMATOPOÏETIQUES LYMPHOÏDES DE TYPE B**

La présente invention se rapporte à un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène CD20, dont la région variable de chacune des chaînes légères est codée par une séquence possédant au moins 70% d'identité avec la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 5, la région variable de chacune des chaînes lourdes est codée par une séquence possédant au moins 70% d'identité avec la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 7, et les régions constantes des chaînes légères et des chaînes lourdes sont des régions constantes provenant d'une espèce non-murine, ainsi qu'à l'utilisation de cet anticorps pour activer les récepteurs FcγRIII de cellules immunitaires effectrices, et pour la fabrication d'un médicament, notamment destiné au traitement d'une leucémie ou d'un lymphome.

**Introduction et art antérieur**

L'antigène CD20 est une protéine transmembranaire hydrophobe d'un poids moléculaire de 35-37 kDa présente à la surface des lymphocytes B matures (Valentine et al. 1987 *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(22):8085-9 ; Valentine et al. 1989 *J.Biol. Chem.* 264(19):11282-11287). Il est exprimé au cours du développement des lymphocytes B dès le stade pré-B précoce et ce jusqu'à la différenciation en plasmocyte; stade où cette expression disparaît. L'antigène CD20 est présent à la fois sur les lymphocytes B normaux et sur les cellules B malignes. Plus particulièrement, l'antigène CD20 est exprimé sur la plupart des lymphomes de phénotype B (80% des lymphomes) : il est exprimé par exemple sur plus de 90%

des lymphomes non-Hodgkiniens (NHL) de lymphocytes B, et sur plus de 95% des Leucémies Lymphoïdes Chroniques de type B (LLC-B). L'antigène CD20 n'est pas exprimé sur les cellules souches hématopoïétiques ni sur les plasmocytes.

La fonction du CD20 n'est pas encore totalement élucidée, mais il pourrait agir comme un canal calcique et intervenir dans la régulation des premières étapes de la différenciation (Golay et al. 1985 *J Immunol.* ;135(6):3795-801) et de la prolifération (Tedder et al. 1986 *Eur J Immunol.* 1986 Aug;16(8):881-7) des lymphocytes B.

Ainsi, bien qu'il subsiste des incertitudes quant à son rôle dans l'activation et la prolifération des lymphocytes B, l'antigène CD20 est, de par sa localisation, une cible importante pour le traitement des pathologies impliquant des lymphocytes B tumoraux, comme par exemple les NHL ou la LLC-B par des anticorps reconnaissant spécifiquement le CD20. De plus, cet antigène est une cible idéale car il s'agit d'une protéine membranaire pour laquelle on ne connaît pas de modulation d'expression ou de polymorphisme.

Un seul anticorps monoclonal anti-CD20 non radiomarqué, le Rituxan® (Genentech), est actuellement disponible sur le marché pour le traitement des lymphomes de cellules B. Il montre chez les patients atteints de NHL des résultats cliniques encourageants lorsqu'il est associé à une chimiothérapie. Toutefois, son efficacité reste variable et souvent modeste lorsqu'il est utilisé comme agent unique (Teeling et al. 2004 *Blood* 104(6):1793-800).

Par ailleurs, le Rituxan® n'a qu'un effet modeste sur les lymphocytes B de LLC-B. Cette faible efficacité est liée à différents phénomènes : d'une part, les lymphocytes B de LLC-B n'expriment le CD20 qu'en quantité relativement faible, d'autre part, le Rituxan® n'induit qu'une très

faible activité ADCC (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity) vis à vis de ces cellules in vitro. Ces deux observations pourraient expliquer la corrélation constatée entre le degré d'expression du CD20 sur la tumeur (en cytométrie de flux quantitative) et la réponse au traitement.

La LLC-B étant la forme de leucémie la plus fréquente dans les pays occidentaux, avec des traitements lourds par chimiothérapie parfois insuffisants, comportant des effets secondaires qui aboutissent à une aplasie des cellules hématopoïétiques et à un déficit immunitaire, les anticorps monoclonaux apparaissent comme un recours innovant. Il est donc de première importance de mettre au point des anticorps capables de cibler spécifiquement l'antigène CD20 et permettant de détruire les cellules tumorales n'exprimant que faiblement cet antigène comme la LLC-B.

Les anticorps 2F2 et 7D8 proposés par Genmab (Teeling et al. 2004 *Blood* 104(6):1793-800) pour traiter la LLC-B possèdent une capacité à activer le complément supérieure à celle engendrée par le Rituxan®. Toutefois, ces anticorps possèdent une activité ADCC faible, similaire au Rituxan®. Or, certains cliniciens montrent que l'activité complément est la cause d'effets secondaires délétères car les anticorps déclenchent alors un système d'activation conduisant à la production de molécules (notamment d'anaphylatoxines) ayant un large spectre d'activités non spécifiques (réactions inflammatoire, allergiques, vasculaires...). De plus, ces anticorps en sont encore au stade de la recherche, et leur efficacité clinique est encore à évaluer.

Le Demandeur, dans sa demande FR03/02713 (WO 2004/029092), décrit un anticorps anti-CD20, susceptible d'être produit dans la lignée YB2/0, sélectionné pour ses capacités à induire une forte ADCC et un fort taux de

production d'IL-2 par la cellule Jurkat-CD16 en comparaison avec le Rituxan®. En effet, il existe un besoin important de nouveaux anticorps anti-CD20, permettant d'élargir la gamme de traitement de maladies des lymphocytes B par immunothérapie actuellement proposée, tout particulièrement pour les pathologies des lymphocytes B dans lesquelles l'antigène CD20 est faiblement exprimé sur les populations de lymphocytes B impliquées et pour lesquelles un traitement par immunothérapie satisfaisant n'existe pas.

C'est dans ce but que le Demandeur a mis au point de nouveaux anticorps anti-CD20, présentant une activité ADCC particulièrement élevée comparée au Rituxan®.

#### Description

Un premier objet de l'invention se rapporte ainsi à un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène CD20, dont la région variable de chacune des chaînes légères est codée par une séquence possédant au moins 70% d'identité avec la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 5, la région variable de chacune des chaînes lourdes est codée par une séquence possédant au moins 70% d'identité avec la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 7, et les régions constantes des chaînes légères et des chaînes lourdes sont des régions constantes provenant d'une espèce non-murine.

Les anticorps sont constitués de chaînes lourdes et de chaînes légères, liées entre elles par des ponts disulfures. Chaque chaîne est constituée, en position N-terminale, d'une région (ou domaine) variable (codée par les gènes réarrangés V-J pour les chaînes légères et V-D-J pour les chaînes lourdes) spécifique de l'antigène contre lequel l'anticorps est dirigé, et en position C-terminale, d'une région constante, constituée d'un seul

domaine CL pour les chaînes légères ou de plusieurs domaines pour les chaînes lourdes.

Aux fins de l'invention, les expressions « anticorps monoclonal » ou « composition d'anticorps monoclonal » se réfèrent à une préparation de molécules d'anticorps possédant une spécificité identique et unique.

L'anticorps selon l'invention, dont les régions variables des chaînes légères et lourdes appartiennent à une espèce différente des régions constantes des chaînes légères et des chaînes lourdes, est qualifié d'anticorps « chimérique ».

Les séquences d'acide nucléique murines SEQ ID NO : 5 et SEQ ID NO : 7 codent pour le domaine variable de chacune des chaînes légères et le domaine variable de chacune des chaînes lourdes respectivement de l'anticorps produit par l'hybridome murin CAT-13.6E12, disponible à la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) sous le numéro ACC 474. Cet hybridome produit un anticorps monoclonal murin de type IgG2a, $\kappa$  dirigé contre le CD20.

Ces séquences murines ont été choisies pour dériver les séquences des régions variables des anticorps selon l'invention en raison de la spécificité de l'anticorps murin CAT-13.6E12 pour l'antigène CD20, antigène également reconnu par Rituxan®. Les régions variables des anticorps selon l'invention comportent au moins 70% d'identité avec les séquences SEQ ID NO : 5 et SEQ ID NO : 7, cette identité de séquences conférant une identité de spécificité des anticorps selon l'invention avec l'anticorps murin CAT-13.6E12. De préférence, cette identité de séquences confère également une identité d'affinité pour la cible entre l'anticorps selon l'invention et l'anticorps murin CAT-13.6E12.

De plus, le Demandeur a montré de manière surprenante que l'anticorps murin CAT-13.6E12 possède la capacité

d'induire la sécrétion d'IL-2 en présence de cellules Jurkat-CD16 exprimant les ectodomains du récepteur FcγRIIIA (comme cela est illustré dans la Figure 11), indiquant une forte fixation de l'anticorps murin avec le CD16 (FcγRIIIA) humain, ce qui a encore motivé le Demandeur dans son choix.

Les anticorps selon l'invention possèdent en outre des régions constantes de ses chaînes légères et lourdes appartenant à une espèce non-murine. A cet égard, toutes les familles et espèces de mammifères non-murins sont susceptibles d'être utilisées, et en particulier l'homme, le singe, les muridés (sauf la souris), les suidés, les bovidés, les équidés, les félidés, les canidés, par exemple, ainsi que les oiseaux.

Les anticorps selon l'invention peuvent être construits en utilisant les techniques standard de l'ADN recombinant, bien connues de l'homme du métier, et plus particulièrement en utilisant les techniques de construction des anticorps « chimériques » décrites par exemple dans Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, pp. 6851-55 (1984), où la technologie de l'ADN recombinant est utilisée pour remplacer la région constante d'une chaîne lourde et/ou la région constante d'une chaîne légère d'un anticorps provenant d'un mammifère non-humain avec les régions correspondantes d'une immunoglobuline humaine. Un mode de réalisation particulier sera illustré plus loin.

De manière avantageuse, la région variable de chacune des chaînes légères de l'anticorps selon l'invention est codée par une séquence possédant au moins 80% d'identité avec la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 5, et la région variable de chacune des chaînes lourdes de l'anticorps selon l'invention est codée par une séquence possédant au moins 80% d'identité avec la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 7.

De manière avantageuse, la région variable de chacune des chaînes légères de l'anticorps selon l'invention est codée par une séquence possédant au moins 90% d'identité avec la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 5, et la région variable de chacune des chaînes lourdes de l'anticorps selon l'invention est codée par une séquence possédant au moins 90% d'identité avec la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 7.

De manière avantageuse, la région variable de chacune des chaînes légères de l'anticorps selon l'invention est codée par une séquence possédant au moins 95% d'identité avec la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 5, et la région variable de chacune des chaînes lourdes de l'anticorps selon l'invention est codée par une séquence possédant au moins 95% d'identité avec la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 7.

De manière avantageuse, la région variable de chacune des chaînes légères de l'anticorps selon l'invention est codée par une séquence possédant au moins 99% d'identité avec la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 5, et la région variable de chacune des chaînes lourdes de l'anticorps selon l'invention est codée par une séquence possédant au moins 99% d'identité avec la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 7.

Avantageusement, l'invention s'entend aussi de tout anticorps possédant des régions variables de leur chaînes lourdes et légères présentant une ou plusieurs substitution(s), insertion(s) ou délétion(s) d'un ou plusieurs acides nucléiques, ces modifications de séquences répondant aux pourcentages d'identités de séquences tels que définis ci-dessus, et n'altérant ni la spécificité de l'anticorps pour sa cible, ni son affinité pour sa cible.

Les anticorps de l'invention s'entendent aussi de tout anticorps possédant les régions CDR (Complementary

Determining Region) de l'anticorps CAT-13.6E12, associées à des régions FR (framework, régions très conservées des régions variables, nommées aussi "charpente"). De tels anticorps possèdent une affinité et une spécificité très comparables, de préférence identiques, à l'anticorps murin CAT-13.6E12.

De manière préférée, la région variable de chacune des chaînes légères de l'anticorps selon l'invention est codée par la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 5 ou par la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 25, et la région variable de chacune des chaînes lourdes de l'anticorps selon l'invention est codée par la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 7.

Dans un premier mode de réalisation de l'invention, un anticorps selon l'invention est donc un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène CD20, dont la région variable de chacune des chaînes légères est codée par la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 5, la région variable de chacune des chaînes lourdes est codée par la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 7, et les régions constantes des chaînes légères et des chaînes lourdes sont des régions constantes provenant d'une espèce non-murine.

Dans un deuxième mode de réalisation, l'anticorps selon l'invention est donc un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène CD20, dont la région variable de chacune des chaînes légères est codée par la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 25, la région variable de chacune des chaînes lourdes est codée par la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 7, et les régions constantes des chaînes légères et des chaînes lourdes sont des régions constantes provenant d'une espèce non-murine.

Les anticorps des deux modes de réalisation diffèrent dans leur séquence nucléotidique par un seul nucléotide :

le nucléotide situé en position 318 des séquences SEQ ID NO : 5 et SEQ ID NO : 25, qui correspond respectivement à une cytosine et à une adénine.

Les anticorps de l'invention répondant à chacun de ces modes de réalisation possèdent une spécificité comparable, de préférence identique par rapport à l'antigène cible, le CD20, ainsi qu'une affinité comparable, de préférence identique par rapport au CD20.

De manière préférée, les régions constantes de chacune des chaînes légères et de chacune des chaînes lourdes de l'anticorps selon l'invention sont des régions constantes humaines. Ce mode de réalisation préféré de l'invention permet de diminuer l'immunogénicité de l'anticorps chez l'homme et par là même d'améliorer son efficacité lors de son administration thérapeutique chez l'homme.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, la région constante de chacune des chaînes légères de l'anticorps selon l'invention est de type  $\kappa$ . Tout allotype convient à la réalisation de l'invention, par exemple Km(1), Km(1, 2), Km(1, 2, 3) ou Km(3) mais l'allotype préféré est Km(3).

Dans un autre mode de réalisation complémentaire, la région constante de chacune des chaînes légères de l'anticorps selon l'invention est de type  $\lambda$ .

Dans un aspect particulier de l'invention, et notamment lorsque les régions constantes de chacune des chaînes légères et de chacune des chaînes lourdes de l'anticorps selon l'invention sont des régions humaines, la région constante de chacune des chaînes lourdes de l'anticorps est de type  $\gamma$ . Selon cette variante, la région constante de chacune des chaînes lourdes de l'anticorps peut être de type  $\gamma_1$ , de type  $\gamma_2$ , de type  $\gamma_3$ , ces trois types de régions constantes présentant la particularité de fixer le complément humain, ou encore de type  $\gamma_4$ . Les anticorps

possédant une région constante de chacune des chaînes lourdes de type  $\gamma$  appartiennent à la classe des IgG. Les immunoglobulines de type G (IgG), sont des hétérodimères constitués de 2 chaînes lourdes et de 2 chaînes légères, liées entre elles par des ponts disulfures. Chaque chaîne est constituée, en position N-terminale, d'une région ou domaine variable (codée par les gènes réarrangés V-J pour la chaîne légère et V-D-J pour la chaîne lourde) spécifique de l'antigène contre lequel l'anticorps est dirigé, et en position C-terminale, d'une région constante, constituée d'un seul domaine CL pour la chaîne légère ou de 3 domaines (CH1, CH2 et CH3) pour la chaîne lourde. L'association des domaines variables et des domaines CH<sub>1</sub> et CL des chaînes lourdes et légères forme les parties Fab, qui sont connectées à la région Fc par une région charnière très flexible permettant à chaque Fab de se fixer à sa cible antigénique tandis que la région Fc, médiatrice des propriétés effectrices de l'anticorps, reste accessible aux molécules effectrices telles que les récepteurs Fc $\gamma$ R et le C1q. La région Fc, constituée des 2 domaines globulaires CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub>, est glycosylée au niveau du domaine CH<sub>2</sub> avec la présence, sur chacune des 2 chaînes, d'un N-glycane biantenné de type lactosaminique, lié à l'Asn 297.

De manière préférée, la région constante de chacune des chaînes lourdes de l'anticorps est de type  $\gamma$ 1, car un tel anticorps montre une capacité à engendrer une activité ADCC chez le plus grand nombre d'individus (humains). A cet égard, tout allotype convient à la réalisation de l'invention, par exemple G1m(3), G1m (1, 2, 17), G1m(1, 17) ou G1m(1,3). De manière préférentielle, l'allotype est G1m(1,17).

Dans un aspect particulier de l'invention, la région constante de chacune des chaînes lourdes de l'anticorps est de type  $\gamma$ 1, et elle est codée par la séquence d'acide

nucléique humaine SEQ ID NO : 23, la région constante de chacune de ses chaînes légères étant codée par la séquence d'acide nucléique humaine SEQ ID NO : 21. Ainsi, un tel anticorps possède une région variable murine et une région constante humaine, avec des chaînes lourdes de type  $\gamma 1$ . Cet anticorps appartient donc à la sous-classe des IgG1. Selon le mode de réalisation de l'anticorps selon l'invention, l'anticorps possède deux chaînes légères dont le domaine variable est codé par la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 5 ou par la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 25 et la région constante humaine est codée par la séquence d'acide nucléique SEQ ID NO : 21, et deux chaînes lourdes dont le domaine variable est codé par la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 7 et la région constante est codée par la séquence d'acide nucléique humaine SEQ ID NO : 23.

De manière préférentielle, chacune des chaînes légères de l'anticorps selon l'invention est codée par la séquence d'acide nucléique chimère murine-humaine SEQ ID NO : 13 ou par la séquence d'acide nucléique chimère murine-humaine SEQ ID NO : 27, et chacune des chaînes lourdes est codée par la séquence d'acide nucléique chimère murine-humaine SEQ ID NO : 19. La séquence d'acide nucléique chimère murine-humaine SEQ ID NO : 13 codant pour chacune des chaînes légères de l'anticorps est obtenue par fusion de la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 5 codant pour le domaine variable de chacune des chaînes légères de l'anticorps et de la séquence d'acide nucléique humaine SEQ ID NO : 21 codant pour la région constante de chacune des chaînes légères de l'anticorps.

La séquence d'acide nucléique chimère murine-humaine SEQ ID NO : 27 codant pour chacune des chaînes légères de l'anticorps est obtenue par fusion de la séquence d'acide

nucléique murine SEQ ID NO : 25 codant pour le domaine variable de chacune des chaînes légères de l'anticorps et de la séquence d'acide nucléique humaine SEQ ID NO : 21 codant pour la région constante de chacune des chaînes légères de l'anticorps.

La séquence d'acide nucléique chimère murine-humaine SEQ ID NO : 19 codant pour chacune des chaînes lourdes de l'anticorps est obtenue par fusion de la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 7 codant pour le domaine variable de chacune des chaînes lourdes de l'anticorps et de la séquence d'acide nucléique humaine SEQ ID NO : 23 codant pour la région constante de chacune des chaînes lourdes de l'anticorps.

