

ARRIERE-PLAN DE L'INVENTION

1. Domaine de l'invention

La présente invention concerne un procédé et des compositions à utiliser pour la liaison, la détection et l'amplification de la détection de séquences spécifiques d'Acide Nucléique Cible dans un échantillon avec fidélité et exactitude, même en présence d'acides nucléiques très proches, mais différents. La liaison peut impliquer le fait de chaperonner et d'assembler des molécules spécifiques en des Assemblages de Liaison de Cible, qui lient spécifiquement les Régions de Liaison de Cible par l'hybridation des Acides Nucléiques Sondes et des séquences d'Acide Nucléique Cible. L'amplification peut impliquer le fait de chaperonner et/ou d'assembler des molécules spécifiques en des Assemblages de Liaison d'Amplification, qui lient spécifiquement des Régions de Liaison d'Amplification, formées par l'hybridation des Acides Nucléiques d'Amplification avec les Acides Nucléiques Sondes, les Acides Nucléiques Cibles ou d'autres Acides Nucléiques d'Amplification. La détection implique la mise à disposition d'un ou de plusieurs marqueurs détectables, y compris des molécules radioactives, émettant de la lumière ou la fluorescence, enzymatiques ou détectables ou générant un signal autre,

en association avec les Acides Nucléiques Sondes, Les Acides Nucléiques Cibles, les Acides Nucléiques d'Amplification ou l'Assemblage de Liaison d'Amplification.

5

2. Arrière-plan et description de la technique apparentée

Il existe un nombre croissant de cas, dans lesquels il est important d'être capable de détecter des acides nucléiques contenant une séquence spécifique, dits ci-après Acides Nucléiques Cibles (TNA), dans un échantillon. Il est désirable de détecter les TNA avec le plus faible nombre d'étapes de traitement, les composants les plus simples et en excluant d'autres acides nucléiques similaires, mais différents, dits ci-après Acides Nucléiques Cousins (CNA). Il est désirable d'être capable de détecter des TNA spécifiques en excluant l'un quelconque et tous les CNA dans l'échantillon de détection sans nécessiter d'amplification ou d'un autre traitement post-détection.

Il existe de nombreux procédés, qui utilisent des acides nucléiques immobilisés ou étiquetés comme sondes pour les TNA. Cependant, par utilisation des procédés connus, il est difficile de différencier un TNA lié à l'Acide Nucléique Sonde (PNA) d'un CNA lié au PNA. Par exemple, un ou plusieurs mésappariements de bases entre le PNA et un CNA peut encore résulter en une hybridation CNA-PNA, qui est presque indistinguable d'une hybridation TNA-PNA. Ainsi, l'hybridation seule n'est pas un indicateur optimal qu'un PNA s'est hybridé à un TNA unique.

Il existe de nombreuses situations dans lesquelles un PNA doit être utilisé pour essayer de déterminer si un TNA est présent dans un échantillon, qui peut contenir

des CNA. L'hybridation du PNA à un CNA quelconque dans cette situation, va limiter la valeur diagnostique que le PNA peut avoir pour la détection d'un TNA, en l'absence de vérification supplémentaire. De plus, il est désirable d'être capable de détecter et de localiser des TNA de faible nombre de copies dans des échantillons, qui peuvent contenir beaucoup de copies des CNA, sans nécessiter de créer des copies supplémentaires du TNA. Il serait également désirable d'être capable de confirmer la présence des CNA, indépendamment des TNA, sans nécessiter de séparation des CNA et des TNA dans l'échantillon.

De plus, il serait désirable d'être capable d'amplifier le signal, même d'une hybridation de faible fréquence d'un TNA-PNA particulier. Pour cet objet, un procédé de polymérisation de plusieurs copies d'un marqueur, indiqué ci-après Acide Nucléique d'Amplification (BNA) sur le TNA-PNA serait désirable.

La présente invention propose des procédés et compositions pour atteindre les objectifs désirés précédents. Comme révélé par la revue suivante, les présents compositions et procédés n'ont pas été décrits ou suggérés dans la technique. Une revue générale et détaillée de l'état de la technique de détection des acides nucléiques est donnée dans Keller H., M.M. Manak (1989) DNA Probes, Stockton Press.

Un procédé a été décrit pour la détection de mésappariements de paires de bases par des moyens chimiques afin de déterminer si un PNA s'est hybridé à un CNA plutôt qu'à un TNA. Dans le brevet U.S. N°4 794 075 de Ford et coll., un procédé pour distinguer des fragments d'ADN, qui contiennent des mésappariements d'une seule base de leurs homologues parfaitement appariés est discuté. Des régions simple brin dans un

fragment duplex sont modifiées avec un carbodiimide, qui réagit avec des résidus guanine (G) et thymine (T) non appariés dans l'ADN. Les molécules d'ADN linéaire duplex ne réagissent pas, alors que les molécules d'ADN avec des
5 mésappariements d'une seule base réagissent de manière quantitative. Après la réaction avec le carbodiimide, les molécules d'ADN sont fractionnées sur des gels de polyacrylamide à haut pourcentage, de sorte que les fragments modifiés et non modifiés peuvent être
10 distingués. Ford et coll. appliquent cette technique pour localiser et purifier les différences de séquence d'ADN responsables d'une variation de phénotype et d'une maladie héréditaire. Bien que ce procédé soit utile pour les variations suivantes du matériau génétique, il
15 comprend un grand nombre d'étapes, il exige des composants onéreux et il n'offre pas un moyen direct pour déterminer si un PNA s'est hybridé au TNA à l'exclusion des CNA dans l'échantillon.

Il y a eu certains essais pour affirmer qu'au moins
20 une partie de l'hybridation entre le PNA et un autre acide nucléique est complémentaire. Un procédé implique le contrôle des produits de transcription, qui sont produits si le PNA s'hybride suffisamment à un acide nucléique pour être transcrit à partir d'un site
25 promoteur présent dans la sonde. Le brevet US N°5 215 899 de Dattagupta décrit comment des séquences spécifiques d'acide nucléique sont amplifiées par utilisation d'une sonde en épingle à cheveux, qui par hybridation avec et
ligature à une séquence cible, est capable d'être
30 transcrite. La sonde comprend une séquence simple brin, auto-complémentaire, qui dans les conditions d'hybridation, forme une structure en épingle à cheveux, ayant une région promoteur fonctionnelle et comprend en

outre, une séquence de sonde, simple brin, se prolongeant depuis l'extrémité 3' de la séquence en épingle à cheveux. Par hybridation avec une séquence cible, complémentaire à la séquence de la sonde et ligature de l'extrémité 3' de la séquence cible hybridée à l'extrémité 5' de la sonde en épingle à cheveux, la séquence cible est rendue transcribable en présence d'une ARN polymérase appropriée et de triphosphates de ribonucléoside appropriés (rNTP). L'amplification est réalisée par hybridation de la séquence TNA désirée avec la sonde, ligature du TNA au PNA, ajout de l'ARN polymérase et des rNTP aux hybrides séparés et réalisation de la transcription jusqu'à ce qu'une quantité désirée de produit de transcription ARN se soit accumulé. Ce procédé implique généralement et spécifiquement, l'utilisation de l'ADN en épingle à cheveux, formé avec une extrémité simple brin non appariée pour anneler la séquence cible. Lorsque la séquence cible est liée, la production des produits de transcription ARN est permise. Ainsi, le procédé implique la détection de produits de transcription secondaires plutôt que l'utilisation d'un assemblage de liaison d'acide nucléique pour directement immobiliser et/ou localiser une séquence cible. Un CNA peut aisément se lier à la sonde et l'absence de complémentarité ne va pas nécessairement interférer avec la formation d'un hybride CNA-PNA, qui peut alors supporter la production des produits de transcription non désirés.

Un CNA lié au PNA peut être détecté si l'absence de complémentarité interfère avec la susceptibilité de la paire hybride CNA-PNA à être coupée par une endonucléase de restriction. Dans le brevet US N°5 118 605 de Urdea et le brevet US N°4 775 619 de Urdea, de nouveaux procédés

pour doser un analyte acide nucléique sont proposés, lesquels utilisent des polynucléotides ayant des séquences d'oligonucléotide sensiblement homologues à une séquence intéressante dans l'analyte, où la présence ou
5 l'absence d'hybridation à une rigueur prédéterminée, conduit à la libération d'un marqueur depuis un support. Différentes techniques sont utilisées pour la liaison d'un marqueur à un support, où par clivage d'un brin simple ou double, un marqueur peut être libéré d'un
10 support et la libération du marqueur peut être détectée comme une indication de la présence d'une séquence particulière de polynucléotide dans un échantillon. Cependant, cette technique a le défaut qu'une paire CNA-PNA peut être coupée par l'endonucléase de restriction,
15 même s'il y a un mésappariement, tant que le mésappariement se trouve hors de la région de reconnaissance de l'endonucléase. Ceci conduirait à un échec du dosage pour identifier un hybride CNA-PNA.

Un autre procédé utilise une sonde ramifiée d'ADN
20 pour détecter des acides nucléiques. Le brevet US N°5 214 246 de Urdea et coll., décrit des multimères d'oligonucléotide linéaire ou ramifié, utiles comme amplifications dans des dosages biochimiques, qui comprennent (1) au moins une première unité
25 oligonucléotide simple brin (PNA), qui est complémentaire d'une séquence oligonucléotide simple brin d'intérêt (TNA), et (2) une série de deuxièmes unités oligonucléotide simple brin, qui sont complémentaires d'un oligonucléotide marqué, simple brin. Bien que des
30 hybridations d'acide nucléique en sandwich, amplifiées et des immunodosages à l'aide des multimères sont décrits, le procédé a la limitation que l'hybridation

PNA-CNA peut se produire et va résulter en la production d'un signal non désiré.

