

(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  
27 mai 2004 (27.05.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2004/044204 A2**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
**C12N 15/13**, C07K  
16/18, C12N 15/63, 1/21, G01N 33/53, A61K 39/395,  
A61P 25/28, C07K 14/47, G01N 33/68

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2003/003319

(22) Date de dépôt international :  
6 novembre 2003 (06.11.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
02/13866 6 novembre 2002 (06.11.2002) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : IN-  
STITUT PASTEUR [FR/FR]; 28 rue du Docteur Roux,  
F-75724 Paris cedex 15 (FR). CENTRE NATIONAL DE  
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 rue  
Michel-Ange, F-75794 Paris cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :  
ROUGEON, François [FR/FR]; 36 rue Fontaine, F-92310  
Sevres (FR). LAFAYE, Pierre [FR/FR]; 31 Boulevard  
Camelinat, F-92240 MALAKOFF (FR).

(74) Mandataire : CABINET ORES; 36, rue de St Péters-  
bourg, F-75008 Paris (FR).

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

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (BW, GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR), brevet 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

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

(54) Title: VARIABLE FRAGMENTS OF SINGLE-CHAIN CAMELIDE ANTIBODIES AND USES THEREOF FOR DIAG-  
NOSING AND TREATING VARIOUS PATHOLOGIES

(54) Titre : FRAGMENTS VARIABLES D'ANTICORPS DE CAMELIDES A CHAÎNE UNIQUE ET LEURS APPLICATIONS  
POUR LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DE PATHOLOGIES DIVERSES.

(57) Abstract: The invention concerns variable fragments of single-chain camelide antibodies and uses thereof for diagnosing and  
treating various pathologies associated with molecules identified by said antibodies.

(57) Abrégé : Fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique ainsi que leurs applications pour le traitement ou le  
diagnostic des pathologies associées aux molécules reconnues par ces anticorps.



WO 2004/044204 A2

**FRAGMENTS VARIABLES D'ANTICORPS DE CAMELIDES A CHAINE  
UNIQUE ET LEURS APPLICATIONS POUR LE DIAGNOSTIC ET LE  
TRAITEMENT DE PATHOLOGIES DIVERSES**

La présente invention est relative à des fragments variables d'anti-  
5 corps de camélidés à chaîne unique ainsi qu'à leurs applications pour le traitement ou  
le diagnostic des pathologies associées aux molécules reconnues par ces anticorps.

De manière plus précise, la présente invention est relative à :

- des fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique  
dirigés contre des agents pathogènes, qui ne secrètent pas de toxines et plus  
10 particulièrement à des fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique  
dirigés contre au moins une molécule d'adhésion et notamment la phosphorylcholine  
(VHH-anti-phosphorylcholine) associée aux surfaces des agents pathogènes  
retrouvées dans les infections mucoales ainsi qu'à leurs applications dans le  
diagnostic et le traitement des maladies infectieuses correspondantes ;

15 - des fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique  
dirigés contre le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42 ( $A\beta$ 42) (VHH- $A\beta$ 42), ainsi qu'à leurs appli-  
cations pour le diagnostic et le traitement de pathologies non infectieuses comprenant  
le dépôt, dans un ou plusieurs organes ou tissus, de substances amyloïdes (produits  
dérivés de constituants cellulaires comme des produits dérivés de protéines  
20 insolubles), et plus particulièrement pour le diagnostic et le traitement des maladies  
neuroagréatives comme la maladie d'Alzheimer.

Au sens de la présente invention, on entend par :

- maladies infectieuses, des maladies induites par des agents  
pathogènes (virus ou bactéries), à l'exclusion des bactéries productrices de toxines ;  
25 de manière plus précise, il s'agit d'infections mucoales, dans lesquelles on observe  
l'expression, à la surface des bactéries induisant lesdites infections, d'au moins une  
molécule d'adhésion et notamment de phosphorylcholine.

- maladies non-infectieuses dans lesquelles on observe un dépôt de  
substances amyloïdes insoluble, notamment les maladies suivantes : des maladies  
30 chroniques inflammatoires, le myélome multiple, la macroglobulinémie, la poly-  
neuropathie amyloïde familiale, la cardiomyopathie familiale, l'amylose sénile  
systémique, la polynéphropathie amyloïde familiale, l'amylose familiale, le syndrome

de Gerstmann-Straussler-Scheinker, la néphropathie amyloïde familiale avec urticaire et surdité (syndrome de Muckle-Wells), le carcinome médullaire de la thyroïde, le dépôt amyloïde isolé des auricules, l'amylose associée à l'hémodialyse (HAA) et les maladies neuroagréatives ou neurodégénératives associées à la présence de dépôts amyloïdes (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, etc...).

La maladie d'Alzheimer est un désordre neurodégénératif ou neuroagréatif qui affecte 1 à 6 % de la population âgée de plus de 65 ans. L'une de ses caractéristiques est la présence de plaques séniles qui contiennent du  $\beta$ -amyloïde, produit toxique dérivé de la protéine  $\beta$ APP ( $\beta$  *Amyloid Precursor Protein*), constitué de peptides de 39 à 42 acides aminés (peptides A $\beta$ ), engendrés par le clivage de la  $\beta$ APP par des sécrétases. Les mécanismes responsables de la toxicité du  $\beta$ -amyloïde ne sont pas connus et la relation entre le  $\beta$ -amyloïde et la pathologie n'est pas élucidée.

Jusqu'à maintenant, il n'existe pas de traitement de la maladie d'Alzheimer mais l'immunothérapie à base d'anticorps semble être une voie extrêmement prometteuse. En effet, dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (souris transgéniques pour la protéine  $\beta$ APP), il a été montré que l'immunisation par le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42 (peptide A $\beta$ 42) empêche le dépôt cérébral de  $\beta$ -amyloïde chez les jeunes souris, élimine les dépôts de  $\beta$ -amyloïde chez les souris âgées et surtout prévient les pertes de mémoire chez ces souris (Schenk et al., *Archives of Neurology*, 2000, 57 : 934-936 ; Weiner et al., *Annals of Neurology*, 2000, 48): 567-579 ; Janus et al., *Nature*, 2000, 408 : 979-982 ; Morgan et al., *Nature*, 2000, 408: 982-9857; Bard, F., et al., *Nature Medicine*, 2000, 6: 916-9 ; Solomon et al., *P.N.A.S.*, 1997, 94 : 4109-4112). La Demande Internationale PCT WO 02/074240 préconise également l'immunothérapie passive (administration d'anticorps anti-amyloïdes), dans la mesure où les vaccins à base de peptide A $\beta$ 42 se sont révélés inflammatoires. Les anticorps préconisés sont des immunoglobulines classiques, produites par les techniques d'ADN recombinant ou par synthèse chimique.

Deux mécanismes non-exclusifs ont été proposés pour expliquer l'action des anticorps anti-A $\beta$ 42 :

- un effet direct des anticorps à l'intérieur du cerveau (Bard et al., précité; Solomon et al., *DNA & Cell Biology*, 2001, 20 : 697-703) ; les anticorps se

fixeraient au peptide A $\beta$ 42 du cerveau d'une manière qui empêche la conversion de la forme soluble du peptide en la forme insoluble trouvée sur les plaques (Solomon et al., 2001, précité). Cette hypothèse est appuyée par les travaux sur l'immunisation contre la protéine du prion (Peretz et al., *Nature*, 2001, **412**: 739-743),

5                   - un effet indirect sur les échanges dynamiques du peptide A $\beta$ 42 entre le sang et le cerveau (DeMattos, R.B., et al., *P.N.A.S.*, 2001, **98**: 8850-8855) ; les anticorps anti-A $\beta$ 42 ne pénétreraient pas dans le cerveau, mais agiraient plutôt à la périphérie. Le peptide A $\beta$ 42 semble passer la barrière hémato-encéphalique par transport actif et être en situation d'équilibre entre le cerveau et le sang. En se fixant  
10 aux peptides A $\beta$ 42 en solution dans le sang, les anticorps pourraient modifier cet équilibre, causant la séquestration du peptide A $\beta$ 42 dans le sang ou peut-être son extraction du cerveau.

Toutefois, les anticorps monoclonaux de souris ou leurs fragments (scFv) présentent les inconvénients suivants pour une utilisation en thérapie humaine :

15                   - les anticorps monoclonaux de souris qui sont immunogènes chez l'Homme ne peuvent pas être administrés de façon répétée, sur une longue période, et  
                      - les fragments scFv sont peu solubles et peu stables *in vivo*.

Afin de traiter plus efficacement les maladies comprenant le dépôt de substances amyloïdes et notamment les maladies neuroagréatives telles que la  
20 maladie d'Alzheimer, il existe un réel besoin de disposer de nouveaux anticorps mieux adaptés aux besoins de la pratique.

Par ailleurs, certaines maladies infectieuses sont dues à des espèces bactériennes qui expriment au moins une molécule d'adhésion et notamment de la phosphorylcholine à leur surface et colonisent les muqueuses (pathogènes primaires,  
25 pathogènes occasionnels ou pathogènes commensales). Les infections mucosales sont la première étape d'infections invasives (bactériémies et méningites) : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Streptococcus pneumoniae*. En raison des polyrésistances aux antibiotiques et de l'absence de vaccins efficaces, notamment en raison de la variabilité de certaines espèces (*N. meningitidis* et *S. pneumoniae*), il  
30 existe un réel besoin de traitements alternatifs de ces infections, ainsi que d'un diagnostic rapide.

Les camélidés (chameaux, dromadaires, lamas, alpagas, etc...) ont la particularité de posséder à la fois des immunoglobulines classiques possédant deux chaînes lourdes et deux chaînes légères et des immunoglobulines dénommées immunoglobulines à chaîne lourde (HCAbs) ou immunoglobulines à chaîne unique qui possèdent deux chaînes lourdes mais pas de chaînes légères (Pour une revue voir NGUYEN et al., *Advances in Immunology*, 2001, 79: 261-296 et Muyldermans et al., *Reviews in Molecular Biotechnology*, 2001, 74: 277-302). Leur chaîne lourde qui possède un poids moléculaire compris entre 43 kDa et 47 kDa selon les espèces, est constituée d'un domaine variable (VHH) d'environ 16 kDa, séparé de deux domaines constants (CH2 et CH3) par une région charnière. Leur paratope (domaine de liaison à l'antigène) est constitué d'un seul domaine variable (VHH). Malgré l'absence de diversité due à la combinatoire entre les domaines variables des chaînes lourdes et légères (VH-VL), ces anticorps à chaîne unique possèdent une grande capacité de reconnaissance des antigènes grâce à des CDRs qui possèdent un nombre d'acides aminés plus important que les CDRs « classiques ». La préparation d'anticorps à partir de camélidés immunisés par un antigène (toxine bactérienne ou venin) et le criblage, par la technique d'exposition sur phage (*phage display*), de banques de ces domaines VHH sont décrits dans la Demande EP 0739 981.

Les banques fabriquées à partir de ces domaines VHH uniques contiennent des anticorps fonctionnels qui ont subi une maturation *in vivo*. Les VHH issus de ces banques possèdent une affinité et une spécificité élevées pour l'antigène. En outre, ils sont capables de reconnaître des épitopes peu immunogènes pour les anticorps "classiques" et certains d'entre eux sont des inhibiteurs d'enzyme très puissants grâce à un mécanisme très original ; le CDR 3 qui est beaucoup plus long que la moyenne est capable de former une boucle qui va s'insérer dans le site actif de l'enzyme.

Les VHH, sélectionnés à partir de ces banques, sont bien exprimés, très solubles et très stables. En outre, du fait de leur petite taille et de l'homologie de leurs séquences FR avec celles des immunoglobulines humaines, les VHH sont peu immunogènes chez l'Homme.

En conséquence, les VHH offrent des perspectives incontestables pour le diagnostic et le traitement de pathologies humaines ou animales, par rapport aux anticorps monoclonaux ou aux fragments d'anticorps conventionnels (ScFv).

En outre, pour ce qui concerne les infections dans lesquelles on observe l'expression d'au moins un molécule d'adhésion et notamment de phosphorylcholine à la surface des agents pathogènes, l'administration de tels anticorps, notamment par voie topique (intranasale, dans le cas des agents pathogènes respiratoires) présentent les avantages supplémentaires suivants :

- efficacité jusqu'à cent fois supérieure à celle de l'administration parentérale
- activité immédiate
- traitement ciblé au site même de l'infection
- facilité d'administration et bonne tolérance
- peu ou pas d'interférence avec le système immunitaire de l'hôte
- adaptation rapide de la préparation d'anticorps à tout nouveau variant antigénique
- peu de risque de sélection de variants résistants.

En conséquence, la présente invention a pour objet l'utilisation d'anticorps à chaîne unique de camélidés, sélectionnés dans le groupe constitué par des anticorps comprenant des fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre des agents pathogènes ne sécrétant pas de toxine ou ne contenant pas la protéase NS3 de l'HCV et des anticorps comprenant des fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42, pour la détection de la présence d'un agent pathogène ne sécrétant pas de toxine ou ne contenant pas la protéase NS3 de l'HCV ou pour la détection d'une maladie comprenant des dépôts de substances amyloïdes insolubles.

Les Inventeurs ont préparé une banque de fragments variables d'anticorps de camélidés, dirigés contre le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42 (banque VHH-A $\beta$ 42) ; à partir de cette banque, les Inventeurs ont isolé des fragments d'anticorps qui répondent mieux aux besoins de la pratique en ce qu'ils présentent les propriétés suivantes :

- ils se lient spécifiquement au peptide 1-42 du précurseur de la protéine  $\beta$ -amyloïde avec une affinité élevée,

- ils possèdent un faible poids moléculaire et sont solubles,

- ils sont très stables, et

5 - ils sont peu immunogènes.

Les fragments variables d'anticorps à chaîne unique anti-A $\beta$ 42 représentent des candidats pour une immunothérapie des maladies comprenant le dépôt de substances amyloïdes dans au moins un organe ou tissu et notamment de la maladie d'Alzheimer. En outre, ils sont utiles pour le diagnostic de cette maladie ; par  
10 exemple des VHH marqués peuvent être utilisés en imagerie médicale.

En conséquence, la présente invention a pour objet une banque immune d'ADNc de fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique, dirigés contre le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42 (SEQ ID NO: 1), déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724  
15 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2937.

La banque immune d'ADNc VHH-A $\beta$ 42 selon l'invention est préparée à partir de lymphocytes de camélidés immunisés par le peptide A $\beta$ 42, par clonage de fragments VHH, comme décrit dans la Demande EP 0739981.

La présente invention a également pour objet un fragment variable  
20 d'anticorps de camélidés à chaîne unique, dirigé contre le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42, caractérisé en ce qu'il est codé par un ADNc isolé par un procédé comprenant au moins les étapes suivantes :

- la culture de la banque d'ADNc de fragments variables d'anticorps VHH-A $\beta$ 42 telle que définie ci-dessus, dans des conditions permettant l'expression  
25 desdits fragments variables,

- la mise en contact desdits fragments variables avec le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42 (A $\beta$ 42), dans des conditions permettant la liaison dudit fragment variable d'anticorps avec ledit peptide, et

- l'isolement de l'ADNc correspondant aux fragments variables  
30 d'anticorps capables de se lier audit peptide.

Les conditions de culture de la banque d'ADNc et d'incubation des fragments variables avec le peptide A $\beta$ 42 sont des conditions classiques connues en elles-mêmes de l'Homme du métier.

Conformément à l'invention, lesdits fragments variables d'anticorps à chaîne unique sont issus de n'importe quel animal de la famille des camélidés, par exemple de chameau, dromadaire, lama ou d'alpaga.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit fragment variable d'anticorps, il présente une séquence en acides aminés sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 3, 5, 7 et 9.

La présente invention a également pour objet un anticorps ou un fragment d'anticorps, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment variable tel que défini ci-dessus.

La présente invention a également pour objet une molécule d'ADNc, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par le procédé tel que défini ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite molécule d'ADNc, elle présente une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 2, 4, 6 et 8.

La présente invention a également pour objet un vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend au moins une molécule d'ADNc telle que définie ci-dessus.

De nombreux vecteurs où l'on peut insérer une molécule d'acide nucléique d'intérêt afin de l'introduire et de la maintenir dans une cellule hôte eucaryote ou procaryote, sont connus en eux-mêmes ; le choix d'un vecteur approprié dépend de l'utilisation envisagée pour ce vecteur (par exemple répllication de la séquence d'intérêt, expression de cette séquence, maintien de la séquence sous forme extrachromosomique ou bien intégration dans le matériel chromosomique de l'hôte), ainsi que de la nature de la cellule hôte.

De préférence, ledit vecteur est un vecteur d'expression procaryote ou eucaryote, comprenant au moins une cassette d'expression comprenant l'ADNc codant les fragments variables d'anticorps (VHH-A $\beta$ 42) tels que définis ci-dessus, placé sous le contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié, notamment un promoteur permettant l'expression desdits fragments VHH-A $\beta$ 42 dans des cellules

hôtes modifiées. Avantageusement, ledit ADNc est cloné dans ledit vecteur, en phase avec une séquence étiquette, éventuellement clivable (épitope, séquence polyHistidine...); une telle construction permet de produire ledit fragment VHH-A $\beta$ 42 sous forme d'une protéine de fusion qui est ensuite purifiée sur une colonne appropriée (colonne d'immunoaffinité ou colonne de nickel), ladite séquence étiquette pouvant éventuellement être clivée par tout moyen approprié.