Dans un aspect particulier de l'invention, lorsque chacune des chaînes légères de l'anticorps est codée par la séquence d'acide nucléique chimère murine-humaine SEQ ID NO : 13, et que chacune des chaînes lourdes est codée par la séquence d'acide nucléique chimère murine-humaine SEQ ID NO : 19, la séquence peptidique de chacune des chaînes légères, déduite de la séquence d'acide nucléique SEQ ID NO : 13, est la séquence SEQ ID NO : 14 et la séquence peptidique de chacune des chaînes lourdes, déduite de la séquence d'acide nucléique SEQ ID NO : 19, est la séquence SEQ ID NO : 20.

Dans un autre aspect particulier de l'invention, lorsque chacune des chaînes légères de l'anticorps est codée par la séquence d'acide nucléique chimère murine-humaine SEQ ID NO : 27, et que chacune des chaînes lourdes est codée par la séquence d'acide nucléique chimère murine-humaine SEQ ID NO : 19, la séquence peptidique de chacune des chaînes légères, déduite de la séquence d'acide nucléique SEQ ID NO : 27, est la séquence SEQ ID NO : 28 et la séquence peptidique de chacune des chaînes lourdes, déduite de la séquence d'acide nucléique SEQ ID NO : 19, est la séquence SEQ ID NO : 20.

Les séquences peptidiques SEQ ID NO : 14 et SEQ ID NO : 28 diffèrent uniquement par l'acide aminé présent en position 106 de chacune de ces deux séquences. L'acide aminé situé en position 106 est une lysine (K) dans la séquence SEQ ID NO : 28 ; il s'agit d'une asparagine (N) dans la séquence SEQ ID NO : 14.

L'invention s'entend aussi des anticorps dont chacune des chaînes légères codées par une séquence d'acide nucléique chimère murine-humaine possède au moins 70% d'homologie ou d'identité avec la séquence d'acide nucléique chimère murine-humaine SEQ ID NO : 13 et chacune des chaînes lourdes codées par une séquence d'acide nucléique chimère murine-humaine possède au moins 70% d'homologie ou d'identité avec la séquence d'acide nucléique chimère murine-humaine SEQ ID NO : 19, ces modifications n'altérant ni la spécificité de l'anticorps ni ses activités effectrices, comme l'activité ADCC (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity).

De manière particulièrement avantageuse, l'anticorps de l'invention est produit par une lignée cellulaire d'hybridome de rat. La lignée productrice de l'anticorps selon l'invention est une caractéristique importante puisqu'elle confère à l'anticorps certaines de ses propriétés particulières. En effet, le moyen d'expression des anticorps est à l'origine des modifications post-traductionnelles, notamment des modifications de la glycosylation, qui peuvent varier d'une lignée cellulaire à l'autre, et ainsi conférer des propriétés fonctionnelles différentes à des anticorps ayant pourtant des structures primaires identiques.

Dans un mode de réalisation préféré, l'anticorps est produit dans l'hybridome de rat YB2/0 (cellule YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20, déposée à l'American Type Culture Collection sous le numéro ATCC CRL-1662). Cette lignée a été choisie en raison de sa capacité à produire des

anticorps présentant une activité ADCC améliorée par rapport à des anticorps de même structure primaire produits par exemple dans CHO.

Dans un mode de réalisation particulier, un anticorps préféré selon l'invention est l'anticorps EMAB6 produit par le clone R509 déposé le 8 novembre 2004 sous le numéro d'enregistrement CNCM I-3314 à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15). Chacune des chaînes légères de l'anticorps EMAB6 est codée par la séquence d'acide nucléique chimère murine-humaine SEQ ID NO : 13, et chacune des chaînes lourdes est codée par la séquence d'acide nucléique chimère murine-humaine SEQ ID NO : 19. Cet anticorps chimérique entre en compétition avec l'anticorps murin CAT-13.6E12 pour la fixation du CD20 et possède une activité cytotoxique très supérieure à celle du Rituxan<sup>®</sup>, qui peut être attribuée pour partie à la glycosylation particulière du N-glycane de la chaîne lourde de ces anticorps (cf. exemple 4). En effet, le clone R509 a pour particularité de produire une composition d'anticorps EMAB6 possédant un ratio taux de fucose/taux de galactose inférieur à 0,6, pour lequel il a été démontré dans la demande de brevet FR 03 12229 qu'il est optimal pour conférer une forte activité ADCC aux anticorps. Cet anticorps est donc particulièrement intéressant comme outil thérapeutique pour le traitement de pathologies dont les cellules à cibler expriment le CD20.

Dans un autre mode de réalisation particulier, un autre anticorps préféré selon l'invention est l'anticorps EMAB603 produit par le clone R603 déposé le 29 novembre 2005 sous le numéro d'enregistrement CNCM I-3529 à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15). Chacune des chaînes légères de

l'anticorps EMAB603 est codée par la séquence d'acide nucléique chimère murine-humaine SEQ ID NO : 27, et chacune des chaînes lourdes est codée par la séquence d'acide nucléique chimère murine-humaine SEQ ID NO : 19. Cet anticorps chimérique entre en compétition avec l'anticorps murin CAT-13.6E12 pour la fixation du CD20 et possède une activité cytotoxique très supérieure à celle du Rituxan®, qui peut être attribuée pour partie à la glycosylation particulière du N-glycane de la chaîne lourde de ces anticorps (cf. exemple 3). En effet, le clone R603 a pour particularité de produire une composition d'anticorps EMAB603 possédant un ratio taux de fucose/taux de galactose inférieur à 0,6 (cf exemple 4), pour lequel il a été démontré dans la demande de brevet FR 03 12229 qu'il est optimal pour conférer une forte activité ADCC aux anticorps. Cet anticorps est donc particulièrement intéressant comme outil thérapeutique pour le traitement de pathologies dont les cellules à cibler expriment le CD20.

Un autre objet de l'invention se rapporte au vecteur pEF-EMAB6-K d'expression de la chaîne légère d'un anticorps selon l'invention, de séquence SEQ ID NO : 12. Ce vecteur est le vecteur permettant l'expression d'un anticorps selon l'invention dont la chaîne légère est codée par la séquence d'acide nucléique SED ID NO : 13, dont la séquence peptidique déduite est la séquence SEQ ID NO : 14. Ce vecteur est une molécule d'acide nucléique dans laquelle la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 5 codant pour le domaine variable de chacune des chaînes légères de l'anticorps et la séquence d'acide nucléique SEQ ID NO : 21 codant pour la région constante de chacune des chaînes légères de l'anticorps ont été insérées, afin de les introduire et de les maintenir dans une cellule hôte. Il permet l'expression de ces fragments d'acide nucléique étrangers dans la cellule hôte car il possède

des séquences indispensables (promoteur, séquence de polyadénylation, gène de sélection) à cette expression. De tels vecteurs sont bien connus de l'homme du métier, et peuvent être un adénovirus, un rétrovirus, un plasmide ou un bactériophage, cette liste n'étant pas limitative. De plus, toute cellule de mammifère peut être utilisée comme cellule hôte, c'est-à-dire comme cellule exprimant l'anticorps selon l'invention, par exemple YB2/0, CHO, CHO dhfr- (par exemple CHO DX B11, CHO DG44), CHO Lec13, SP2/0, NS0, 293, BHK ou COS.

Un autre objet de l'invention se rapporte au vecteur pEF-EMAB6-H d'expression de la chaîne lourde d'un anticorps selon l'invention, de séquence SEQ ID NO : 18. Ce vecteur est le vecteur permettant l'expression d'un anticorps selon l'invention dont la chaîne lourde est codée par la séquence d'acide nucléique SED ID NO : 19, dont la séquence peptidique déduite est la séquence SEQ ID NO : 20. Ce vecteur est une molécule d'acide nucléique dans laquelle la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 7 codant pour le domaine variable de chacune des chaînes lourdes de l'anticorps et la séquence d'acide nucléique humaine SEQ ID NO : 23 codant pour la région constante de chacune des chaînes lourdes de l'anticorps ont été insérées, afin de les introduire et de les maintenir dans une cellule hôte. Il permet l'expression de ces fragments d'acide nucléique étrangers dans la cellule hôte car il possède des séquences indispensables (promoteur, séquence de polyadénylation, gène de sélection) à cette expression. Tout comme indiqué précédemment, le vecteur peut être par exemple un plasmide, un adénovirus, un rétrovirus ou un bactériophage, et la cellule hôte peut être toute cellule de mammifère, par exemple YB2/0, CHO, CHO dhfr- (CHO DX B11, CHO DG44), CHO Lec13, SP2/0, NS0, 293, BHK ou COS.

Un anticorps produit par co-expression des vecteurs pEF-EMAB6-K et pEF-EMAB6-H dans la cellule YB2/0 est illustré par l'anticorps anti-CD20 EMAB6, produit par le clone R509 (déposé sous le numéro d'enregistrement CNCM I-3314 à la CNCM). Cet anticorps induit une cytotoxicité supérieure à celle induite par Rituxan<sup>®</sup> à la fois sur les cellules de patients atteints de LLC-B (sur lesquelles l'antigène CD20 est plus faiblement exprimé) et sur des cellules Raji, utilisées en tant que modèle et exprimant le CD20 à une densité plus importante par rapport aux cellules de patients atteints de LLC-B. De plus, l'anticorps EMAB6 induit une sécrétion d'IL-2 (interleukine 2) par les cellules Jurkat-CD16 beaucoup plus forte que l'anticorps Rituxan<sup>®</sup>. L'anticorps EMAB6, pouvant être produit par culture du clone R509 dans un milieu de culture et à des conditions permettant l'expression des vecteurs précédemment décrits, est donc un outil des plus intéressants susceptibles de faire progresser la thérapie et le diagnostic des pathologies impliquant le CD20, et plus particulièrement la LLC-B, ainsi que la recherche dans ce domaine.

Un objet particulier de l'invention est une lignée cellulaire stable exprimant un anticorps selon l'invention.

De manière avantageuse, la lignée cellulaire stable exprimant un anticorps selon l'invention est choisie parmi le groupe consistant en : SP2/0, YB2/0, IR983F, un myélome humain comme Namalwa ou toute autre cellule d'origine humaine comme PERC6, les lignées CHO, notamment CHO-K-1, CHO-Lec10, CHO-Lec1, CHO-Lec13, CHO Pro-5, CHO dhfr- (CHO DX B11, CHO DG44), ou d'autres lignées choisies parmi Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293-HEK, BHK, K6H6, NS0, SP2/0-Ag 14 et P3X63Ag8.653.

De manière préférée, la lignée utilisée est l'hybridome de rat YB2/0. Cette lignée a été choisie en raison de sa

capacité à produire des anticorps présentant une activité ADCC améliorée par rapport à des anticorps de même structure primaire produits par exemple dans CHO.

Dans un aspect particulier de l'invention, la lignée cellulaire stable exprimant un anticorps selon l'invention, et plus particulièrement choisie dans le groupe précédemment décrit, a intégré les deux vecteurs d'expression pEF-EMAB6-K et pEF-EMAB6-H, tels que précédemment décrits.

Un aspect particulier de l'invention se rapporte au clone R509 déposé sous le numéro d'enregistrement CNCM I-3314 à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM).

Un aspect particulier de l'invention se rapporte au clone R603 déposé sous le numéro d'enregistrement CNCM I-3529 à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM).

Un autre objet de l'invention se rapporte à un fragment d'ADN de séquence SEQ ID NO : 19 codant pour la chaîne lourde d'un anticorps selon l'invention. La séquence d'acide nucléique chimère murine-humaine SEQ ID NO : 19 code pour chacune des chaînes lourdes de l'anticorps. Elle est obtenue par fusion de la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 7 codant pour le domaine variable de chacune des chaînes lourdes de l'anticorps et de la séquence d'acide nucléique humaine SEQ ID NO : 23 codant pour la région constante de chacune des chaînes lourdes de l'anticorps.

Un autre objet particulier de l'invention se rapporte à un fragment d'ADN de séquence SEQ ID NO : 13 codant pour la chaîne légère d'un anticorps selon l'invention. La séquence d'acide nucléique chimère murine-humaine SEQ ID NO : 13 code pour chacune des chaînes légères de l'anticorps. Elle est obtenue par fusion de la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 5 codant pour le

domaine variable de chacune des chaînes légères de l'anticorps et de la séquence d'acide nucléique humaine SEQ ID NO : 21 codant pour la région constante de chacune des chaînes légères de l'anticorps.

Un autre objet particulier de l'invention se rapporte à un fragment d'ADN de séquence SEQ ID NO : 27 codant pour la chaîne légère d'un anticorps selon l'invention. La séquence d'acide nucléique chimère murine-humaine SEQ ID NO : 27 code pour chacune des chaînes légères de l'anticorps. Elle est obtenue par fusion de la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 25 codant pour le domaine variable de chacune des chaînes légères de l'anticorps et de la séquence d'acide nucléique humaine SEQ ID NO : 21 codant pour la région constante de chacune des chaînes légères de l'anticorps.

Un objet particulier de l'invention se rapporte à l'utilisation de l'anticorps selon l'invention pour activer, in vivo ou in vitro, les récepteurs Fc $\gamma$ RIIIA de cellules immunitaires effectrices. En effet, les anticorps de l'invention ont pour particularité et avantage d'être cytotoxiques. A ce titre, ils présentent la capacité d'activer par leur région Fc le récepteur Fc $\gamma$ RIIIA. Ceci représente un intérêt considérable, car ce récepteur est exprimé à la surface de cellules appelées « cellules effectrices » : la liaison de la région Fc de l'anticorps à son récepteur porté par la cellule effectrice provoque l'activation du Fc $\gamma$ RIIIA et la destruction des cellules cibles. Les cellules effectrices sont par exemple des cellules NK (Natural Killer), des macrophages, des neutrophiles, les lymphocytes CD8, les lymphocytes T $\gamma\delta$ , les cellules NKT, les éosinophiles, les basophiles ou les mastocytes.

Dans un aspect particulier, l'anticorps de l'invention est utilisé comme médicament. Avantagusement, un tel médicament est destiné à traiter les maladies dont les

cellules cibles sont des cellules exprimant le CD20, comme les lymphomes malins à cellules B.

Dans un aspect avantageux, l'anticorps selon l'invention est utilisé pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une leucémie ou d'un lymphome.

Un objet particulier de l'invention est l'utilisation de l'anticorps selon l'invention, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une pathologie choisie parmi les leucémies aiguës lymphoblastiques B, les lymphomes lymphoblastiques B, les lymphomes à lymphocytes B matures, parmi lesquels la leucémie lymphoïde chronique de type B (LLC-B), le lymphome lymphocytaire à petits lymphocytes B, la leucémie prolymphocytaire B, le lymphome lymphoplasmocytaire, le lymphome à cellules du manteau, le lymphome folliculaire, le lymphome de la zone marginale de type MALT, le lymphome ganglionnaire de la zone marginale avec ou sans cellule B monocytoïde, le lymphome splénique de la zone marginale (avec ou sans lymphocyte villeux), la leucémie à tricholeucocytes, le lymphome diffus à grandes cellules B, le lymphome de Burkitt ainsi que toute pathologie dysimmunitaire impliquant des cellules de la lignée lymphoïde B dont les maladies auto-immunes.

Un autre objet de l'invention est l'utilisation de l'anticorps selon l'invention pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une leucémie lymphoïde.

Un autre objet de l'invention est l'utilisation de l'anticorps selon l'invention pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement de la leucémie lymphoïde chronique de type B (LLC-B). En outre, l'anticorps selon l'invention est particulièrement adapté à traiter des pathologies pour lesquelles le CD20 est plus faiblement exprimé sur les lymphocytes B, et de manière préférée la LLC-B (Leucémie Lymphoïde Chronique de type B). A cet

égard, l'anticorps selon l'invention peut être utilisé en combinaison avec un ou plusieurs autre(s) anticorps, par exemple monoclonal(ux), dirigé(s) contre un ou plusieurs autre(s) antigène(s) exprimé(s) sur les cellules lymphoïdes, comme par exemple les antigènes HLA-DR, CD19, CD23, CD22, CD80, CD32 et CD52, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une leucémie ou d'un lymphome. Ainsi, l'anticorps humanisé Campath-1H<sup>®</sup> (alentuzumab, MabCampathR<sup>®</sup>) qui cible une molécule abondamment exprimée sur les cellules lymphoïdes, l'antigène CD52, et permet d'induire une lyse cellulaire en mobilisant les mécanismes effecteurs de l'hôte (fixation du complément, cytotoxicité dépendant des anticorps) est utilisé dans le traitement de la LLC (Moreton P, Hillmen P 2003 *Semin. Oncol.*, 30(4) :493-501 ; Rawstron AC et al 2004 *Blood*, 103(6) :2027-2031 ; Robak T 2004 *Leuk. Lymphoma*, 45(2) :205-219 ; Stanglmaier M et al 2004 *Ann Hematol.*, 83(10) :634-645). Des essais cliniques sont également en cours pour l'évaluation d'anticorps ou d'immunotoxines ciblant les antigènes HLA-DR, CD22, CD23, CD80 chez des patients atteints de LLC (Mavromatis BH, Cheson BD 2004 *Blood Rev.* 18(2):137-148 ; Mavromatis B, Cheson BD 2003 *J Clin. Oncol.* 21(9):1874-1881, Coleman M et al 2003 *Clin. Cancer Res.* 9:3991S-3994S ; Salvatore G et al 2002 *Clin. Cancer Res.* 8:995-1002).

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps selon l'invention peut être utilisé en association avec des cellules exprimant des Fc $\gamma$ R telles que les cellules NK, les cellules NKT (Natural Killers T), les lymphocytes T $\gamma\delta$ , les macrophages, les monocytes ou les cellules dendritiques, c'est-à-dire en association avec une thérapie cellulaire (Peller S, Kaufman S *Blood* 1991, 78:1569, Platsoucas CD et al *J Immunol* 1982, 129:2305 ; Kimby E et al. 1989 *Leukemia* 3(7):501-504 ; Soorskaar D

et al. 1988 *Int Arch Allergy Appl Immunol* 87(2) :159-164 ;  
Ziegler HW et al. 1981 *Int J Cancer* 27(3) :321-327 ;  
Chaperot L et al. 2000 *Leukemia* 14(9):1667-77 ; Vuillier  
F, Dighiero G 2003 *Bull Cancer*. 90(8-9):744-50).