En plus des procédés d'identification des TNA, des procédés ont été décrits pour l'amplification de cet ADN.

5 Dans le brevet US N°5 200 314 de Urdea, un brin polynucléotide analyte, ayant une séquence d'analyte (TNA), est détecté dans un échantillon contenant des polynucléotides par mise en contact du polynucléotide analyte avec une sonde de capture (PNA) dans des

10 conditions d'hybridation, où la sonde de capture a un premier partenaire de liaison, spécifique du TNA, et une deuxième séquence de liaison, spécifique d'un troisième partenaire de liaison, de phase solide. Le duplex résultant est alors immobilisé par liaison spécifique

15 entre les partenaires de liaison, et les polynucléotides non liés sont séparés des espèces liées. Le polynucléotide analyte est le cas échéant déplacé de la phase solide, puis amplifié par PCR. Les amorces de PCR ont chacune une région, capable de s'hybrider à une

20 région du polynucléotide analyte, et au moins une des amorces a en outre, une partenaire de liaison supplémentaire, capable de lier un partenaire de liaison de phase solide. Le produit amplifié est alors séparé du mélange réactionnel par liaison spécifique entre les

25 partenaires de liaison et le produit amplifié est détecté. Bien qu'il soit possible de confirmer (par PCR) qu'un acide nucléique particulier s'est hybridé avec le PNA, la confirmation est onéreuse et implique de multiples étapes.

30 Comme pour les descriptions qui impliquent l'interaction d'un acide nucléique double brin et d'une protéine liant l'ADN, un procédé a été décrit, par lequel une séquence d'ADN immobilisée, qui contient des sites de

liaison pour une seule protéine, est utilisée pour purifier cette protéine. Le brevet US N°5 122 600 de Kawaguchi et coll. décrit une microsphère avec ADN immobilisé, comprenant des chaînes d'ADN ayant des séquences de bases, qui se lient spécifiquement à une protéine particulière, et un support ayant une taille des particules non supérieure à 50 µm et non inférieure à 0,01 µm, qui n'adsorbe pas de protéine, ledit support et lesdites chaînes d'ADN étant liés l'un à l'autre par une liaison chimique, et un procédé de purification d'une protéine à l'aide desdites microsphères. Ceci étant un procédé de purification d'une protéine, il ne décrit pas de procédé de détection d'un TNA, ni de procédé dans lequel plus d'une protéine sont liées à un acide nucléique double brin pour les objets de détection et de localisation de séquences spécifiques de TNA.

Le document EP-A-0453301 décrit un procédé de détection d'une séquence cible de polynucléotide dans un échantillon, dans lequel des séquences dans un TNA sont détectées par hybridation de premier et deuxième PNA au TNA. Chaque PNA contient un duplex préformé, ou un duplex qui est formé par extension de chaîne, capable de lier une protéine liant un nucléotide, spécifique de séquence.

Le document EP-A-0147665 décrit également l'utilisation de protéines liant l'ADN duplex, spécifiques de séquence, comme moyen de détection dans un dosage d'hybridation. A nouveau, la sonde duplex est préformée.

Le document EP-A-0450594 décrit la possibilité du marquage de molécules dites développeur, avec des composés spécifiques de séquence duplex, par exemple certains intercalants. Ces composés sont attachés aux molécules développeur avant hybridation.

Le document US-A-4556643 décrit la détection non radioactive de séquences spécifiques de nucléotides dans un échantillon, impliquant l'hybridation d'une sonde contenant des séquences spécifiques de protéine liant l'ADN.

Le document WO 93/00446 décrit des oligonucléotides simple brin, comprenant une partie qui, lorsqu'elle est double brin, se lie à la protéine UL9 dérivée du virus *Herpes simplex*, et une autre partie qui, lorsqu'elle est double brin, se lie à des composés d'intercalation.

RESUME DE L'INVENTION

La présente invention est définie dans les revendications annexées. Elle propose des procédés par lesquels des séquences spécifiques d'Acide Nucléique Cible (TNA) sont détectées par utilisation d'Acides Nucléiques Sondes (PNA) qui, par hybridation avec les TNA, sont capables de lier des Assemblages de Liaison de Cible (TBA). Chaque TBA lie au moins une région spécifique de la paire hybride PNA-TNA, la Région de Liaison de Cible (TBR). Le TBA est composé d'une ou de plusieurs molécules, une ou plusieurs de celles-ci pouvant lier les séquences TBR de manière spécifique et dépendant de la séquence ou de la conformation. Le TBA peut comprendre une ou plusieurs séquences de pilotage, dites « PILOTES » ou « Séquences d'Asymétrie », qui assemblent et contraignent les composants de liaison des nucléotides du TBA en des géométries spécifiques. Les PILOTES agissent pour assembler des unités spécifiques de reconnaissance d'acide nucléique ou d'autres pilotes auxquels les unités spécifiques de reconnaissance d'acide nucléique sont attachées dans les TBA, de manière

prédéterminée. Le TBA peut également contenir une ou plusieurs molécules, qui ancrent ou localisent le TBA.

Les PNA selon l'invention sont définis à la revendication 1. Les utilisations de ces acides nucléiques sont définies dans d'autres revendications, ainsi que des kits les contenant.

Les PNA, en plus des séquences spécifiques de TNA, contiennent également une ou plusieurs séquences, 1/2 BBR, capables de s'hybrider à des 1/2 BBR complémentaires dans les Acides Nucléiques d'Amplification (BNA). Par l'hybridation des BNA ajoutés aux 1/2 BBR de départ présents dans les PNA, des extensions des PNA sont préparées sous forme de PNA-BNA, puis d'hybrides BNA-BNA. Ces extensions contiennent une ou plusieurs Régions de Liaison d'Amplification (BBR). Chaque BBR est capable de lier un Assemblage de Liaison d'Amplification (BBA). Le BBA est composé de molécules, dont une ou plusieurs peuvent lier un BBR de manière spécifique et dépendant de la séquence ou de la conformation. Le BBA peut comprendre une ou plusieurs séquences de pilotage, dites « PILOTES » ou « Séquences d'Asymétrie », qui assemblent et contraignent les composants de liaison des nucléotides du TBA en des géométries spécifiques. Les PILOTES agissent pour assembler des unités spécifiques de reconnaissance d'acide nucléique ou d'autres pilotes auxquels les unités spécifiques de reconnaissance d'acide nucléique sont attachées dans les BBA, de manière prédéterminée. Le BBA peut contenir des molécules qui ancrent ou localisent le BBA ou qui permettent la détection des BBA liés, et ainsi des complexes TBA-TNA-PNA, auxquels ils sont liés, à leur tour. On décrit des procédés et des compositions pour l'utilisation des 1/2 BBR, des BNA, des BBR et des BBA

PILOTES, y compris leur utilisation comme composants de kits pour tests diagnostiques et légaux.

Des procédés et compositions sont décrits pour les procédures de test et la production d'un kit de test
5 contenant des PNA, des TBA, des TBR, des BNA, des BBR et des BBA, pour la détection, la localisation et la différenciation des séquences spécifiques d'acide nucléique, y compris des séquences d'acide nucléique, que l'on trouve dans les cellules humaines, dans le virus de
10 l'immunodéficience humaine (VIH), du papillomavirus humain (HPV) et d'autres systèmes contenant des acides nucléiques, comme les virus et les bactéries.

Ainsi, un objet de l'invention est de proposer des procédés et compositions à utiliser pour la liaison, la
15 détection et l'amplification de la détection de séquences spécifiques d'Acide Nucléique Cible dans un échantillon, avec fidélité et exactitude, même en présence de séquences d'acide nucléique très proches, mais différentes.

Ainsi, un objet de l'invention est de proposer des
20 procédés et compositions pour la création d'Assemblages de Liaison de Cible, qui lient spécifiquement des Régions de Liaison de Cible, formées par l'hybridation des Acides Nucléiques Sondes et des séquences d'Acide Nucléique
25 Cible.

Un autre objet de la présente invention est de proposer un procédé et des compositions pour la création d'Assemblages de Liaison d'Amplification, qui lient
spécifiquement des Régions de Liaison d'Amplification, formées par l'hybridation de séquences d'Acide Nucléique
30 d'Amplification avec les Acides Nucléiques Sondes, les Acides Nucléiques d'Amplification et des Acides Nucléiques en Epingle à Cheveux.

Un autre objet de la présente invention est de proposer un procédé et des compositions à utiliser pour l'amplification de la détection des Assemblages de Liaison de Cible, liés aux Régions de Liaison de Cible à l'aide des Assemblages de Liaison d'Amplification et des Acides Nucléiques d'Amplification.

Un autre objet de la présente invention est de proposer un procédé et des compositions, qui permettent l'utilisation d'un ou de plusieurs marqueurs détectables, y compris mais sans limitation, des marqueurs radioactifs, des molécules émettant de la lumière, fluorescentes, enzymatiques ou générant un signal autre. Ces marqueurs sont utilisés en association avec les Acides Nucléiques Sondes, les Assemblages de Liaison de Cible, les Assemblages de Liaison d'Amplification, les Acides Nucléiques d'Amplification ou les Acides Nucléiques en Epingle à Cheveux.

BREVE DESCRIPTION DES DESSINS

Les illustrations suivantes sont présentes à la figure 1 : la figure 1-I est un PNA contenant un 1/2 TBR, qui est une séquence simple brin, qui est complémentaire à un TNA et une séquence 1/2 BBR. La figure 1-IIa est un TNA, auquel sont ajoutés les composants de la figure 1-I et dans des conditions d'hybridation, se lie au PNA pour former les composants de la figure 1-IIIa, un hybride PNA-TNA contenant au moins un TBR. La figure 1-IVa est un BNA, qui est ajouté aux composants de la figure 1-IIIa et dans des conditions d'hybridation, se lie au 1/2 BBR de la figure 1-IIIa, pour former un hybride PNA-BNA contenant un BBR représenté à la figure 1-Va.