La présente invention a également pour objet une cellule hôte eucaryote ou procaryote, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par une molécule d'acide nucléique ou un vecteur tels que définis ci-dessus.

10 Selon un mode de réalisation avantageux de ladite cellule hôte modifiée, elle a été déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2933 ; ladite cellule hôte exprime le fragment VHH-A $\beta$ 42 de séquence SEQ ID NO: 3.

15 Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite cellule hôte modifiée, elle a été déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2934 ; ladite cellule hôte exprime le fragment VHH-A $\beta$ 42 de séquence SEQ ID NO: 5.

20 Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite cellule hôte modifiée, elle a été déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2935 ; ladite cellule hôte exprime le fragment VHH-A $\beta$ 42 de séquence SEQ ID NO: 7.

25 Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite cellule hôte modifiée, elle a été déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2936 ; ladite cellule hôte exprime le fragment VHH- A $\beta$ 42 de séquence SEQ ID NO:9.

30 Les molécules d'acide nucléique selon l'invention sont obtenues par les méthodes classiques, connues en elles-mêmes, en suivant les protocoles standards tels que ceux décrits dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M.

*AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA*). Par exemple, elles peuvent être obtenues par amplification d'une séquence nucléique par PCR ou RT-PCR ou bien par synthèse chimique totale ou partielle.

Les techniques de production et de purification de protéines recombinantes, les méthodes d'immunisation et de production d'anticorps et les techniques immunologiques reposant sur la détection de complexes antigène-anticorps (ELISA, RIA, Western-Blot) sont connues en elles-mêmes ; à titre d'exemple on peut citer celles décrites dans *Current Protocols in Molecular Biology*, précité et dans *Current protocols in Immunology* (John E. Coligan, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA).

Du fait de leurs propriétés telles que définies ci-dessus, les fragments variables d'anticorps (VHH-A $\beta$ 42) selon l'invention sont utiles pour le diagnostic et le traitement des maladies comprenant un dépôt, dans un ou plusieurs organes ou tissus, de substances amyloïdes, et notamment des maladies neuroagré- gatives comme la maladie d'Alzheimer.

En conséquence la présente invention a pour objet l'utilisation d'un fragment variable d'anticorps VHH-A $\beta$ 42 ou bien d'un anticorps ou d'un fragment d'anticorps dérivés, tels que définis ci-dessus pour la préparation d'un réactif de diagnostic destiné à la détection de maladies comprenant le dépôt, dans un ou plusieurs organes ou tissus, de substances amyloïdes insolubles, et notamment des maladies neuroagré- gatives comme la maladie d'Alzheimer.

Ladite détection peut-être effectuée par toute technique appropriée, notamment par des techniques d'imagerie médicale.

La présente invention a également pour objet un kit de diagnostic de maladies comprenant le dépôt, dans un ou plusieurs organes ou tissus, de substances amyloïdes insolubles, et notamment des maladies neuroagré- gatives comme la maladie d'Alzheimer, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment variable d'anticorps VHH-A $\beta$ 42 ou bien un anticorps ou un fragment d'anticorps comprenant ledit fragment variable d'anticorps, tels que définis ci-dessus.

La présente invention a en outre pour objet une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un fragment variable d'anticorps VHH-A $\beta$ 42 ou bien un anticorps ou un fragment d'anticorps comprenant

ledit fragment variable d'anticorps, tels que définis ci-dessus, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention a également pour objet l'utilisation des anticorps VHH-A $\beta$ 42 tels que définis ci-dessus pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies comprenant le dépôt, dans un ou plusieurs organes ou tissus, de substances amyloïdes.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, lesdites maladies sont des maladies neuroagréatives, notamment la maladie d'Alzheimer.

Du fait de leurs propriétés telles que définies ci-dessus, les fragments variables d'anticorps (VHH-A $\beta$ 42) selon l'invention présentent les avantages suivants par rapport aux anticorps ou fragments d'anticorps existants :

- ils sont produits facilement, en grande quantité, à un coût peu élevé,
- ils se lient au peptide A $\beta$ 42 de façon spécifique et avec une affinité élevée,
- ils possèdent une demi-vie importante,
- ils n'induisent pas de réponse immunitaire du type HAMA (Human anti-mouse antibody) et peuvent donc être administrés chez un patient humain ou animal, de façon répétée sur une longue durée.

Par ailleurs, les fragments variables d'anticorps à chaîne unique anti-molécules d'adhésion et plus particulièrement anti-phosphorylcholine représentent des candidats pour une immunothérapie des maladies infectieuses telles que définies ci-dessus, i.e. dues à des agents pathogènes exprimant à leurs surfaces au moins une molécule d'adhésion et notamment la phosphorylcholine ; les maladies concernées sont notamment les maladies infectieuses mucosales des voies respiratoires.

En conséquence, la présente invention a également pour objet un fragment variable d'anticorps de camélidés à chaîne unique, dirigé contre des agents pathogènes ne sécrétant pas de toxines, caractérisé en ce qu'il est capable de reconnaître les agents pathogènes ou des fragments de ceux-ci à l'intérieur ou à l'extérieur de cellules eucaryotes ou de tissus ou d'organes de mammifères et en ce

qu'il est codé par un ADNc isolé par un procédé comprenant au moins les étapes suivantes :

- la culture d'une banque d'ADNc de fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre des agents pathogènes, exprimant à leurs surfaces des molécules d'adhésion de la paroi bactérienne, dans des conditions permettant l'expression desdits fragments variables,

- la mise en contact desdits fragments variables d'anticorps avec au moins une molécule d'adhésion ou des agents pathogènes exprimant à leur surface des molécules d'adhésion, dans des conditions permettant la liaison desdits fragments variables d'anticorps avec au moins une desdites molécules d'adhésion, et

- l'isolement de l'ADNc correspondant aux fragments variables d'anticorps VHH-anti-molécule d'adhésion capables de se lier à la molécule d'adhésion correspondante.

La molécule d'adhésion est de préférence la phosphorylcholine ; dans ce cas, la présente invention a également pour objet un fragment variable d'anticorps de camélidés à chaîne unique, dirigé contre des agents pathogènes, à l'exclusion des bactéries produisant des toxines et à l'exclusion des toxines correspondantes, caractérisé en ce qu'il est capable de reconnaître les agents pathogènes ou des fragments de ceux-ci à l'intérieur ou à l'extérieur de cellules eucaryotes ou de tissus ou d'organes de mammifères et en ce qu'il est codé par un ADNc isolé par un procédé comprenant au moins les étapes suivantes :

- la culture d'une banque d'ADNc de fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre des agents pathogènes, exprimant à leurs surfaces de la phosphorylcholine (VHH-anti-phosphorylcholine), dans des conditions permettant l'expression desdits fragments variables,

- la mise en contact desdits fragments variables d'anticorps avec de la phosphorylcholine ou des agents pathogènes exprimant à leur surface de la phosphorylcholine, dans des conditions permettant la liaison desdits fragments variables d'anticorps avec la phosphorylcholine, et

- l'isolement de l'ADNc correspondant aux fragments variables d'anticorps VHH-anti-phosphorylcholine, capables de se lier à la phosphorylcholine.

On entend, au sens de la présente invention, par anticorps VHH-anti-phosphorylcholine :

- des anticorps dirigés contre des agents pathogènes présentant à leur surface de la phosphorylcholine, ou dirigés contre la phosphorylcholine,

5 - lesdits anticorps reconnaissant la phosphorylcholine dans n'importe quel environnement.

Les conditions de culture de la banque d'ADNc et d'incubation des fragments variables avec la phosphorylcholine sont des conditions classiques connues en elles-mêmes de l'Homme du métier.

10 Conformément à l'invention, lesdits fragments variables d'anticorps à chaîne unique (VHH-anti-molécules d'adhésion ou VHH-anti-phosphorylcholine) sont issus de n'importe quel animal de la famille des camélidés, par exemple de chameau, dromadaire, lama ou d'alpaga.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit fragment variable d'anticorps (VHH-anti-phosphorylcholine), il présente une séquence en acides aminés sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO :29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 et 49.

La banque immune d'ADNc VHH-anti-molécules d'adhésion ou VHH-anti-phosphorylcholine selon l'invention est préparée à partir de lymphocytes de 20 camélidés immunisés soit par des agents pathogènes présentant à leur surface de la phosphorylcholine, soit par de la phosphorylcholine éventuellement couplée à une protéine porteuse telle que la KLH ou la sérum albumine, par clonage de fragments VHH, comme décrit dans la Demande Européenne n° 0 739 981.

La présente invention a également pour objet un anticorps ou un 25 fragment d'anticorps, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment variable VHH-anti-molécule d'adhésion et notamment VHH-anti-phosphorylcholine, tel que défini ci-dessus.

La présente invention a également pour objet une molécule d'ADNc, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par le procédé tel que défini ci-dessus.

30 Selon un mode de réalisation avantageux de ladite molécule d'ADNc, elle présente une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 et 48.

La présente invention a également pour objet un vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend au moins une molécule d'ADNc telle que définie ci-dessus.

De nombreux vecteurs où l'on peut insérer une molécule d'acide nucléique d'intérêt afin de l'introduire et de la maintenir dans une cellule hôte eucaryote ou procaryote, sont connus en eux-mêmes ; le choix d'un vecteur approprié dépend de l'utilisation envisagée pour ce vecteur (par exemple répllication de la séquence d'intérêt, expression de cette séquence, maintien de la séquence sous forme extrachromosomique ou bien intégration dans le matériel chromosomique de l'hôte),  
10 ainsi que de la nature de la cellule hôte.

De préférence, ledit vecteur est un vecteur d'expression procaryote ou eucaryote, comprenant au moins une cassette d'expression comprenant l'ADNc codant les fragments variables d'anticorps (VHH-anti-phosphorylcholine) tels que définis ci-dessus, placé sous le contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié,  
15 notamment un promoteur permettant l'expression desdits fragments VHH-anti-phosphorylcholine dans des cellules hôtes modifiées. Avantagement, ledit ADNc est cloné dans ledit vecteur, en phase avec une séquence étiquette, éventuellement clivable (épitope, séquence polyHistidine...) ; une telle construction permet de produire ledit fragment VHH-anti-phosphorylcholine sous forme d'une protéine de  
20 fusion qui est ensuite purifiée sur une colonne appropriée (colonne d'immunoaffinité ou colonne de nickel), ladite séquence étiquette pouvant éventuellement être clivée par tout moyen approprié.

La présente invention a également pour objet une cellule hôte eucaryote ou procaryote, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par une molécule d'acide nucléique ou un vecteur tels que définis ci-dessus.  
25

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un fragment variable d'anticorps VHH dirigé contre toutes les molécules d'adhésion de la paroi bactérienne, pour la préparation d'un réactif de diagnostic destiné à la détection des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment au moins une  
30 molécule d'adhésion à leur surface.

Dans le cas où la molécule d'adhésion est la phosphorylcholine, la présente invention a pour objet l'utilisation d'un fragment variable d'anticorps VHH-

anti-phosphorylcholine ou bien d'un anticorps ou d'un fragment d'anticorps dérivés, tels que définis ci-dessus pour la préparation d'un réactif de diagnostic destiné à la détection des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment de la phosphorylcholine à leur surface et notamment des maladies infectieuses des voies  
5 respiratoires.

Ladite détection peut-être effectuée par toute technique appropriée, notamment par des techniques d'imagerie médicale.

La présente invention a également pour objet un kit de diagnostic des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment de la  
10 phosphorylcholine à leur surface et notamment des maladies infectieuses des voies respiratoires, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment variable d'anticorps VHH-anti-phosphorylcholine ou bien un anticorps ou un fragment d'anticorps comprenant ledit fragment variable d'anticorps, tels que définis ci-dessus.

La présente invention a en outre pour objet une composition  
15 pharmaceutique comprenant des anticorps de camélidés dirigés contre des agents pathogènes ou leurs fragments, caractérisée en ce qu'ils ne secrètent pas de toxine et en ce qu'ils ne sont pas des éléments constitutifs de la protéase NS3 de HCV.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un fragment variable  
20 d'anticorps VHH dirigé contre toutes les molécules d'adhésion de la paroi bactérienne selon l'invention.

Dans le cas où la molécule d'adhésion est la phosphorylcholine, la présente invention a pour objet une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un fragment variable d'anticorps VHH-anti-phosphoryl-  
25 choline ou bien un anticorps ou un fragment d'anticorps comprenant ledit fragment variable d'anticorps, tels que définis ci-dessus, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Conformément à l'invention ladite composition est avantageusement associée à des véhicules pharmaceutiquement acceptables appropriés à une  
30 administration intranasale.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un fragment variable d'anticorps VHH dirigé contre toutes les molécules d'adhésion de la

paroi bactérienne, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment au moins une molécule d'adhésion à leur surface.

Dans le cas où la molécule d'adhésion est la phosphorylcholine, la présente invention a également pour objet l'utilisation des anticorps VHH-anti-phosphorylcholine tels que définis ci-dessus pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment de la phosphorylcholine à leur surface.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, lesdites maladies sont des maladies infectieuses qui colonisent les muqueuses et plus particulièrement des maladies infectieuses des voies respiratoires.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre de la banque de VHH anti- $\beta$ 42 selon l'invention, ainsi qu'au Tableau I illustrant les séquences de la Demande et aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 illustre la cinétique en ELISA, des anticorps sériques spécifiques chez les alpagas immunisés avec le peptide A $\beta$ 42. Les valeurs représentent la densité optique à 295 nm des sérums dilués au 1/3200, respectivement aux jours J<sub>0</sub>, J<sub>35</sub>, J<sub>77</sub> et J<sub>131</sub> du protocole d'immunisation.

- la figure 2 illustre la diversité de la banque de fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique, spécifiques du peptide A $\beta$ 42 (VHH anti-A $\beta$ 42), analysée sur 6 clones (VHH-03, VHH-05, VHH-07, VHH-25, VHH-11 et VHH-33, respectivement SEQ ID NO : 26, 24, 22, 23, 25 et 27) pris au hasard.

- la figure 3 illustre la séquence en acides aminés des VHHs des clones VHH ALZ-61, VHH ALZ-L35, VHH ALZ L1-3, VHH ALZ V31-1 (SEQ ID NO: 3, 5, 7 et 9). Les séquences indiquées en gras correspondent respectivement au CDR1, CDR2 et CDR3.

- la figure 4 illustre la liaison des VHHs solubles des clones VHH ALZ-61, VHH ALZ-L35, VHH ALZ L1-3, VHH ALZ V31-1 au peptide A $\beta$ 42, analysée par un test ELISA direct.

- la figure 5 illustre la formule GPB-synthon utilisée pour le criblage des banques : PC liée à N-acétyl glucosamine (GalNac) couplée à la biotine via un pont disulfure.

- la figure 6 illustre les séquences nucléotidiques des VHH anti-phosphorylcholine sélectionnés.

**Tableau I: Séquences de la Demande**

Numéro d'identification	Séquence
SEQ ID NO: 1	peptide A $\beta$ 42
SEQ ID NO: 2	ADNc VHH-61
SEQ ID NO: 3	peptide VHH-61
SEQ ID NO: 4	ADNc VHH-L35
SEQ ID NO: 5	peptide VHH-L35
SEQ ID NO: 6	ADNc VHH-L1-3
SEQ ID NO: 7	peptide VHH-L1-3
SEQ ID NO: 8	ADNc VHH-V31-1
SEQ ID NO: 9	peptide VHH-V31-1
SEQ ID NO: 10	amorces VHBACK A6
SEQ ID NO: 11	amorces CH2FORT A4
SEQ ID NO: 12	amorces VHBACKA4
SEQ ID NO: 13	amorces VHFOR36
SEQ ID NO: 14	amorces LH
SEQ ID NO: 15	ADNc VHH-07
SEQ ID NO: 16	ADNc VHH-25
SEQ ID NO: 17	ADNc VHH-05
SEQ ID NO: 18	ADNc VHH-11
SEQ ID NO: 19	ADNc VHH-17
SEQ ID NO: 20	ADNc VHH-03
SEQ ID NO: 21	ADNc VHH-43
SEQ ID NO: 22	peptide VHH-07
SEQ ID NO: 23	peptide VHH-25
SEQ ID NO: 24	peptide VHH-05

SEQ ID NO: 25	peptide VHH-11
SEQ ID NO: 26	peptide VHH-03
SEQ ID NO: 27	peptide VHH-33
SEQ ID NO:28	ADNc clone 1
SEQ ID NO:29	peptide clone 1
SEQ ID NO:30	ADNc clone 2
SEQ ID NO:31	peptide clone 2
SEQ ID NO:32	ADNc clone 3
SEQ ID NO:33	peptide clone 3
SEQ ID NO:34	ADNc clone 4
SEQ ID NO:35	peptide clone 4
SEQ ID NO:36	ADNc clone 5
SEQ ID NO:37	peptide clone 5
SEQ ID NO:38	ADNc clone 7
SEQ ID NO: 39	peptide clone 7
SEQ ID NO:40	ADNc clone 8
SEQ ID NO:41	peptide clone 8
SEQ ID NO:42	ADNc clone 9
SEQ ID NO:43	peptide clone 9
SEQ ID NO:44	ADNc clone 10
SEQ ID NO :45	peptide clone 10
SEQ ID NO:46	ADNc clone 11
SEQ ID NO:47	peptide clone 11
SEQ ID NO:48	ADNc clone 12
SEQ ID NO:49	peptide clone 12
SEQ ID NO:50	Amorce M13-40
SEQ ID NO:51	Amorce myc seq 10

**Exemple 1 : Préparation d'une banque de fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique, spécifiques du peptide A $\beta$ 42 (VHH anti- A $\beta$ 42)**

**1) Immunisation d'alpagas avec le peptide A $\beta$ 42**

Le peptide A $\beta$ 42 (SEQ ID NO: 1) est synthétisé en phase solide  
5 selon la méthode décrite par Merrifield et al. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1964, 85 : 2149).