Par ailleurs, l'anticorps selon l'invention permet de manière avantageuse de réduire les doses administrées aux patients : avantageusement, la dose de l'anticorps administrée au patient est 2 fois, 5 fois, ou encore 10 fois, 25 fois, 50 fois ou de manière particulièrement avantageuse 100 fois moins élevée qu'une dose de Rituxan<sup>®</sup>. De manière avantageuse, la dose de l'anticorps administrée au patient est entre 2 et 5 fois, entre 5 et 10 fois, entre 5 et 25 fois, entre 5 et 50 fois ou encore entre 5 et 100 fois moins élevée qu'une dose de Rituxan<sup>®</sup>. Ainsi, l'anticorps selon l'invention, par exemple l'anticorps EMAB6, peut être administré avantageusement à une dose inférieure à 187,5 mg/m<sup>2</sup>, à 75 mg/m<sup>2</sup>, à 37,5 mg/m<sup>2</sup>, 15 mg/m<sup>2</sup>, 7,5 mg/m<sup>2</sup> ou de manière particulièrement avantageuse inférieure à 3,75 mg/m<sup>2</sup>. La dose administrée est avantageusement comprise entre 187,5 mg/m<sup>2</sup> et 75 mg/m<sup>2</sup>, ou entre 75 mg/m<sup>2</sup> et 37,5 mg/m<sup>2</sup>, entre 75 mg/m<sup>2</sup> et 15 mg/m<sup>2</sup>, entre 75 mg/m<sup>2</sup> et 7,5 mg/m<sup>2</sup> ou encore entre 75 mg/m<sup>2</sup> et 3,75 mg/m<sup>2</sup>.

Ainsi, l'invention s'entend aussi d'une méthode de traitement des maladies dont les cellules cibles sont des cellules exprimant le CD20, comme les lymphomes malins à cellules B, comprenant l'administration à un patient, à une dose efficace, d'une composition comprenant un anticorps selon l'invention. Plus particulièrement, la méthode de traitement est particulièrement adaptée au traitement d'une leucémie ou d'un lymphome. De manière encore plus spécifique, il s'agit d'une méthode de traitement d'une pathologie choisie parmi les leucémies aiguës lymphoblastiques B, les lymphomes lymphoblastiques B, les lymphomes à cellules B matures, parmi lesquels la

leucémie lymphoïde chronique de type B (LLC-B), le lymphome lymphocytaire à petits lymphocytes B, la leucémie prolymphocytaire B, le lymphome lymphoplasmocytaire, le lymphome à cellules du manteau, le lymphome folliculaire, le lymphome de la zone marginale de type MALT, le lymphome ganglionnaire de la zone marginale avec ou sans cellule B monocytoïde, le lymphome splénique de la zone marginale (avec ou sans lymphocyte villeux), la leucémie à tricholeucocytes, le lymphome diffus à grandes cellules B, le lymphome de Burkitt ainsi que toute pathologie dysimmunitaire impliquant des cellules de la lignée lymphoïde B dont les maladies auto-immunes, comprenant l'administration, à une dose efficace, d'un anticorps ou d'une composition comprenant l'anticorps selon l'invention.

Un objet particulier de l'invention est l'utilisation d'un anticorps selon l'invention pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement de la maladie chronique du greffon contre l'hôte afin de traiter les manifestations impliquant les lymphocytes B du receveur. Enfin un dernier objet de l'invention est l'utilisation d'un anticorps selon l'invention pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du rejet de greffes d'organes, notamment de rein.

En effet, des études récentes (Ratanatharathorn et al. 2003 *Biol Blood Marrow Transplant*. 2003 Aug;9(8):505-11 ; Becker et al. 2004 *Am J Transplant*. 2004 Jun;4(6):996-1001) ont montré l'intérêt d'anticorps anti-CD20 dans le traitement de ces pathologies.

D'autres aspects et avantages de l'invention seront décrits dans les exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et ne limitent pas l'étendue de l'invention.

### Description des Figures

**Figure 1 :** Représentation schématique du vecteur CKHu utilisé pour la chimérisation de la chaîne légère kappa des anticorps EMAB6 et EMAB603.

**Figure 2 :** Représentation schématique du vecteur d'expression chaîne légère pEF-EMAB6-K utilisé pour la production de l'anticorps EMAB6.

**Figure 3 :** Représentation schématique du vecteur G1Hu utilisé pour la chimérisation de la chaîne lourde des anticorps EMAB6 et EMAB603.

**Figure 4 :** Représentation schématique du vecteur d'expression chaîne lourde pEF-EMAB6-H utilisé pour la production de l'anticorps EMAB6.

**Figure 5 :** Compétition par l'anticorps chimérique EMAB6 pour la fixation de l'anticorps murin d'origine CAT-13.6E12 (CAT13) au CD20 exprimé sur les cellules Raji.

**Figure 6 :** Activité cytotoxique complément dépendante des anticorps anti-CD20 sur les cellules Raji. (A) Rituxan<sup>®</sup> triangle vide, EMAB6 losange plein. La lyse des cellules est estimée par mesure de la LDH intracellulaire libérée dans le surnageant. Résultats exprimés en pourcentage de lyse, le 100% étant la valeur obtenue avec Rituxan<sup>®</sup> (à 5000ng/ml d'anticorps anti-CD20). Moyenne de 5 essais. (B) Comparaison des activités cytotoxiques complément dépendante des anticorps EMAB6 (losange plein) et EMAB603 (losange vide).

**Figure 7 :** ADCC induite par les anticorps anti-CD20 vis à vis des cellules Raji. (A) Rituxan<sup>®</sup> triangle vide, EMAB6 losange plein. La lyse des cellules est estimée par mesure de la LDH intracellulaire libérée dans le surnageant. Résultats exprimés en pourcentage de lyse, le 100% étant la valeur obtenue avec Rituxan<sup>®</sup> (à 250ng/ml d'anticorps anti-CD20). Moyenne de 3 essais. (B) Comparaison de l'ADCC induite par les anticorps EMAB6 (losange plein) et EMAB603 (losange vide).

**Figure 8 :** ADCC induite par les anticorps anti-CD20 en présence de lymphocytes B de patients présentant une LLC-B.

Rituxan<sup>®</sup> triangle vide, EMAB6 losange plein. Ratio E/T = 15. La lyse des cellules est estimée par mesure de la calcéine libérée dans le surnageant. Résultats exprimés en pourcentage, le 100% étant la valeur obtenue avec Rituxan<sup>®</sup> (à 500ng/ml d'anticorps anti-CD20). Moyenne de 4 expériences correspondant à 4 patients différents.

**Figure 9 :** Activation du CD16 (FcγRIIIA) induite par les anticorps anti-CD20 en présence de cellules Raji. (A) Rituxan<sup>®</sup> triangle vide, EMAB6 losange plein. Résultats exprimés en pourcentage d'IL-2, celle-ci étant mesurée dans les surnageants par ELISA ; 100% étant la valeur obtenue avec Rituxan<sup>®</sup> (à 2500ng/ml d'anti-CD20). Moyenne de 4 essais. (B) Comparaison entre l'activation du CD16 (FcγRIIIA) induite par les anticorps EMAB6 (losange plein) et EMAB603 (losange vide).

**Figure 10 :** Activation du CD16 (FcγRIIIA) induite par les anti-CD20 en présence de lymphocytes B de patients présentant une LLC-B. Rituxan<sup>®</sup> triangle vide, EMAB6 losange plein. Résultats exprimés en pourcentage d'IL-2, celle-ci étant mesurée dans les surnageants par ELISA ;

100% étant la valeur obtenue avec Rituxan<sup>®</sup> (à 2500ng/ml d'anticorps anti-CD20). Moyenne de 12 patients.

**Figure 11 :** Production d'IL-2 induite par l'anticorps murin CAT-13.6E12 en présence des cellules Jurkat-CD16 (FcγRIIIA).

**Figure 12 :** Représentation schématique du vecteur d'expression des chaînes lourde et légère pRSV-HL-EMAB603 utilisé pour la production de l'anticorps EMAB603.

### Exemples

**Exemple 1 : Construction des vecteurs d'expression des anticorps chimériques anti-CD20 EMAB6 et EMAB603**

A. Détermination de la séquence des régions variables de l'anticorps murin CAT-13.6E12

L'ARN total de l'hybridome murin CAT-13.6E12 (fournisseur : DSMZ, réf. ACC 474) produisant une immunoglobuline de type IgG2a, $\kappa$  a été isolé (kit RNeasy, Qiagen réf. 74104). Après transcription inverse, les domaines variables des chaînes légères (Vk) et lourdes (VH) de l'anticorps CAT-13.6E12 ont été amplifiées par la technique de 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) (kit GeneRacer, Invitrogen réf. L1500-01). Les amorces utilisées pour ces deux étapes sont les suivantes :

1. amorces de transcription inverse

a. Amorce antisens spécifique Kappa murin (SEQ ID NO : 1)

5' - ACT GCC ATC AAT CTT CCA CTT GAC -3'

b. Amorce antisens spécifique G2a murin (SEQ ID NO : 2)

5' - CTG AGG GTG TAG AGG TCA GAC TG -3'

2. amorces de PCR 5'RACE

a. Amorce antisens spécifique Kappa murin (SEQ ID NO : 3)

5' - TTGTTCAAGAAGCACACGACTGAGGCAC -3'

b. Amorce antisens spécifique G2a murin (SEQ ID NO : 4)

5' - GAGTTCAGGTCAAGGTCCTGGCTCAG -3'

Les produits de PCR VH et V $\kappa$  ainsi obtenus ont été clonés dans le vecteur PCR4Blunt-TOPO (Zero blunt TOPO PCR cloning kit, Invitrogen, réf. K2875-20) puis séquencés.

La séquence nucléotidique de la région V $\kappa$  de l'anticorps murin CAT-13.6E12 est indiquée sous la séquence SEQ ID NO : 5 et la séquence peptidique déduite est la séquence SEQ ID NO : 6. Le gène V $\kappa$  appartient à la famille V $\kappa$ 4 [Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", NIH Publication, 91-3242 (1991)].

La séquence nucléotidique de la région VH de CAT-13.6E12 est la séquence SEQ ID NO : 7 et la séquence peptidique déduite est la séquence SEQ ID NO : 8. Le gène VH appartient à la famille VH1 [Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", NIH Publication, 91-3242 (1991)].

B. Construction des vecteurs d'expression chaîne lourde et chaîne légère des anticorps chimériques EMAB6 et EMAB603

1. Vecteur chaîne légère Kappa

1.1 Vecteur de chaîne légère de l'anticorps EMAB6

La séquence  $V_k$  clonée dans le vecteur de séquençage pCR4Blunt-TOPO a été amplifiée à l'aide des amorces de clonage suivantes :

a) amorce sens  $V_k$  (SEQ ID NO : 9)

5'- CTCAGTACTAGT**GCCGCCACCATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAG** -3'

La séquence soulignée correspond au site de restriction Spe I, la séquence en gras correspond à une séquence de Kozak consensus, l'ATG initiateur est en italiques.

b) amorce antisens  $V_k$  (SEQ ID NO : 10)

5'- **TGAAGACACTTGGTGCAGCCACAGTCCGGTTTATTTCCAGCCTGGT** -3'

Cette amorce réalise la jonction des séquences  $V_k$  murine (en italique) et région constante ( $C_k$ ) humaine (en gras). La séquence soulignée correspond au site de restriction Dra III.

Le produit de PCR  $V_k$  ainsi obtenu contient la séquence codant le peptide signal naturel de l'anticorps murin CAT-13.6E12. Cette PCR  $V_k$  a été ensuite clonée entre les sites Spe I et Dra III du vecteur de chimérisation chaîne légère (Fig. 1) qui correspond à la séquence SEQ ID NO : 11, en 5' de la région constante  $C_k$  humaine, dont la séquence nucléique est la séquence SEQ ID NO : 21 et la séquence peptidique déduite est la séquence SEQ ID NO 22. La séquence  $C_k$  humaine de ce vecteur de chimérisation avait été préalablement modifiée par mutagénèse silencieuse afin de créer un site de restriction Dra III pour permettre le clonage de séquences  $V_k$  murines. Ce vecteur de chimérisation contient un promoteur RSV et une séquence de polyadénylation bGH (bovine Growth Hormone) ainsi que le gène de sélection dhfr (dihydrofolate reductase).

La séquence de la chaîne légère de l'anticorps chimérique EMAB6 codée par ce vecteur est présentée en SEQ ID NO : 13 pour la séquence nucléotidique et correspond à la séquence peptidique déduite SEQ ID NO :14.

## 1.2 Vecteur de chaîne légère de l'anticorps EMAB603

Le protocole est le même que pour le vecteur de chaîne légère de l'anticorps EMAB6 (cf exemple 1, B-1.1), hormis l'amorce antisens V $\kappa$  qui est :

b') amorce antisens V $\kappa$  (SEQ ID NO : 29)

5' - TGAAGACACTTGGTGCAGCCACAGTCCGTTTTATTTCCAGCCTGGT -3'

Cette amorce réalise la jonction des séquences V $\kappa$  murine (en italique) et région constante (C $\kappa$ ) humaine (en gras). La séquence soulignée correspond au site de restriction Dra III.

Cette amorce introduit également la mutation AAC → AAA (nucléotide encadré dans la séquence de l'amorce antisens SEQ ID NO : 29) qui correspond à la mutation N106K (cf. séquence nucléotidique et la séquence peptidique déduite SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 26) par rapport à la séquence naturelle V $\kappa$  de CAT-13.6E12 (cf. SEQ ID NO : 5 et SEQ ID NO : 6).

La séquence de la chaîne légère de l'anticorps chimérique EMAB603 codée par ce vecteur est présentée en SEQ ID NO : 27 pour la séquence nucléotidique et correspond à la séquence peptidique déduite SEQ ID NO : 28.

## 2. Vecteur chaîne lourde

Une démarche similaire a été appliquée pour la chimérisation de la chaîne lourde des anticorps EMAB6 et EMAB603.

La séquence VH clonée dans le vecteur pCR4Blunt-TOPO a été tout d'abord amplifiée à l'aide des amorces de clonage suivantes :

a) amorce sens VH (SEQ ID NO :15)

5' - CTCAGTACTAGT**GCCGCCACC**ATGGGATTCAGCAGGATCTTTCTC -3'

La séquence soulignée correspond au site de restriction Spe I, la séquence en gras correspond à une séquence de Kozak consensus, l'ATG initiateur est en italiques.

b) amorce antisens VH (SEQ ID NO :16)

5' - **GACCGAT**GGGCC**CTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGACTGAGGTTCC** -3'

Cette amorce réalise la jonction des séquences VH murine (en italique) et région constante G1 humaine (en gras). La séquence soulignée correspond au site de restriction Apa I.

Le fragment VH amplifié contient la séquence codant le peptide signal naturel de l'anticorps murin CAT-13.6E12. Cette PCR VH a été ensuite clonée entre les sites Spe I et Apa I du vecteur de chimérisation chaîne lourde (Fig. 3) qui correspond à la séquence SEQ ID NO : 17, en 5' de la région constante  $\gamma$ 1 humaine dont la séquence nucléique est la séquence SEQ ID NO : 23 et la séquence peptidique déduite est la séquence SEQ ID NO : 24. Ce vecteur de chimérisation contient un promoteur RSV et une séquence de polyadénylation bGH (bovine Growth Hormone) ainsi que le gène de sélection néo.

La séquence de la chaîne lourde des anticorps chimériques EMAB6 et EMAB603 codée par ce vecteur est présentée en SEQ ID NO : 19 pour la séquence nucléotidique et en séquence SEQ ID NO : 20 pour la séquence peptidique déduite.

### 3. Vecteurs d'expression finaux

#### 3.1 Vecteurs d'expression de l'anticorps EMAB6

Pour l'expression de l'anticorps EMAB6, le promoteur RSV du vecteur de chimérisation de la chaîne légère kappa (cf exemple 1, B-1.1) a été remplacé par le promoteur EF-1

alpha humain. Le vecteur final d'expression chaîne légère pEF-EMAB6-K est présenté en Fig. 2 et correspond à la séquence SEQ ID NO : 12.

La séquence de la chaîne légère de l'anticorps chimérique EMAB6 codée par ce vecteur est présentée en SEQ ID NO : 13 pour la séquence nucléotidique et correspond à la séquence peptidique déduite SEQ ID NO :14.

Pour l'expression de l'anticorps EMAB6, le promoteur RSV du vecteur de chimérisation de la chaîne lourde (cf exemple 1, B-2) a été remplacé par le promoteur EF-1 alpha humain. Le vecteur final d'expression chaîne lourde pEF-EMAB6-H ainsi obtenu est présenté en Fig. 4 et correspond à la séquence SEQ ID NO : 18.

### 3.2 Vecteur d'expression de l'anticorps EMAB603

Un vecteur d'expression unique contenant les deux unités de transcription chaîne lourde et chaîne légère de l'anticorps anti-CD20 EMAB-603 a été construit à partir des deux vecteurs de chimérisation de la chaîne légère et de la chaîne lourde (cf respectivement exemple 1, B-1.2 et exemple 1-B2) par sous-clonage, dans le site Xho I du vecteur chaîne lourde, d'un fragment Bgl II-Pvu II du vecteur chaîne légère contenant l'unité de transcription chaîne légère et le gène dhfr. Ce vecteur d'expression pRSV-HL-EMAB-603 présente deux gènes de sélection néo (neo-phosphotransphérase II) et dhfr (dihydrofolate reductase) ainsi que deux unités de transcription chaîne lourde et chaîne légère sous le contrôle d'un promoteur RSV (Figure 12).

**Exemple 2 : Création de lignées cellulaires dérivées de la lignée YB2/0 productrices de l'anticorps chimérique**

**anti-CD20 EMAB6 et de l'anticorps chimérique anti-CD20 EMAB603**

La lignée de rat YB2/0 (ATCC # CRL-1662) a été cultivée en milieu EMS (Invitrogen, réf. 041-95181M) contenant 5% de sérum de veau fœtal (JRH Biosciences, réf. 12107). Pour la transfection, 5 millions de cellules ont été électroporés (électroporateur Biorad, modèle 1652077) en milieu Optimix (Equibio, réf. EKITE 1) avec 25 µg de vecteur chaîne légère, pEF-EMAB6-K (Fig. 2), linéarisé par Aat II, et 27 µg de vecteur chaîne lourde, pEF-EMAB6-H (Fig. 4), linéarisé par Sca I pour l'expression de l'anticorps EMAB6, ou avec le vecteur pRSV-HL-EMAB-603 pour l'expression de l'anticorps EMAB603. Les conditions d'électroporation appliquées étaient de 230 volts et 960 microfarads pour une cuvette de 0,5 ml. Chaque cuvette d'électroporation a été ensuite répartie sur 5 plaques P96 avec une densité de 5000 cellules/puits.

La mise en milieu sélectif RPMI (Invitrogen, ref 21875-034) contenant 5% de sérum dialysé (Invitrogen, réf. 10603-017), 500 µg/ml de G418 (Invitrogen, réf. 10131-027) et 25 nM de methotrexate (Sigma, réf. M8407), a été réalisée 3 jours après la transfection.