La figure 1-IIb est un BNA, qui est ajouté aux composants de la figure 1-I et qui dans des conditions

d'hybridation, se lie au PNA pour former les composants de la figure 1-IIIb, un hybride PNA-TNA contenant un BBR. La figure 1-IVb est un TNA, auquel on ajoute les composants de la figure 12-IIIb et qui, dans des conditions d'hybridation, lie le 1/2 TBR de la figure 1-IIIb pour former un hybride PNA-BNA contenant un TBR, représenté à la figure 1-Vb.

La figure 1-IIc est un HNA, qui est ajouté aux composants de la figure 1-I et qui, dans des conditions d'hybridation, se lie au PNA pour former les composants de la figure 1-IIIc, un hybride PNA-HNA, contenant un BBR. La figure 1-IVc est un TNA, qui est ajouté aux composants de la figure 2-IIIc et qui, dans des conditions d'hybridation, se lie au 1/2 TBR de la figure 1-IIIc, pour former un hybride PNA-BNA, contenant un BBR, représenté à la figure 1-Vc.

Les hybrides qui forment les TBR et BBR sont utiles dans la présente invention. Les PNA et BNA, comme indiqué à la figure 1, peuvent ne pas contenir de support et/ou indicateur (OSA) attaché, ou contenir un support attaché ou un autre moyen de localisation, y compris mais sans limitation, un attachement à des billes, des polymères et des surfaces, et/ou des indicateurs.

La figure 2a est un diagramme des stratégies de polymérisation des BNA sur les PNA et de coiffage par les HNA.

La figure 2b est un diagramme de stratégies supplémentaires pour l'amplification des signaux PNA-TNA via la polymérisation des BNA et le coiffage par les HNA.

La figure 3 est un diagramme montrant l'utilisation des BNA contenant plusieurs 1/2 BBR par BNA.

La figure 4a est un diagramme montrant la liaison des TBA et des BBA aux TBR et BBR, et la capacité du TBA

à différencier les TNA des CNA. Selon cette forme de réalisation, si le TBA est immobilisé, sur une bille, la surface d'une plaque de microtitrage ou tout autre surface similaire, seuls les complexes tels que le complexe X seront retenus et détectés, alors que les complexes tels que le complexe XI, ne le sont pas.

La figure 4b est un diagramme exemplifiant des phénomènes similaires à ceux représentés à la figure 4a, mais dans un ordre légèrement différent.

La figure 5 est un diagramme exemplifiant des PNA contenant un 1/2 TBR et aucun 1/2 BBR jusqu'aux PNA contenant jusqu'à cinq 1/2 TBR et un 1/2 BBR. Les éléments (a) et (b) de chaque nombre (I, II, III, IV, V) forment un ensemble, qui, par hybridation à un TNA, procure des TBR avec (éléments (a)) ou sans (éléments (b)) 1/2 BBR disponible pour l'amplification via hybridation aux BNA ayant des 1/2 BBR complémentaires.

La figure 6a est un diagramme exemplifiant un TNA particulier, ayant deux 1/2 TBR qui par liaison d'un PNA approprié, forment deux TBR associés proches, capables de lier deux TBA. Un 1/2 BBR est également fourni pour amplification.

La figure 6b est un diagramme montrant les mêmes événements qu'à la figure 6a, excepté qu'ici, un TBA double est utilisé, de sorte qu'une discrimination entre des TBR uniques, qui se présentent dans des échantillons cellulaires normaux, et des TBR doubles, anormaux, peut se faire.

La figure 6c est un diagramme montrant le même scénario qu'à la figure 6a, excepté qu'ici, cinq TBR sont identifiés dans le TNA. Chaque TBR peut être lié au même TBA ou à un TBA différent, et chaque TBA peut être marqué

différemment, ce qui permet une confirmation de la présence des cinq sites dans le TNA.

La figure 6d est un diagramme des mêmes événements qu'à la figure 6c, excepté qu'ici, un TBA double est montré, prolongeant ce qui est représenté à la figure 6b à l'utilisation du TBA double. Un exemple du TNA représenté au point II des figures 6a, 6b, 6c et 6d est l'ADN ou l'ARN simple brin du VIH.

La figure 7 montre le LTR du VIH comme TNA, et deux PNA, et une stratégie de détection du TNA à l'aide des PNA.

La figure 8 est une représentation schématique d'une forme de réalisation de l'invention, dans laquelle un assemblage de liaison de cible est utilisé pour lier un hybride TNA-PNA, et des assemblages de liaison d'amplification sont utilisés pour lier les BNA polymérisés.

La figure 9 est une représentation schématique d'un TBA modulaire, dans lequel des séquences d'assemblage, des séquences de lieur et des séquences d'asymétrie sont utilisées pour chaperonner les unités désirées de reconnaissance d'acide nucléique pour former ensemble, un TBA.

La figure 10 montre des TBA modulaires, utiles dans la détection de séquences spécifiques de VIH.

La figure 11 montre des TBA modulaires, utiles dans la détection de séquences du papillomavirus humain. Chaque unité de E2 est réellement un dimère de la partie de liaison de l'ADN de E2.

La figure 12a est une représentation schématique du fractionnement de TNA et du déplacement de mobilité par la liaison d'un TBA.

La figure 12b est une représentation schématique du fractionnement de TNA et du déplacement amplifié de mobilité par la liaison de BBA en plus des TBA.

5 La figure 13 montre une stratégie de détection pour des séquences de détection ; un exemple d'utilisation de cette stratégie est celui du dosage de l'intégration du papillomavirus humain.

10 La figure 14 montre un assemblage d'ordre supérieur de TBA par utilisation d'unités de reconnaissance d'acide nucléique, de lieu, d'assemblage et de séquences d'asymétrie, de sorte que différents Assemblages de Liaison de Cible, spécifiques de sites de liaison dans le LTR de VIH, sont formés.

15 La figure 15 montre un assemblage d'ordre supérieur de TBA par utilisation d'unités de reconnaissance d'ADN, de lieu, d'assemblage et de séquences d'asymétrie, de sorte que différents Assemblages de Liaison de Cible, spécifiques de sites de liaison du génome du HPV, sont formés.

20 La figure 16 montre la discrimination obtenue par utilisation d'un complexe TBA et la capacité des molécules endogènes de liaison de cible en compétition à éliminer la liaison du TBA à un acide nucléique cousin, mais pas du TNA, qui contient l'orientation appropriée de plus d'un site reconnu par le TBA.

25 La figure 17 montre la capacité d'un TBA à être spécifiquement ciblé pour se lier à des sites de mésappariement de séquence et à se lier préférentiellement aux sites, par rapport aux sites
30 cousins, qui ne contiennent pas tous les mésappariements ciblés.

BREVE DESCRIPTION DES SEQUENCES

La SEQ ID N°1 correspond à la figure 5-Ia-1 et montre le site de liaison du MHC NF-kB de classe I.

La SEQ ID N°2 correspond à la figure 5(Ia) et montre le site de liaison du NF-kB de microglobuline B2.

5 La SEQ ID N°3 correspond à la figure 5(Ia) et montre le site de liaison du NF-kB de l'immunoglobuline kappa.

La SEQ ID N°4 correspond à la figure 5(Ia) et montre un des sites de liaison du NF-kB de VIH.

10 La SEQ ID N°5 correspond à la figure 5(Ia) et montre un des sites de liaison du NF-kB de VIH.

La SEQ ID N°6 correspond à la figure 5(Ia) et montre le site de liaison du NF-kB de c-myc.

La SEQ ID N°7 correspond à la figure 5(IIa) et montre un site de liaison double du NF-kB de VIH.

15 La SEQ ID N°8 correspond à la figure 5(IIa) et montre un site de liaison double du NF-kB de VIH.

20 Les SEQ ID N°9-16 correspondent à la figure 5(IIa) et montrent un site de liaison double, un site étant un site de liaison du NF-kB de VIH, l'autre site étant un site de liaison de SP1 de VIH.

Les SEQ ID N°17-18 correspondent à la figure 5(IIa) et montrent un site de liaison double de SP1 de VIH.

25 Les SEQ ID N°19-31 correspondent à la figure 5(IIIa) et montrent un site de liaison double de NF-kB de VIH et un site de liaison de SP1 de VIH.

Les SEQ ID N°32-33 correspondent à la figure 5(IVa) et montrent un site de liaison quadruple, où deux sites sont des sites de liaison du NF-kB de VIH, et deux sites sont des sites de liaison de SP1 de VIH.

30 La SEQ ID N°34 correspond à la figure 5(VIa) et montre un site de liaison quintuple, où deux sites sont des sites de liaison du NF-kB de VIH, et trois sites sont des sites de liaison de SP1 de VIH.

La SEQ ID N°35 est un exemple d'un 1/2 BBR, dans ce cas les éléments OL1, OL2 et OL3 proviennent de l'opérateur gauche du bactériophage lambda, y compris les séquences d'intervention.

5 La SEQ ID N°36 est un exemple d'un 1/2 BBR, dans ce cas les éléments OR1, OR2 et OR3 proviennent de l'opérateur droit du bactériophage lambda, y compris les séquences d'intervention.

La SEQ ID N°37 est le LTR du VIH.

10 La SEQ ID N°38 est un PNA complémentaire au PNA du LTR du VIH.

La SEQ ID N°39 est un PNA complémentaire à un autre PNA du LTR du VIH que la SEQ ID N°38.

15 La SEQ ID N°40 est un PNA complémentaire à une partie du LTR du VIH et contient également un 1/2 BBR et une séquence en saillie pour la polymérisation des BNA sur le PNA.