Un alpaga (*Lama pacos*) a été immunisé avec le peptide A $\beta$ 42 agrégé (ce peptide a tendance naturellement à s'agréger et à former des fibres amyloïdes) en suivant le protocole suivant :

**J<sub>0</sub>: Saignée pré-immune**

10 - J<sub>0</sub>: 200  $\mu$ g de peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant complet de Freund par voie sous-cutanée

- J<sub>10</sub> : 200  $\mu$ g peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant incomplet de Freund par voie sous-cutanée

15 - J<sub>21</sub> : 200  $\mu$ g peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant incomplet de Freund par voie sous-cutanée

**J<sub>35</sub>: saignée 2**

- J<sub>42</sub> : 200  $\mu$ g peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant incomplet de Freund par voie sous-cutanée

20 - J<sub>48</sub> : 200  $\mu$ g peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant incomplet de Freund par voie sous-cutanée

- J<sub>70</sub> : 200  $\mu$ g peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant incomplet de Freund par voie sous-cutanée

**J<sub>77</sub> : saignée 3**

- J<sub>101</sub> : **prélèvement des lymphocytes**

25 - J<sub>101</sub> : 200  $\mu$ g peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant incomplet de Freund par voie sous-cutanée

- J<sub>115</sub> : 200  $\mu$ g peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant incomplet de Freund par voie sous-cutanée

30 - J<sub>129</sub> : 200  $\mu$ g peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant incomplet de Freund par voie sous-cutanée

**J<sub>131</sub> : saignée 4**

La cinétique de la réponse en anticorps sériques spécifiques du peptide Aβ42 est analysée, en ELISA, aux jours J<sub>0</sub>, J<sub>35</sub>, J<sub>77</sub> et J<sub>131</sub>, sur des peptides à la dilution 1/3200.

5 Les résultats présentés à la figure 1 montrent un pic d'anticorps à J77.

**2) Purification des ARNm et synthèse des ADNc**

Les lymphocytes sanguins sont préparés à partir du sang hépariné prélevé à J<sub>131</sub>, par centrifugation en gradient de ficoll. De manière plus précise, le sang  
10 (120 ml) hépariné (25 000 UI d'héparine) est dilué dans du tampon HBSS (120 ml), centrifugé sur un gradient de ficoll, pendant 30 min à 400 g, puis les lymphocytes sont récoltés, lavés trois fois dans du tampon HBSS, centrifugés pendant 5 min à 1000 g. Les lymphocytes ainsi obtenus (1,7.10<sup>8</sup> cellules) sont aliquotés (3.10<sup>7</sup> cellules par tube) puis les ARNm sont extraits à partir de 10<sup>7</sup> lymphocytes, à l'aide du kit  
15 RNAXEL® (Eurobio), en suivant les instructions du fabricant.

L'ADNc est synthétisé à partir de 5 à 10 µg d'ARNm dans les conditions suivantes : 2 µl de β-mercaptoéthanol (1M) et 2 µl de RNAsine 40 U/µl (PROMEGA) sont ajoutés à 20 µl de la préparation d'ARNm purifié et le mélange est incubé 5 min à température ambiante, puis 2 heures à 42 °C, dans un volume de 96 µl  
20 contenant 400 UI de MLV (GIBCO) dans du tampon MLV(GIBCO) 8,33 mM DTT, 500 µM de chacun des dNTPs et 6 à 30 pmoles d'amorce hexanucléotidique aléatoire (PdN6).

Les fragments VHH sont amplifiés par des réactions de PCR imbriquées (*nested PCR*) :

**25 - 1<sup>ère</sup> réaction PCR**

Un produit de 600 pb correspondant au fragment VHH-charnière-CH2 est amplifié à l'aide du couple d'amorces :

- VHBACK A6 :5' GATGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGRGGAGG 3' (SEQ ID NO: 10)

- CH2FORT A4 :5' CGCCATCAAGGTACCAGTTGA 3' (SEQ ID NO: 11)

30 De manière plus précise, la réaction PCR est réalisée dans un volume final de 50 µl, en présence de 5 µl d'ADNc, 6 à 30 pmoles de chacune des

amorces, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de chacun des dNTPs et 5 unités de Taq polymérase Hot start (QIAGEN).

L'amplification PCR est réalisée dans les conditions suivantes : une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 15 min est suivie de 40 cycles alternant  
5 une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 sec, une étape d'hybridation des amorces à 52°C pendant 30 sec et une étape d'extension à 72°C pendant 30 sec, puis la réaction est terminée par une étape finale d'extension à 72 °C pendant 2 min.

Le produit d'amplification de 600 pb est séparé par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % contenant du bromure d'éthidium, dans du tampon TBE (Tris-Borate-EDTA), extrait du gel et purifié à l'aide du kit Nucleospin Extract  
10 (MACHEREY/NAGEL).

**- 2<sup>ème</sup> réaction PCR :**

Un produit d'environ 350 pb correspondant au fragment VHH est amplifié à partir du produit de 600 pb, à l'aide des couples d'amorces suivants :

15 **\* Couple 1 :**

- VHBACKA4 (*SfiI*): 5' CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAKGTSCA  
GCT 3' (SEQ ID NO: 12)

et

20 - VHFOR36 (*NotI*) : 5' GGACTAGTTGCGGCCGCTGAGGAGACGGTGACCTG 3' (SEQ ID NO: 13).

**\* Couple 2 :**

- VHBACKA4 (*SfiI*)

et

25 - LH (*NotI*) : 5' GG ACT AGT TGC GGC CGC TGG TTG TGG TTT TGG TGT CTT GGG 3' (SEQ ID NO: 14)

Le couple 1 amplifie les VHH de tous les isotopes d'immunoglobulines à chaîne unique alors que le couple 2 est spécifique de l'isotype IgG3.

De manière plus précise, la réaction PCR est réalisée dans un volume final de 50 μl, en présence de 5 μl du produit de 600 pb, 10 pmoles de  
30 chacune des amorces, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de chacun des dNTPs et 5 unités de Taq polymérase.

L'amplification PCR est réalisée dans les conditions suivantes : une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 15 min est suivie de 35 cycles alternant une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 sec, une étape d'hybridation des amorces à 45°C pendant 30 sec et une étape d'extension à 72°C pendant 60 sec, puis la réaction  
5 est terminée par une étape finale d'extension à 72°C pendant 2 min.

Le produit d'amplification de 350 pb est séparé par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % contenant du bromure d'éthidium, dans du tampon TBE (Tris-Borate-EDTA), extrait du gel et purifié à l'aide du kit Nucleospin Extract (MACHEREY/NAGEL).

### 10 **3) Clonage des ADNc dans le vecteur pHEN 1**

Le phagemide pHEN1 (Hoogenbaum et al., *N.A.R.*, 1991, **19**: 4133-4137) est purifié à l'aide du kit Nucleobond AX (MACHEREY/NAGEL), digéré par les enzymes *Sfi* I et *Not* I (BIOLABS), en suivant les instruction du fabricant, purifié sur gel d'agarose comme décrit ci-dessus, puis traité à la phosphatase alcaline (CIP).  
15 Le phagemide pHEN1 linéarisé et déphosphorylé et le produit d'amplification de 350 pb préalablement digéré par les enzymes *Sfi* I et *Not* I, sont ensuite incubés en présence de ligase, puis des bactéries *E.coli* SURE® sont transformées par électroporation avec le produit de la ligation. Les bactéries transformées sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu 2YT gélosé, additionné de 100 µg/ml d'ampicilline  
20 et de 1 % de glucose. Les colonies résistantes ( $2 \times 10^6$  clones) sont remises en suspension dans du milieu 2YT et la banque est conservée à -80°C dans du glycérol.

La banque ainsi obtenue qui contient des clones incluant un insert VHH amplifié avec le couple d'amorces 1 (sous-banque 1) et des clones incluant un insert VHH amplifié avec le couple d'amorces 2 (sous-banque 2 spécifique de l'isotype  
25 IgG3), est dénommée banque immune VHH ALZ, a été déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2937.

### **4) Contrôle de la diversité de la banque**

L'ADN plasmidique de 12 colonies résistantes est extrait à l'aide du  
30 kit Nucleospin Plasmid (MACHEREY/NAGEL).

La présence d'un insert est contrôlée par restriction enzymatique de l'ADN plasmidique, à l'aide de *Sfi I* et *Not I* (BIOLABS), en suivant les instructions du fabricant.

La diversité de la banque est contrôlée par amplification de l'ADN plasmidique, par PCR à l'aide du couple d'amorces VHBACKA4 et VHFOR36 comme décrit ci-dessus puis restriction enzymatique du produit PCR, à l'aide de *Bst NI* (BIOLABS), en suivant les instructions du fabricant et séparation des produits de digestion par électrophorèse en gel d'agarose (3 %). Alternativement, la séquence des inserts est déterminée par séquençage automatique.

Les résultats sont les suivants :

- 90 % des clones ont un insert (VHH-07, VHH-25, VHH-05, VHH-11, VHH-17, VHH-03, VHH-43, VHH-61, VHH-L35, VHH-L1-3, VHH-V31-1 et VHH-33, respectivement SEQ ID NO: 15 à 21, 2, 4, 6 et 8).

- le profil de restriction par *Bst NI* montre une diversité des inserts.

La figure 2 montre que la banque possède une grande diversité étant donné que parmi 6 clones pris au hasard, 5 codent pour des VHH dont les CDRs sont tous différents entre eux (VHH-05, VHH-07, VHH-25, VHH-11 et VHH-33, respectivement SEQ ID NO: 24, 22, 23, 25 et 27) et 1 code pour un VH tronqué sans CDR3 (VHH-03, SEQ ID NO: 26).

## **Exemple 2 : Criblage de la banque de VHH anti-A $\beta$ 42 par la technique d'exposition sur phage**

### **1) Matériels et méthodes**

Les phagemides de la banque de VHH anti-A $\beta$ 42 sont encapsidés dans des phages filamenteux (M13) et les phages sont amplifiés et titrés selon les techniques classiques de Biologie moléculaire en suivant les protocoles standard tels que ceux décrits dans *Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA)*. 3 criblages successifs de la banque de VHH anti-A $\beta$ 42 ont été réalisés par la technique d'exposition sur phage, en suivant le protocole suivant :

#### **- 1<sup>er</sup> criblage**

4 ml de peptide A $\beta$ 42 (25  $\mu$ g/ml) dilué dans du tampon PBS sont répartis dans des immunotubes (maxisorp®, 5 ml, NUNC) puis incubés une nuit à

37°C ou à 4°C. Après 5 lavages dans du PBS, 4 ml de tampon PBS contenant 2 % de lait écrémé (tampon de saturation) sont ajoutés et incubés 2 h à 37°C. Après des lavages avec du tampon PBS,  $10^{12}$  à  $10^{13}$  phages dilués dans 4 ml de tampon PBS contenant 2 % de lait écrémé sont ajoutés et incubés une heure à température ambiante sur une roue, puis une heure à température ambiante sans agitation. Après 10 lavages avec du tampon PBS contenant 0,1 % de Tween 20 suivis de 10 lavages avec du tampon PBS, 3 ml d'une culture d'*E. coli* TG1 (*supE hsdΔ5thi Δ(lac-proAB)* F' [*traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>f</sup> lacZ DM15*], STRATAGENE), à la densité optique de 0,5, sont ajoutés dans les immunotubes et incubés 45 min à 37°C, sous agitation. A la fin de l'incubation, les bactéries sont diluées (dilutions  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-6}$ ) dans un volume de 100 µl, étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu 2YTAG gélosé (milieu 2YT additionné de 100 µg/ml d'ampicilline et de 1 % de glucose) et incubées une nuit à 37°C. Le reste de la culture (3 ml) est étalé sur une grande boîte de Pétri contenant le même milieu et incubé une nuit à 30°C.

15                   - 2<sup>ième</sup> et 3<sup>ième</sup> criblages

Le lendemain, les bactéries survivantes sont récoltées dans 5 ml de milieu 2YT puis 50 µl sont mis en culture dans 100 ml de milieu 2YTAG et le volume restant est congelée à -80°C dans du glycérol. La culture est incubée à 37°C jusqu'à l'obtention d'une  $DO_{600}$  de 0,5 puis 10 ml de la culture sont infectés par 0,5 ml de phage auxiliaire (*helper* phage), incubés 130 min à 37° C sans agitation puis centrifugés 10 min à 5000 rpm. Le culot est remis en suspension dans 50 ml de milieu 2YT additionné d'ampicilline (100 µg/ml) et de kanamycine (25 µg/ml) et la suspension obtenue est incubée une nuit à 30°C. Ensuite, 40 ml de cette culture sont centrifugés 10 min à 8000 rpm et le surnageant additionné de 8 ml d'une solution de PEG/NaCl (20 % PEG 8000, 2,5 M NaCl) est incubé 2 à 4 h à 4°C puis centrifugé 2 fois à 10 min à 8000 rpm. Le culot de phage est remis en suspension dans 2 ml de PBS puis les phages sont titrés comme décrit ci-dessus et 1 ml de phage est criblé sur immunotube, comme décrit pour le 1<sup>er</sup> criblage, à l'exception que la concentration de peptide déposée dans les immunotubes est diminuée et la composition des tampons de saturation et de lavage des phages non fixés sont modifiés comme indiqué dans le Tableau II ci-dessous :

**Tableau II : Conditions des criblages successifs**

Criblage	Concentration en peptide	Tampon de saturation	Tampon de lavage
1 <sup>er</sup> criblage	25 µg/ml	PBS + 2 % de poudre de lait écrémé	PBS + 0,1 % Tween 20
2 <sup>ième</sup> criblage	12,5 µg/ml	PBS + 0,5 % gélatine	PBS + 0,3 % Tween 20
3 <sup>ième</sup> criblage	12,5 µg/ml	PBS + 3 % BSA	PBS + 0,5% Tween 20

**3) Résultats**

Le rendement de chaque criblage, représenté par la proportion de phages liés au peptide Aβ42 est illustré par le Tableau III ci-dessous.

5

**Tableau III : Rendement des criblages**

Criblage	Nbre total de phages	Nbre de phages liés au peptide Aβ42	Rapport
1 <sup>er</sup> criblage	$2 \times 10^{12}$	$10^9$	$5 \times 10^{-4}$
2 <sup>ième</sup> criblage	$3 \times 10^{13}$	$2 \times 10^{10}$	$6 \times 10^{-4}$
3 <sup>ième</sup> criblage	$10^{14}$	$3,5 \times 10^{13}$	$3 \times 10^{-1}$

La proportion de phages se liant au peptide Aβ42, en ELISA, est illustrée par le Tableau IV ci-dessous :

**Tableau IV : Proportion de phages se liant au peptide Aβ42 en ELISA**

Etat de la banque	Sous-banque 1		Sous-banque 2	
	DO < 0,5	DO > 0,5	DO > 0,5	DO > 0,5
Avant criblage	3/8	0/8	3/8	0/8
Après 1 <sup>er</sup> criblage	3/24	3/24	5/24	0/24
Après 2 <sup>ième</sup> criblage	11/32	2/32	5/35	4/32
Après 3 <sup>ième</sup> criblage	15/64	16/64	27/64	1/64

10

Le Tableau IV indique que la proportion de phages se liant avec une bonne affinité au peptide Aβ42 augmente au cours des criblages successifs.

**Exemple 3 : Production de VHH solubles et analyse de la spécificité et de l'affinité des VHH solubles pour le peptide A $\beta$ 42**

**1) Matériels et méthodes**

a) Production de VHH solubles

5 - microculture en plaque à 96 puits

Une colonie de *E. coli* HB2151 (Carter et al., *N.A.R.*, 1991, 19: 4133-4137) contenant le plasmide pHEN-VHH est mise en culture toute la nuit dans un puits d'une microplaque de 96 puits contenant 200  $\mu$ l de milieu 2YT additionné d'ampicilline (100  $\mu$ g/ml) et de glucose 1% (culture I).

10 3  $\mu$ l de la culture I sont ensuite transférés dans un puits d'une microplaque de 96 puits contenant 200  $\mu$ l de milieu 2YT additionné d'ampicilline (100  $\mu$ g/ml) et de glucose 0,1% et la culture est incubée pendant 3 heures à 37°C (culture II).

A la fin de cette incubation, 25  $\mu$ l de milieu 2YT contenant de  
15 l'IPTG 20 mM (soit 2 mM final) sont ajoutés dans les puits et la culture II est ensuite incubée toute la nuit à 30°C avec agitation. Le lendemain, la culture en plaque est centrifugée 10 min à 2500 rpm et le surnageant contenant les VHH solubles est récolté.