Les surnageants des puits de transfection résistants ont été criblés pour la présence d'immunoglobuline (Ig) chimérique par dosage ELISA spécifique des séquences Ig humaines.

Les 10 transfectants produisant le plus d'anticorps ont été amplifiés en plaques P24 et leur surnageant redosé par ELISA afin d'estimer leur productivité et de sélectionner les 3 meilleurs producteurs pour le clonage par dilution limite (40 cellules/plaque).

A l'issue du clonage, le clone R509.6A4 (R509-33903/046-6H1(1)6A4, productivité : 17 µg/10<sup>6</sup> cellules), dénommé ci-après « R509 », ainsi que le clone R603 ont été

sélectionnés respectivement pour la production de l'anticorps chimérique EMAB6 et celle de l'anticorps EMAB603 et adaptés progressivement au milieu de production CD Hybridoma (Invitrogen, réf. 11279-023).

La production des anticorps chimériques EMAB6 et EMAB603 a été réalisée par expansion de la culture adaptée en milieu CD Hybridoma, obtenue par dilution à  $3 \times 10^5$  cellules/ml en flacons de 75 cm<sup>2</sup> et 175 cm<sup>2</sup> puis par dilution à  $4,5 \times 10^5$  cellules/ml en flacon de type roller. Après avoir atteint le volume maximal (1 l), la culture a été poursuivie jusqu'à ce que la viabilité cellulaire ne soit plus que de 20%. Après production, les anticorps chimériques EMAB6 et EMAB603 ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur protéine A (pureté estimée par HPLC < 95 %) et contrôlés par électrophorèse en gel de polyacrylamide.

### **Exemple 3 : Caractérisation de l'activité fonctionnelle des anticorps chimériques EMAB6 et EMAB603**

#### **A. Spécificité**

La spécificité de la reconnaissance antigénique de l'anticorps chimérique EMAB6 a été évaluée par une étude de compétition avec l'anticorps murin d'origine CAT-13.6E12 pour la fixation à l'antigène CD20 exprimé par les cellules Raji.

Pour cela, l'anticorps EMAB6 (10 µl de 0,5 à 50 µg/ml) a été incubé à 4°C avec une quantité fixe de l'anticorps murin CAT-13.6E12 (10 µl à 5 µg/ml) pendant 20 minutes en présence de cellules Raji (50 µl à  $4 \times 10^6$ /ml). Après lavage, un anticorps anti-IgG de souris couplé à la phycoérythrine (PE) a été ajouté aux cellules Raji de façon à détecter spécifiquement la fixation de l'anticorps murin CAT-13.6E12. Les MFI obtenues en

présence des différentes concentrations de EMAB6 sont traduites en pourcentage, le 100% correspondant à la fixation aux cellules de CAT-13.6E12 en absence de l'anticorps EMAB6.

On obtient ainsi une courbe d'inhibition de la fixation de l'anticorps CAT-13.6E12 (CAT13) sur les cellules Raji en présence de concentrations croissantes de EMAB6 (Fig. 5).

Cette étude démontre que le processus de chimérisation n'a pas altéré la spécificité de l'anticorps EMAB6 qui entre bien en compétition avec l'anticorps murin parental CAT-13.6E12 pour la fixation du CD20 exprimé à la surface des cellules Raji.

La spécificité de reconnaissance antigénique de l'anticorps EMAB603 est comparable à celle de l'anticorps EMAB6.

#### B. Activité Cytotoxique Dépendante du Complément

L'activité cytotoxique dépendante du complément des anticorps EMAB6 et EMAB603 est étudiée avec les cellules Raji en présence de sérum de jeune lapin comme source de complément ; l'anticorps anti-CD20 chimérique Rituxan<sup>®</sup> est inclus dans un test pour comparaison.

Pour ce test les cellules Raji sont ajustées à  $6 \times 10^5$  cellules/ml en IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) 5% SVF. Les anticorps sont dilués en IMDM+0,5% SVF. Le mélange réactionnel est composé de 50 $\mu$ l d'anticorps, 50 $\mu$ l de sérum de jeune lapin (dilution au 1/10 en IMDM 0,5% SVF du réactif Cedarlane CL 3441), 50 $\mu$ l de cellules cibles et 50 $\mu$ l de milieu IMDM 0,5% SVF. Les concentrations finales d'anticorps sont de 5 000, 1 250, 250 et 50 ng/ml. Un contrôle sans anticorps est inclus dans le test. Après 1h d'incubation à 37°C sous atmosphère enrichie en 5% CO<sub>2</sub>, les plaques sont

centrifugées et les taux de LDH intracellulaire libérée dans le surnageant évalués par un réactif spécifique (Cytotoxicity Detection Kit 1 644 793).

Le pourcentage de lyse est estimé en utilisant une gamme de calibration obtenue avec différentes dilutions de cellules cibles lysées au triton X100 (2%), correspondant à 100, 50, 25 et 0% de lyse respectivement.

Les résultats présentés en Fig. 6 (A) indiquent que les anticorps EMAB6 et Rituxan<sup>®</sup> induisent tous deux une lyse des cellules Raji dépendante du complément. Néanmoins, l'activité complément de l'anticorps EMAB6 apparaît légèrement inférieure à celle de Rituxan<sup>®</sup>. Cette différence est plus importante aux faibles concentrations d'anticorps utilisées dans ce test. Ainsi, pour les concentrations de 50 et 250ng/ml, l'activité de l'anticorps EMAB6 est de l'ordre de 45% de celle de Rituxan<sup>®</sup>. Cette différence s'amenuise lorsque la concentration d'anticorps est augmentée, le pourcentage d'activité cytotoxique dépendante du complément de l'anticorps EMAB6 représentant 92% de celle de Rituxan<sup>®</sup> à la plus forte concentration testée, c'est à dire 5000ng/ml.

Cette activité cytotoxique dépendante du complément de l'anticorps EMAB6 plus faible que celle de Rituxan<sup>®</sup> peut être considérée comme un avantage car elle limite la toxicité potentielle de l'EMAB6 « in vivo » comparé à Rituxan<sup>®</sup> liée à l'activation de la voie classique du complément conduisant à la production de différentes molécules ayant des activités inflammatoires, allergiques et vasculaires indésirables.

L'activité complément de l'anticorps EMAB603 apparaît Figure 6 (B).

### C. Activité ADCC

La cytotoxicité de l'anticorps chimérique EMAB6 a été évaluée en présence de cellules Raji ou bien de lymphocytes B de patients atteints de LLC. L'anticorps anti-CD20 chimérique Rituxan<sup>®</sup> est inclus dans les tests pour comparaison.

La technique de mesure d'ADCC en marquage calcéine utilisée est la suivante :

Les cellules NK sont isolées à partir des PBMC en utilisant la technique de séparation sur billes magnétiques (MACS) de chez Myltenyi. Les cellules NK sont lavées et resuspendues en IMDM+5% SVF ( $45 \times 10^5$  cellules/ml). Les cellules effectrices et les cellules cibles sont utilisées dans un ratio 15/1. Les cellules Raji ou les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) de patients présentant une LLC-B obtenues après Ficoll (>95% de lymphocytes B) sont préalablement marquées à la calcéine (1ml de cellules à  $3 \times 10^6$  cellules/ml en IMDM +5% SVF + 20 $\mu$ l calcein (20 $\mu$ M) incubation 20min à 37°C puis lavage en HBSS (Hank's Buffered Saline Solution)) et ajustées à  $3 \times 10^5$  cellules/ml en IMDM 5% SVF. Les anticorps sont dilués en IMDM 0,5% SVF (concentration finale 500 ; 50 ; 5 ; 0,5, ; 0,005 et 0,005 ng/ml).

Le mélange réactionnel est composé de 50 $\mu$ l d'anticorps, 50 $\mu$ l de cellules effectrices, 50 $\mu$ l de cellules cibles et de 50 $\mu$ l de milieu IMDM en plaque de microtitration P96.

Deux témoins négatifs sont établis :

- Lyse sans NK : les cellules effectrices NK sont remplacées par de l'IMDM + 5% SVF.
- Lyse sans anticorps (Ac) : les anticorps sont remplacées par de l'IMDM + 5% SVF.

Après 4h d'incubation à 37°C sous atmosphère enrichie en 5% CO<sub>2</sub>, les plaques sont centrifugées et la fluorescence

associée au surnageant mesurée sur un fluorimètre (excitation 485nm /émission 535nm).

Le pourcentage de lyse est estimé en utilisant une gamme de calibration obtenue avec différentes dilutions de cellules cibles lysées au Triton X100 (2%) correspondant à 100, 50, 25 et 0% de lyse respectivement.

Les résultats sont calculés dans un premier temps selon la formule suivante :

$$\% \text{ de lyse} = (\% \text{ lyse avec Anticorps et NK}) - (\% \text{ lyse sans Anticorps}) - (\% \text{ de lyse sans NK}),$$
 puis exprimés en pourcentage relatif, 100% étant la valeur obtenue à la plus forte concentration de Rituxan<sup>®</sup>.

Les résultats obtenus pour l'anticorps EMAB6 sur les cellules de la lignée Raji, présentés en Fig. 7 (A), montrent que quelle que soit la concentration testée, la cytotoxicité induite par l'anticorps EMAB6 est supérieure à celle induite par Rituxan<sup>®</sup>. Cette différence est particulièrement importante pour les faibles concentrations d'anticorps. Ainsi, à la concentration de 0,5ng/ml, les pourcentages de lyse sont de 96 et 4% pour EMAB6 et Rituxan<sup>®</sup> respectivement. En augmentant de 500 fois la dose (250ng/ml) la différence est encore appréciable puisque les pourcentages respectifs d'ADCC sont de 164 et 100% pour EMAB6 et Rituxan<sup>®</sup> respectivement. Lorsque l'on calcule les EC50 (concentration d'anticorps correspondant à 50% du E Max, efficacité maximale obtenue à la concentration d'anticorps la plus élevée et au plateau) par estimation graphique (en ng/ml) et selon l'hypothèse que Rituxan<sup>®</sup> et EMAB6 atteignent le même E Max, le rapport EC50 Rituxan<sup>®</sup>/EC50 EMAB6 dans ce test est alors égal à 300. La cytotoxicité de l'anticorps chimérique EMAB603 a été évaluée en présence de cellules Raji selon le même

procédé que pour l'anticorps EMAB6. Son activité est comparable à celle de l'anticorps EMAB6 (cf. Figure 7 (B)).

Avec les lymphocytes de patients présentant une LLC-B, les résultats obtenus, présentés en Fig. 8, démontrent que quelle que soit la concentration testée, la cytotoxicité induite par l'anticorps EMAB6 est supérieure à celle induite par Rituxan<sup>®</sup>. Comme déjà observée avec les cellules Raji, cette différence est particulièrement importante pour les faibles concentrations d'anticorps. Une concentration de 0,5ng/ml de EMAB6 induit le même pourcentage de lyse que 500ng/ml de Rituxan<sup>®</sup> soit un rapport de concentrations de 1000. A la concentration de 5ng/ml, les pourcentages de lyse sont de 269 et 9% pour EMAB6 et Rituxan<sup>®</sup>, respectivement. A la dose maximale testée (500ng/ml), la différence est encore très importante puisque les pourcentages d'ADCC sont de 350 et 100% pour EMAB6 et Rituxan<sup>®</sup>, respectivement. Un résultat intéressant correspond aux concentrations qui donnent 50% de lyse. Le rapport EC50 Rituxan<sup>®</sup>/EC50 EMAB6 dans ce test est estimé à 10 000 (estimation graphique en ng/ml de EC50 selon l'hypothèse que Rituxan<sup>®</sup> et EMAB6 atteignent le même E Max).

Dans ces tests les activités cytotoxiques de EMAB6 et celle de EMAB603 sont donc très supérieures à celle de Rituxan<sup>®</sup>.

#### D. Activation du CD16 (sécrétion d'IL-2)

L'activation CD16 (FcγRIIIA) induite par l'anticorps chimérique EMAB6 a été déterminée en présence de cellules Raji ou bien de lymphocytes B de patients présentant une LLC. Ce test évalue la capacité de l'anticorps à se fixer

sur le récepteur CD16 (FcγRIIIA) exprimé sur les cellules Jurkat-CD16 et à induire la sécrétion d'IL-2. L'anticorps anti-CD20 chimérique Rituxan<sup>®</sup> est inclus dans les tests pour comparaison.

La mesure d'activation CD16 est réalisée sur la lignée Jurkat-CD16 en présence de cellules Raji ou de lymphocytes B de patients présentant une LLC de la façon suivante :

Mélange en plaque de 96 puits : 50µl d'une solution d'anticorps (dilution à 10 000, 1 000, 100 et 10 ng/ml en IMDM 5% SVF pour les lymphocytes B de patients présentant une LLC-B et 10 000, 2 000, 1 000, 200, 100, 50 et 25 ng/ml pour les cellules Raji), 50µl de PMA (Phorbol Myristate Acetate, dilution à 40ng/ml en IMDM 5% SVF), 50µl de cellules Raji ou de PBMC de patients présentant une LLC-B obtenues après Ficoll (>95% de lymphocytes B) diluées à  $6 \times 10^5$ /ml en IMDM 5% SVF, et 50µl de cellules Jurkat-CD16 ( $20 \times 10^6$ /ml en IMDM 5% SVF). Des contrôles sans anticorps sont inclus dans tous les tests. Après incubation 1 nuit à 37°C, les plaques sont centrifugées, et l'IL-2 contenue dans les surnageants évaluée avec le kit commercial (Quantikine de chez R/D). La lecture de la DO se fait à 450nm.

Les résultats sont exprimés dans un premier temps en taux d'IL-2 en fonction de la concentration d'anticorps (de 0 à 2500ng/ml concentration finale), puis en pourcentage relatif, 100% étant la valeur obtenue avec Rituxan<sup>®</sup> à la plus forte concentration testée.

Les résultats obtenus avec les cellules de la lignée Raji, présentés en Fig. 9 (A), indiquent qu'en présence de l'anticorps EMAB6 et de Rituxan<sup>®</sup>, les cellules Jurkat-CD16 sécrètent de l'IL-2, indiquant une activation cellulaire via la fixation de la portion Fc des anticorps sur le CD16. Néanmoins l'anticorps EMAB6 possède une

activité inductrice beaucoup plus forte que l'anticorps Rituxan<sup>®</sup>. Ainsi, à la concentration de 6,25ng/ml les pourcentages d'IL-2 sont de 112 et 21% pour EMAB6 et Rituxan<sup>®</sup> respectivement. A 50ng/ml, la différence est encore importante, les pourcentages d'IL-2 étant de 112 et 65% respectivement. Aux plus fortes concentrations, cette différence diminue, puisque à 2500ng/ml, les pourcentages respectifs d'IL-2 entre EMAB6 et Rituxan<sup>®</sup> sont de 124 et 100%. Le rapport EC50 Rituxan<sup>®</sup>/EC50 EMAB6 dans ce test est estimé à 15 (estimation graphique en ng/ml de EC50 selon l'hypothèse que Rituxan<sup>®</sup> et EMAB6 atteignent le même E Max).

Ces résultats confortent les résultats d'ADCC, tous deux dépendants du CD16. Ils indiquent que l'engagement du CD16 (FcγRIIIA) par la portion Fc de l'anticorps EMAB6 est suivie d'une forte activation cellulaire conduisant à l'induction de fonctions effectrices.

L'activation CD16 (FcγRIIIA) induite par l'anticorps chimérique EMAB603 en présence de cellules Raji est comparable avec celle induite par l'anticorps EMAB6.

Avec les lymphocytes de patients présentant une LLC-B, les résultats obtenus, présentés en Fig. 10, montrent qu'en présence des anticorps anti-CD20 Rituxan<sup>®</sup> et EMAB6, les cellules Jurkat-CD16 sécrètent de l'IL-2, indiquant une activation cellulaire via la fixation de la portion Fc des anticorps par le CD16. Néanmoins l'anticorps EMAB6 possède une capacité inductrice beaucoup plus importante que l'anticorps Rituxan<sup>®</sup>. En effet, l'activité d'induction de sécrétion d'IL-2 de Rituxan<sup>®</sup> est proche de la ligne de base pour les concentrations de 2,5 et 25ng/ml, alors que celle de l'anticorps EMAB6 est significative. Ainsi, à la concentration de 25ng/ml, les pourcentage d'IL-2 sont de 132 et 34% pour EMAB6 et

Rituxan<sup>®</sup> respectivement. A la plus forte concentration (2500ng/ml), les pourcentages d'IL-2 sont de 148 et 100% respectivement. Le rapport EC50 Rituxan<sup>®</sup>/EC50 EMAB6 dans ce test est supérieur à 100 : il est estimé à 300 (estimation graphique en ng/ml de EC50 selon l'hypothèse que Rituxan<sup>®</sup> et EMAB6 atteignent le même E Max).

En conclusion, l'ensemble des tests effectués sur les cellules Raji démontre que les anticorps EMAB6 et EMAB603, contrairement à Rituxan<sup>®</sup> sont fortement cytotoxiques et induisent une activation des cellules exprimant le CD16 (FcγRIIIA) et cela particulièrement aux faibles concentrations d'anticorps. Par contre dans ces mêmes conditions, l'activité cytotoxique dépendante du complément de l'anticorps EMAB6 diminue d'environ 50% comparée à celle de Rituxan<sup>®</sup>.

Ces résultats sont renforcés par les études réalisées avec des cellules isolées à partir de patients présentant une LLC-B qui indiquent que l'anticorps EMAB6 est beaucoup plus cytotoxique que Rituxan<sup>®</sup> vis à vis des lymphocytes B de patients atteints de LLC-B. Les différences entre les deux anticorps sont plus marquées avec les cellules issues de patients atteints de LLC-B qu'avec les cellules Raji, démontrant un intérêt thérapeutique important pour EMAB6 comparé à Rituxan<sup>®</sup> dans cette pathologie.

L'origine de cette différence plus importante peut, entre autres, être due à la plus faible expression antigénique du CD20 sur les lymphocytes B de patients atteints de LLC-B par rapport à celle des cellules Raji.

Par analogie avec les cellules Raji, on peut suggérer que l'activité cytotoxique dépendante du complément de l'anticorps EMAB6 vis à vis des lymphocytes de patients atteints de LLC-B doit être inférieure à celle induite par Rituxan<sup>®</sup>, présentant ainsi l'avantage d'être moins

toxique « in vivo » du fait des effets indésirables liés à une forte activation de la voie classique du complément.

**Exemple 4 : Analyse des glycanes de EMAB6 et EMAB603 par HPCE-LIF**

La structure du N-glycane de la chaîne lourde des anticorps EMAB6 et EMAB603 a été analysée par HPCE-LIF. La structure du N-glycane de la chaîne lourde de Rituxan<sup>®</sup> a aussi été analysée pour comparaison.