La SEQ ID N°41 est un BNA complémentaire au 1/2 BBR de la SEQ ID N°40.

20 La SEQ ID N°42 est un BNA, qui va polymériser sur le BNA de la SEQ ID N°41 et qui, avec les SEQ ID N°40 et 41, crée un site de reconnaissance de PstI.

25 La SEQ ID N°43 est un BNA complémentaire au BNA de la SEQ ID N°42 et qui complète un site de reconnaissance de BamHI.

La SEQ ID N°44 est un HNA, qui a un site de reconnaissance de BamHI, qui va s'hybrider au site de reconnaissance de BamHI créé par les SEQ ID N°42 et 43 au polymère en croissance.

30 La SEQ ID N°45 est un deuxième PNA, qui comme SEQ ID N°40, est complémentaire à une partie du LTR du VIH, mais pas à la même séquence que SEQ ID N°40. SEQ ID N°45 code également un 1/2 BBR et une saillie, qui va permettre la

polymérisation des BNA en commençant avec un site de reconnaissance de Sph1.

5 Les SEQ ID N°46-62 sont des PNA spécifiques du papillomavirus humain (HPV), qui par hybridation avec des séquences du HPV, forment des TBR, qui se lient aux protéines liant l'ADN de HPV.

Les SEQ ID N°63-71 sont des unités de reconnaissance de l'ADN NF-kB pour l'incorporation dans des TBA.

10 La SEQ ID N°72 est une séquence de localisation nucléaire.

La SEQ ID N°73 est une unité de reconnaissance de séquence SP1.

La SEQ ID N°72 est une unité de reconnaissance d'une protéine de liaison de TATA.

15 Les SEQ ID N°75-84 sont des unités de reconnaissance de l'ADN E2 du papillomavirus.

Les SEQ ID N°85-92 sont des séquences d'asymétrie.

La SEQ ID N°93 est une unité de reconnaissance de protéine de liaison de TATA d'arabidopsis.

20 La SEQ ID N°94 est une unité de reconnaissance de protéine de liaison d'ADN HPV-16-E2-1.

La SEQ ID N°95 est une unité de reconnaissance de protéine de liaison d'ADN HPV-16-E2-2.

25 La SEQ ID N°96 est une unité de reconnaissance de protéine de liaison d'ADN HPV-18-E2.

La SEQ ID N°97 est une unité de reconnaissance de protéine de liaison d'ADN HPV-33-E2.

La SEQ ID N°98 est une unité de reconnaissance de protéine de liaison d'ADN E2 de papillomavirus bovin.

30 Les SEQ ID N°99-102 sont des séquences lieu exemplaires.

La SEQ ID N°103 est une séquence signal de localisation nucléaire (NLS) exemplaire.

Les SEQ ID N°104-108 sont des séquences chaperon exemplaires.

Les SEQ ID N°109-116 sont des séquences de TBA assemblés exemplaires.

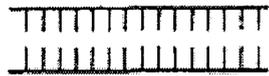
5 La SEQ ID N°117 est un site de liaison de NF-kB consensus.

La SEQ ID N°118 est une séquence d'acides aminés de Tat de VIH.

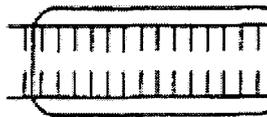
10 ABBREVIATIONS



acide nucléique simple brin



acide nucléique double brin



région de liaison sur un acide nucléique



15 pas de support ou d'indicateur, ou support solide, ou autre moyen de localisation, y compris, mais sans limitation, l'attachement à des billes, des polymères et des surfaces, ou des indicateurs = OSA

20 BBA assemblage de liaison d'amplification

BBR région de liaison d'amplification

BNA acide nucléique d'amplification

25 BNA acide nucléique cousin

1/2 BBR région simple brin, qui lorsqu'elle s'hybride à la séquence complémentaire d'un HNA ou d'un BNA, peut lier un BBA

1/2 TBR région simple brin du PNA, qui lorsqu'elle s'hybride à la séquence complémentaire d'un TNA, peut lier un TBA.

	OSA	support	ou	attachement
5	facultatif, cercle dans un carré			
	PNA	acide nucléique sonde		
	TBA	assemblage de liaison de cible		
	TBR	région de liaison de cible		
	TNA	acide nucléique cible		
10	HNA	acide nucléique en épingle à cheveux		

DEFINITIONS

Il convient également de comprendre, à partir de la description qui suit, que lorsque l'on fait mention de termes tels que des assemblages de liaison de cible (TBA), des assemblages de liaison d'amplification (BBA), des protéines liant l'ADN, des protéines liant l'acide nucléique ou des protéines liant l'ARN, ce que l'on entend sont des compositions composées de molécules qui se lient à des séquences d'acide nucléique cible, ADN ou ARN (TNA), sans tenir compte de la spécificité de la catégorie des molécules de liaison desquelles elles dérivent. Ainsi par exemple, un TBA adapté pour lier des séquences du virus de l'immunodéficience humaine, peut être très similaire d'un facteur de transcription NF-KB, qui lie typiquement des séquences d'ADN. Cependant, tel qu'utilisé ici, il convient de comprendre que le TBA peut être adapté à un usage optimal pour lier des séquences d'ARN d'une composition de séquence ou conformation particulière.

La fidélité du procédé de détection décrit ici, dépend dans une large mesure de la liaison sélective des

TBA et des BBA à des motifs particuliers d'acide nucléique. Il convient de comprendre que dans la présente description, la base de la discrimination des TNA par les TBA et BBA parmi des séquences apparentées (acides nucléiques cousins ou CNA) peut être la formation de segments précis hybrides acide nucléique sonde (PNA)-acide nucléique cible (TNA) (hybrides PNA-TNA). Cependant, la base de la discrimination peut être également, seulement la formation d'une conformation particulière, et peut ne pas exiger l'absence complète de mésappariement de base dans l'hybride TNA-PNA. Ainsi, la base du fonctionnement du TBA ou du BBA doit être comprise en ce qu'elle dépend de la discrimination d'une propriété quelconque, unique à l'hybride TNA-PNA, par opposition à tout autre propriété présentée par les hybrides PNA-CNA quelconques, qui peuvent se former dans un échantillon testé, en contact avec un PNA donné.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

La présente invention est définie dans les revendications annexées. Elle propose des procédés pour identifier spécifiquement, un acide nucléique cible (TNA) dans un échantillon, par utilisation d'assemblages de liaison de cible (TBA), qui comprennent des protéines spécifiques de liaison d'acide nucléique. En utilisant des acides nucléiques sondes (PNA), spécifiques d'une séquence donnée de TNA, et un TBA, qui est spécifique de la région de liaison de cible (TBR) duplex, formée par l'hybride des séquences TNA-PNA, un complexe stable TBA-TNA-PNA est formé. En fournissant en outre, des séquences spécifiques amplifiables dans le PNA, en plus des séquences qui contribuent spécifiquement à la formation du TBR, reconnues par le TBA, la liaison du PNA au TNA

est détectée et la détection est amplifiée. Pour cet objet, l'un quelconque d'un certain nombre de systèmes d'amplification d'acide nucléique, y compris la réaction en chaîne par polymérase, ou l'utilisation d'ADN ramifié, chaque branche de celui-ci contenant un marqueur détectable, peut être utilisée. En particulier, un nouveau procédé d'amplification est décrit ici, où la partie amplifiable du PNA contient des séquences sur lesquelles l'acide nucléique d'amplification (BNA) peut être polymérisé. Par formation de chaque hybride BNA-PNA, on forme une région de liaison d'amplification (BBR), sur laquelle un assemblage de liaison d'amplification (BBA) se lie spécifiquement. S'ils sont marqués de manière détectable, les BBA ou BNA procurent une amplification essentiellement non limitée de l'événement initial de liaison TNA-PNA.

Selon l'invention, il convient de comprendre que le TNA comprend des séquences spécifiques d'acide nucléique. Il convient de comprendre que le TBA est n'importe quel assemblage moléculaire, qui peut se lier spécifiquement et fermement à un hybride TNA-PNA formé. Le TBA va contenir une ou plusieurs molécules, dont les séquences sont suffisantes pour lier le TBR. Les domaines de liaison d'acide nucléique, qui sont connus, peuvent être utilisés directement comme composants du TBA ou être modifiés selon les descriptions données ici. Les molécules les plus aisément accessibles, avec de telles séquences, sont les domaines liant l'ADN des protéines liant l'ADN. Spécifiquement, beaucoup de protéines liant l'ADN ou l'ARN sont connues, lesquelles peuvent être utilisées directement an tant que protéine connue, non modifiée, ou le TBA peut être une protéine liant un acide nucléique, modifié selon les descriptions spécifiques

données ici. Dans ce dernier cas, des modifications spécifiques, qui sont désirables, vont comprendre l'optimisation des affinités de liaison, l'élimination des activités non désirées (comme l'activité de nucléase et la réorganisation du TBA en présence d'autres molécules avec une affinité pour les composants du TBA), l'optimisation de la sélectivité pour une séquence cible par rapport à des séquences très proches, et l'optimisation de la stabilité.