- culture à moyenne échelle

Une colonie de *E. coli* HB2151 (Carter et al., précité) contenant le  
20 plasmide pHEN-VHH est mise en culture dans 75 ml de milieu 2YT additionné d'ampicilline (100  $\mu$ g/ml) et de glucose 1% pendant 2 heures puis la culture est induite par l'IPTG (2mM final) pendant 4 h à 25 °C et centrifugée pendant 10 min à 4000 rpm. Le culot est ensuite remis en suspension dans 1 ml de tampon 200 mM Tris HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 17,2 % sucrose (P/V) puis la suspension est incubée 30  
25 min à 1 h sur de la glace, sous agitation, centrifugée à 13000 rpm; à 4°C, pendant 5 min et le surnageant (périplasme) contenant les VHH solubles est récolté.

b) Test ELISA (cultures en microplaques)

Le peptide A $\beta$ 42, dilué dans du tampon PBS (1  $\mu$ g/ml -100  
30  $\mu$ l/puits), est distribué dans les puits d'une microplaque et la plaque est incubée une nuit à 37°C. Des plaques recouvertes de BSA (1  $\mu$ g/ml -100  $\mu$ l/puits) sont utilisées comme contrôle. Après des lavages avec du tampon PBS contenant 0,1 % Tween 20 (PBS-T), 50  $\mu$ l du surnageant de culture II obtenu comme décrit ci-dessus, mélangé à

50 µl de tampon PBS-T contenant 0,5 % gélatine sont ajoutées dans chaque puits et la plaque est incubée pendant 2 heures à 37°C. Après des lavages dans le même tampon que précédemment, l'anticorps murin anti-*c myc* 9E10 (référence sc-40, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) dilué dans du tampon PBS-T (1 µg/ml – 100 µl par puits) est ajouté dans les puits et la plaque est incubée pendant 1 heure à 37°C. Après des lavages dans le même tampon que précédemment, un anticorps anti-immunoglobulines de souris couplé à la peroxydase diluée dans du tampon PBS-T (1 µg/ml - 100 µl par puits ) est ajouté dans les puits et la plaque est incubée pendant 1 heure à 37°C. La réaction est révélée par addition d'*O*-phénylènediamine (0,2 % dans du tampon citrate 0.1 M, pH 5.2 contenant 0.03 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-100 µl /puits) et incubation des plaques à température ambiante, à l'obscurité. La réaction est ensuite stoppée par addition d'HCl 3 M (50 µl /puits) et l'absorbance à 492 nm est mesurée à l'aide d'un lecteur automatique. Les valeurs significatives correspondent à un rapport DO (A β42)/DO (BSA) supérieur à 5.

#### 15 c) Test ELISA en compétition

Des quantités variables du peptide Aβ42 dans du tampon PBS sont incubés avec une concentration fixe de surnageant de culture contenant le VHH, pendant 2 heures à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite transféré dans les puits d'une microplaque recouverte de peptide Aβ42, dans les conditions telles que décrites ci-dessus puis la plaque est incubée pendant 30 min à température ambiante et lavée avec du tampon PBS-T et les VHHs libres (VHHs non liés au peptide Aβ42), présents dans le mélange réactionnel sont dosés en ELISA, selon le protocole tel que décrit ci-dessus. Pour chaque concentration , le pourcentage d'inhibition correspond à la valeur  $\frac{I_0 - I_c}{I_0} \times 100$  où I<sub>0</sub> et I<sub>c</sub> sont les absorbances à 492 nm obtenues respectivement, en l'absence et en présence du peptide Aβ42 dans le milieu réactionnel.

## 2) Résultats

Des VHHs solubles ont été préparés selon le protocole tel que décrit ci-dessus, à partir de 4 clones positifs en ELISA, à savoir :

- VHH ALZ 61 : *E. coli* HB2151 transformée par le plasmide pHEN-1 qui possède la séquence nucléotidique VH-61 (SEQ ID NO: 2) insérée entre

les sites *Sfi I* et *Not I* (pHEN-1/VHH-61), déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2933.

- VHH ALZ L35 : *E. coli* HB2151 transformée par le plasmide pHEN-1 qui possède la séquence nucléotidique VHH-L35 (SEQ ID NO: 4) insérée entre les sites *Sfi I* et *Not I* (pHEN-1/VHH-L35), déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2934.

- VHH ALZ L1-3 : *E. coli* HB2151 transformée par le plasmide pHEN-1 qui possède la séquence nucléotidique VHH-L1-3 (SEQ ID NO: 6) insérée entre les sites *Sfi I* et *Not I* (pHEN-1/VHH-L1-3), déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2935.

- VHH ALZ V31-1 : *E. coli* HB2151 transformée par le plasmide pHEN-1 qui possède la séquence nucléotidique VHH-V31-1 (SEQ ID NO: 8) insérée entre les sites *Sfi I* et *Not I* (pHEN-1/VHH-V31-1), déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2936.

La séquence en acides aminés des VHH de ces clones (SEQ ID NO: 3, 5, 7 et 9) est illustrée par la figure 3.

La spécificité et l'affinité du VHH produit par ces clones pour le peptide A $\beta$ 42 ont été analysées, respectivement en ELISA direct et par un test ELISA en compétition. Les résultats sont les suivants :

- les clones produisent un VHH qui se lie spécifiquement au peptide A $\beta$ 42 (figure 4), et

- les clones produisent un VHH qui présentent une affinité élevée pour le peptide A $\beta$ 2 : une inhibition de respectivement 56 % et 42 % pour le VHH-L35 et VHH-L1-3 est observée pour une concentration de  $3 \cdot 10^{-8}$ M de peptide A $\beta$ 42.

De manière plus précise, l'affinité des VHH L35 et L1-3 sont respectivement de  $3 \cdot 10^{-8}$ M et  $6 \cdot 10^{-8}$ M.

Des études complémentaires mettant en œuvre des peptides chevauchant correspondant à des fragments du peptide A $\beta$ 42 ont montré que le VHH V31-1

réagit avec la partie carboxy terminale avec une affinité d'environ  $10^{-8}$ M et reconnaît bien par ELISA la forme fibrillaire de A $\beta$ 42, mais pas la forme A $\beta$ 40. En immunohistochimie, sur des coupes de cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer, un marquage intraneuronal sous forme de dépôts granulaires est observé avec le VHH  
5 V31.

**Exemple 4 : Production de VHH solubles et analyse de la spécificité et de l'affinité des VHH solubles pour les bactéries exprimant à leur surface de la phosphorylcholine**

1) Immunisation d'alpagas avec du *Streptococcus pneumoniae* dénaturé par la chaleur  
10 ou avec de la phosphorylcholine couplée à de l'albumine d'alpaga (ASA-PC).

Deux alpagas ont été immunisés respectivement avec deux antigènes, naturel (*S. pneumoniae* dénaturés par la chaleur) ou synthétique pour obtenir des anticorps monoclonaux anti-PC. Un mime de l'antigène de *S. pneumoniae* comprenant à la fois la PC et une partie de son support naturel a été synthétisé, c'est-à-dire la N-Acetyl-D-galactosamine liée en position 6 (6-O-PC- $\beta$ -D-GalNAc). Ce  
15 synthon a été couplé à de l'albumine d'alpaga. Après 5 immunisations, le sérum des alpagas contient des anticorps anti-PC. La spécificité des sérums pour la phosphorylcholine a été caractérisée en mesurant la concentration inhibitrice 50 % (IC50) des sérums vis-à-vis du polysaccharide C, qui correspond à de la PC couplée à des acides  
20 teichoïques. Les IC50 sont respectivement de 5 ng/ml pour l'alpaga immunisé avec le composé synthétique et de 0,5 ng/ml pour l'alpaga immunisé avec les *S. pneumoniae* dénaturés par la chaleur.

Le protocole utilisé est du même type que celui décrit à l'exemple 1. Pour ce qui concerne plus précisément l'obtention de l'antigène à base de *S. pneumoniae*,  $1,5 \cdot 10^8$  bactéries/ml sont chauffées toute une nuit à 37°C.  
25

2) Purification des ARNm et synthèse des ADNc

Les lymphocytes sanguins sont préparés, à partir du sang hépariné prélevé à J<sub>131</sub>, par centrifugation en gradient de Ficoll, sensiblement dans les mêmes conditions que celles exposées à l'exemple 1. De manière plus précise, 300 ml de sang  
30 d'alpagas immunisés dans les conditions précisées ci-dessus, à savoir l'un avec ASA-PC (PC couplée à de l'albumine d'alpaga) et l'autre avec du *Streptococcus pneumoniae*, dénaturé par la chaleur est collecté, en présence de 5ml d'anticoagulant

(Héparine). Ce sang est ensuite dilué au 1/2 dans du HBSS, puis réparti dans des tubes (environ 25 ml par tube) et avec de l'Histopaque (environ 15 ml par tube) (Histopaque 1077, Sigma) pour créer un gradient de densité. Les échantillons sont centrifugés 30 minutes à 400 g. Les cellules mononucléées qui forment un anneau à l'interface  
5 plasma-Histopaque sont récupérées et lavées 3 fois dans du HBSS.

Les lymphocytes ainsi obtenus ( $10^8$  cellules) sont aliquotés puis les ARN sont isolés à partir de  $10^7$  cellules. Le culot de cellules est repris dans 500  $\mu$ l de RNAXEL (Eurobio) et 100  $\mu$ l de chloroforme. 0,4 g de billes (212-300 microns) sont ensuite ajoutés pour permettre le broyage des cellules par l'appareil FastPrep  
10 (Q.BIOgene, Illkirch, France) pendant 2 fois 30 secondes à vitesse maximale. La phase supérieure est récupérée puis traitée au TRIzol (Invitrogen, San Diego, CA). Après lavage au chloroforme, précipitation à l'isopropanol et lavage à l'éthanol, le culot est repris dans 100  $\mu$ l d'eau traitée au DEPC (0,01 %) puis précipité par du chlorure de lithium de concentration finale 2 molaire. Cette ultime étape assure la  
15 pureté de l'échantillon d'ARN. Les aliquotes sont ensuite conservés à - 80°C.

L'ADNc est synthétisé à partir de 1,5  $\mu$ g d'ARN dans les conditions suivantes : 2  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoéthanol (1M) et 2  $\mu$ l de RNAsine 40 U/ $\mu$ l (PROMEGA) sont ajoutés à 20  $\mu$ l de la préparation d'ARNm purifié et le mélange est incubé 5 min à température ambiante, puis 2 heures à 42 °C, dans un volume de 96  $\mu$ l contenant 400  
20 UI de reverse transcriptase MLV superscript II (Invitrogen, San Diego, CA) dans du tampon MLV(GIBCO), 8,33 mM DTT, 500  $\mu$ M de chacun des dNTPs et 6 à 30 pmoles d'amorce hexanucléotidique aléatoire (PdN6). On obtient alors les ADN complémentaires (ADNc) de ces ARN.

L'ADN ainsi synthétisé sert de matrice pour des réactions de PCR  
25 pour l'amplification des gènes codant pour  $V_H-C_H2$ . Selon qu'il s'agit d'un anticorps conventionnel ou d'un anticorps à domaine variable unique, l'amplifiat a un poids moléculaire différent. En effet, la présence de la région  $C_H1$  et la longueur de la région charnière déterminent la taille de l'ADN amplifié. Ainsi, l'amplifiat correspondant à un anticorps conventionnel (IgG1) est de l'ordre de 900 pb, celui correspondant à une IgG  
30 de type 2 (anticorps à domaine unique) est d'environ 690 pb, et celui correspondant à une IgG 3 (anticorps à domaine unique) est de 620 pb.

On peut ainsi discriminer les deux catégories d'anticorps et réamplifier les fragments d'environ 650 pb, contenant le V<sub>H</sub>H, par une seconde PCR. On obtient alors des fragments d'environ 400 pb correspondant au V<sub>H</sub>H. Lors de cette seconde PCR, des amorces spécifiques présentant chacune un site de clivage pour une enzyme de restriction à site rare sont utilisées.

De manière plus précise, les fragments obtenus sont amplifiés par des réactions de PCR imbriquées (*nested PCR*) :

- 1<sup>ère</sup> réaction PCR

L'ADNc précédemment synthétisé (produit de 650 pb) correspondant au fragment VHH-charnière CH2 est amplifié à l'aide du couple d'amorces :

- VHBACK A6 (5' GATGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGRGGAGG 3') (SEQ ID NO :10) et

- CH2FORT A4 (5' CGCCATCAAGGTACCAGTTGA 3') (SEQ OD NO :11).

Le mélange de PCR est composé de 5 µl d'ADNc, 30 pmol de chaque amorce, 1 µl d'un mélange équimolaire de dNTP 25 mM, 3 µL de MgCl<sub>2</sub>, 5 µL de tampon de PCR 10X et de 5 unités de Hot Start Taq polymérase qui permet une dénaturation de l'ADN à température élevée (94°C pendant 15 minutes). La PCR se poursuit ensuite par 40 cycles successifs d'hybridation (30 secondes à 52°C), d'extension d'amorce (30 secondes à 72°C) et de dénaturation (30 secondes à 94°C). La réaction se termine par une phase d'élongation terminale de 10 minutes à 72°.

Le produit d'amplification de 650 pb est séparé par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % contenant du bromure d'éthidium, dans du tampon TBE (Tris-Borate-EDTA), extrait du gel et purifié à l'aide du kit Nucleospin Extract (MACHEREY/NAGEL).

2<sup>ème</sup> réaction PCR

Un produit d'environ 400 pb correspondant au fragment VHH est amplifié à partir du produit de 650 pb, à l'aide des amorces suivantes :

- VHBACKA4 (*SfiI*): 5' CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAKGTSCAGCT 3' (SEQ ID.NO: 12)

30 et

- VHFOR36 (*NotI*) : 5' GGACTAGTTGCGGCCGCTGAGGAGACGGTGACCTG 3' (SEQ ID NO: 13),

qui contiennent respectivement les sites de restriction des enzymes SfiI et NotI.

A la différence de la première PCR, il n'y a que 35 cycles d'amplification et la phase d'extension d'amorce dure une minute.

5 Le produit d'amplification de 400 pb est séparé par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % contenant du bromure d'éthidium, dans du tampon TBE (Tris-Borate-EDTA), extrait du gel et purifié à l'aide du kit Nucleospin Extract (MACHEREY/NAGEL), puis quantifié.

### 3) Clonage des ADNc dans le vecteur pHEN2 (préparation des banques)

10 Le vecteur utilisé pour le clonage de V<sub>H</sub>H est le plasmide pHEN 2 (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk>). Il est de nature phagemidique, c'est-à-dire qu'il contient deux origines de répllication : d'une part celle du phage M13 (parasite naturel d' *E. coli*) qui permet la synthèse de particules phagemidiques dont l'ADN est simple brin, et d'autre part celle du plasmide Col E1 (Bedbrook, JR. et al., Nature, 1979, 281, 15 447) qui permet la répllication d'ADN double brin.

Lors du clonage, le gène codant pour V<sub>H</sub>H est inséré en phase avec le gène g III codant pour la région C-terminale, allant des acides aminés 198 à 406, de la protéine membranaire p III. Cette protéine de fusion V<sub>H</sub>H-pIII est sous la dépendance du promoteur lac inductible par l'IPTG, et est située à l'extrémité du phage. 20 L'induction par IPTG de cellules infectées par le phagemide permet la synthèse de la protéine de fusion V<sub>H</sub>H-pIII puis son exportation au niveau du périplasme. Ceci se fait sous la conduite de séquences leader Pel B, secondairement clivée par une protéase de la cellule hôte.

Après ligation des inserts dans les vecteurs, des transformations par 25 choc thermique sont effectuées. Après optimisation du ratio VHH/pHEN2, la taille des deux banques est d'environ  $2 \cdot 10^5$  CFU (Colony Forming Unit) pour chacune.

De manière plus précise, à partir de 11 µg de plasmide dans 23 µl d'eau, on effectue une coupure Sfi I (New England BioLabs, ) du côté 5' de l'ADN. Pour cela, on ajoute 30 unités d'enzyme, 3,5 µl de son tampon (NEB2) et 4 µl de BSA 30 pour optimiser la réaction. De même, on prépare les inserts à partir de 1 µg de chaque ADN.

La digestion a lieu durant une nuit à 50°C ; puis on ajoute 2 µl de NaCl, 0,7 µl de tampon et 30 unités de NotI (Roche) pour effectuer la digestion du côté 3' pendant 5 heures à 37°C.

Les ADN (inserts et vecteurs) sont ensuite purifiés sur gel et quantifiés, dans les mêmes conditions que celles exposées ci-dessus.

Afin d'éviter une autoligation du vecteur lors de l'étape suivante, on effectue une déphosphorylation de celui-ci. A partir de 5 µg de pHEN2 purifié, on ajoute 25 µl d'eau, 5 µl de tampon 10X et 1 µl de phosphatase alcaline de veau (CIP). Après 30 minutes d'incubation à 20°C, la réaction est arrêtée avec de l'EDTA de concentration finale 20 mM puis l'échantillon est incubé 20 minutes à 75°C.

On réalise deux extractions phénol-chloroforme pour purifier le vecteur. L'ADN est ensuite précipité dans 0,1 volume d'acétate de sodium 3M (pH=5) et 3 volumes d'éthanol 100% pendant une nuit, puis est repris dans 50 µl d'eau.