A cette fin les anticorps monoclonaux anti-CD20 ont été dessalés sur une colonne de Sephadex G-25 (HiTrap Desalting, Amersham Biosciences), séchés par évaporation et remis en suspension dans le tampon d'hydrolyse de la PNGase F (Glyko) en présence de 50 mM de  $\beta$ -mercaptoéthanol. Après 16 h d'incubation à 37°C, la fraction protéique a été précipitée par l'ajout d'éthanol absolu et le surnageant, qui contient les N-glycanes, séché par évaporation. Les oligosaccharides ainsi obtenus ont été soit marqués directement par un fluorochrome : l'APTS (1-amino-pyrène-3,6,8-trisulfonate), soit soumis à l'action d'exoglycosidases spécifiques avant marquage par l'APTS. Les oligosaccharides ainsi marqués ont été injectés sur un capillaire N-CHO, séparés et quantifiés par électrophorèse capillaire à détection de fluorescence induite par laser (HPCE-LIF).

L'évaluation du taux de fucose a été réalisée soit par l'addition des formes fucosylées isolées, soit plus spécifiquement après action simultanée de la neuraminidase, la  $\beta$ -galactosidase et la N-acétylhexosaminidase, permettant d'obtenir, sur l'électrophorégramme, 2 pics correspondant au pentasaccharide [GlcNac2-Man3], fucosylé ou non:

Tableau 1 : analyse des N-glycannes des anticorps anti-CD20 EMAB603 et Rituxan<sup>®</sup>

Anti-CD20	% Fucose	% Galactose	Fuc/Gal
EMAB603	15	37	0,4
Rituxan <sup>®</sup>	93	57	1,63

Le taux de fucose, exprimé en %, a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Taux de fucose} = \frac{[\text{GlcNac2-Man3}] \text{ fucosylé} \times 100}{[\text{GlcNac2-Man3} + \text{GlcNac2-Man3 fucosylé}]}$$

Le taux de galactose, exprimé en %, a été calculé en additionnant les pourcentages des formes oligosaccharidiques contenant du galactose obtenues après action de la neuraminidase et de la fucosidase. La formule utilisée est la suivante :

$$\text{Taux de galactose} = (G1+G1B) + 2x(G2+ G2B)$$

Le rapport taux de fucose/taux de galactose est obtenu en divisant le taux de fucose par le taux de galactose, les taux étant calculés comme décrit ci-dessus.

D'après cette analyse (cf. Tableau 1), il apparaît que les anticorps EMAB6 et EMAB603 sont peu fucosylés (% Fucose inférieur à 25) comparé à Rituxan<sup>®</sup> (% Fucose = 93). De plus, le ratio Fuc/Gal (ratio taux de Fucose / taux de Galactose) de EMAB6 et de EMAB603 est faible (ratio Fuc/Gal inférieur à 0,6) contrairement aux anticorps exprimés dans CHO comme Rituxan<sup>®</sup> (ratio Fuc/Gal = 1,63).

### Revendications

1. Anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène CD20, caractérisé en ce que la région variable de chacune de ses chaînes légères est codée par une séquence possédant au moins 70% d'identité avec la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 5, la région variable de chacune de ses chaînes lourdes est codée par une séquence possédant au moins 70% d'identité avec la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 7, et les régions constantes de ses chaînes légères et de ses chaînes lourdes sont des régions constantes provenant d'une espèce non-murine.

2. Anticorps selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite région variable de chacune de ses chaînes légères est codée par une séquence possédant au moins 80% d'identité avec la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 5, et en ce que ladite région variable de chacune de ses chaînes lourdes est codée par une séquence possédant au moins 80% d'identité avec la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 7.

3. Anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que ladite région variable de chacune de ses chaînes légères est codée par une séquence possédant au moins 90% d'identité avec la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 5, et en ce que ladite région variable de chacune de ses chaînes lourdes est codée par une séquence possédant au moins 90% d'identité avec la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 7.

4. Anticorps selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite région variable

de chacune de ses chaînes légères est codée par une séquence possédant au moins 95% d'identité avec la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 5, et en ce que ladite région variable de chacune de ses chaînes lourdes est codée par une séquence possédant au moins 95% d'identité avec la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 7.

5. Anticorps selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite région variable de chacune de ses chaînes légères est codée par une séquence possédant au moins 99% d'identité avec la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 5, et en ce que ladite région variable de chacune de ses chaînes lourdes est codée par une séquence possédant au moins 99% d'identité avec la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 7.

6. Anticorps selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la région variable de chacune de ses chaînes légères est codée par la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 5 ou par la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 25, la région variable de chacune de ses chaînes lourdes est codée par la séquence d'acide nucléique murine SEQ ID NO : 7, et les régions constantes de ses chaînes légères et de ses chaînes lourdes sont des régions constantes provenant d'une espèce non-murine.

7. Anticorps selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les régions constantes de chacune de ses chaînes légères et de chacune de ses chaînes lourdes sont des régions constantes humaines.

8. Anticorps selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la région constante de chacune de ses chaînes légères est de type  $\kappa$ .

9. Anticorps selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la région constante de chacune de ses chaînes lourdes est de type  $\gamma$ .

10. Anticorps selon la revendication 9, caractérisé en ce que la région constante de chacune de ses chaînes lourdes est de type  $\gamma_1$ .

11. Anticorps selon la revendication 10, caractérisé en ce que la région constante de chacune de ses chaînes lourdes est de type  $\gamma_1$  et codée par la séquence d'acide nucléique humaine SEQ ID NO : 23 et en ce que la région constante de chacune de ses chaînes légères est codée par la séquence d'acide nucléique humaine SEQ ID NO : 21.

12. Anticorps selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que chacune de ses chaînes légères est codée par la séquence d'acide nucléique chimère murine-humaine SEQ ID NO : 13 ou par la séquence d'acide nucléique chimère murine-humaine SEQ ID NO : 27 et en ce que chacune de ses chaînes lourdes est codée par la séquence d'acide nucléique chimère murine-humaine SEQ ID NO : 19.

13. Anticorps selon la revendication 12, caractérisé en ce que la séquence peptidique déduite de la séquence SEQ ID NO : 13 est la séquence SEQ ID NO : 14 et en ce que la séquence peptidique déduite de la séquence SEQ ID NO : 19 est la séquence SEQ ID NO : 20.

14. Anticorps selon la revendication 12, caractérisé en ce que la séquence peptidique déduite de la séquence SEQ ID NO : 27 est la séquence SEQ ID NO : 28 et en ce que la séquence peptidique déduite de la séquence SEQ ID NO : 19 est la séquence SEQ ID NO : 20.

15. Anticorps selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est produit par une lignée cellulaire d'hybridome de rat.

16. Anticorps selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il est produit dans l'hybridome de rat YB2/0 (cellule YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20, déposée à l'American Type Culture Collection sous le numéro ATCC CRL-1662).

17. Anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il s'agit de l'anticorps EMAB6 produit par le clone R509 déposé sous le numéro d'enregistrement CNCM I-3314 à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM).

18. Anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 et 14, caractérisé en ce qu'il s'agit de l'anticorps EMAB603 produit par le clone R603 déposé sous le numéro d'enregistrement CNCM I-3529 à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM).

19. Vecteur pEF-EMAB6-K d'expression de la chaîne légère d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 de séquence SEQ ID NO : 12.

20. Vecteur pEF-EMAB6-H d'expression de la chaîne lourde d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 de séquence SEQ ID NO : 18.

21. Lignée cellulaire stable exprimant un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 18.

22. Lignée cellulaire stable selon la revendication 21 choisie parmi le groupe consistant en : SP2/0, YB2/0, IR983F, le myélome humain Namalwa, PERC6, les lignées CHO, notamment CHO-K-1, CHO-Lec10, CHO-Lec1, CHO-Lec13, CHO Pro-5, CHO dhfr-, Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293-HEK, BHK, K6H6, NS0, SP2/0-Ag 14 et P3X63Ag8.653.

23. Lignée cellulaire stable selon la revendication 21 ou 22, ayant intégré les deux vecteurs d'expression pEF-EMAB6-K et pEF-EMAB6-H selon les revendications 19 et 20.

24. Clone R509 déposé sous le numéro d'enregistrement CNCM I-3314 à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM).

25. Clone R602 déposé sous le numéro d'enregistrement CNCM I-3529 à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM).

26. Fragment d'ADN de séquence SEQ ID NO : 19 codant pour la chaîne lourde d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 18.

27. Fragment d'ADN de séquence SEQ ID NO : 13 codant pour la chaîne légère d'un anticorps selon l'une des revendications 1 à 13.

28. Fragment d'ADN de séquence SEQ ID NO : 27 codant pour la chaîne légère d'un anticorps selon l'une des revendications 1 à 12 et 14.

29. Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, pour activer in vitro les récepteurs Fc $\gamma$ RIII de cellules immunitaires effectrices.

30. Anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, pour son utilisation comme médicament.

31. Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une leucémie ou d'un lymphome.

32. Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une pathologie choisie parmi les leucémies aiguës lymphoblastiques B, les lymphomes lymphoblastiques B, les lymphomes à cellules B matures, parmi lesquels la leucémie lymphoïde chronique de type B (LLC-B), le lymphome lymphocytaire à petits lymphocytes B, la leucémie prolymphocytaire B, le lymphome lymphoplasmocytaire, le lymphome à cellules du manteau, le lymphome folliculaire, le lymphome de la zone marginale de type MALT, le lymphome ganglionnaire de la zone marginale avec ou sans cellule B monocytoïde, le lymphome splénique de la zone marginale (avec ou sans lymphocyte villeux), la leucémie à tricholeucocytes, le lymphome diffus à grandes cellules B, le lymphome de Burkitt, ainsi que toute pathologie dysimmunitaire

impliquant des cellules de la lignée lymphoïde B dont les maladies auto-immunes.

33. Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une leucémie lymphoïde.

34. Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement de la leucémie lymphoïde chronique de type B (LLC-B).

35. Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement de la maladie du greffon contre l'hôte chronique.

36. Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du rejet de greffes d'organes, notamment de rein.

37. Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 18 en combinaison avec un ou plusieurs autre(s) anticorps dirigé(s) contre un ou plusieurs autre(s) antigène(s) exprimé(s) sur les cellules lymphoïdes, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une leucémie ou d'un lymphome.

38. Utilisation d'un anticorps selon la revendication 37, caractérisée en ce que ledit antigène exprimé sur les cellules lymphoïdes est choisi parmi le HLA-DR, le CD19, le CD23, le CD80, le CD22, le CD32 et le CD52.

39. Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, en association avec des cellules exprimant des FcγR, telles que les cellules NK (Natural Killer), les cellules NKT (Natural Killers T), les lymphocytes Tγδ, les macrophages, les monocytes ou les cellules dendritiques, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une leucémie ou d'un lymphome.

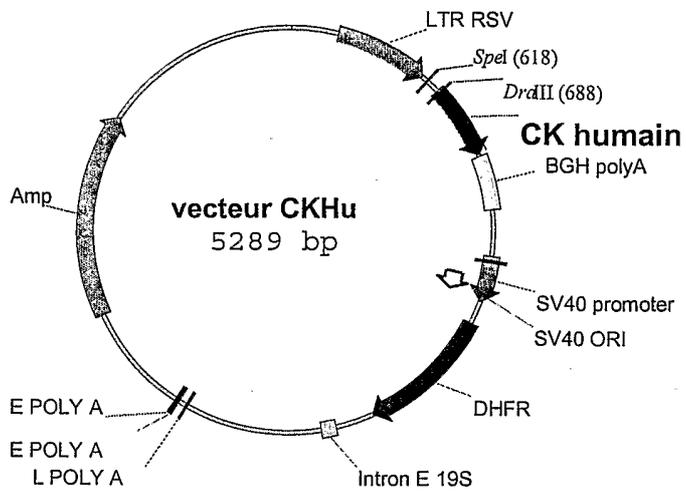


Fig. 1

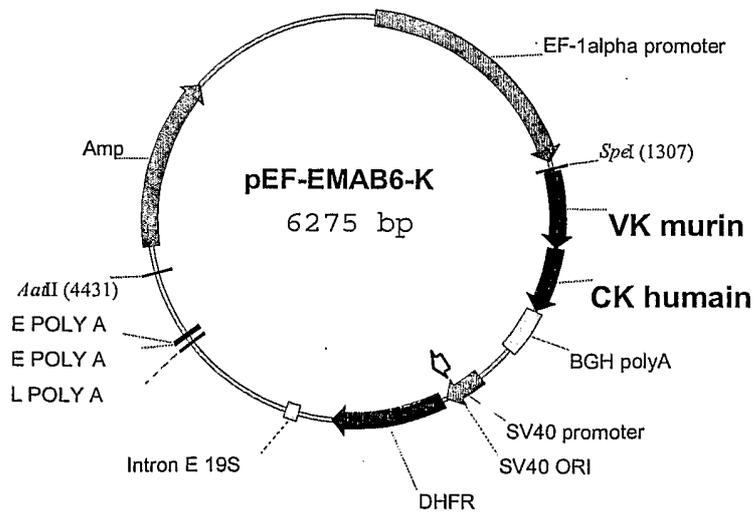


Fig. 2

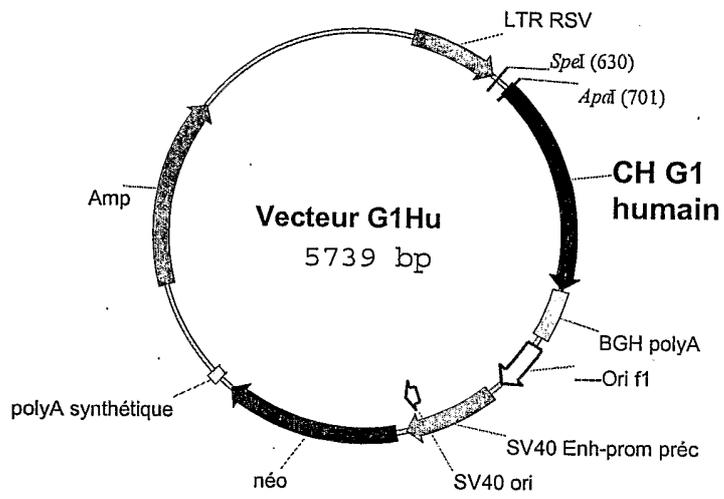


Fig. 3

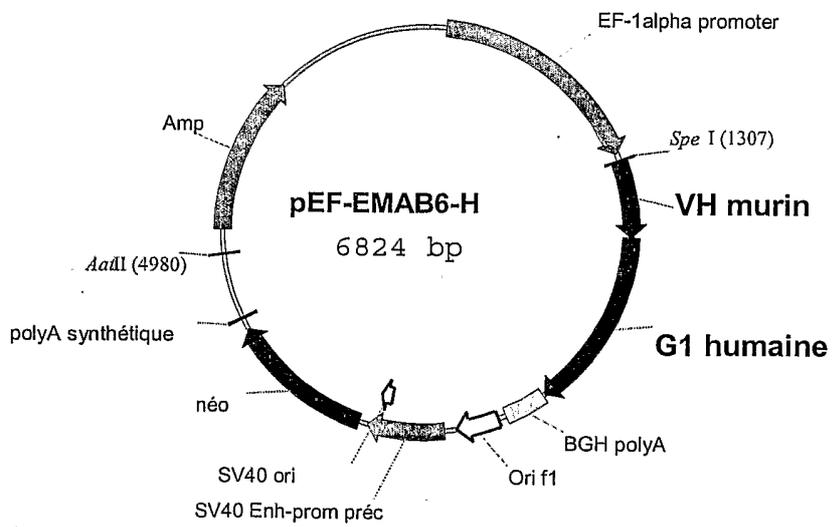


Fig. 4

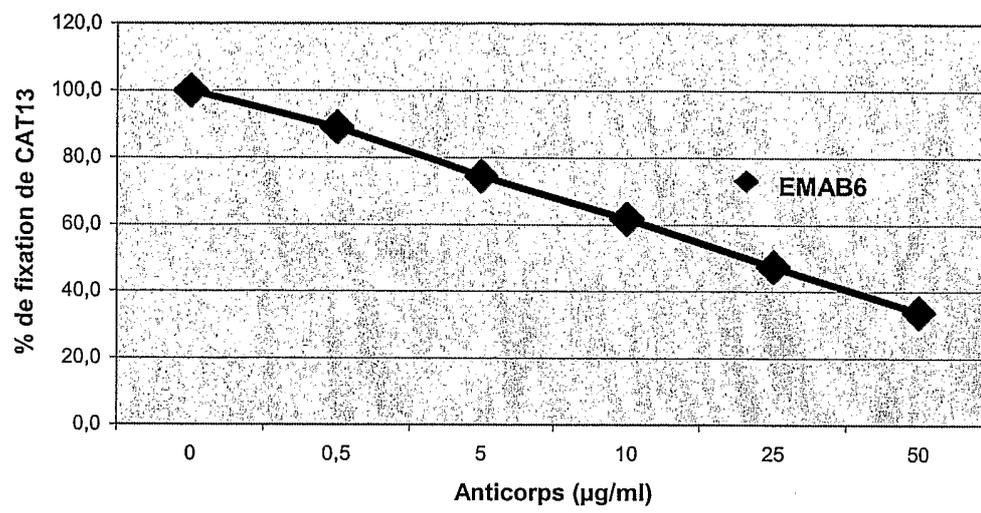


Fig. 5

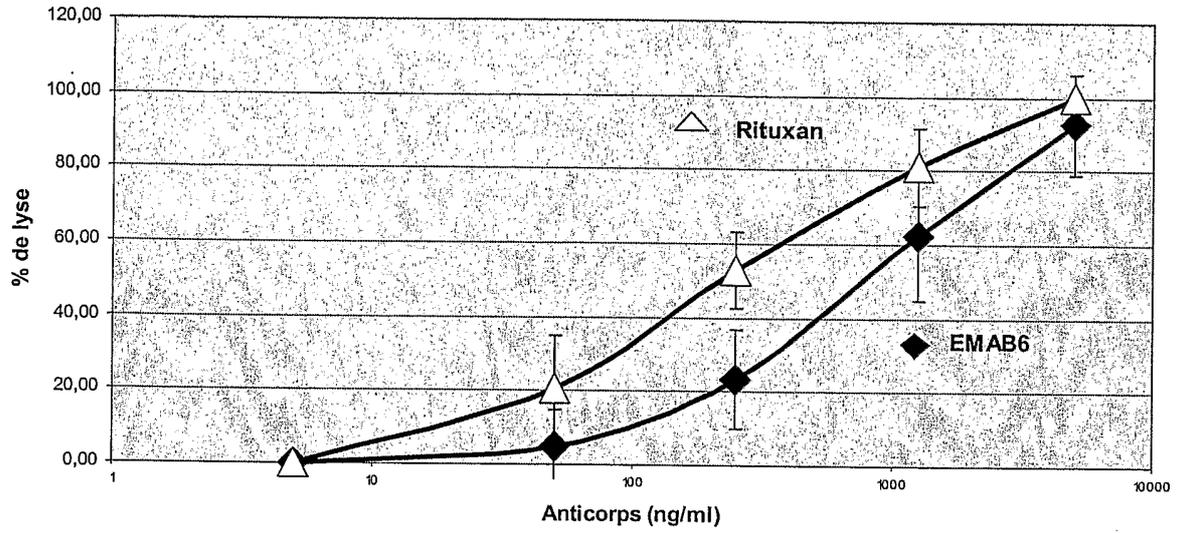


Fig. 6 (A)