Des exemples de protéines liant l'ADN, qui peuvent être utilisées selon la présente invention, sont les parties liant l'ADN du facteur de transcription NF-kB (p50 et p65), NF-IL6, NF-AT, rel, TBP, la protéine E2 du papillomavirus, sp1, les répresseurs cro et C1 du bactériophage lambda, et des protéines similaires et sont des protéines bien connues, dont la partie liant l'ADN a été isolée, clonée, séquencée et caractérisée. En outre, toute autre protéine liant l'ADN ou partie de protéine, qui est nécessaire et suffisante pour lier un hybride TBR ou un BBR est incluse. Ceci comprend des protéines ou parties de protéines de type sauvage, avec activité de liaison de l'ADN altérée, ainsi que les protéines créées avec une spécificité de liaison de l'ADN altérée, comme l'échange d'une hélice de reconnaissance liant l'ADN, d'une protéine vers une autre. En outre, les protéines qui présentent des fonctions de liaison de l'acide nucléique et d'autres vis-à-vis d'un acide nucléique, comme des endonucléases de restriction, peuvent être utilisées comme fonction liant l'acide nucléique. Des protéines qui lient des régions cibles dans les hybrides ADN-ARN, ainsi que les hybrides ARN-ARN sont incluses. (Voir par exemple, Shi 1995, DeStefano 1993, Zhu 1995, Gonzales 1994, Salazar 1993, Jaishree 1993, Wang 1992,

Roberts 1992, Kainz 1992, Salazar 1993 (b)). Les assemblages de liaison peuvent être construits en utilisant une molécule, qui chaperonne des parties de l'assemblage de liaison, de sorte que des combinaisons
5 spécifiques de composants et des géométries spécifiques peuvent être atteintes. Cette molécule est désignée ici PILOTE. Les pilotes peuvent être composés de protéines ou de toute combinaison de matériaux organiques et inorganiques, qui procurent la sélection combinatoire
10 et/ou induisent des géométries spécifiques entre les membres des TBA ou BBA. Un chaperon est un échafaudage stable, par lequel un TBA ou un BBA peut être construit, de sorte que la conformation correcte du TBA ou du BBA est procurée alors qu'en même temps, on élimine les
15 propriétés indésirables d'une protéine naturelle liant l'acide nucléique. Comme exemple spécifique de cette forme de réalisation, une version modifiée du facteur de transcription pléiotrope, NF-kB, est proposée à l'aide d'une protéine cro de bactériophage lambda, modifiée,
20 comme chaperon. Chaque dimère de liaison NF-kB conserve une affinité de liaison picomolaire pour le site de liaison de NF-kB alors qu'en même temps, l'assemblage de liaison présente plusieurs caractéristiques avantageuses de préparation, stabilité et spécificité.

25 Au vu de ce qui précède, les différents aspects et formes de réalisation de la présente invention sont décrits ci-dessous de manière détaillée.

1. Les Acides Nucléiques Sondes (PNA) et leur préparation

30 Les PNA de la présente invention comprennent au moins trois parties principales, jointes ensemble. En référence à la figure 1(I) des dessins, la première partie du PNA est une ou plusieurs séquences de bases,

dites « 1/2 TBR ». En référence à la figure 1(I et IIa) des dessins, le 1/2 TBR dans le PNA est complémentaire à une séquence intéressante dans un échantillon, le TNA contenant un 1/2 TBR. En référence à la figure 1(IIIa) des dessins, le TNA, lorsqu'il est ajouté au PNA dans des conditions d'hybridation, forme un hybride PNA-TNA contenant un TBR. En référence à la figure 1(I) des dessins, la deuxième partie du PNA est une séquence de bases, dite « 1/2 BBR ». En référence à la figure 1(I, IIc, IIc et IVa) des dessins, le 1/2 BBR dans le PNA est complémentaire à un 1/2 BBR présent dans un BNA ou un HNA. En référence à la figure 1(IIIb, IIIc et Va) des dessins, le BNA ou le HNA, lorsqu'il est ajouté au PNA dans des conditions d'hybridation, formes un hybride PNA-BNA ou un hybride PNA-HNA, respectivement, contenant un BBR. En référence à la figure 1(I) des dessins, la troisième partie du PNA est l'OSA, désigné par un cercle dans un carré. L'OSA est aucun support et/ou aucun indicateur, ou un support solide, ou un autre moyen de localisation, y compris, mais sans limitation, un attachement à des billes, des polymères et des surfaces, et/ou des indicateurs, qui sont attachés de manière covalente à, ou associés de manière non covalente, mais spécifiquement, au PNA. L'OSA peut être un atome ou une molécule, qui aide à la séparation et/ou localisation, comme un support solide liant un groupe ou marqueur, qui peut être détecté par différents moyens physiques, comprenant, mais sans limitation, l'adsorption ou l'imagerie de particules émises ou de lumière. Les procédés d'attachement des indicateurs aux oligonucléotides ou d'immobilisation des oligonucléotides aux supports solides sont bien connus dans la technique (voir Keller et Manak, ci-dessus).

Le PNA de la présente invention peut être préparé par tout procédé approprié. De tels procédés, de manière générale, vont comprendre la synthèse d'oligonucléotide et le clonage dans un vecteur répliquable. Les procédés de
5 synthèse d'acide nucléique sont bien connus dans la technique. Lorsqu'il est cloné ou synthétisé, la purification et la séparation du brin peuvent être nécessaires pour utiliser le produit sous forme d'un PNA pur. Les procédés de préparation de sondes ARN sont bien
10 connus (voir par exemple, Blais 1993, Blais 1994, qui utilise la transcription *in vitro* à partir d'une réaction PCR, comprenant un promoteur d'ARN polymérase de T7).

L'homme de métier doit comprendre que la longueur et la séquence spécifique du PNA dépendent de la longueur et
15 de la séquence à détecter dans un TNA, et des structures pour atteindre une liaison ferme et spécifique du TBA particulier à utiliser (voir discussion des TBA ci-dessous). De manière générale, des PNA ayant des longueurs de séquence allant d'environ 10 à environ
20 300 nucléotides sont adéquats, des longueurs d'environ 15-100 nucléotides étant désirables pour beaucoup des formes de réalisation spécifiquement exemplifiées ici.

Il convient de comprendre également, que le PNA peut être construit de manière qu'il contient plus d'un 1/2
25 TBR et qu'il produit plus d'un TBR pour un ou plusieurs TBA, identiques ou différents, ainsi que des TBR complexes reconnus par de nouveaux TBA duplex et multiplex (voir la description ci-dessous concernant ces nouveaux TBA) lors de l'hybridation des PNA et des TNA.
30 La figure 5 illustre des PNA spécifiques, qui contiennent un ou plusieurs 1/2 TBR. Les séquences spécifiques qui correspondent aux séquences 1/2 TBR illustrées à la

figure 5 (Ia, IIa, IIIa, IVa et Va) sont les SEQ ID N°1-34 (voir la description des séquences ci-dessous).

Comme représenté aux figures 2a et 2b, le PNA, contenant un 1/2 TBR, peut s'hybrider à un ou plusieurs BNA (voir la description ci-dessous) et la chaîne des BNA polymérisés jusqu'à toute longueur désirée potentielle pour l'amplification de l'événement d'hybridation TNA-PNA. De préférence, d'environ 1 à 10 1/2 BBR seront présents dans le PNA.

Comme le montrent les figures 6a et 6b, le PNA peut contenir plusieurs 1/2 TBR, identiques ou différents, qui peuvent s'hybrider à plusieurs 1/2 TBR dans un TNA. Chaque fois qu'un 1/2 TBR dans le PNA s'apparie à un 1/2 TBR dans un TNA, une Région de Liaison de Cible, TBR, est formée, qui peut lier un TBA. De plus, il n'est pas essentiel que tous les TBR soient sur un seul PNA, de manière contiguë. Ainsi, dans une forme de réalisation de l'invention, deux PNA différents sont utilisés pour détecter des séquences sur un TNA particulier. Comme illustration de cet aspect de l'invention, la figure 7 montre une représentation de la longue répétition terminale (LTR) du virus de l'immunodéficience humain (VIH). Comme il est connu dans la technique, le LTR du VIH comprend deux sites de liaison de NF-kB et trois sites de liaison de SP1, à proximité, où NF-kB et SP1 sont des protéines liant l'ADN connues. La figure 7 donne deux PNA, PNA1 (SEQ ID N°38) et PNA2 (SEQ ID N°39), chacun étant complémentaire au brin opposé représenté sous forme d'un TNA (SEQ ID N°37), qui présente les deux sites de liaison de NF-kB et les trois sites de liaison de SP1 du LTR de VIH. Selon cet aspect de l'invention, PNA1 s'hybride spécifiquement à la partie du TNA représentée à la figure 7, avec les bases soulignées par

un symbole « + », alors que la PNA2 s'hybride spécifiquement à la partie du TNA représentée à la figure 7, avec les bases soulignées par un symbole « = ». Chacun des PNA1 et PNA2 peut également contenir des séquences (indiquée par les symboles « # » ou « * »), qui vont s'hybrider à des séquences 1/2 BBR d'un BNA (voir ci-dessous). En outre, chacun des PNA1 et PNA2 peut être différemment étiqueté avec un OSA, comme un fluorophore tel qu'un marqueur fluorescéine ou rhodamine, qui va permettre la confirmation que les deux sondes ont été liées au TNA. Si seulement un marqueur ou aucun des marqueurs n'est détecté, on conclut que le TNA n'est pas présent dans l'échantillon à tester.

Dans un autre aspect de la forme de réalisation représentée à la figure 7, un procédé d'altération de la spécificité du présent procédé de dosage est représenté. En modifiant la longueur de l'intervalle en PNA1 et PNA2, de sorte que la région du TNA restant non hybridée est altérée, celui qui met en œuvre la présente invention, est capable d'altérer la discrimination du dosage.