Le plasmide pHEN2 linéarisé et déphosphorylé et le produit d'amplification de 400 pb préalablement digéré par les enzymes Sfi I et Not I, sont ensuite incubés en présence de ligase (T4 DNA LIGASE, NEW ENGLAND BIOLABS).

Puis, 5 µl de chaque ligation sont mis en présence de 50 µl de bactéries compétentes (XL2-Blue MRF' Ultracompetent Cells, Stratagene). Les tubes sont incubés une demi-heure dans la glace, puis 30 secondes à 42°C. Après ce choc thermique, on ajoute 900 µl de solution SOC (20 g de bacto-tryptone, 5 g de bacto-yeast extract, 0,5 g NaCl qsp 1 l d'eau plus 20 mM de glucose) pour permettre aux bactéries de récupérer et croître pendant 1H à 37°C. 100 µl de chaque test sont étalés sur boîte de Pétri, en milieu 2YTAG (Yeast Tryptone Ampicilline Glucose).

Le phagemide contient un gène de résistance à l'ampicilline qui permet la sélection positive des cellules transfectées, lors de la croissance sur milieu antibiotique. Les colonies obtenues sont ensuite comptées. La ligation correspondant au meilleur ratio (ratio insert:vecteur 2:1) est de nouveau effectuée, en grande quantité. Puis on réalise des électroporations en masse. Pour chacun des deux alpagas, il est nécessaire de préparer 8 tubes de 15 ml avec 1 ml de milieu SOC. Sur glace, dans 8 tubes Eppendorf froids, 40 µl de bactéries (SURE Electroporation-Competent Cells, Stratagene) sont mis au contact de 4 µl de vecteur d'expression dans chacun des

8 tubes. Après 5 minutes, les 44 µl de culture sont déposés dans une cuve d'électroporation refroidie à 4°C. L'appareil (Bio-Rad) est alors réglé sur un voltage de 2,5 kV, une capacitance de 25 µF et une résistance de 200 Ω. Immédiatement après électroporation, le milieu SOC est aspiré avec une pipette Pasteur de façon à le rajouter aux bactéries et les transférer au plus vite dans le Falcon ensuite placé à 37°C sous agitation pendant une heure. 10 et 100 µl de cette préculture sont ensuite étalés sur boîte de Pétri 2 YTAG et le reste des 8 tubes est étalé sur plaque "screening" 500 cm<sup>2</sup> (Fisher Scientific Labosi, Elancourt, France). Toutes les boîtes sont placées à 37°C pendant une nuit. Les colonies résistantes sont remises en suspension dans du milieu YT2 et la banque est conservée à -80°C dans du glycérol.

#### 4) Contrôle de la diversité de la banque

10 colonies résistantes de chaque alpaga sont de nouveau mises en culture dans 5 ml de milieu 2YTAG. A partir de 4 ml de celles-ci, l'ADN plasmidique est extrait à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne).

15 La présence d'un insert est contrôlée par restriction enzymatique de l'ADN plasmidique à l'aide des enzymes de restriction *Sfi* I et *Not* I (BIOLABS) en suivant les instructions du fabricant, puis déposé sur gel d'agarose 1% pour vérifier la présence de l'insert.

La diversité de la banque est contrôlée par amplification de l'ADN plasmidique, par PCR, à l'aide du couple d'amorces M 13-40 (5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3', SEQ ID NO :50) et Myc Seq 10 (5'-CTCTTCTGAGATGAGTTTTTG-3', SEQ ID NO :51). L'amplification se fait lors de 30 cycles de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 54°C, et 30 secondes à 72°C précédés par 5 minutes à 94°C et suivis par 10 minutes à 72°C. Les produits de PCR sont déposés sur gel d'agarose 1% pour vérifier la présence de l'amplifiat. Puis ils sont envoyés à la société Génome Express S.A. (Grenoble, France) avec les amorces utilisées, pour être séquencés. Les séquences sont ensuite analysées grâce au logiciel DNA Strider 1.3f11, puis alignées par le logiciel CLUSTAL W.

5) Criblage de la banque de VHH anti-phosphorylcholine par la technique d'exposition des phages (sélection des phages VHH spécifiques de la phosphorylcholine)

a) Préparation des phages

5 50 µl de banque de chaque alpaga sont dilués dans 1 ml de milieu 2 YTAG. Les bactéries sont mises sous agitation à 37°C pendant 3 heures puis sont utilisées pour ensemercer 100 ml de 2 YTAG jusqu'à obtention d'une DO de 0,044 à 600 nm ; soit environ 250 µl de la préculture. La culture est également mise sous agitation à 37°C jusqu'à obtention d'une DO à 600 nm de l'ordre de 0,5 ; c'est-à-dire en  
10 début de phase exponentielle de croissance des bactéries.  $5 \cdot 10^{11}$  PFU de phage Helper M13K07 (Viera J et al., Methods Enzymol., 1987, 153, 3-11) résistant à la kanamycine sont ajoutés à la culture qui est ensuite incubée 30 minutes à 37°C sans agitation puis 30 minutes à 37°C avec agitation.

Après centrifugation pendant 15 minutes à 4°C et 4 000 g, le  
15 surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans 300 ml de 2YTAG contenant de la Kanamycine à 50 µg/ml. La culture est incubée durant une nuit à 30°C sous agitation.

Les phages en suspension sont centrifugés deux fois pour éliminer les bactéries (10 minutes, 8 000 rpm, 4°C, puis précipités pendant 4 heures à 4°C en présence de 0,04 volume de PEG-NaCl. Le précipitat est centrifugé une demi-heure à  
20 8 000 rpm et 4°C, puis repris dans 1 ml de PBS stérile.

b) Titrage des phages

La souche *d'E. coli* utilisée pour le titrage est TG1 (Stratagène, La Jolla, CA), dans laquelle le pili sexuel est codé par un transposon. Une colonie de TG1 sur milieu minimum, est repiquée dans 2 ml de 2YT. Cette préculture est incubée  
25 durant une nuit à 37°C puis sert à l'ensemencement de 50 ml de 2 YT jusqu'à obtention d'une DO de 0,045. La culture est mise sous agitation à 37°C jusqu'à ce que la DO atteigne 0,5 à 600 nm, c'est à dire environ 2 heures.

5 aliquotes de 50 µl de TG1 sont ensuite additionnés de 1 µl de phage précédemment préparé, à différentes dilutions ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ). Après  
30 15 minutes à température ambiante, les aliquotes sont étalées sur boîte de Pétri 2 YTAG et incubées une nuit à 37°C. Le titrage est enfin effectué lorsque les colonies sélectionnées sont comptées.

## c) Criblage

Le criblage s'effectue à partir de  $2,5 \cdot 10^{11}$  phages/ml dans 100  $\mu$ l de PBS, auxquels est ajouté 1  $\mu$ l de GPB (Gal-Nac-PC-Biotine) à 1mg/ml (Figure 5). Le mélange est incubé 2 heures à température ambiante sous agitation, puis additionné de 900  $\mu$ l de PBS et 100  $\mu$ l de gélatine à 0,5%. Les phages ayant une affinité pour la PC sont alors liés à GPB. Après 10 minutes d'agitation, le mélange est transféré dans un immunotube préalablement coaté par de la neutravidine. Celle-ci ayant une affinité très élevée pour la biotine (de l'ordre de  $10^{13}$ ), les phages liés à GPB se lient aux parois des immunotubes placés une heure sous agitation à température ambiante. Les tubes sont ensuite lavés 10 fois par du PBS-tween 0,1%, puis 10 fois en PBS. On ajoute alors 1 ml de DTT 50 mM dans les tubes que l'on agite durant une demi-heure, pour casser la liaison dissulfure PC-Biotine. 500  $\mu$ l sont conservés à 4°C et 500  $\mu$ l sont incubés avec 5,5 ml de TG1 en phase exponentielle dans un tube de 15 ml, pendant 45 minutes, à 37°C. En parallèle, les immunotubes sont remplis par 4 ml de TG1. Les deux tubes sont alors réunis puis centrifugés 10 minutes, à 4°C et 4 500 rpm. Le culot est repris dans 2 mL de 2 YT puis étalé sur boîtes 2 YTAG. 100  $\mu$ l aux dilutions  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$  sont étalés sur boîtes de Pétri et le reste sur grande boîte de "screening". Après culture durant la nuit à 37°C, les colonies des boîtes de Pétri sont comptées pour estimer la proportion de phages sélectionnés par leur affinité pour la PC. Les grandes boîtes sont raclées en présence de 2 ml de 2 YT puis les bactéries sont conservées dans 2 ml de glycérol 40%, à - 20°C. Auparavant, 10  $\mu$ l de bactéries servent à ensemencer 50 ml de 2 YTAG pour préparer de nouveaux phages selon le même protocole que précédemment. Une fois le PEG-NaCl bien éliminé, le culot est repris dans 500  $\mu$ l de PBS. Les phages sont de nouveau titrés puis conservés à 4°C.

Afin de ne pas sélectionner les phages ayant une affinité pour l'agent saturant, celui-ci est changé à chaque tour de criblage. Ainsi, lors du premier tour l'agent saturant des immunotubes est la gélatine à 0,5% ; au second tour, du lait 2% dialysé est utilisé et au troisième tour on utilise de nouveau de la gélatine.

## d) Résultats

Les bactéries sont infectées par un phage helper (M13K07), comme précisé ci-dessus, qui permet la réplication d'ADN sous forme simple-brin. La

majorité des virions produits présente alors la protéine de fusion VHH-pIII exprimée à la surface, ce qui permet la sélection des virions les plus avides vis-à-vis du polysaccharide C. A l'issue du 1<sup>er</sup> tour de criblage,  $2.10^6$  phages (output) sont susceptibles de reconnaître le polysaccharide C parmi les  $2,5.10^{11}$  initialement présents (input), ce qui correspond à la fixation d'un phage sur 105. Après le second tour de criblage, 1% des phages sélectionnés précédemment est conservé. Le 3<sup>ème</sup> tour de criblage est effectué 2 fois, et les résultats sont similaires. En effet, le rendement de fixation est à chaque fois de  $10^{-4}$ . Cette dernière baisse de rendement pourrait être due à des conditions plus drastiques (augmentation de la stringence et diminution de la concentration de GPB).

**Tableau V** : Criblage de la banque de VHH obtenue à partir de l'alpaga immunisé par *S. pneumoniae*

	Conditions	Input	output	$\rho = \text{input/output}$
Criblage 1	0,1% Tween GPB $10^{-6}$ M	$2,5.10^{11}$ $\phi$ /ml	$2.10^6$ $\phi$ /ml	$10^{-5}$
Criblage 2	0,3% Tween GPB $10^{-7}$ M	$10^{12}$ $\phi$ /ml	$3.10^{10}$ $\phi$ /ml	$10^{-2}$
Criblage 3	0,5% Tween GPB $10^{-8}$ M	$10^{11}$ $\phi$ /ml	$10^7$ $\phi$ /ml	$10^{-4}$
Criblage 3bis	0,5% Tween GPB $10^{-8}$ M	$4.10^{11}$ $\phi$ /ml	$4.10^7$ $\phi$ /ml	$10^{-4}$

**Exemple 5 : Sélection de phages-VHH spécifiques de la phosphorylcholine**

Après le 2<sup>ème</sup> et le 3<sup>ème</sup> tour de criblage, des phages pris au hasard sont testés par ELISA direct pour leur affinité pour le polysaccharide C. Au total 11 phagemides sont sélectionnés et les séquences sont données dans la figure 6. Ces anticorps sont exprimés sous forme soluble en dehors du contexte du phage.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

### REVENDICATIONS

1°) Utilisation d'anticorps à chaîne unique de camélidés, sélectionnés dans le groupe constitué par des anticorps comprenant des fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre des agents pathogènes ne sécrétant pas de toxine ou ne contenant pas la protéase NS3 de l'HCV et des anticorps comprenant des fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42, pour la détection de la présence d'un agent pathogène ne sécrétant pas de toxine ou ne contenant pas la protéase NS3 de l'HCV ou pour la détection d'une maladie comprenant des dépôts de substances amyloïdes insolubles.

2°) Banque immune d'ADNc de fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique, dirigés contre le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42, déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2937.

3°) Fragment variable d'anticorps de camélidés à chaîne unique, dirigé contre le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42, caractérisé en ce qu'il est codé par un ADNc isolé par un procédé comprenant au moins les étapes suivantes :

- la culture de la banque d'ADNc de fragments variables d'anticorps selon la revendication 2, dans des conditions permettant l'expression desdits fragments variables,

- la mise en contact desdits fragments variables avec le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42, dans des conditions permettant la liaison dudit fragment variable d'anticorps avec ledit peptide, et

- l'isolement de l'ADNc correspondant aux fragments variables d'anticorps capables de se lier audit peptide.

4°) Fragment variable d'anticorps selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il présente une séquence en acides aminés sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 3, 5, 7 et 9.

5°) Anticorps ou fragment d'anticorps, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment variable selon la revendication 3 ou la revendication 4.

6°) Molécule d'ADNc, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par le procédé tel que défini à la revendication 3.

7°) Molécule d'ADNc selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle présente une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 2, 4, 6 et 8.

8°) Vecteur recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend au moins  
5 une molécule d'ADNc selon la revendication 6 ou la revendication 7.

9°) Cellule hôte procaryote ou eucaryote, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par une molécule d'acide nucléique selon la revendication 6 ou la revendication 7 ou un vecteur recombinant selon la revendication 8.

10°) Cellule hôte procaryote selon la revendication 9, déposée à la  
10 Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2933.

11°) Cellule hôte procaryote selon la revendication 9, déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2934.

12°) Cellule hôte procaryote selon la revendication 9, déposée à la  
15 Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2935.

13°) Cellule hôte procaryote selon la revendication 9, déposée à la  
20 Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2936.

14°) Utilisation d'un fragment variable d'anticorps selon la revendication 3 ou la revendication 4 ou bien d'un anticorps ou un fragment d'anticorps selon la revendication 5 pour la préparation d'un réactif de diagnostic destiné à la détection de maladies dans lesquelles on observe un dépôt de substances amyloïdes insolubles,  
25 dans un ou plusieurs organes ou tissus et notamment de maladies neuroagrégatives.

15°) Kit de diagnostic de maladies comprenant des dépôts de substances amyloïdes insolubles, dans un ou plusieurs organes ou tissus et notamment de maladies neuroagrégatives, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment variable d'anticorps selon la revendication 3 ou la revendication 4 ou bien un anticorps  
30 ou un fragment d'anticorps selon la revendication 5.

16°) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un fragment variable d'anticorps selon la revendication 3 ou la

revendication 4 ou bien un anticorps ou un fragment d'anticorps selon la revendication 5, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

17°) Utilisation d'un fragment variable d'anticorps selon la revendication 3 ou la revendication 4 ou bien d'un anticorps ou un fragment d'anticorps selon la revendication 5 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies comprenant le dépôt, dans un ou plusieurs organes ou tissus, de substances amyloïdes.

18°) Utilisation selon la revendication 17, caractérisée en ce que lesdites maladies sont des maladies neuroagréatives, notamment la maladie d'Alzheimer.

19°) Fragment variable d'anticorps de camélidés à chaîne unique, dirigé contre des agents pathogènes ne sécrétant pas de toxines, caractérisé en ce qu'il est capable de reconnaître les agents pathogènes ou des fragments de ceux-ci à l'intérieur ou à l'extérieur de cellules eucaryotes ou de tissus ou d'organes de mammifères et en ce qu'il est codé par un ADNc isolé par un procédé comprenant au moins les étapes suivantes :

- la culture d'une banque d'ADNc de fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre des agents pathogènes, exprimant à leurs surfaces des molécules d'adhésion de la paroi bactérienne, dans des conditions permettant l'expression desdits fragments variables,

- la mise en contact desdits fragments variables d'anticorps avec au moins une molécule d'adhésion ou des agents pathogènes exprimant à leur surface des molécules d'adhésion, dans des conditions permettant la liaison desdits fragments variables d'anticorps avec au moins une desdites molécules d'adhésion, et

- l'isolement de l'ADNc correspondant aux fragments variables d'anticorps VHH-anti-molécule d'adhésion capables de se lier à la molécule d'adhésion correspondante.

20°) Fragment variable d'anticorps de camélidés à chaîne unique selon la revendication 19, caractérisé en ce que ladite molécule d'adhésion est la phosphorylcholine, en ce que ledit fragment variable d'anticorps est capable de reconnaître les agents pathogènes ou des fragments de ceux-ci à l'intérieur ou à l'extérieur de cellules eucaryotes ou de tissus ou d'organes de mammifères et en ce

qu'il est codé par un ADNc isolé par un procédé comprenant au moins les étapes suivantes :

- la culture d'une banque d'ADNc de fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre des agents pathogènes, exprimant à leurs surfaces de la phosphorylcholine (VHH-anti-phosphorylcholine), dans des conditions  
5 permettant l'expression desdits fragments variables,

- la mise en contact desdits fragments variables d'anticorps avec de la phosphorylcholine ou des agents pathogènes exprimant à leur surface de la phosphorylcholine, dans des conditions permettant la liaison desdits fragments  
10 variables d'anticorps avec la phosphorylcholine, et

- l'isolement de l'ADNc correspondant aux fragments variables d'anticorps VHH-anti-phosphorylcholine capables de se lier à la phosphorylcholine.