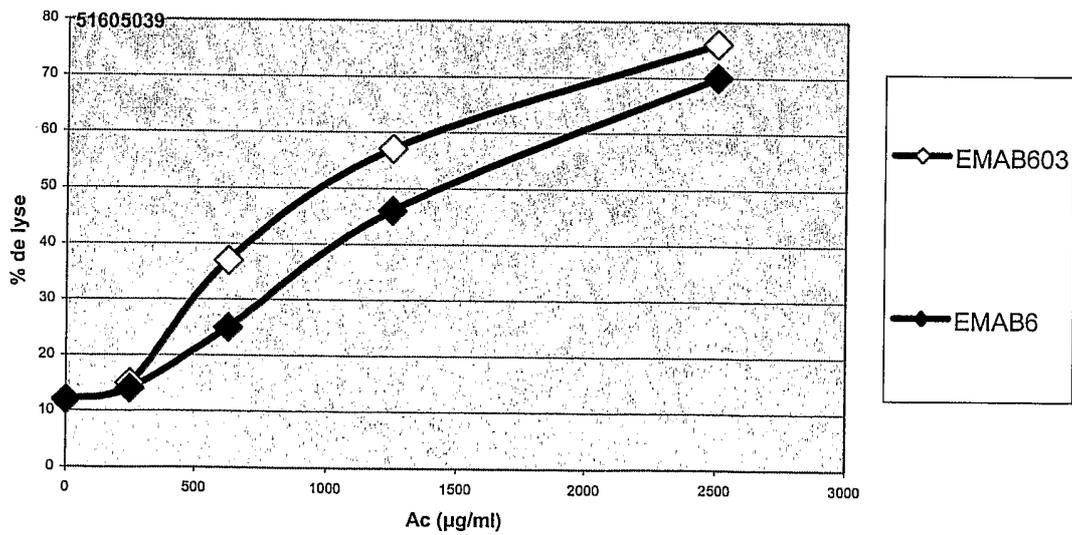


Fig. 6 (B)

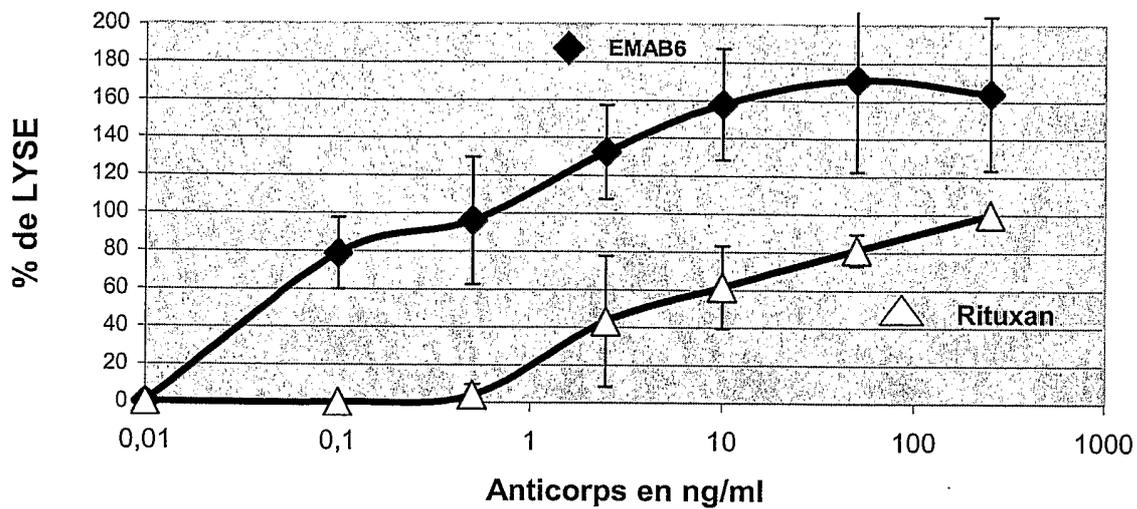


Fig. 7 (A)

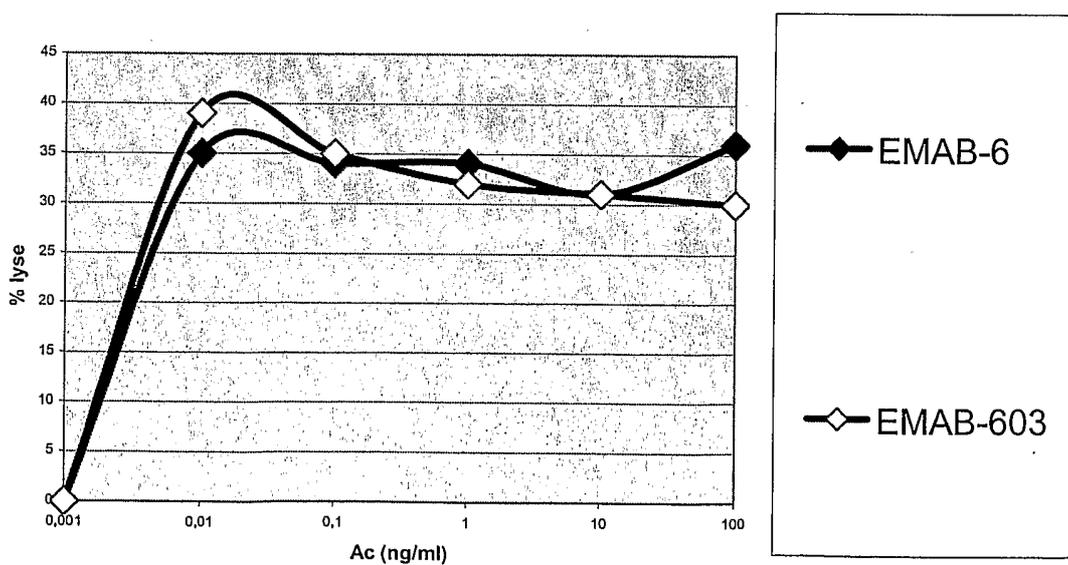


Fig.7 (B)

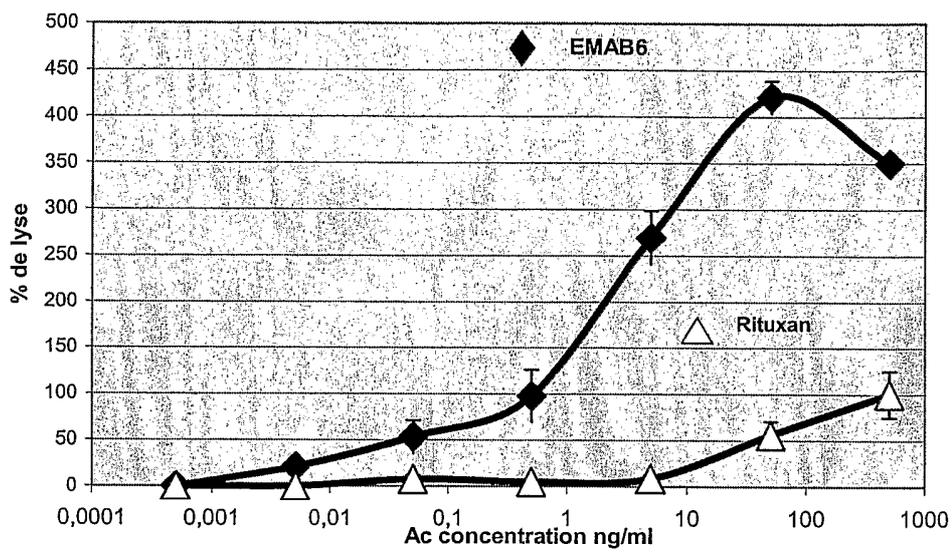


Fig. 8

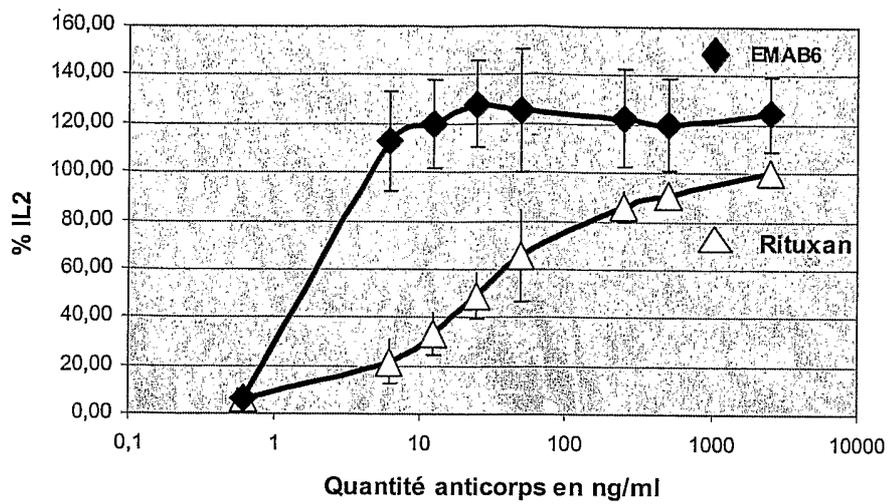


Fig. 9 (A)

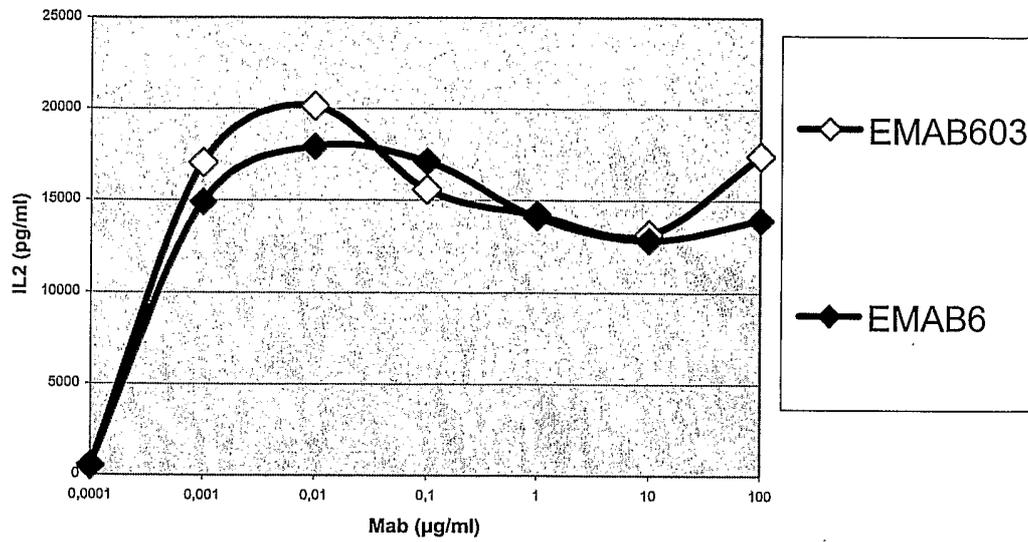


Fig.9 (B)

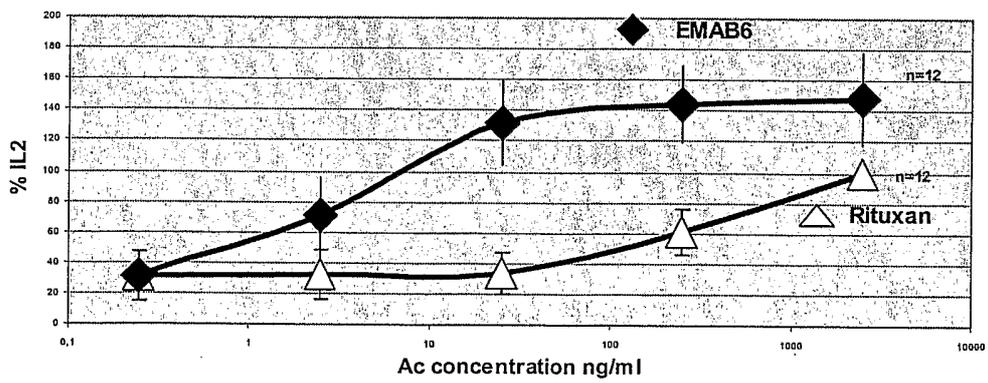


Fig. 10

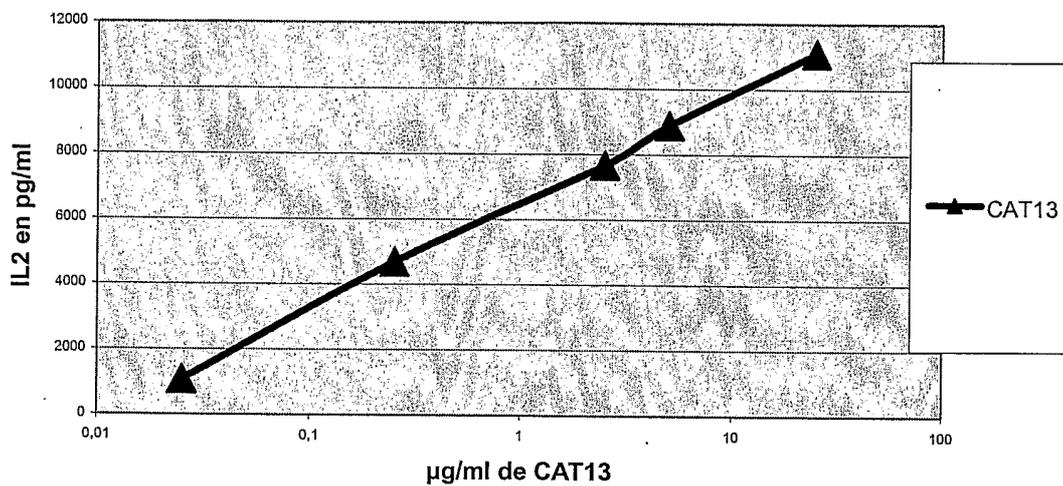


Fig. 11

10/10

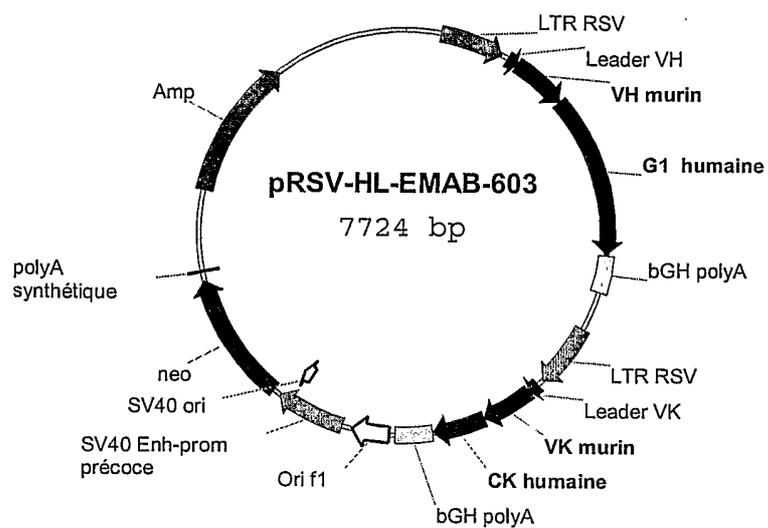


Fig.12

20051122.ST25.txt  
SEQUENCE LISTING

<110> Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB)

<120> Anticorps monoclonal dirigé contre le CD20

<130> Anti-CD20

<160> 29

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 1

actgccatca atcttccact tgac

24

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 2

ctgaggggtgt agaggtcaga ctg

23

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20051122.ST25.txt

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 3

ttgttcaaga agcacacgac tgaggcac

28

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 4

gagttccagg tcaaggtcac tggctcag

28

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 5

caaattgttc tctcccagtc tccagcaatc ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca 60

atgacttgca gggccagctc aagtgtaagt tacatgcact ggtaccagca gaagccagga 120

tcctcccca aaccctggat ttatgccaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 180

ttcagtgcca gtgggtctgg gacctttat tctttcacia tcagcagagt ggaggctgaa 240

gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg acttttaacc caccacggt cggagggggg 300

accaggctgg aaataaacg g 321

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 6

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly  
1 5 10 15

20051122.ST25.txt

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Phe Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Asn Arg  
 100 105

<210> 7

<211> 354

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 7

caggcttatc tacagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcctc agtgaagatg 60  
 tcctgcaagg cttctggcta cacatttacc agttacaata tgcactgggt aaagcagaca 120  
 cctagacagg gcctggaatg gattggaggt atttatccag gaaatggatga tacttcctac 180  
 aatcagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgtaggca aatcctccag cacagcctac 240  
 atgcagctca gcagcctgac atctgaagac tctgcggtct atttctgtgc aagatatgac 300  
 tacaactatg ctatggacta ctgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca 354

<210> 8

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

20051122.ST25.txt

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Gly Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Gly Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ala Arg Tyr Asp Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 9