Afin d'exemplifier plus clairement cet aspect de l'invention, il est nécessaire d'insister sur le fait que le TBR peut avoir une structure en hélice. Ainsi, alors que le PNA1 crée des TBR sur une « face » de l'hélice, le PNA2 crée un TBR avec la même face ou une autre face de l'hélice, en fonction de la distance entre le milieu de chaque TBR (souligné à la figure 7). Si le milieu de chaque site de liaison est un produit entier de 10,5 bases, les TBR se trouveront sur la même face de l'hélice, alors que des produits non entiers séparés de 10,5 bases vont placer les TBR sur les côtés opposés de l'hélice. De cette manière, toute coopérativité au niveau de la liaison par le TBA reconnaissant le TBR de PNA1 et

le TBA reconnaissant le TBR de PNA2 peut être manipulée (voir Hochschild A., M. Ptashne [1986] Cell 44 : 681-687, montrant cet effet pour la liaison du répresseur du bactériophage lambda en deux sites différents d'opérateur, localisés à différentes distances l'un de l'autre dans une hélice d'ADN). Comme décrit par Perkins et coll. ([1993] EMBO J. 12 : 3551-3558), la coopérativité entre les sites NF-kB et SP1 est exigée pour atteindre l'activation du LTR de VIH. Cependant, pour l'objet de la présente invention, on peut tirer avantage du motif site de liaison double NF-kB-triple SP1 dans le LTR de VIH en procurant une nouvelle protéine de liaison, unique, capable de lier les deux sites simultanément, mais seulement si l'espacement entre les sites est géométriquement faisable. Ceci est contrôlé par la structure du TBA choisi et par les PNA utilisés. Ainsi, dans la forme de réalisation exemplifiée à la figure 7, les deux sondes peuvent être utilisées avec une région inter-sonde de l'ADN simple brin restant assez grande, de sorte que même si les sites de liaison NF-kB et SP1 sont sur les faces opposées de l'hélice, la région simple brin entre les sondes procure une « charnière » suffisamment flexible, de sorte que l'ADN peut fléchir et se tordre pour accommoder la géométrie du TBA. En variante, un dosage plus rigoureux peut être conçu en rétrécissant la distance inter-sonde, de sorte que l'ADN peut être seulement fléchi, mais pas tordu. Finalement, les sondes peuvent être si proches, ou un seul PNA est utilisé, de sorte que l'ADN peut seulement fléchir, mais pas se tordre. Ainsi, cette figure exemplifie et permet la production de systèmes de détection avec tout degré désiré donné de discrimination entre les acides

nucléiques cibles ayant des séquences similaires, mais des juxtapositions différentes de ces séquences.

En terme de kit diagnostique ou légal pour le VIH, l'homme de métier comprendra que les aspects mentionnés
5 ci-dessus de l'invention tiennent compte de l'ajustement des composants du kit diagnostique ou légal pour s'apparier à ce qui est connu en tout moment donné concernant les contraintes prévalentes du VIH ou d'un
10 autre état pathogène ou d'une autre maladie. Il convient d'apprécier également que, bien que la détection d'une infection par le VIH ne soit pas la seule utilité de la présente invention, à cause de l'aptitude à la mutation du génome du VIH, il est probablement l'un des environnements de test les plus complexes pour un tel
15 diagnostic. C'est précisément dans un tel environnement mutable, cependant, que la flexibilité du présent procédé, couplée à sa capacité à différencier des séquences très apparentées, peut être le plus clairement appréciée. Dans des environnements moins mutables,
20 certaines des sophistications que la présente invention peut présenter, ne doivent pas être utilisées. Ainsi, dans un kit diagnostique pour une infection par le papillomavirus, toutes les caractéristiques de différenciation de l'interaction TBA-TBR sont
25 disponibles, avec la capacité à amplifier le signal à l'aide des BNA et BBA, mais un seul PNA simple, comme l'une quelconque des SEQ ID N°46-62, peut être identifié, lequel identifie des séquences uniques du papillomavirus, dont on sait également qu'il se lie à un TBA tel que la
30 protéine E2 du papillomavirus ou des parties tronquées, liant l'ADN, de celle-ci (voir Hegde et coll. [1992] Nature 359 : 505-512 ; Monini et coll. [1991] J. Virol. 65 : 2124-2130).

Lors de l'application du présent procédé à la détection d'un TNA particulier pour établir si certaines acides nucléiques sont présents, lesquels sont associés à la progression d'un mélanome, hépatome, cancer du sein, du col, du poumon, du colon, de la prostate, du pancréas ou de l'ovaire, le TNA peut être obtenu à partir de matériaux de biopsie, prélevé des organes suspectés contenir les cellules cancéreuses. Pour la détection de déficiences génétiques, le TNA peut être obtenu d'échantillons de patient, contenant les cellules affectées. Pour la détection de contaminants de fermentation et de produits dans la préparation d'aliments, des produits chimiques ou biotechnologiques ou la bioréhabilitation des déchets, le TNA peut être obtenu d'échantillons prélevés à différentes étapes de la fermentation ou du processus de traitement. Pour la détection de pathogènes ou contaminants dans les aliments ou médicaments, l'échantillon de TNA peut être obtenu de l'aliment ou le médicament, par frottis de l'aliment ou de surfaces en contact avec l'aliment, des fluides en contact avec l'aliment, des matériaux de traitement, des fluides et similaires associés à la fabrication ou mis en contact avec l'aliment, le médicament ou des échantillons biologiques prélevés de ceux en contact avec l'aliment ou le médicament, ou similaire.

2. Acides Nucléiques d'Amplification (BNA), Région de Liaison d'Amplification (BBR) et leur préparation

Les BNA de la présente invention sont composés d'au moins un ou plusieurs 1/2 BBR couplés à un OSA. Les 1/2 BBR peut s'hybrider aux 1/2 BBR complémentaires présents dans le PNA, d'autres BNA ou un HNA.

En référence à la figure 1(I, IIb et IIIb) des
dessins, le BNA le plus simple est composé de deux
parties. En référence à la figure 1(IIb) des dessins, la
première partie du BNA le plus simple est une séquence de
5 bases, qui est complémentaire à la séquence du PNA, qui
est désignée « 1/2 BBR ». En référence à la figure 1(IIb)
des dessins, la deuxième partie du BNA le plus simple est
l'OSA, désigné par un cercle dans un carré. L'OSA est
aucun support et/ou aucun indicateur, ou un support
10 solide, ou un autre moyen de localisation, y compris,
mais sans limitation, un attachement à des billes, des
polymères et des surfaces, et/ou des indicateurs, qui
sont attachés de manière covalente à, ou associés de
manière non covalente, mais spécifiquement, au BNA.

15 En référence à la figure 2a(II et III) des dessins,
le BNA peut contenir plus d'une séquence 1/2 BBR. Le BNA
illustré à la figure 3(II) contient une séquence, qui est
complémentaire au PNA illustré à la figure 3(I), et deux
autres séquences 1/2 BBR. Le BNA illustré à la
20 figure 3(III) contient deux séquences 1/2 BBR, qui sont
complémentaires à deux des séquences 1/2 BBR dans le BNA
illustré à la figure 3(II), plus jusqu'à « n » 1/2 BBR
supplémentaires pour la polymérisation de BNA
supplémentaires.

25 Dans les conditions d'hybridation, le BNA illustré à
la figure 3(II), lorsqu'il est combiné au PNA illustré à
la figure 3(I), crée l'hybride PNA-BNA illustré à la
figure 3(IVa) contenant un BBR et une extension non
hybridée avec deux séquences 1/2 BBR supplémentaires ou
30 séquences « d'amplification ». Les BBR créés par ladite
hybridation peuvent être de séquences identiques,
similaires ou non. Les BBR créés par ladite hybridation
peuvent lier des BBA identiques, similaires ou non (voir

ci-dessous). Les BNA peuvent être préparés de manière analogue aux PNA.

Dans les conditions d'hybridation, l'hybride BNA-BNA illustré à la figure 3(IVb), lorsqu'il est combiné au PNA illustré à la figure 3(Vb), crée l'hybride PNA-BNA illustré à la figure 3(VI), contenant un BBR, deux hybrides BNA-BNA supplémentaires contenant les BBR, et une extension non hybridée avec une séquence 1/2 BBR supplémentaire, une séquence « d'amplification ». Les BBR créés par ladite hybridation peuvent être de séquences identiques, similaires ou non. Les BBR créés par ladite hybridation peuvent lier des BBA identiques, similaires ou non (voir ci-dessous). Les BNA peuvent être préparés de manière analogue à la préparation des PNA.

15

3. Acides Nucléiques Cibles (TNA) et leur préparation

La première étape dans la détection et l'amplification de signaux produits par la détection d'un TNA particulier selon le présent procédé, est l'hybridation d'une telle cible avec le PNA dans un mélange approprié. Une telle hybridation est réalisée dans des conditions appropriées, bien connues dans la technique.

L'échantillon suspecté de ou contenant le TNA visé peut être obtenu d'une variété de sources. Il peut être un échantillon biologique, un échantillon d'aliment ou agricole, un échantillon environnemental, etc. Lors de l'application du présent procédé à la détection d'un TNA particulier pour des objets de diagnostic médical ou de médecine légale, le TNA peut être obtenu d'un échantillon de biopsie, un fluide corporel ou un exsudat comme l'urine, le sang, le lait, le fluide cérébrospinal, le crachat, la salive, les selles, des aspirations de

30

poumon, des frottis de gorge ou génitaux et similaire. En outre, la détection peut être *in situ* (voir par exemple Embretson 1993 ; Patterson 1993 ; Adams 1994).