21°) Fragment variable d'anticorps selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il présente une séquence en acides aminés sélectionnée dans le  
15 groupe constitué par les séquences SEQ ID NO :29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 et 49.

22°) Anticorps ou fragment d'anticorps, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment variable selon l'une quelconque des revendications  
19 à 21.

23°) Molécule d'ADNc, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par le  
20 procédé tel que défini à la revendication 19 ou la revendication 20.

24°) Molécule d'ADNc selon la revendication 23, caractérisée en ce qu'elle présente une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 et 48.

25°) Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend au moins une molécule d'ADNc selon la revendication 23 ou la revendication 24.

26°) Cellule hôte eucaryote ou procaryote, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par une molécule d'acide nucléique selon la revendication 23 ou la revendication 24 ou un vecteur selon la revendication 25.

27°) Utilisation d'un fragment variable d'anticorps VHH dirigé  
30 contre toutes les molécules d'adhésion de la paroi bactérienne, pour la préparation d'un

réactif de diagnostic destiné à la détection des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment au moins une molécule d'adhésion à leur surface.

28°) Utilisation d'un fragment variable d'anticorps VHH-anti-phosphorylcholine selon la revendication 20 ou bien d'un anticorps ou d'un fragment  
5 d'anticorps dérivés, selon la revendication 22 pour la préparation d'un réactif de diagnostic destiné à la détection des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment la molécule d'adhésion phosphorylcholine à leur surface et notamment les maladies infectieuses des voies respiratoires.

29°) Kit de diagnostic des maladies infectieuses dues à des agents  
10 pathogènes qui expriment de la phosphorylcholine à leur surface, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment variable d'anticorps VHH-anti-phosphorylcholine selon la revendication 20 ou la revendication 21 ou bien un anticorps ou un fragment d'anticorps comprenant ledit fragment variable d'anticorps selon la revendication 22.

15 30°) Composition pharmaceutique comprenant des anticorps de camélidés dirigés contre des agents pathogènes ou leurs fragments, caractérisée en ce qu'ils ne secrètent pas de toxine et qu'ils ne sont pas des éléments constitutifs de la protéase NS3 de HCV.

31°) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle  
20 comprend au moins un fragment variable d'anticorps VHH dirigé contre toutes les molécules d'adhésion de la paroi bactérienne selon la revendication 19.

32°) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle  
comprend au moins un fragment variable d'anticorps VHH-anti-phosphorylcholine selon la revendication 20 ou la revendication 21 ou bien un anticorps ou un fragment  
25 d'anticorps comprenant ledit fragment variable d'anticorps selon la revendication 22, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

33°) Composition pharmaceutique selon la revendication 32, caractérisée en ce que lesdits véhicules pharmaceutiquement acceptables sont appropriés à une administration intranasale.

30 34°) Utilisation d'un fragment variable d'anticorps VHH dirigé contre toutes les molécules d'adhésion de la paroi bactérienne, pour la préparation d'un

médicament destiné au traitement des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment au moins une molécule d'adhésion à leur surface.

35°) Utilisation d'un fragment variable d'anticorps VHH-anti-phosphorylcholine selon la revendication 20 ou la revendication 21 ou bien d'un anticorps ou un fragment d'anticorps selon la revendication 22, pour la préparation d'un  
5 médicament destiné au traitement des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment de la phosphorylcholine à leur surface.

36°) Utilisation selon la revendication 35, caractérisée en ce que  
lesdites maladies sont des maladies infectieuses qui colonisent les muqueuses, et plus  
10 particulièrement des maladies infectieuses des voies respiratoires.

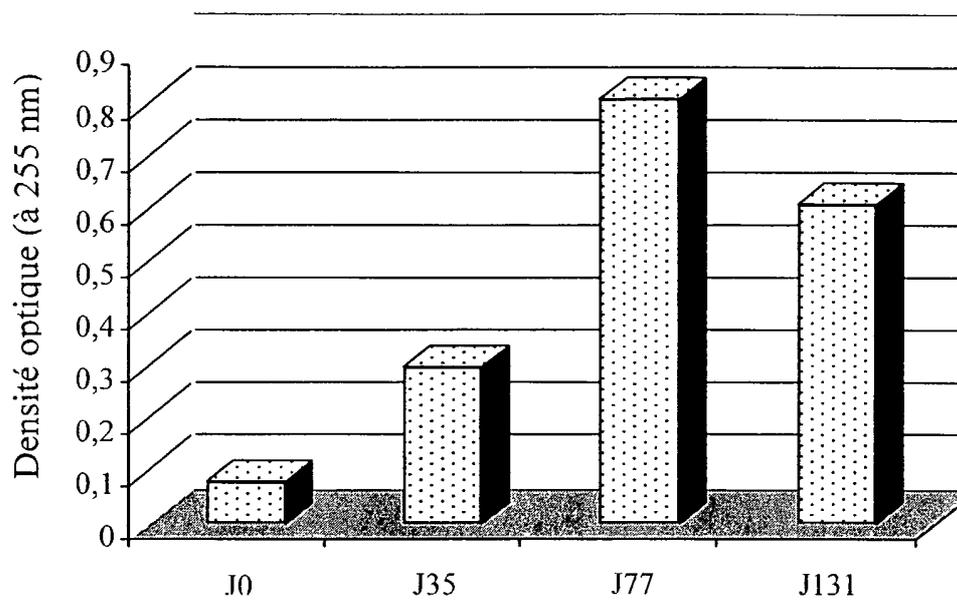


Figure 1

	CDR 1	CDR 2
VHH-03	ADVQLQASGGG L VQPGGSPGLSCAASGFTFR	YIDS <del>SGSRKLY</del> ADSAKG RFTISRDNAKNTVY <del>LQMN</del> SLKPEDTG
VHH-05	ADVQLQASGGG L VQPGESLTLSCAAYGFTLD	CICSS <del>LGR</del> TDYADSVK <del>G</del> RFTISRDNAKNTMY <del>LQMN</del> DLKPEDAA
VHH-07	GRCQLQASGGG L VQPGSLRLSCAASGFTLE	CISSTN <del>GRADY</del> VDSVK <del>G</del> RFTISRDNAKNAFY <del>LQMN</del> SLKPEDTA
VHH-25	GRGPLQASGGG L VQPGSLTLSCIASGFTLD	CTCPN <del>GESTNY</del> ADSVK <del>G</del> RFTISRDNAKNTAY <del>LQMN</del> SLKPD <del>DDTA</del>
VHH-11	VQLQASGGG L VQAGGSLNLSCAASGRSFS	AISWIG <del>GRTYY</del> AVSVK <del>G</del> RFTITRDNAKNTLN <del>LQMN</del> SLKPEDTA
VHH-33	ADVQLQASGGG L AQAGGSLRLSCAASGGTDS	AIAR-DART <del>NYAD</del> SLK <del>G</del> RFTVTRDNAKNTVY <del>LQMN</del> RMKPEDTA

CDR 3

VHH-03	VYYC	cIgG1 (SEQ ID NO: 26)
VHH-05	VYYCAA KIGGAMCVPNEYDY----	<b>cIgG3 (SEQ ID NO: 24)</b>
VHH-07	VYYCAA AMWKCQLMSSSNYTKI	cIgG2 (SEQ ID NO: 22)
VHH-25	VYYCAA VALPQCTWARMDEYDYS-	cIgG2 (SEQ ID NO: 23)
VHH-11	VYYCAA KSGDGYFSIQKYDS----	<b>cIgG3 (SEQ ID NO: 25)</b>
VHH-33	VYYCNA EALMHTQFPRHY-----	cIgG3 (SEQ ID NO: 27)

Mutations des acides aminés des FR1 et FR2 entre VH et VHH

VH	L11	V37	G44	L45	W47
VHH	S11	F37	E44	R45	G47
		Y37	Q44		R47

Figure 2

61 AEVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGS-TFRI **NRMG** WYRQAPGKQRELVA  
 L35 AEVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGS-TFSI **NVIG** WYRQAPGKQRELVA  
 L1-3 AEVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCSASASTTFSM **NTMA** WHRQAPGKQRLVA  
 V31-1 AEVQLQASGGGSVQPGGSLRLSCAASGF-IFGW **STMS** WVRQAPGKGLEWVS  
 \*\*\*\*\* \*\*.\*\*\*\*\*\*:\*\*\*. \* . :. \* \*\*\*\*\* . \*:

61 **SINSGG-STNYADSVKG** RFTISRDNAGTVNLTMNSLKPEDTAVYYC  
 L35 **GISRSG-NTNYADSVKG** RFTISRDIYAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYC  
 L1-3 **LIGATH-SINYEDSVKG** RFTISRDNAGTVNLTMNSLKPEDTAVYYC  
 V31-1 **TISGGGSATTYTDVSKG** RFTISRDRAKNTLYLQMNLSLKPEDTAIYYC  
 \*. . \* \*\*\*:\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*.\*: \* \*.\*\*\*\*\*:\*\*\*:

61 **NR---VTPWP---Y** WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 3)  
 L35 **HS---KTYLLHM-Y** WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 5)  
 L1-3 **ND---WYWQMKGGS** WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 7)  
 V31-1 **NADVSTGFRYQRKDY** WGRGTQVTVSSEPKTPKPQP (SEQ ID NO: 9)  
 \*\*:\*\*\*\*\*

**Figure 3**

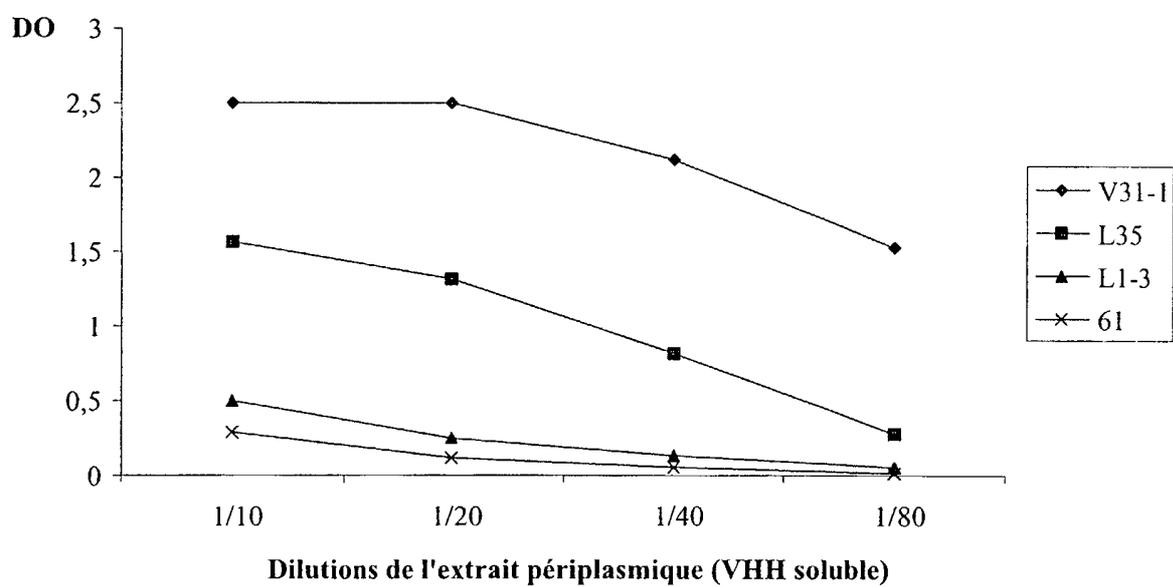


Figure 4

5/8

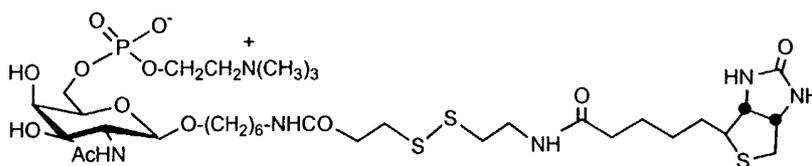


FIGURE 5

6/8

## Clone 1

GAGGTGCAGCTGcAGGCGTCTGGGGGGGGCTTGGTGGAACTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGAAAGCATCTGGGTCAATGTAATGGACTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAGCAGCGGAGTTGGTTCGAGCTATTACTCGTGGTGGTGTCAAACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACATGATGTTCTGCAAATGCACAGCCTGCTACCTGAGGACACGGCCGTCTATTATTGCCATGCGCGTACATGGaGACTATTGGGGCCAGGGGACcCaggtCACGTCTCCTCCAGCGGCCGCACATCATCACCATCACGGGGCCGCAGAACAAAA

## Clone 2

GAGGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGCAAGCATCTTCAGTATCGATGGCATGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGAAAGCAGCGGAGTTGGTTCGAGGTATTACTAGTGGTGGTAGCACAACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACATGATGTTCTGCAAATGCGCAGCCTGTACCTGAGAACACGGCCGTCTATTACTGTTCATGCGCGTACATGGAGAGACTATTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCACATCATC

## Clone 3

GAGGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGACCGGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGACGCACCTTCAGCAGCTACGCCATGGGCTGGTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGAGAGTTTGTAGCAGCTGTAGCCAGAGTGGTGTTCGTACAACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGTTCACGGTGTATCTGCAAACGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCCTTTATTACTGTGCAGCCACTACGAAACCCTTTTGGGGGTACGAATGTTTCAACCAGAGTACTGGGGCCAGGG

## Clone 4

GATGTCCAGCTGCAGGCGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGCATCTTCAGTAACCATGCCATGGGCTGGTACCGCCAGCCTCCAGGGAAGCAGCGGAGTTCGTTCGCAAATATTTTAGTGGCGGTTCGCATAAACTATGCAGACTTCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAATACGGTGTATCTGCAAATGAACAACCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATCCCTGTAATGCGTGGAGGTTAGTTATGACTATTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCACATCATC

FIGURE 6.1

7/8

## Clone 5

GATGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTC  
TCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAATCGTCTTCAGAGTCAGTACCA  
TGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAGCAGCGCGAGTTGGTCGCAACT  
ATTTCTAGTGGTGGTAGTACAACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATT  
CACCATCTACAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACA  
GCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTAATGCAAATACAGGA  
CTCCGTACCCTTTTCGTTCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTC  
AGCGGCC

## Clone 7

GAGGTgCAGCTGCAGGCGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGGCTC  
TCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGAACGCACCTTCAGTAACGCTCGCA  
TGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGACAGGAGCGTGAGTTTGTAGCGGCT  
ATTAGCTGGAGTGGTACTACCACGAACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG  
ATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAATACGGTGTATCTGCAAATGA  
ACAGCCTGAAGCCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGCGCAGCAGATGGT  
TCCTGGCGGGGAGTCTGCAACAATGTGTATGACTACTGGGGCCAGGGGAC  
CCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCACATCATCACCATCACGG

## Clone 8

GAGGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGAGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGGCTC  
TCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAGGCACCTTGAGTAGCTATGTCA  
TGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAGATTGTAGCAGCT  
ATTAGTCTAGTGGTAGCGCATGGTATGCAGACTCCGTGCAGGGCCGATT  
CACCATCTCCAGAGACGGCGCCAGGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACA  
GCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTACTACTGTGCAGCAAAGAAAGGA  
ATTACGGTCTTTACTCGTGACTCGTCGTATGACTACTGGGGCCAGGGGAC  
CCAGGTCACCGTCTCCT

## Clone 9

CGTGTCCAGCTGCAGGCGTCTGGAGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGGCTC  
ACTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACGCTCAGTAGTTATGCCA  
TGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGATCGTGAGTTTGTAGCAGCT  
ATTAGCTGGAGTGGTACTAGGACATCGTATGCGGACTCCGTGAAGGGCCG  
ATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTATATCTGCAAATGA  
ACAGCCTGAAACCCGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGATGCGTTCA  
ATGCGTTCCAACCTCTATACCGTCTATGAGGCCCGCATGACTATGACTA  
CTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGC

FIGURE 6.2

8 / 8

## Clone 10

GAGGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGGCTC  
TCTGAGACTCGCCTGTGCGGCCTCTGGACGCACCTTCAGGAGCTATGCCA  
TGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGAGCGCGAGGGGTCTCATGT  
ATTAGTAGTAATGATGGTAGCACATATTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG  
ATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCGAAAACACGATGTATCTGCAAATGA  
ACGGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCTTCAGCAAAA  
TGGTATAGTGGACGTTTCTACCGGAGTGCCGCGGATGATTGTGCCCTTA  
CGAGTAT

## Clone 11

TGTGAGCTGCAGGCGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCT  
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGCATCTTCAGTAACCATGCCATGG  
GCTGGTACCGCCAGCCTCCAGGGAAGCAGCGCGAGTTCGTGCGAAATATT  
TTTAGTGGCGTTCGCATAAACTATGCAGACTTCGTGAAGGGCCGATTAC  
CATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAAAC  
TGAAACCTGAGGACACGGCCGTTCTATCTCTGTAATGCGTGGAGGTTAGGT  
TATGACTACTGGGGCCAGGGGAccCaggtcACCGTCTCCTCAGCGCCCGC  
ACAT

## Clone 12

GAGGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGGGGAGGATTGCTGCAGGCTGGGGACTC  
TCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTCAGTACATATAACA  
TGGCGTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAGCTTGTAGCAGCT  
ATCACTTGGAGTGGAGGTACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATT  
CACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTATCTCTGCAAATGGACA  
GCCTGAAACCCGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTACACGATCGGGCGT  
GCTAGTTACTTCCGGGACCCCACTGACTTTCGTTCCCTGGGGCCAGGGGAC  
CCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCC

FIGURE 6.3

0226-105-SEQ.ST25  
SEQUENCE LISTING

- <110> INSTITUT PASTEUR  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
ROUGEON, Francois  
LAFAYE, Pierre
- <120> Fragments variables d'anticorps de camélidés  
à chaîne unique et leurs applications pour le  
diagnostic et le traitement de pathologies diverses
- <130> S226EXT105
- <160> 51
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1  
<211> 42  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence
- <220>  
<223> Description de la séquence artificielle: Peptide synthétique
- <400> 1  
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
1 5 10 15  
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
20 25 30  
Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala  
35 40
- <210> 2  
<211> 399  
<212> DNA  
<213> Camelidae

0226-105-SEQ.ST25

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(399)

<223>

<400> 2

gcc	gag	gtg	cag	ctg	cag	gcg	tct	gga	gga	ggc	ttg	gtg	cag	gct	ggg	48
Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	
1			5					10					15			
ggg	tct	ctg	aga	ctc	tcc	tgc	gca	gcc	tct	gga	agc	acc	ttc	agg	atc	96
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Thr	Phe	Arg	Ile	
			20				25						30			
aat	cgc	atg	ggc	tgg	tac	cgc	cag	gct	cca	ggg	aag	cag	cgc	gag	ttg	144
Asn	Arg	Met	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Leu	
		35					40					45				
gtc	gct	agt	att	aat	agt	ggc	ggt	agt	aca	aac	tat	gca	gac	tcc	gtg	192
Val	Ala	Ser	Ile	Asn	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50					55					60					
aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aac	gcc	aag	ggc	aca	gtg	aat	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Gly	Thr	Val	Asn	
65					70					75					80	
ctg	aca	atg	aac	agc	ctg	aaa	cct	gag	gac	acg	gcc	gtc	tat	tac	tgt	288
Leu	Thr	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85				90						95		
aat	cga	gta	acc	ccc	tgg	cct	tac	tgg	ggc	cag	ggg	acc	cag	gtc	acc	336
Asn	Arg	Val	Thr	Pro	Trp	Pro	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	
			100					105					110			
gtc	tcc	tca	gcg	gcc	gca	gaa	caa	aaa	ctc	atc	tca	gaa	gag	gat	ctg	384
Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	
		115				120						125				
aat	ggg	gcc	gca	tag												399
Asn	Gly	Ala	Ala													
	130															

<210> 3

<211> 132

<212> PRT

<213> Camelidae

<400> 3

Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly
1			5					10					15		
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Thr	Phe	Arg	Ile
			20					25					30		

0226-105-SEQ.ST25

Asn Arg Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu  
 35 40 45

Val Ala Ser Ile Asn Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Gly Thr Val Asn  
 65 70 75 80

Leu Thr Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Asn Arg Val Thr Pro Trp Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu  
 115 120 125

Asn Gly Ala Ala  
 130

<210> 4

<211> 405

<212> DNA

<213> camelidae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(405)

<223>

<400> 4

gcc gag gtg cag ctg cag gcg tct ggg gga ggc ttg gtg cag gct ggg 48  
 Ala Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly  
 1 5 10 15

ggg tct ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga agc acc ttc agt atc 96  
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Ser Ile  
 20 25 30

aat gtc ata gga tgg tac cgc cag gct cca ggg aag cag cgc gag ttg 144  
 Asn Val Ile Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu  
 35 40 45

gtc gca ggt att agt cgt agt ggt aac aca aat tat gca gac tcc gta 192  
 Val Ala Gly Ile Ser Arg Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

gag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac tac gcc aag aac aca gtg tat 240

0226-105-SEQ.ST25

Glu	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Tyr	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	
65					70					75					80	
ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aaa	cct	gag	gac	acg	gcc	gtc	tat	tat	tgt	288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
cat	tcc	aag	acc	tat	ctt	cta	cat	atg	tac	tgg	ggc	cag	ggg	acc	cag	336
His	Ser	Lys	Thr	Tyr	Leu	Leu	His	Met	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	
			100					105					110			
gtc	acc	gtc	tcc	tca	gcg	gcc	gca	gaa	caa	aaa	ctc	atc	tca	gaa	gag	384
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	
			115				120					125				
gat	ctg	aat	ggg	gcc	gca	tag										405
Asp	Leu	Asn	Gly	Ala	Ala											
			130													

- <210> 5
- <211> 134
- <212> PRT
- <213> camelidae

<400> 5

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

0226-105-SEQ.ST25

<210> 6

<211> 411

<212> DNA

<213> camelidae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<223>

<400> 6

gcc gag gtc cag ctg cag gcg tct gga gga ggc ttg gtg cag gct ggg	48
Ala Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly	
1 5 10 15	
ggg tct ctg aga ctc tcc tgt tca gcc tct gca agc acc acc ttc agt	96
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Thr Thr Phe Ser	
20 25 30	
atg aat acc atg gcc tgg cac cgc cag gct cca ggg aag cag cgc agc	144
Met Asn Thr Met Ala Trp His Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Ser	
35 40 45	
ttg gtc gcc ctt att gga gca act cat agt att aac tat gaa gac tcc	192
Leu Val Ala Leu Ile Gly Ala Thr His Ser Ile Asn Tyr Glu Asp Ser	
50 55 60	
gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac act gtg	240
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val	
65 70 75 80	
tat tta caa atg agc agc ctg aaa cct gag gac acg gcc gtc tat tac	288
Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr	
85 90 95	
tgt aat gac tgg tat tgg caa atg aaa ggg ggt tcc tgg ggc cag ggg	336
Cys Asn Asp Trp Tyr Trp Gln Met Lys Gly Gly Ser Trp Gly Gln Gly	
100 105 110	
acc cag gtc acc gtc tcc tca gcg gcc gca gaa caa aaa ctc atc tca	384
Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser	
115 120 125	
gaa gag gat ctg aat ggg gcc gca tag	411
Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala	
130 135	

<210> 7

<211> 136

<212> PRT

<213> camelidae

0226-105-SEQ.ST25

<400> 7

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

<210> 8

<211> 450

<212> DNA

<213> camelidae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(450)

<223>

<400> 8

gcc gag gtg cag ctg cag gcg tct ggg gga ggc tcg gtg cag cct ggg 48  
 Ala Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly  
 1 5 10 15  
 ggg tct ctg aga ctc tcc tgc gca gcc tct gga ttc atc ttc ggt tgg 96  
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Gly Trp  
 20 25 30  
 tct act atg agc tgg gtc cgc cag gct cca gga aag ggg tta gag tgg 144

0226-105-SEQ.ST25

Ser Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

gtc tca act att tct gga gga ggt agt gcc aca acc tat aca gac tcc 192  
 Val Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Ala Thr Thr Tyr Thr Asp Ser  
 50 55 60

gtg aag ggc cga ttc acc att tcc aga gac agg gcc aag aac acg ttg 240  
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Arg Ala Lys Asn Thr Leu  
 65 70 75 80

tat ctg caa atg aac agc ctg aaa cct gag gac acg gcc atc tat tac 288  
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr  
 85 90 95

tgt aat gca gat gtg agt acg ggt ttc cgg tat cag cgt aaa gac tac 336  
 Cys Asn Ala Asp Val Ser Thr Gly Phe Arg Tyr Gln Arg Lys Asp Tyr  
 100 105 110

tgg ggc cgg ggg acc cag gtc acc gtc tcc tca gaa ccc aag aca cca 384  
 Trp Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Thr Pro  
 115 120 125

aaa cca caa cca gcg gcc gca gaa caa aaa ctc atc tca gaa gag gat 432  
 Lys Pro Gln Pro Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp  
 130 135 140

ctg aat ggg gcc gca tag 450  
 Leu Asn Gly Ala Ala  
 145

<210> 9

<211> 149

<212> PRT

<213> camelidae

<400> 9

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Gly Trp  
 20 25 30

Ser Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Val Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Ala Thr Thr Tyr Thr Asp Ser  
 50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Arg Ala Lys Asn Thr Leu  
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr  
 85 90 95

0226-105-SEQ.ST25

Cys Asn Ala Asp Val Ser Thr Gly Phe Arg Tyr Gln Arg Lys Asp Tyr  
 100 105 110

Trp Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Thr Pro  
 115 120 125

Lys Pro Gln Pro Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp  
 130 135 140

Leu Asn Gly Ala Ala  
 145

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 10 gatgtgcagc tgcaggcgtc tggrggagg 29

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 11 cgccatcaag gtaccagttg a 21

<210> 12

<211> 45

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 12 catgccatga ctcgcgcccc agccggccat ggccgagkts cagct 45

## 0226-105-SEQ.ST25

<210> 13  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
  
 <220>  
 <223> Description de la séquence artificielle: amorce  
 <400> 13  
 ggactagttg cggccgctga ggagacggtg acctg 35  
  
 <210> 14  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
  
 <220>  
 <223> Description de la séquence artificielle: amorce  
 <400> 14  
 ggactagttg cggccgctgg ttgtggtttt ggtgtcttgg g 41  
  
 <210> 15  
 <211> 384  
 <212> DNA  
 <213> camelidae  
  
 <400> 15  
 atgggccgat gtcagctgca ggcgtctgga ggaggcttgg tgcagccggg ggggtctctg 60  
 agactctcct gtgcagcctc tggattcact ttggagtatt atgccttagc ctggttccgc 120  
 caggccccag ggaaggagcg tgtggggatt tcttgatta gtagtactaa tggtcgcgca 180  
 gactatgtag actccgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaacgc caagaacgcg 240  
 ttctatctgc aatgaacag cctgaaacct gaggacacag ccgtttacta ctgtgcagca 300  
 gcaatgtgga aatgccaatt aatgatgtcc tcttctaatt ataccaaaat ttggggccag 360  
 ggcacccagg tcaccgtctc ctca 384  
  
 <210> 16  
 <211> 381

0226-105-SEQ.ST25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

<400> 16  
 camdaggccg aggtccgctg caggcgtctg ggggaggctt ggtgcagcct ggggggtctc 60  
 tgacactctc ctgtatagcc tctggattca ctttggatta ttatagtgtg ggctggttcc 120  
 gccaggcccc agggaagaag cgtgagaggg tctcatgtac tgggccgaat ggtgaaagca 180  
 caaactatgc agactccgtg aagggccgat tcaccatctc cagagacaac gccaagaaca 240  
 cggcgtatct gcaaatgaac agcctgaaac ctgacgacac tgccgtttat tactgtgcag 300  
 cagtcgcact cccacaatgt acctgggccc gtatggatga atatgactac tcaggccagg 360  
 ggaccagggt cacggtctcc t 381

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 396

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

<400> 17  
 atggccgatg tgcagctgca ggcgtctggg ggaggcttag tgcagcctgg ggagtctctg 60  
 acgctctcct gtgcagccta tggattcaca ttggattatt gtgcggtagg ctggttccgc 120  
 caggccccag ggaaggagcg cgagggagtc gcatgtattg gcagtagttt aggtcgcaca 180  
 gattatgcag actccgtgaa gggccgattc accatctccc gagacaacgc caagaacacg 240  
 atgtatctgc aatgaacga cctgaaacct gaggacgcag ccgtttatta ctgtgcagcg 300  
 aagatagggg gggcaatgtg tgtcccaaact gagtatgact actggggcca ggggaccag 360  
 gtcaccgtct cctcgaacc caagacacca aagcca 396

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 396

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

<400> 18  
 gtgcagctgc aggcgtctgg gggaggattg gtgcaggctg ggggctcttt gaatctctcc 60  
 tgtgcagcct ctggacgcag cttcagtggc tatgccctgg gctggttccg ccaggctccg 120  
 ggggaaggagc gtgaatttgt aggagctatt agctggattg gtggaaggac atactatgca 180  
 gtgtccgtga agggccgatt caccatcacc agagacaacg ccaagaacac acttaatctg 240  
 caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcggc caaaggttct 300

## 0226-105-SEQ.ST25

gatggtgatt acttcagcat ccagaaatat gacagctggg gccaggggaac ccaggtcacc 360  
gtctcctcag aaccaagac accaaaacca caacca 396

<210> 19

<211> 413

<212> DNA

<213> camelidae

<400> 19  
atggccgatg tgcagctgca ggcgtctggg ggaggattgg tgcaggctgg gggctctttg 60  
aatctctcct gtgcagcctc tggacgcagc ttcagtggct atgccctggg ctggttccgc 120  
caggctccgg ggaaggagcg tgaatttcta ggagctatta gctggattgg tgaaggaca 180  
tactatgcag tgtccgtgaa gggccgattc accatcacca gagacaacgc caagaacaca 240  
cttaatctgc aaatgaacag cctgaaacct gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgcggcc 300  
aaaggttctg atggtgatta cttcagcatc cagaaatatg acagctgggg ccaggggaacc 360  
caggtcaccg tctcctcaga acccaagaca ccaaaaccac aaccagcggc cgc 413

<210> 20

<211> 263

<212> DNA

<213> camelidae

<400> 20  
atggccgatg tgcagctgca ggcgtctggg ggaggcttgg tgcagcctgg gggttctccg 60  
ggactctcct gtgcagcctc cggattcacc tttaggacgt ctgacatgag ttgggtccgc 120  
caggctccag ggaaggggct cgaatgggtc tcatatattg atagtggtag tgaaggaaa 180  
ctgtatgcgg actccgcgaa gggccgattc accatctcca gagacaacgc caagaacacg 240  
gtgtatctgc aaatgaacag cct 263

<210> 21

<211> 294

<212> DNA

<213> camelidae

<400> 21  
atggccgatg tgcagctgca ggcgtctggg ggaggcttgg tgcagcctgg gggttctccg 60  
ggactctcct gtgcagcctc cggattcacc tttaggacgt ctgacatgag ttgggtccgc 120

0226-105-SEQ.ST25

caggctccag ggaaggggct cgaatgggtc tcatatattg atagtggtag tggaagaaa 180  
 ctgtatgcgg actccgcgaa gggccgattc accatctcca gagacaacgc caagaacacg 240  
 gtgtatctgc aaatgaacag cctgaaaccc gaggacacag gcgtttatta ctgt 294

<210> 22  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> camelidae

<400> 22

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

<210> 23  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> camelidae

<400> 23

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

0226-105-SEQ.ST25

Gly Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ile Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Tyr  
 20 25 30

Tyr Ser Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Glu Arg  
 35 40 45

Val Ser Cys Thr Gly Pro Asn Gly Glu Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser  
 50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ala  
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Ala Val Ala Leu Pro Gln Cys Thr Trp Ala Arg Met Asp Glu  
 100 105 110

Tyr Asp Tyr Ser Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser  
 115 120 125

<210> 24

<211> 131

<212> PRT

<213> camelidae

<400> 24

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

Glu Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Tyr Gly Phe Thr Leu Asp Tyr  
 20 25 30

Cys Ala Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly  
 35 40 45

Val Ala Cys Ile Gly Ser Ser Leu Gly Arg Thr Asp Tyr Ala Asp Ser  
 50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met  
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Ala Lys Ile Gly Gly Ala Met Cys Val Pro Asn Glu Tyr Asp  
 100 105 110

0226-105-SEQ.ST25

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Thr  
 115 120 125

Pro Lys Pro  
 130

<210> 25

<211> 132

<212> PRT

<213> . camelidae

<400> 25

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

Leu Asn Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Phe Ser Gly Tyr Ala  
 20 25 30

Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Gly  
 35 40 45

Ala Ile Ser Trp Ile Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Val Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Thr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Asn Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Ala Lys Gly Ser Asp Gly Asp Tyr Phe Ser Ile Gln Lys Tyr Asp Ser  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Thr Pro  
 115 120 125

Lys Pro Gln Pro  
 130

<210> 26

<211> 97

<212> PRT

<213> camelidae

<400> 26

0226-105-SEQ.ST25

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

Gly Ser Pro Gly Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Thr  
20 25 30

Ser Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Val Ser Tyr Ile Asp Ser Gly Ser Gly Arg Lys Leu Tyr Ala Asp Ser  
50 55 60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val  
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr  
85 90 95

Cys

<210> 27

<211> 130

<212> PRT

<213> camelidae

<400> 27

Ala Asp Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln Ala Gly  
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Thr Asp Ser Ile  
20 25 30

Asn Val Met Ala Trp Tyr Arg Pro Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu  
35 40 45

Val Ala Ala Ile Ala Arg Asp Ala Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Leu  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Thr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Arg Met Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Asn Ala Glu Ala Leu Met His Thr Gln Phe Pro Arg His Tyr Trp Gly  
100 105 110

0226-105-SEQ.ST25

Pro Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Thr Pro Lys Pro  
 115 120 125

Gln Pro  
 130

<210> 28

<211> 381

<212> DNA

<213> camelidae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(381)