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 9

ctcagtacta gtgccgccac catggatttt caagtcgaga ttttcag

47

<210> 10

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 10

tgaagacact tgggtgcagcc acagtccggt ttatttccag cctggt

46

<210> 11

<211> 5289

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20051122.ST25.txt

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Vector

&lt;400&gt; 11

```
gatctcccga tcccctatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa      60
gccagtatct gctccctgct tgtgtgttgg aggtcgctga gtagtgcgcg agcaaaattt    120
aagctacaac aaggcaaggc ttgaccgaca attgcatgaa gaatctgctt agggttaggc    180
gttttgcgct gcttcgcat gtacgggcca gatatacgcg tatctgaggg gactaggggtg    240
tgtttagggc aaaagcgggg cttcggttgt acgcggttag gagtcccctc aggatatagt    300
agtttcgctt ttgcataggg agggggaaat gtagtcttat gcaatactct tgtagtcttg    360
caacatggta acgatgagtt agcaacatgc cttacaagga gagaaaaagc accgtgcatg    420
ccgattggtg gaagtaaggt ggtacgatcg tgccttatta ggaaggcaac agacgggtct    480
gacatggatt ggacgaacca ctgaattccg cattgcagag atattgtatt taagtgccta    540
gctcgataca ataaacgcca tttgaccatt caccacattg gtgtgcacct ccaagcttgg    600
taccgagctc ggatccacta gtaacggccg ccagtgtgct ggaattctgc agatatccat    660
cactactggc gccgctggct gcaccaagtg tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt    720
tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca    780
aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcggttaa ctcccaggag agtgtcacag    840
agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag    900
actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccc    960
tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt agtctagagc tcgctgatca gcctcgactg   1020
tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt gccctcccc cgtgccttcc ttgaccctgg   1080
aaggtgccac tcccactgtc ctttctaata aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga   1140
gtaggtgtca ttctattctg ggggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg   1200
aagacaatag caggcatgct ggggatgcmg tgggctctat ggcttctgag gcgaaagaa   1260
ccagctgggg ctcgactgtg gaatgtgtgt cagttagggg gtggaaagtc cccaggctcc   1320
ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt cagcaaccag gtgtggaaag   1380
tcccaggct cccagcagg cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc   1440
atagtccgc ccctaactcc gccatcccc cccctaactc cgcccagttc cgcccattct   1500
ccgccccatg gctgactaat tttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc ctcggcctct   1560
gagctattcc agaagtagtg aggaggcttt tttggaggcc taggcttttg caaaaagctt   1620
gggggggggg acagctcagg gctgcmgatt cgcmgcaaac ttgacggcaa tcctagcmgt   1680
aaggctggta ggattttatc cccgctgcca tcatggttcg accattgaac tgcatcmgtc   1740
ccgtgtcca agatatgggg attggcaaga acggagacct accctggcct ccgctcagga   1800
acgagttcaa gtacttcaa agaatgacca caacctctc agtggaaagt aaacagaatc   1860
```

## 20051122.ST25.txt

tggtgattat gggtaggaaa acctggttct ccattcctga gaagaatcga cctttaaagg 1920  
acagaattaa tatagttctc agtagagaac tcaaagaacc accacgagga gctcattttc 1980  
ttgccaaaag tttggatgat gccttaagac ttattgaaca accggaattg gcaagtaaag 2040  
tagacatggt ttggatagtc ggaggcagtt ctgtttacca ggaagccatg aatcaaccag 2100  
gccacctcag actctttgtg acaaggatca tgcaggaatt tgaaagtgac acgtttttcc 2160  
cagaaattga tttggggaaa tataaacttc tcccagaata cccaggcgtc ctctctgagg 2220  
tccaggagga aaaaggcatc aagtataagt ttgaagtcta cgagaagaaa gactaacagg 2280  
aagatgcttt caagtctctc gctcccctcc taaagctatg ctttttata agaccatggg 2340  
acttttgctg gcttttagatc gatctttgtg aaggaacctt acttctgtgg tgtgacataa 2400  
ttggacaaac tacctacaga gatttaaagc tctaaggtaa atataaaatt ttttaagtga 2460  
taatgtgtta aactactgat tctaattggt tgtgtatfff agattccaac ctatggaact 2520  
gatgaatggg agcagtggty gaatgccttt aatgaggaaa acctgttttg ctcagaagaa 2580  
atgccatcta gtgatgatga ggctactgct gactctcaac attctactcc tccaaaaaag 2640  
aagagaaaag tagaagacc caaggacttt ccttcagaat tgctaagttt tttgagtcac 2700  
gctgtgttta gtaatagaac tcttgcttgc tttgctatff acaccacaaa ggaaaaagct 2760  
gcactgctat acaagaaaat tatggaaaaa tattctgtaa cttttataag taggcataac 2820  
agttataatc ataacatact gttttttctt actccacaca ggcatagagt gtctgctatt 2880  
aataactatg ctcaaaaatt gtgtaccttt agctttttaa tttgtaaagg ggttaataag 2940  
gaatatttga tgtatagtc cttgactaga gatcataatc agccatacca catttgtaga 3000  
ggttttactt gctttaaaaa acctcccaca cctcccctg aacctgaaac ataaaatgaa 3060  
tgcaattggt gttgttaact tgtttattgc agcttataat ggttacaaat aaagcaatag 3120  
catcacaaat ttcacaaata aagcattttt ttcactgcat tctagttgtg gtttgtccaa 3180  
actcatcaat gtatcttatac atgtctggat ccgctgatgg tgcactctca gtacaatctg 3240  
ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acaccgcca acaccgctg acgcgccctg 3300  
acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg 3360  
catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg agacgaaagg gcctcgtgat 3420  
acgcctatff ttataggtta atgtcatgat aataatggtt tcttagacgt caggtggcac 3480  
ttttcgggga aatgtgvcg gaaccctat ttgtttatff ttctaaatac attcaaatat 3540  
gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag 3600  
tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcctt tattccctff tttgcggcat tttgccttcc 3660  
tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc 3720  
acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc 3780  
cgaagaacgt tttccaatga tgagcactff taaagttctg ctatgtggcg cggtattatc 3840  
ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tgcgccata cactattctc agaatgactt 3900

## 20051122.ST25.txt

ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt 3960  
 atgcagtgct gccataacca tgagtataa cactgaggcc aacttacttc tgacaacgat 4020  
 cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct 4080  
 tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat 4140  
 gcctgtagca atggcaacaa cgttgacgaa actattaact ggcgaaactac ttactctagc 4200  
 ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgag 4260  
 ctcgccctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccgggtg agcgtgggtc 4320  
 tcgaggatc attgcagcac tggggccaga tggttaagccc tcccgtatcg tagttatcta 4380  
 cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgtg agataggtgc 4440  
 ctactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga 4500  
 tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat ctaggatgaag atcctttttg ataattctcat 4560  
 gacaaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt cactgagcgc tcagaccccg tagaaaagat 4620  
 caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgagtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa 4680  
 accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa 4740  
 ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt 4800  
 aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctgctctgctc taatcctggt 4860  
 accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata 4920  
 gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt 4980  
 ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcggcac 5040  
 gcttcccga gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga 5100  
 gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg 5160  
 ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca ggggggaggga gcctatggaa 5220  
 aaacgccagc aacgcggcct ttttacgggt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat 5280  
 ggctcgaca 5289

<210> 12

<211> 6275

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Vector

<400> 12

tcgaggagac ctgcaaagat ggataaagtt ttaaacagag aggaatcttt gcagctaatg 60  
 gaccttctag gtcttgaaag gagtgggaat tggctccgggt gcccgtcagt gggcagagcg 120

## 20051122.ST25.txt

cacatcgccc acagtccccg agaagtgtg gggagggggtc ggcaattgaa ccggtgccta 180  
gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc gcctttttcc 240  
cgaggggtggg ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgcaa 300  
cgggtttgcc gccagaacac aggtaagtgc cgtgtgtggt tcccgcgggc ctggcctctt 360  
tacgggttat ggcccttgcg tgccttgaat tacttccacc tggctgcagt acgtgattct 420  
tgatcccag cttcgggttg gaagtgggtg ggagagttcg aggccttgcg cttaggagc 480  
cccttcgcct cgtgcttgag ttgaggcctg gcctgggcgc tggggccgcc gcgtgcgaat 540  
ctggtggcac cttcgcgcct gtctcgctgc tttcgataag tctctagcca tttaaaattt 600  
ttgatgacct gctgcgacgc tttttttctg gcaagatagt cttgtaaag cgggccaaga 660  
tctgcacact ggtatttcgg tttttggggc cgcgggcggc gacggggccc gtgctgcca 720  
gcgcacatgt tcggcgaggc ggggcctgcg agcgcggcca ccgagaatcg gacgggggta 780  
gtctcaagct ggccggcctg ctctggtgcc tggcctcgcg ccgccgtgta tcgccccgcc 840  
ctgggcggca aggctggccc ggtcggcacc agttgcgtga gcggaaagat ggccgcttcc 900  
cggccctgct gcagggagct caaaatggag gacgcggcgc tcgggagagc gggcgggtga 960  
gtcaccaca caaaggaaaa gggcctttcc gtcctcagcc gtcgcttcat gtgactccac 1020  
ggagtaccgg gcgccgtcca ggcacctcga ttagttctcg agcttttga gtacgtcgtc 1080  
tttaggttg ggggaggggt tttatgcat ggagtttccc cacactgagt ggggtggagac 1140  
tgaagttagg ccagcttggc acttgatgta attctccttg gaatttgccc tttttgagtt 1200  
tggatcttgg ttcatttca agcctcagac agtggttcaa agtttttttcc ttccatttca 1260  
ggtgtcgtga ggaattagct tggtaacaac agcaaagctt aaggtactag tgccgccacc 1320  
atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc 1380  
agaggacaaa ttgttctctc ccagtctcca gcaatcctgt ctgcatctcc aggggagaag 1440  
gtcacaatga cttgcagggc cagctcaagt gtaagttaca tgactggta ccagcagaag 1500  
ccaggatcct ccccaaac ctggatttat gccacatcca acctggcttc tggagtccct 1560  
gctcgttca gtggcagtggt gtctgggacc tcttattctt tcacaatcag cagagtggag 1620  
gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggactt ttaaccacc cacgttcgga 1680  
ggggggacca ggctggaaat aaaccggact gtggctgcac caagtgtctt catcttcccg 1740  
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 1800  
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 1860  
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagacct acagcctcag cagcaccctg 1920  
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 1980  
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgttagtc tagagctcgc 2040  
tgatcagcct cgactgtgcc ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccc ctccccctg 2100  
ccttccttga ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt 2160

## 20051122.ST25.txt

gcatcgcatt gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtgggggtggg gcaggacagc 2220  
aagggggagg attggaaga caatagcagg catgctgggg atgcggtggg ctctatggct 2280  
tctgaggcgg aaagaaccag ctggggctcg actgtggaat gtgtgtcagt taggggtgtgg 2340  
aaagtcccca ggctccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc 2400  
aaccaggtgt ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcatct 2460  
caattagtca gcaaccatag tcccgcccct aactccgccc atcccgcccc taactccgcc 2520  
cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt tttatttatg cagaggccga 2580  
ggccgcctcg gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg 2640  
cttttgcaaa aagctttatc cccgctgcca tcatggttcg accattgaac tgcacgctcg 2700  
ccgtgtccca agatatgggg attggcaaga acggagacct accctggcct ccgctcagga 2760  
acgagttcaa gtacttccaa agaatgacca caacctcttc agtggaaggt aaacagaatc 2820  
tggtgattat gggtaggaaa acctggttct ccattcctga gaagaatcga cttttaaagg 2880  
acagaattaa tatagttctc agtagagaac tcaaagaacc accacgagga gctcattttc 2940  
ttgcaaaaag tttggatgat gccttaagac ttattgaaca accggaattg gcaagtaaag 3000  
tagacatggt ttggatagtc ggaggcagtt ctgtttacca ggaagccatg aatcaaccag 3060  
gccacctcag actctttgtg acaaggatca tgcaggaatt tgaaagtgac acgtttttcc 3120  
cagaaattga tttggggaaa tataaacttc tcccagaata cccaggcgtc ctctctgagg 3180  
tccaggagga aaaaggcátc aagtataagt ttgaagtcta cgagaagaaa gactaacagg 3240  
aagatgcttt caagttctct gctcccctcc taaagctatg cttttttata agaccatggg 3300  
acttttgctg gcttttagatc gatctttgtg aaggaacctt acttctgtgg tgtgacataa 3360  
ttggacaaac tacctacaga gatttaaagc tctaaggtaa atataaaatt ttttaagtgt 3420  
taatgtgta aactactgat tctaattggt tgtgtatfff agattccaac ctatggaact 3480  
gatgaatggg agcagtggtg gaatgccttt aatgaggaaa acctgttttg ctcagaagaa 3540  
atgccatcta gtgatgatga ggctactgct gactctcaac attctactcc tccaaaaaag 3600  
aagagaaagg tagaagacc caaggacttt ccttcagaat tgctaagttt tttgagtcac 3660  
gctgtgttta gtaatagaac tcttgcttgc tttgctatff acaccacaaa ggaaaaagct 3720  
gcactgctat acaagaaaat tatggaaaaa tattctgtaa cttttataag taggcataac 3780  
agttataatc ataacatact gttttttctt actccacaca ggcatagagt gtctgctatt 3840  
aataactatg ctcaaaaatt gtgtaccttt agctttttta tttgtaaagg ggttaataag 3900  
gaatatttga tgtatagtgc cttgactaga gatcataatc agccatacca catttgtaga 3960  
ggttttactt gcttttaaaaa acctcccaca cctcccctg aacctgaaac ataaaatgaa 4020  
tgcaattggt gttgttaact tgtttattgc agcttataat ggttacaat aaagcaatag 4080  
catcaciaat ttcaciaata aagcattttt ttcactgcat tctagttgtg gtttgtccaa 4140  
actcatcaat gtatcttctc atgtctggat ccgctgatgg tgcaactctca gtacaatctg 4200

## 20051122.ST25.txt

ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acacccgcca acacccgctg acgcgcccctg 4260  
acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg 4320  
catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg agacgaaagg gcctcgtgat 4380  
acgcctatth ttataggtha atgtcatgat aataatggth tcttagacgt cagggtggcac 4440  
ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat ttgtttatth ttctaaatac attcaaatat 4500  
gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag 4560  
tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcctt tattccctth tttgcggcat tttgccttcc 4620  
tgthtttgct caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc 4680  
acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc 4740  
cgaagaacgt tttccaatga tgagcactth taaagttctg ctatgtggcg cggattatc 4800  
ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgata cactattctc agaatgactt 4860  
ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcattgacag taagagaatt 4920  
atgcagtgct gccataacca tgagtataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat 4980  
cggaggaccg aaggagctaa ccgctthttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct 5040  
tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc catacacaac gacgagcgtg acaccacgat 5100  
gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac ttactctagc 5160  
ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg 5220  
ctcggccctt ccggtggct ggtttattgc tgataaatct ggagccgggtg agcgtgggtc 5280  
tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta 5340  
cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgtg agatagggtg 5400  
ctcactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga 5460  
tttaaaactt cattthtaat ttaaaaggat ctaggatgag atcctthttg ataatctcat 5520  
gacaaaatc ccttaacgtg agttttcgth cactgagcg tcagaccccg tagaaaagat 5580  
caaaggatct tcttgagatc cththththct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa 5640  
accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tththccgaa 5700  
ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt 5760  
aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc taatcctgth 5820  
accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata 5880  
gttaccgat aaggcgcagc ggtcgggctg aacgggggtc tcgtgcacac agcccagctt 5940  
ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac 6000  
gcttcccga gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga 6060  
gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg 6120  
ccaccttga cttgagcgtc gattthttgt atgtctgtca ggggggcgga gcctatggaa 6180  
aaacgccagc aacgcggcct tthtacggtt cctggcctth tgctggcctt ttgctcacat 6240

20051122.ST25.txt

ggctcgacag atccgacgga tcgggagatc ctage 6275

<210> 13

<211> 639

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 13

caaattgttc tctcccagtc tccagcaatc ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca 60  
 atgacttgca gggccagctc aagtgtaagt tacatgcact ggtaccagca gaagccagga 120  
 tcctccccc aaccctggat ttatgccaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 180  
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctttat tctttcaca tcagcagagt ggaggctgaa 240  
 gatgctgcca cttattactg ccagcagtg acttttaacc caccacggt cggagggggg 300  
 accaggctgg aaataaaccg gactgtggct gcaccaagtg tcttcatctt cccgccatct 360  
 gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 420  
 agagaggcca aagtacagtg gaaggtgat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480  
 agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540  
 agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcacca tcagggcctg 600  
 agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgt 639

<210> 14

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 14

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
 35 40 45

20051122.ST25.txt

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Phe Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Asn Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 15

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 15

ctcagtacta gtgccgccac catgggattc agcaggatct ttctc

45

<210> 16

<211> 48

20051122.ST25.txt

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 16

gaccgatggg cccttggtgg aggctgagga gacggtgact gaggttcc 48

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 5739

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Vector

&lt;400&gt; 17

catggctcga cagatctccc gatcccctat ggtgcaactc cagtacaatc tgctctgatg 60  
ccgcatagt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg 120  
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180  
ttagggtag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgtatctgag 240  
gggactaggg tgtgtttagg cgaaaagcgg ggcttcgggt gtacgcgggt aggagtcccc 300  
tcaggatata gtagtttcgc ttttgcatag ggagggggaa atgtagtctt atgcaatact 360  
ctttagtct tgcaacatgg taacgatgag ttagcaacat gccttacaag gagagaaaaa 420  
gcaccgtgca tgccgattgg tggagtaag gtggtacgat cgtgccttat taggaaggca 480  
acagacgggt ctgacatgga ttggacgaac cactgaattc cgcattgcag agatattgta 540  
ttaaagtgcc tagctcgata caataaacgc catttgacca ttcaccacat tgggtgacac 600  
ctccaagctt ggtaccgagc tcggatccac tagtaacggc cgccagtgtg ctggaattct 660  
gcagatatcc atcacactgg cggccgctcc accaagggcc catcgggtctt ccccctggca 720  
ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt caaggactac 780  
ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc 840  
ttccccgctg tcctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc 900  
tccagcagct tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc 960  
aaggtggaca agaaagtga gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 1020  
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac 1080  
accctcatga tctccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa 1140  
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 1200

## 20051122.ST25.txt

aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 1260  
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca 1320  
gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acagggtgac 1380  
accctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 1440  
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 1500  
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ctttcttctt ctacagcaag 1560  
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaaagtct tctcatgctc cgtgatgcat 1620  
gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatagtct 1680  
agagctcgct gatcagcctc gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc 1740  
tccccgtgc cttccttgac cctggaaggt gccactccca ctgtcctttc ctaataaaat 1800  
gaggaaattg catcgattg tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg 1860  
caggacagca agggggagga ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga tgcggtgggc 1920  
tctatggctt ctgaggcggg aagaaccagc tggggctcga gcgtgggcca tcgccctgat 1980  
agacggtttt tcgccctttg acgttggagt ccacgttctt taatagtgga ctcttgttcc 2040  
aaactggaac aacactcaac cctatctcgg tctattcttt tgatttataa gggattttgc 2100  
cgatttcggc ctattgggta aaaaatgagc tgatttaaca aatatttaac gcgaatttta 2160  
acaaaatatt aacgtttaca atttcgctg atgcggtatt ttctccttac gcatctgtgc 2220  
ggtatttcac accgcatacg cggatctgcg cagcaccatg gcctgaaata acctctgaaa 2280  
gaggaacttg gttaggtacc ttctgaggcg gaaagaacca gctgtggaat gtgtgtcagt 2340  
taggggtgtg aaagtcccca ggctccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca 2400  
attagtcagc aaccagggtg ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaaa 2460  
gcatgcatct caattagtca gcaaccatag tcccgccctt aactccgcc atcccccccc 2520  
taactccgcc cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt tttatttatg 2580  
cagaggccga ggccgcctcg gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg 2640  
gaggcctagg cttttgcaaa aagcttgatt cttctgacac aacagtctcg aacttaaggc 2700  
tagagccacc atgattgaac aagatggatt gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga 2760  
gaggctattc ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt 2820  
ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt ccggtgcctt 2880  
gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg 2940  
cgcagctgtg ctcgacgttg tactgaagc ggggaaggac tggctgctat tgggcgaagt 3000  
gccggggcag gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc 3060  
tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc 3120  
gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga 3180  
tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg 3240