5 Ainsi, des PNA spécifiques des vertébrés (y compris les mammifères et y compris l'homme) ou l'un quelconque ou tous les microorganismes suivants intéressants, peuvent être envisagés et utilisés selon le présent procédé :

10 Corynebactéries

Corynebacterium diphtherie

Bacillus

Bacillus thuringiensis

Pneumocoques

15 *Diplococcus pneumoniae*

Streptocoques

Streptococcus pyogenes

Streptococcus salivarius

Staphylocoques

20 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus albus

Pseudomonas

Pseudomonas stutzen

Neisseria

25 *Neisseria meningitidis*

Neisseria gonorrhoea

Entérobactériacées

Escherichia coli

Aerobacteria aerogenes

30 *Klebsiella pneumoniae* la bactérie coliforme

Salmonella typhosa

Salmonella choleraesuis Les Salmonelles

Salmonella typhimurium

Shigellae dysenteriae
Shigellae schmitzii
Shigellae arabinotarda
Shigellae flexneri
5 *Shigellae boydii*
Shigellae sonnei

Autres bacilles entériques

Proteus vulgaris
Proteus mirabilis
10 *Proteus morgani*
Pseudomonas aeruginosa
Alcaligenes faecalis
Vibrio cholerae

Groupe Hemophilus-Bordetella

15 *Hemophilus influenza, H. ducryi*
Hemophilus hemophilus
Hemophilus aegypticus
Hemophilus parainfluenzae
Bordetella pertussis

20 Pasteurellae

Pasteurella pestis
Pasteurella tularensis

Brucellae

Brucella melitensis
25 *Brucella abortus*
Brucella suis

Bacilles formant des spores aérobies

Bacillus anthracis
Bacillus subtilis
30 *Bacillus megaterium*
Bacillus cereus

Bacilles formant des spores anaérobies

Clostridium botulinum

Clostridium tetani
Clostridium perfringens
Clostridium novyi
Clostridium septicum
5 *Clostridium histolyticum*
Clostridium tertium
Clostridium bifermentans
Clostridium sporogenes

Mycobactéries

10 *Mycobacterium tuberculosis hominis*
Mycobacterium bovis
Mycobacterium avium
Mycobacterium leprae
Mycobacterium paratuberculosis

15 Actinomycètes (bactéries de type champignon)

Actinomyces israeli
Actinomyces bovis
Actinomyces naeslundii
Nocardia asteroides

20 *Nocardia brasiliensis*

Spirochètes

Treponema pallidum
Treponema pertenue
Treponema carateum

25 *Spirillum minus*
Streptobacillus moniliformis
Borrelia recurrentis
Leptospira icterohemorrhagiae
Leptospira canicola

30 Trypanosome

Mycoplasmes

Mycoplasma pneumoniae

Autres pathogènes

Listeria monocytogenes

Erysipelothrix rhusiopathiae

5 *Streptobacillus moniliformis*

Donvania granulomatis

Bartonella bacilliformis

Rickettsiae (parasites de type bactéries)

Rickettsia prowazekii

10 *Rickettsia mooseri*

Rickettsia rickettsii

Rickettsia conori

Rickettsia australis

Rickettsia sibiricus

15 *Rickettsia akari*

Rickettsia tsutsugamushi

Rickettsia burnetti

Rickettsia quintana

Chlamydia (parasites inclassifiables bactériens/viraux)

20 Agents Chlamydia (nomination incertaine)

Champignons

Cryptococcus neoformans

Blastomyces dermatidis

Histoplasma capsulatum

25 *Coccidioides immitis*

Paracoccidioides brasiliensis

Candida albicans

Aspergillus fumigatus

Mucor corymbifera (*Absidia corymbifera*)

30 *Rhizopus oryzae*

Rhizopus arrhizus Phycomycètes

Rhizopus nigricans

Sporotrichum schenkii

- Flonsecaea pedrosoi*
Fonsecaea compact
Fonsecacae dermatidis
Cladosporium carrioni
5 *Phialophora verrucosa*
Aspergillus nodulans
Madurella mycetomi
Madurella grisea
Allescheria boydii
10 *Phialophora jeanselmei*
Microsporum gypsum
Trichophyton mentagrophytes
Keratinomyces ajelloi
Microsporum canis
15 *Trichophyton rubrum*
Microsporum adouini

Virus

Adénovirus

Virus herpes

- 20 *Herpes simplex*
varicelle
Herpes zoster (zona)
Virus B
cytomégalovirus

25 Virus pox

- varirole
vaccine
Poxvirus bovis
Paravaccinia
30 *Molluscum contagiosum*

Picomavirus

Virus de la polio
Virus coxsachie

Virus Echo

Rhinovirus

Myxovirus

Influenza (A, B et C)

5 Parainfluenza (1-4)

Virus des oreillons

Virus de la maladie de Newcastle

Virus de la rougeole

Virus de la peste bovine

10 Virus de la maladie de Carré

Virus respiratoire syncytial

Virus de la rubéole

Arbovirus

Virus de l'encéphalite équine de l'est

15 Virus de l'encéphalite équine de l'ouest

Virus Sindbis

Virus du chikugunya

Virus forêt de Semliki

Virus Mayora

20 Virus de l'encéphalite de St Louis

Virus de l'encéphalite de Californie

Virus de la fièvre à tique du Colorado

Virus de la fièvre jaune

Virus de la dengue

25 Réovirus

Réovirus des types 1-3

Rétrovirus

Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

30 Virus lymphotrophiques des cellules T humains I & II
(HTLV)

Hépatite

Virus de l'hépatite A

Virus de l'hépatite B

Virus de l'hépatite non-A, non-B

Hépatite C, D, E

Virus tumoraux

Virus de la leucémie de Rauscher

5 Virus de Gross

Virus de la leucémie de Maloney

Papillomavirus humains

10 Il convient de comprendre par l'homme de métier, qu'il est généralement nécessaire de traiter des échantillons suspectés de contenir un TNA particulier, de telle manière de l'on produise des fragments qui peuvent aisément s'hybrider au PNA. Il peut être nécessaire de traiter l'échantillon à tester pour réaliser une

15 libération de ou d'extraction du TNA pour l'hybridation, comme par exposition du sang ou d'autres cellules à un environnement hypotonique, ou par rupture de l'échantillon d'une autre manière, à l'aide de moyens plus vigoureux. Lorsque le TNA est supposé être présent

20 sous forme double brin, il sera naturellement désirable de séparer les brins pour rendre hybridable sous forme simple brin, par des procédés bien connus dans la technique, y compris, mais sans limitation, le chauffage ou une exposition limitée à des conditions alcalines, qui

25 peuvent être neutralisées par addition du PNA simple brin pour permettre l'hybridation. Les procédés de préparation de cibles ARN sont bien connus (voir Waterhouse 1993, Mitchell 1992).

30 La fragmentation d'échantillons d'acide nucléique contenant les TNA, est habituellement requise pour diminuer la viscosité de l'échantillon et pour augmenter l'accessibilité des TNA aux PNA. Une telle fragmentation est réalisée par des moyens statistiques ou spécifiques,

connus dans la technique. Ainsi par exemple, des nucléases spécifiques, connues pour couper avec une fréquence particulière dans le génome particulier à analyser, peuvent être utilisées pour produire des fragments de taille moléculaire moyenne connue. En outre, d'autres nucléases, phosphodiesterases, exonucléases et endonucléases, le cisaillement physique et la sonication sont des procédés pouvant être utilisés pour cet objet. Ces procédés sont bien connus dans la technique. L'utilisation des enzymes de restriction pour l'objet de la fragmentation de l'ADN est généralement préférée. Cependant, l'ADN peut également être fragmenté par une série de moyens chimiques comme l'utilisation des types suivants de réactifs : EDTA-Fe(II) (selon Stoebel et coll. [1988] J. Am. Chem. Soc. 110 : 7927 ; Devran [1986] Science 232 : 464) ; Cu(II)-phénanthroline (selon Chen et Sigman [1987] Science 237 : 1197) ; enzyme de restriction de classe IIS (selon Kim et coll. [1988] Science 240 : 504) ; ADNase hybride (selon Corey et coll. [1989] Biochem. 28 : 8277) ; bléomycine (selon Umezawa et coll. [1986] J. Antibiot. (Tokyo) Ser. A 19 : 200) ; néocarzinostatine (Goldberg et coll. [1981] Second Annual Bristol-Myers Symposium in Cancer Research, Academic Press, New York page 163) et méthidiumpropyle-EDTA-Fe(II) (selon Hertzberg et coll. [1982] J. Am. Chem. Soc. 104 : 313). L'élimination des protéines, comme par traitement avec une protéase, est également généralement souhaitable et des procédés d'élimination des protéines depuis les échantillons d'acide nucléique, sans perte appréciable de l'acide nucléique, sont bien connus dans la technique.

Les TNA de la présente invention doivent être assez longs pour qu'il y ait une quantité suffisante d'hybride double brin flanquant le TBR de sorte qu'un TBA peut se

lier sans être perturbé par les extrémités non ligaturées du fragment. Typiquement, des fragments dans la gamme allant d'environ 10 nucléotides à environ 100 000 nucléotides, et de préférence, dans la gamme allant d'environ 20 nucléotides à environ 1000 nucléotides sont utilisés comme taille moyenne des fragments TNA. Des exemples de séquences spécifiques de TNA, qui peuvent être détectées, sont les séquences complémentaires aux séquences de PNA décrites ici, pour la détection de séquences d'acide nucléique de cellule normale, de cellule anormale (comme dans les oncogènes activés, les gènes étrangers intégrés, les gènes génétiquement défectueux) et spécifiques de pathogène, pour lesquelles on connaît des protéines spécifiques liant l'acide nucléique, ou qui peuvent être produites selon les procédés décrits dans la présente description. En référence à la figure 7, un TNA spécifique du VIH est représenté en SEQ ID N°37.

4. Extensions du PNA à l'aide des BNA, leur préparation et amplification de signal

Dans des conditions d'hybridation, des BNA peuvent être ajoutés, lesquels s'hybrident aux PNA, aux hybrides PNA-BNA, aux BNA et/ou aux hybrides BNA-BNA. Les additions mentionnées ci-dessus peuvent être réalisées de manière polymère non vectorielle ou de manière vectorielle, avec un ordre connu des BNA.