<223>

<400> 28

gag gtg cag ctg cag gcg tct ggg ggg ggc ttg gtg gaa cct ggg ggg 48  
 Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Glu Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

tct ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gaa agc atc tgg gtc aat gta 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Ser Ile Trp Val Asn Val  
 20 25 30

atg gac tgg tac cgc cag gct cca ggg aag cag cgc gag ttg gtc gca 144  
 Met Asp Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala  
 35 40 45

gct att act cgt ggt ggt gtc aca aac tat gca gac tcc gtg aag ggc 192  
 Ala Ile Thr Arg Gly Gly Val Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly  
 50 55 60

cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac atg atg ttc ctg caa 240  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Met Phe Leu Gln  
 65 70 75 80

atg cac agc ctg cta cct gag gac acg gcc gtc tat tat tgc cat gcg 288  
 Met His Ser Leu Leu Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His Ala  
 85 90 95

cgt aca tgg aga gac tat tgg ggc cag ggg acc cag gtc acg tct cct 336  
 Arg Thr Trp Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Ser Pro  
 100 105 110

cca gcg gcc gca cat cat cat cac cat cac ggg gcc gca gaa caa 381  
 Pro Ala Ala Ala His His His His His His Gly Ala Ala Glu Gln  
 115 120 125

<210> 29

<211> 127

<212> PRT

0226-105-SEQ.ST25

<213> camelidae

<400> 29

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

<210> 30

<211> 357

<212> DNA

<213> camelidae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<223>

<400> 30

gag gtg cag ctg cag gcg tct ggg gga ggc ttg gtg cag cct ggg ggg 48  
 Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 tct ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gca agc atc ttc agt atc gat 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Ser Ile Phe Ser Ile Asp  
 20 25 30  
 ggc atg ggc tgg tac cgc cag gct cca gga aag cag cgc gag ttg gtc 144

0226-105-SEQ.ST25

Gly Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
 35 40 45

gca ggt att act agt ggt ggt agc aca aac tat gca gac tcc gtg aag 192  
 Ala Gly Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac atg atg ttc ctg 240  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Met Phe Leu  
 65 70 75 80

caa atg cgc agc ctg cta cct gag aac acg gcc gtc tat tac tgt cat 288  
 Gln Met Arg Ser Leu Leu Pro Glu Asn Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His  
 85 90 95

gcg cgt aca tgg aga gac tat tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc gtc 336  
 Ala Arg Thr Trp Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val  
 100 105 110

tcc tca gcg gcc gca cat cat 357  
 Ser Ser Ala Ala Ala His His  
 115

<210> 31  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> camelidae

<400> 31

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Ser Ile Phe Ser Ile Asp  
 20 25 30

Gly Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
 35 40 45

Ala Gly Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Met Phe Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Arg Ser Leu Leu Pro Glu Asn Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His  
 85 90 95

Ala Arg Thr Trp Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val  
 100 105 110

Ser Ser Ala Ala Ala His His  
 115

0226-105-SEQ.ST25

<210> 32

<211> 348

<212> DNA

<213> camelidae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(348)

<223>

<400> 32

gag gtg cag ctg cag gcg tct ggg gga gga ttg gtg cag acc ggg ggc 48  
 Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Gly  
 1 5 10 15

tct ctg aga ctc tcc tgt gta gcc tct gga cgc acc ttc agc agc tac 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

gcc atg ggc tgg ttc cgc cag gct cca ggg aag gag cga gag ttt gta 144  
 Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val  
 35 40 45

gca gct gtt agc cag agt ggt gtt cgt aca aac tat gca gac tcc gtg 192  
 Ala Ala Val Ser Gln Ser Gly Val Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag ttc acg gtg tat 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Phe Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

ctg caa acg aac agc ctg aaa cct gag gac acg gcc ctt tat tac tgt 288  
 Leu Gln Thr Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

gca gcc act acg aaa ccc ttt ttg ggg gta cga atg ttt caa cca gag 336  
 Ala Ala Thr Thr Lys Pro Phe Leu Gly Val Arg Met Phe Gln Pro Glu  
 100 105 110

tac tgg ggc cag 348  
 Tyr Trp Gly Gln  
 115

<210> 33

<211> 116

<212> PRT

<213> camelidae

<400> 33

Glu val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu val Gln Thr Gly Gly  
 1 5 10 15

0226-105-SEQ.ST25

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val  
 35 40 45  
 Ala Ala Val Ser Gln Ser Gly Val Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Phe Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Thr Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ala Thr Thr Lys Pro Phe Leu Gly Val Arg Met Phe Gln Pro Glu  
 100 105 110  
 Tyr Trp Gly Gln  
 115

- <210> 34
- <211> 360
- <212> DNA
- <213> camelidae
  
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(360)
- <223>

<400> 34  
 gat gtc cag ctg cag gcg tct gga gga ggc ttg gtg cag cct ggg ggg 48  
 Asp Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 tct ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga agc atc ttc agt aac cat 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Asn His  
 20 25 30  
 gcc atg ggc tgg tac cgc cag cct cca ggg aag cag cgc gag ttc gtc 144  
 Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Phe Val  
 35 40 45  
 gca aat att ttt agt ggc ggt cgc ata aac tat gca gac ttc gtg aag 192  
 Ala Asn Ile Phe Ser Gly Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Phe Val Lys  
 50 55 60  
 ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aat acg gtg tat ctg 240

0226-105-SEQ.ST25

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 caa atg aac aaa ctg aaa cct gag gac acg gcc gtc tat ccc tgt aat 288  
 Gln Met Asn Lys Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Pro Cys Asn  
 85 90 95  
 gcg tgg agg tta ggt tat gac tat tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc 336  
 Ala Trp Arg Leu Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 gtc tcc tca gcg gcc gca cat cat 360  
 Val Ser Ser Ala Ala Ala His His  
 115 120

<210> 35  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> camelidae

<400> 35  
 Asp Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Asn His  
 20 25 30  
 Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Phe Val  
 35 40 45  
 Ala Asn Ile Phe Ser Gly Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Phe Val Lys  
 50 55 60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Met Asn Lys Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Pro Cys Asn  
 85 90 95  
 Ala Trp Arg Leu Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser Ala Ala Ala His His  
 115 120

<210> 36  
 <211> 357  
 <212> DNA  
 <213> camelidae

0226-105-SEQ.ST25

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<223>

<400> 36  
gat gtg cag ctg cag gcg tct ggg gga ggc ttg gtg cag cct ggg ggg 48  
Asp Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
tct ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga atc gtc ttc aga gtc agt 96  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Val Phe Arg Val Ser  
20 25 30  
acc atg ggc tgg tac cgc cag gct cca ggg aag cag cgc gag ttg gtc 144  
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
35 40 45  
gca act att tct agt ggt ggt agt aca aac tat gca gac tcc gtg aag 192  
Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60  
ggc cga ttc acc atc tac aga gac aac gcc aag aac acg gtg tat ctg 240  
Gly Arg Phe Thr Ile Tyr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80  
caa atg aac agc ctg aaa cct gag gac acg gcc gtc tat tac tgt aat 288  
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
85 90 95  
gca aat aca gga ctc cgt acc ctt tcg ttc tgg ggc cag ggg acc cag 336  
Ala Asn Thr Gly Leu Arg Thr Leu Ser Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln  
100 105 110  
gtc acc gtc tcc tca gcg gcc 357  
Val Thr Val Ser Ser Ala Ala  
115

<210> 37

<211> 119

<212> PRT

<213> camelidae

<400> 37  
Asp Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Val Phe Arg Val Ser  
20 25 30  
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
35 40 45

0226-105-SEQ.ST25

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Tyr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
 85 90 95  
 Ala Asn Thr Gly Leu Arg Thr Leu Ser Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ala  
 115

<210> 38  
 <211> 396  
 <212> DNA  
 <213> camelidae

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(396)  
 <223>

<400> 38 48  
 gag gtg cag ctg cag gcg tct ggg gga gga ttg gtg cag gct ggg ggc  
 Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15  
 tct ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gaa cgc acc ttc agt aac gct 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Thr Phe Ser Asn Ala  
 20 25 30  
 cgc atg gcc tgg ttc cgc cag gct cca gga cag gag cgt gag ttt gta 144  
 Arg Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Gln Glu Arg Glu Phe Val  
 35 40 45  
 gcg gct att agc tgg agt ggt act acc acg aac tat gca gac tcc gtg 192  
 Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Thr Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aat acg gtg tat 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 ctg caa atg aac agc ctg aag cct gag gac acg gcc gtt tat tac tgc 288  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 gca gca gat ggt tcc tgg cgg gga gtc tgc aac aat gtg tat gac tac 336

0226-105-SEQ.ST25  
 Ala Ala Asp Gly Ser Trp Arg Gly Val Cys Asn Asn Val Tyr Asp Tyr  
 100 105 110  
 tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc gtc tcc tca gcg gcc gca cat cat 384  
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala His His  
 115 120 125  
 cat cac cat cac 396  
 His His His His  
 130

<210> 39  
 <211> 132  
 <212> PRT  
 <213> camelidae

<400> 39  
 Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Thr Phe Ser Asn Ala  
 20 25 30  
 Arg Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Gln Glu Arg Glu Phe Val  
 35 40 45  
 Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Thr Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ala Asp Gly Ser Trp Arg Gly Val Cys Asn Asn Val Tyr Asp Tyr  
 100 105 110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala His His  
 115 120 125  
 His His His His  
 130

<210> 40  
 <211> 366  
 <212> DNA  
 <213> camelidae

0226-105-SEQ.ST25

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(366)

<223>

<400> 40

gag gtg cag ctg cag gcg tct gga gga gga ttg gtg cag gct ggg ggc 48  
 Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

tct ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ggc acc ttg agt agc tat 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Thr Leu Ser Ser Tyr  
 20 25 30

gtc atg ggc tgg ttc cgc cag gct cca ggg aag gag cgt gag att gta 144  
 Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ile Val  
 35 40 45

gca gct att agg tct agt ggt agc gca tgg tat gca gac tcc gtg cag 192  
 Ala Ala Ile Arg Ser Ser Gly Ser Ala Trp Tyr Ala Asp Ser Val Gln  
 50 55 60

ggc cga ttc acc atc tcc aga gac ggc gcc agg aac acg gtg tat ctg 240  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Ala Arg Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80

caa atg aac agc ctg aaa cct gag gac acg gcc gtt tac tac tgt gca 288  
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

gca aag aaa gga att acg gtc ttt act cgt gac tcg tcg tat gac tac 336  
 Ala Lys Lys Gly Ile Thr Val Phe Thr Arg Asp Ser Ser Tyr Asp Tyr  
 100 105 110

tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc gtc tcc 366  
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser  
 115 120

<210> 41

<211> 122

<212> PRT

<213> camelidae

<400> 41

Glu val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Thr Leu Ser Ser Tyr  
 20 25 30

val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ile val  
 35 40 45

0226-105-SEQ.ST25

Ala Ala Ile Arg Ser Ser Gly Ser Ala Trp Tyr Ala Asp Ser Val Gln  
 50 55 60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Ala Arg Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Ala Lys Lys Gly Ile Thr Val Phe Thr Arg Asp Ser Ser Tyr Asp Tyr  
 100 105 110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser  
 115 120

- <210> 42
- <211> 384
- <212> DNA
- <213> camelidae
  
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(384)
- <223>

<400> 42  
 cgt gtc cag ctg cag gcg tct gga gga gga ttg gtg cag gct ggg ggc 48  
 Arg Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10  
 tca ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga cgc acg ctc agt agt tat 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Leu Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 gcc atg ggc tgg ttc cgc cag gct cca ggg aag gat cgt gag ttt gta 144  
 Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val  
 35 40 45  
 gca gct att agc tgg agt ggt act agg aca tcg tat gcg gac tcc gtg 192  
 Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Thr Arg Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac acg gta tat 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 ctg caa atg aac agc ctg aaa ccc gag gac acg gcc gtt tat tac tgt 288  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90  
 gcg atg cgt tca atg cgt tcc aac ctc tat acc gtc tat gag gcc ccg 336

0226-105-SEQ.ST25

Ala Met Arg Ser Met Arg Ser Asn Leu Tyr Thr Val Tyr Glu Ala Pro  
 100 105 110

cat gac tat gac tac tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc gtc tcc tca 384  
 His Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 43

<211> 128

<212> PRT

<213> camelidae

<400> 43

Arg Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Leu Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val  
 35 40 45

Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Thr Arg Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Met Arg Ser Met Arg Ser Asn Leu Tyr Thr Val Tyr Glu Ala Pro  
 100 105 110

His Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 44

<211> 357

<212> DNA

<213> camelidae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

0226-105-SEQ.ST25

<223>

<400> 44

gag	gtg	cag	ctg	cag	gcg	tct	ggg	gga	gga	ttg	gtg	cag	gct	ggg	ggc	48
Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Gly	
1				5				10						15		
tct	ctg	aga	ctc	gcc	tgt	gcg	gcc	tct	gga	cgc	acc	ttc	agg	agc	tat	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ala	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Arg	Thr	Phe	Arg	Ser	Tyr	
			20					25					30			
gcc	atg	ggc	tgg	ttc	gcg	cag	gct	cca	gga	aag	gag	cgc	gag	ggg	gtc	144
Ala	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Gly	Val	
		35					40					45				
tca	tgt	att	agt	agt	aat	gat	ggg	agc	aca	tat	tat	gca	gac	tcc	gtg	192
Ser	Cys	Ile	Ser	Ser	Asn	Asp	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50					55					60					
aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aat	gcc	gaa	aac	acg	atg	tat	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Glu	Asn	Thr	Met	Tyr	
65				70					75					80		
ctg	caa	atg	aac	ggc	ctg	aaa	cct	gag	gac	acg	gcc	ggt	tat	tac	tgt	288
Leu	Gln	Met	Asn	Gly	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85				90						95		
gct	tca	gca	aaa	tgg	tat	agt	gga	cgt	ttc	tac	cgg	agt	gcc	gcg	gat	336
Ala	Ser	Ala	Lys	Trp	Tyr	Ser	Gly	Arg	Phe	Tyr	Arg	Ser	Ala	Ala	Asp	
			100					105					110			
gat	tgt	gcc	cct	tac	gag	tat										357
Asp	Cys	Ala	Pro	Tyr	Glu	Tyr										
		115														

<210> 45

<211> 119

<212> PRT

<213> camelidae

<400> 45

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

0226-105-SEQ.ST25

Leu Gln Met Asn Gly Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Ser Ala Lys Trp Tyr Ser Gly Arg Phe Tyr Arg Ser Ala Ala Asp  
 100 105 110

Asp Cys Ala Pro Tyr Glu Tyr  
 115

<210> 46

<211> 354

<212> DNA

<213> camelidae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

<223>

<400> 46

tgt gag ctg cag gcg tct ggg gga ggc ttg gtg cag cct ggg ggg tct 48  
 Cys Glu Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser  
 1 5 10 15

ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga agc atc ttc agt aac cat gcc 96  
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Asn His Ala  
 20 25 30

atg ggc tgg tac cgc cag cct cca ggg aag cag cgc gag ttc gtc gca 144  
 Met Gly Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Phe Val Ala  
 35 40 45

aat att ttt agt ggc ggt cgc ata aac tat gca gac ttc gtg aag ggc 192  
 Asn Ile Phe Ser Gly Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly  
 50 55 60

cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac acg gtg tat ctg caa 240  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
 65 70 75 80

atg aac aaa ctg aaa cct gag gac acg gcc gtc tat ctc tgt aat gcg 288  
 Met Asn Lys Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys Asn Ala  
 85 90 95

tgg agg tta ggt tat gac tac tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc gtc 336  
 Trp Arg Leu Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val  
 100 105 110

tcc tca gcg gcc gca cat 354  
 Ser Ser Ala Ala His  
 115

0226-105-SEQ.ST25

<210> 47

<211> 118

<212> PRT

<213> camelidae

<400> 47

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

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Asn His Ala  
 20 25 30

Met Gly Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Phe Val Ala  
 35 40 45

Asn Ile Phe Ser Gly Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly  
 50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
 65 70 75 80

Met Asn Lys Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys Asn Ala  
 85 90 95

Trp Arg Leu Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val  
 100 105 110

Ser Ser Ala Ala Ala His  
 115

<210> 48

<211> 375

<212> DNA

<213> camelidae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(375)

<223>

<400> 48

gag gtg cag ctg cag gcg tct ggg gga gga ttg ctg cag gct ggg gac  
 Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Leu Gln Ala Gly Asp  
 1 5 10 15

48

0226-105-SEQ.ST25

tct ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga cgc acc ttc agt aca tat	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Thr Tyr	
20 25 30	
aac atg gcg tgg ttc cgc cag gct cca ggg aag gag cgt gag ctt gta	144
Asn Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val	
35 40 45	
gca gct atc act tgg agt gga ggt aca tac tat gca gac tcc gtg aag	192
Ala Ala Ile Thr Trp Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys	
50 55 60	
ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac acg gta tct ctg	240
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Ser Leu	
65 70 75 80	
caa atg gac agc ctg aaa ccc gag gac acg gcc gtt tat tac tgt aca	288
Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr	
85 90 95	
cga tcg cgg cgt gct agt tac ttc ggg gac ccc act gac ttt cgt tcc	336
Arg Ser Arg Arg Ala Ser Tyr Phe Gly Asp Pro Thr Asp Phe Arg Ser	
100 105 110	
tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc gtc tcc tca gcg gcc	375
Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala	
115 120 125	

<210> 49

<211> 125

<212> PRT

<213> camelidae

<400> 49

Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Leu Gln Ala Gly Asp
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Asn Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val
35 40 45
Ala Ala Ile Thr Trp Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Ser Leu
65 70 75 80
Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95
Arg Ser Arg Arg Ala Ser Tyr Phe Gly Asp Pro Thr Asp Phe Arg Ser
100 105 110

0226-105-SEQ.ST25

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala  
 115 120 125

<210> 50

<211> 18

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 50  
 caggaaacag ctatgacc

18

<210> 51

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 51  
 ctcttctgag atgagttttt g

21