## 20051122.ST25.txt

catgcccgac ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat 3300  
ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg 3360  
ctatcaggac atagcgttgg ctacccgtga tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc 3420  
tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta 3480  
tcgccttctt gacgagtctt tctgagcggg actctggggg tcgaaatgac cgaccaagcg 3540  
acgccaacc tgccatcacg atggccgcaa taaatatct ttattttcat tacatctgtg 3600  
tgttggtttt ttgtgtgaat cgatagcgat aaggatcgat cctctagcta gagtcgatcg 3660  
acctgcaggg atccgcgtat ggtgactct cagtacaatc tgctctgatg ccgcatagtt 3720  
aagccagccc cgacaccgc caacaccgc tgacgcgcc tgacgggctt gtctgctccc 3780  
ggcatccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcattgtgc agaggttttc 3840  
accgtcatca ccgaaacgcg cgagacgaaa gggcctcgtg atacgcctat ttttataggt 3900  
taatgtcatg ataataatgg tttcttagac gtcagggtggc acttttcggg gaaatgtgcg 3960  
cggaaaccct atttgtttat ttttctaat acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca 4020  
ataaccctga taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt 4080  
ccgtgtcgcc cttattccct tttttgcggc attttgctt cctgtttttg ctcaccaga 4140  
aacgctggtg aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg gttacatcga 4200  
actggatctc aacagcggta agatccttga gagttttcgc cccgaagaac gttttccaat 4260  
gatgagcact tttaaagttc tgctatgtgg cgcggtatta tcccgtattg acgccgggca 4320  
agagcaactc ggtcgcggca tacactattc tcagaatgac ttggttgagt actcaccagt 4380  
cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac 4440  
catgagtgat aacactgcgg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct 4500  
aaccgctttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt gggaaaccgga 4560  
gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtag caatggcaac 4620  
aacgttgcg aaactattaa ctggcgaact acttactcta gcttcccggc aacaattaat 4680  
agactggatg gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgctcggccc ttccggctgg 4740  
ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta tcattgcagc 4800  
actggggcca gatggtaagc cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc 4860  
aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg 4920  
gtaactgtca gaccaagttt actcatatat acttttagatt gatttaaac ttcattttta 4980  
atttaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgacaaaaa tcccttaacg 5040  
tgagttttcg ttccactgag cgtcagacc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga 5100  
tcctttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcgg 5160  
ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag 5220  
agcgcagata ccaataactg tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa 5280

20051122.ST25.txt

ctctgtagca ccgcctacat acctcgctct gctaactctg ttaccagtgg ctgctgccag 5340  
 tggcgataag tcgtgtctta ccgggttggga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca 5400  
 gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac 5460  
 cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg aaggagagaaa 5520  
 ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc 5580  
 agggggaaac gcctggtatc tttatagtcc tgctcgggttt cgccacctct gacttgagcg 5640  
 tcgatttttg tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc 5700  
 ctttttacgg ttcctggcct tttgctggcc ttttgctca 5739

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 6824

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Vector

&lt;400&gt; 18

tcgaggagac ctgcaaagat ggataaagtt ttaaacagag aggaatcttt gcagctaatg 60  
 gaccttctag gtcttgaaag gagtgggaat tggctccggt gcccgtcagt gggcagagcg 120  
 cacatcggcc acagtcctccg agaagttgtg gggaggggtc ggcaattgaa ccggtgccta 180  
 gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc gcctttttcc 240  
 cgaggggtgg ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgcaa 300  
 cgggtttgcc gccagaacac aggtaagtgc cgtgtgtggt tcccgcgggc ctggcctctt 360  
 tacgggttat ggcccttgcg tgccttgaat tacttccacc tggctgcagt acgtgattct 420  
 tgatcccag cttcgggttg gaagtgggtg ggagagttcg aggccttgcg ctttaaggagc 480  
 cccttcgcct cgtgcttgag ttgaggcctg gcctgggcgc tggggccgcc gcgtgcgaat 540  
 ctggtggcac cttcgcgcct gtctcgctgc tttcgataag tctctagcca tttaaaattt 600  
 ttgatgacct gctgcgacgc tttttttctg gcaagatagt cttgtaaagc cgggccaaga 660  
 tctgcacact ggtatttcgg tttttggggc cgcggggcgc gacggggccc gtgctccca 720  
 gcgcacatgt tcggcgaggc ggggcctgcg agcgcggcca ccgagaatcg gacgggggta 780  
 gtctcaagct ggccggcctg ctctggtgcc tggcctcgcg ccgccgtgta tcgccccgcc 840  
 ctgggcggca aggctggccc ggtcggcacc agttgctgta gcggaaagat ggccgcttcc 900  
 cggccctgct gcaggagct caaaatggag gacgcggcgc tcgggagagc gggcgggtga 960  
 gtcaccaca caaaggaaaa gggcctttcc gtcctcagcc gtcgcttcat gtgactccac 1020  
 ggagtaccgg gcgccgtcca ggcacctcga ttagttctcg agcttttggga gtacgtcgtc 1080

## 20051122.ST25.txt

tttaggttg ggggaggggt tttatgcat ggagtttccc cacactgagt gggtaggagac 1140  
tgaagttagg ccagcttggc acttgatgta attctccttg gaatttgccc tttttgagtt 1200  
tggatcttgg ttcattctca agcctcagac agtggttcaa agtttttttc ttccatttca 1260  
gggtgctgta ggaattagct tggtagaaac agcaaagctt aaggtagtag tgccgccacc 1320  
atgggattca gcaggatctt tctcttctc ctgtcagtaa ctacagggtg cactcccag 1380  
gcttatctac agcagtctgg ggctgagctg gtgaggcctg gggcctcagt gaagatgtcc 1440  
tgcaaggctt ctggctacac atttaccagt tacaatatgc actgggtaaa gcagacacct 1500  
agacagggcc tggaatggat tggaggattt tatccaggaa atggtagatac ttcctacaat 1560  
cagaagtca agggcaaggc cacactgact gtaggcaaat cctccagcac agcctacatg 1620  
cagctcagca gcctgacatc tgaagactct gcggtctatt tctgtgcaag atatgactac 1680  
aactatgcta tggactactg gggcaagga acctcagtc cgtctctc agcctccacc 1740  
aagggccat cggtcttccc cctggcacc tctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 1800  
gccctgggct gcctggtaaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 1860  
ggcgccctga ccagcggcgt gcacacctc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 1920  
tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc 1980  
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 2040  
gacaaaactc acacatgccc accgtgcca gcacctgaac tcttgggggg accgtcagtc 2100  
ttctcttcc cccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 2160  
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggta agttcaactg gtacgtggac 2220  
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgaggagg agcagtacaa cagcacgtac 2280  
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 2340  
tgcaaggctt ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 2400  
gggagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 2460  
aaccaggta gcctgacctg cctggtaaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 2520  
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 2580  
gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg 2640  
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 2700  
ctctccctgt ctccgggtaa atagtctaga gctcgtgat cagcctcgac tgtgccttct 2760  
agttgccagc catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt ccttgaccct ggaagggtgc 2820  
actcccactg tcttttctca ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct gagtaggtgt 2880  
cattctattc tggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat 2940  
agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atggcttctg aggcggaaag aaccagctgg 3000  
ggctcgagcg tgggcatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg ttggagtcca 3060  
cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct atctcggctc 3120

## 20051122.ST25.txt

attcttttga ttataaagg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga 3180  
tttaacaaat atttaacgcg aattttaaca aaatattaac gtttacaatt tcgcctgatg 3240  
cggtatTTTT tccttacgca tctgtgCGGT atttcacacc gcatacgcgg atctgCGCAG 3300  
caccatggcc tgaataaacc tctgaaagag gaacttggtt aggtaccttc tgaggCGGAA 3360  
agaaccagct gtggaatgtg tgtcagttag ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag 3420  
gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac cagggtgtgga aagtccccag 3480  
gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca tgcattctca ttagtcagca accatagtcc 3540  
cgcccctaac tccgcccatt ccgccccta ctccgcccag ttccgcccatt tctccgcccc 3600  
atggctgact aatTTTTTTT atttatgcag aggccgaggc cgctcggcc tctgagctat 3660  
tccagaagta gtgaggaggc ttttttgag gcctaggctt ttgcaaaaag cttgattctt 3720  
ctgacacaac agtctcgaac ttaaggctag agccaccatg attgaacaag atggattgca 3780  
cgcaggttct ccggccgctt ggggtgagag gctattcggc tatgactggg cacaacagac 3840  
aatcggctgc tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg caggggcgcc cggttctttt 3900  
tgtcaagacc gacctgtccg gtgcctgaa tgaactgcag gacgaggcag cgcggctatc 3960  
gtggctggcc acgacgggCG ttccttgCGC agctgtgctc gacgttgctca ctgaagcggg 4020  
aagggactgg ctgctattgg gcgaagtGCC ggggcaggat ctctgtcat ctcacctgc 4080  
tcctgCGGAG aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg cggctgcata cgcttgatcc 4140  
ggctacctgc ccattcgacc accaagCGAA acatcgcatt gagcgagcac gtactcggat 4200  
ggaagccggt cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag catcaggggc tcgCGCCAGC 4260  
cgaactgttc gccaggctca aggcgcgat gcccgacggc gaggatctcg tcgtgacca 4320  
tggcgatgcc tgcttgCGGA atatcatggt ggaaaatggc cgcttttctg gattcatcga 4380  
ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata gcgttgGCTA cccgtgatat 4440  
tgctgaagag cttggcggCG aatgggctga ccgcttctc gtgctttacg gtatcCGCGC 4500  
tcccgatctg cagcgcattc ctttctatcg ctttcttgac gagttcttct gagcgggact 4560  
ctggggttcg aatgaccga ccaagcGACG cccaacctgc catcacgatg gccGCAATA 4620  
aatatcttta ttttattac atctgtgtgt tggTTTTTTG tgtgaatcga tagcgataag 4680  
gatcgatcct cttagctagag tcgatcgacc tgcagggatc cgcgatggt gactctcag 4740  
tacaatctgc tctgatgccg catagttaag ccagccccga caccgcca caccgctga 4800  
cgcgccccta cgggcttgtc tgcctccggc atccgcttac agacaagctg tgaccgtctc 4860  
cgggagctgc atgtgtcaga ggttttacc gtcatcaccg aaacgcGCGA gacGAAAGG 4920  
cctcgtgata cgcctatttt tataggTAA tgcattgata ataatggttt cttagcgtc 4980  
aggtggcact tttcggggaa atgtgcCGG aaccctatt tgtttatttt tctaaataca 5040  
ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattGAAA 5100  
aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgcCGCCTT attccctttt ttgcggcatt 5160

## 20051122.ST25.txt

ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca 5220  
gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag 5280  
ttttcgcccc gaagaacggt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc tatgtggcgc 5340  
ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggc cgccgcatac actattctca 5400  
gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt 5460  
aagagaatta tgcagtgctg ccataacccat gagtgataac actgcgcca acttactttt 5520  
gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt 5580  
aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga 5640  
caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact 5700  
tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc 5760  
acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccggtga 5820  
gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt 5880  
agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgtga 5940  
gataggtgcc tcaactgatta agcattggtg actgtcagac caagtttact catatatact 6000  
ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga 6060  
taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccg 6120  
agaaaagatc aaaggatcct cttgagatcc ttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca 6180  
aacaacaaaa ccaccgctac cagcgggtgg ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct 6240  
ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtga 6300  
gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct 6360  
aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc 6420  
aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca 6480  
gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga 6540  
aagcgcacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcgg 6600  
aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatcttt atagtcctgt 6660  
cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag 6720  
cctatggaaa aacgccagca acgcccctt tttacggttc ctggcctttt gctggccttt 6780  
tgctcacatg gctcgacaga tccgacggat cgggagatcc tagc 6824

<210> 19

<211> 1344

<212> DNA

<213> Artificial sequence

20051122.ST25.txt

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Construct

&lt;400&gt; 19

```
caggcttatac tacagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcctc agtgaagatg      60
tcctgcaagg cttctggcta cacatttacc agttacaata tgcaactgggt aaagcagaca      120
cctagacagg gcctggaatg gattggaggt atttatccag gaaatggtga tacttcctac      180
aatcagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgtaggca aatcctccag cacagcctac      240
atgcagctca gcagcctgac atctgaagac tctgcbggtct atttctgtgc aagatatgac      300
tacaactatg ctatggacta ctgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctcagcctcc      360
accaagggcc catcggctctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca      420
gcggccctgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac      480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccccggtg tcctacagtc ctcaggactc      540
tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc      600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtgaca agaaagtga gccc aaatct      660
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca      720
gtcttcctct tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc      780
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg      840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg      900
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac      960
aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacct ctccaagcc      1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc      1080
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg      1140
gagtgaggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac      1200
tccgacggct ctttcttct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag      1260
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag      1320
agcctctccc tgtctccggg taaa                                             1344
```

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 448

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Construct

&lt;400&gt; 20

20051122.ST25.txt

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Gly Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Gly Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Tyr Asp Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125  
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140  
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190  
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 195 200 205  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220  
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240  
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270

20051122.ST25.txt

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 21

<211> 318

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

actgtggctg caccaagtgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60  
 actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120  
 aagggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180  
 aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 240  
 cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc 300  
 ttcaacaggg gagagtgt 318

20051122.ST25.txt

<210> 22  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 22

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 1 5 10 15  
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 20 25 30  
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 35 40 45  
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 50 55 60  
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 65 70 75 80  
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 85 90 95  
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105

<210> 23  
 <211> 990  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 23

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60  
 ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120  
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180  
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240  
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300  
 aaatcttgtg acaaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 360  
 ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 420  
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480  
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540

20051122.ST25.txt

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtccctgcacc aggactggct gaatggcaag 600  
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660  
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 720  
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780  
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840  
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900  
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccaactacacg 960  
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

<210> 24  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 24

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

20051122.ST25.txt

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 25

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 25

caaattgttc tctcccagtc tccagcaatc ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca 60  
 atgacttgca gggccagctc aagtgtaagt tacatgcact ggtaccagca gaagccagga 120  
 tcctccccca aaccctggat ttatgccaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 180  
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctttat tctttcacia tcagcagagt ggaggctgaa 240  
 gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg acttttaacc cacccacgtt cggagggggg 300  
 accaggctgg aaataaacg g 321

20051122.ST25.txt

<210> 26  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 26  
 Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
 35 40 45  
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Phe Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 27  
 <211> 645  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Synthetic Construct

<400> 27  
 caaattgttc tctcccagtc tccagcaatc ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca 60  
 atgacttgca gggccagctc aagtgtaagt tacatgcact ggtaccagca gaagccagga 120  
 tcctcccca aaccctggat ttatgccaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 180  
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttat tctttcacia tcagcagagt ggaggctgaa 240  
 gatgctgcca cttattactg ccagcagtg acttttaacc caccacggt cggagggggg 300  
 accaggctgg aaataaaacg gactgtggct gcaccaagtg tcttcatctt cccgccatct 360

## 20051122.ST25.txt

gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 420  
 agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480  
 agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540  
 agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 600  
 agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt agtga 645

<210> 28

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 28

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

20051122.ST25.txt

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 29

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 29

tgaagacact tgggtgcagcc acagtccggt ttatttccag cctggt

46

Référence du dossier du déposant ou du mandataire	11465/10 PCT	Demande internationale n°
---	--------------	---------------------------

**INDICATIONS RELATIVES À UN MICRO-ORGANISME OU  
AUTRE MATÉRIEL BIOLOGIQUE DÉPOSÉ**

(règle 13bis du PCT)

A. Les indications ont trait au micro-organisme ou autre matériel biologique visé dans la description page <u>18</u> , ligne <u>10</u>	
B. IDENTIFICATION DU DÉPÔT <span style="float: right;">D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire <input type="checkbox"/></span>	
Nom de l'institution de dépôt Collection Nationale de Cultures de Microorganismes	
Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) INSTITUT PASTEUR 25, rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	
Date du dépôt <u>08/11/04</u>	n° d'ordre <u>I-3314</u>
C. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES (le cas échéant) <span style="float: right;">Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/></span>	
D. ÉTATS DÉSIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES (si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés)	
E. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT (le cas échéant)	
Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international (spécifier la nature générale des indications p. ex., "n° d'ordre du dépôt")	

<p align="center">Réservé à l'office récepteur</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale - <u>14 DEC. 2005</u></p> <p>Fonctionnaire autorisé <u>HANARD Audrey</u></p>	<p align="center">Réservé au Bureau international</p> <p><input type="checkbox"/> Cette feuille est parvenue au Bureau international le :</p> <p>Fonctionnaire autorisé</p>
--	---

Référence du dossier du déposant ou du mandataire	11465/10 PCT	Demande internationale n°
---	--------------	---------------------------

**INDICATIONS RELATIVES À UN MICRO-ORGANISME OU  
AUTRE MATÉRIEL BIOLOGIQUE DÉPOSÉ**

(règle 13bis du PCT)

A. Les indications ont trait au micro-organisme ou autre matériel biologique visé dans la description page <u>18</u> , ligne <u>14</u>	
B. IDENTIFICATION DU DÉPÔT <span style="float: right;">D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire <input type="checkbox"/></span>	
Nom de l'institution de dépôt Collection Nationale de Cultures de Microorganismes	
Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) INSTITUT PASTEUR 25, rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	
Date du dépôt 29/11/05	n° d'ordre I-3529
C. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES (le cas échéant) <span style="float: right;">Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/></span>	
D. ÉTATS DÉSIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES (si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés)	
E. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT (le cas échéant)	
Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international (spécifier la nature générale des indications p. ex., "n° d'ordre du dépôt")	

Réservé à l'office récepteur
<input checked="" type="checkbox"/> Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale <b>14 DEC. 2005</b>
Fonctionnaire autorisé <b>MAMARO Audrey</b>

Réservé au Bureau international
<input type="checkbox"/> Cette feuille est parvenue au Bureau international le :
Fonctionnaire autorisé