En référence à la figure 2a, une amplification simple est présentée. Un polymère d'amplification est produit en additionnant deux BNA, illustrés à la figure 2a(Ib et Ic), qui lorsqu'ils sont combinés dans des conditions d'hybridation, avec le PNA, forment des hybrides PNA-BNA-BNA, composés du PNA et des « extensions

d'amplification », illustrés à la figure 2a(IIa, IIb, IIc et IID), laissant au moins une séquence 1/2 BBR non appariée. Chaque séquence 1/2 BBR non appariée, illustrée à la figure 2a(IIa, IIb, IIc, IID) peut s'hybrider à des BNA supplémentaires pour former des extensions « d'amplification » supplémentaires. Chaque séquence 1/2 BBR non appariée, illustrée à la figure 2a(IIa, IIb, IIc et IID), peut s'hybrider à des HNA ajoutés, illustrés à la figure 2a(IIIa et IIIb). L'hybridation des HNA, qui ne peuvent pas s'hybrider aux BNA supplémentaires, agissent pour « coiffer » l'addition des BNA au PNA, comme illustré à la figure 2a(IVa, IVb, IVc et IVd).

En référence à la figure 2b, il est possible de contrôler et de spécifier l'ordre et les composants des extensions sur le PNA. Si un seul BBR est requis, un HNA contenant la séquence complémentaire au 1/2 BBR dans le PNA est ajouté au PNA pour produire un seul BBR et pour « coiffer » toute extension « d'amplification » sur le PNA. Si des BBR supplémentaires doivent être ajoutés au PNA, une extension contrôlée du PNA peut être réalisée.

En référence à la figure 2b, une seule amplification est présentée. Une extension polymère vectorielle est réalisée en ajoutant un BNA, qui est spécifique du PNA, comme illustré à la figure 2b(Ia et IIa), qui lorsqu'il est combiné au PNA dans des conditions d'hybridation, forme des hybrides PNA-BNA-BNA, composés du PNA et des extensions « d'amplification ». Ces extensions, si elles sont marquées d'un OSA, procurent un procédé pour fortement amplifier tout signal produit par liaison d'un PNA à un TNA dans l'échantillon. De plus, en liant les BBA marqués aux BBR dans le polymère, une amplification supplémentaire est atteinte.

L'un quelconque d'un certain nombre de procédés peut être utilisé pour préparer les BNA, y compris par exemple, la synthèse via une chimie connue ou via des procédés de production d'ADN recombiné. Dans le dernier
5 procédé, un nombre essentiellement non limité de BNA peut être produit simplement et de manière peu onéreuse, par exemple par production dans des procaryotes (*E. coli* par exemple) d'un ADN plasmide ayant des répétitions multiples des séquences BNA spécifiques, flanquées de
10 sites de restriction ayant des extrémités en saillies. De cette manière, par exemple, les sites de l'opérateur gauche ou droit du bactériophage lambda, ou tout autre séquence d'ADN ou d'acide nucléique connue pour spécifiquement et fermement se lier à un BBA particulier,
15 comme une protéine liant l'ADN ou l'ARN, peuvent être produits en un nombre essentiellement non limité de copies, chaque copie étant flanquée d'un EcoRI, PstI, BamHI ou n'importe lequel d'un certain nombre d'autres sites communs d'endonucléase de restriction. En variante,
20 un polymère avec sites répétés, peut être excisé par des sites uniques de restriction, non présents dans le polymère. De grandes quantités de plasmide pBR322, pUC ou d'autre plasmide ayant plusieurs copies de ces séquences, sont produites par des procédés bien connus
25 dans la technique, le plasmide est coupé avec l'enzyme de restriction flanquant le site polymérisé et les copies multiples libérées des opérateurs sont isolés par chromatographie ou tout autre moyen approprié de la technique. Le BNA, avant utilisation, est alors séparé en
30 brin et peut alors être introduit pour la polymérisation à un PNA, codant une copie simple brin, complémentaire à l'opérateur comme un 1/2 BBR. Les BNA peuvent être polymérisés de manière vectorielle sur le PNA, en

utilisant différents enzymes de restriction, qui
flanquent chaque répétition du polymère dans le plasmide
utilisé pour produire les copies multiples du BNA. En
variante, le polymère BNA peut être hybridé au PNA via
5 des saillies à une extrémité ou les deux du polymère BNA,
sans nécessiter de séparation des brins et d'annelage de
chaque segment BNA. Des exemples de séquences spécifiques
de BNA sont données ci-dessus, dans la partie intitulée
Description des Séquences, sous la forme de SEQ ID N°35-
10 36. Pour stabiliser le polymère BNA, une ADN ligase peut
être utilisée pour lier de manière covalente les BNA
hybridés.

15 5. Les Acides Nucléiques en Epingle à Cheveux (HNA) et leur préparation

Les HNA comprennent au moins deux parties
principales, jointes ensemble. Une séquence simple brin,
qui est complémentaire à un 1/2 BBR, et une région
d'acide nucléique double brin, formée, dans des
20 conditions d'hybridation, par l'auto-association de
séquences auto-complémentaires dans le HNA. En référence
à la figure 1(IIc) des dessins, le 1/2 BBR du HNA peut
être construit de manière à être complémentaire à la
séquence 1/2 BBR du PNA. En référence à la figure 1(I,
25 IIc et IIIc) des dessins, le HNA indiqué ci-dessus,
lorsqu'il est ajouté au PNA dans des conditions
d'hybridation, forme un hybride PNA-HNA contenant un BBR.
En référence à la figure 1(IIIc, IVc et Vc) des dessins,
un hybride PNA-HNA, dans des conditions d'hybridation,
30 lors de l'addition du TNA, peut former un hybride TNA-
PNA-HNA contenant un TBR et un BBR.

En référence aux figures 2a et 2b, les HNA peuvent
être utilisés pour « coiffer » ou terminer l'addition des

extensions BNA au PNA. Les deux BNA de la figure 2a(Ib et Ic) peuvent s'associer pour former l'hybride représenté à la figure 3(IVb) ou peuvent s'hybrider directement et individuellement au PNA comme illustré à la figure 2a(Ia-c, IIa-d). Les deux HNA (représentés à la figure 2a(IIIa et IIIb)) peuvent terminer l'hybridation du BNA aux autres BNA, qui s'étendent à partir du PNA, comme illustré à la figure 2a(IVa-d). Le HNA de la figure 2a(IIIa) peut terminer les hybrides PNA-BNA représentés à la figure 2a(IIb et IID) et tout hybride PNA-BNA avec un 1/2 BBR simple brin, qui est complémentaire au 1/2 BBR du HNA illustré à la figure 2a(IIIa). De manière similaire, le HNA de la figure 2a(IIIb) peut terminer les hybrides PNA-BNA représentés à la figure 2a(IIa et IIc) et tout hybride PNA-BNA avec deux 1/2 BBR simple brin, qui sont complémentaires aux 1/2 BBR du HNA illustré à la figure 2a(IIIb).

Des HNA sont construits, qui vont terminer les hybrides PNA-BNA, qui sont construits par addition séquentielle des BNA au PNA, comme illustré à la figure 2b. Les séquences 1/2 BBR simple brin, illustrées à la figure 2b(Ia, IIIa, Va et VIIa) sont spécifiquement complémentaires aux séquences 1/2 BBR simple brin, illustrées à la figure 2b(Ib, IIIb, Vb et VIIb) et produisent les hybrides PNA-BNA-HNA coiffés uniques, séquences 1/2 BBR simple brin, illustrés à la figure 2b(Ic, IIIc, Vc et VIIc).

Les séquences auto-complémentaires du HNA et la séquence de boucle, qui lie les séquences auto-complémentaires en épingle à cheveux, peuvent avoir n'importe quelle composition et longueur, tant qu'elles n'entravent ou n'inhibent pas la présentation du 1/2 BBR

simple brin, qui compose une partie du HNA, par le HNA ou
lient sélectivement le BBA ou le TBA. Les séquences de
boucle doivent être choisies de sorte que la formation de
la boucle n'entrave pas la formation de l'épingle à
5 cheveux. Un exemple d'un HNA utile dans cette application
est donnée par SEQ ID N°44 (voir Description des
Séquences, ci-dessus).

10 6. Les Assemblages de Liaison de Cible (TBA) et leur préparation

Un TBA peut être toute substance qui lie un TBR
particulier, formé par hybridation de TNA et PNA
particuliers, pourvu que le TBA doit avoir au moins les
attributs suivants :

15 (a) Le TBA doit lier les TBR d'une manière qui est
très spécifique du ou des TBR d'intérêt. Ainsi, le TBA
doit différencier les TBR présents dans l'hybride TNA-PNA
et dans les séquences duplex similaires formées par les
hybrides PNA-CNA. Le TBA doit lier l'hybride PNA-CNA avec
20 une avidité suffisamment faible pour que lors du lavage
du complexe TBA-TNA-PNA, l'hybride PNA-CNA est déplacé et
l'hybride PNA-TNA n'est pas déplacé ;

(b) Le TBA doit lier avidement le ou les TBR créés
par l'hybridation du TNA au PNA. Des affinités de liaison
25 dans l'intervalle allant de 10^{-5} à environ 10^{-12} ou plus
sont généralement considérées comme suffisantes. Comme
noté ci-dessous, il peut être désirable d'utiliser un TBA
particulier, qui a une très faible avidité pour un TBR
particulier, mais qui a une affinité fortement accrue
30 lorsqu'une configuration particulière de plusieurs TBR
est donnée de sorte que le carré de l'affinité du TBA
pour chaque TBR devient l'affinité d'intérêt pour ce TBA
particulier.

Des exemples de composants liant l'ADN, utiles pour la formation des TBA, comprennent, mais ne sont pas limités, au NF-kB, à la protéine E2 de papillomavirus, au facteur de transcription SP1, aux enzymes de restriction inactives, aux anticorps, etc. Chacune de ces protéines a été reconnue dans la technique, comme contenant des séquences, qui se lient à des séquences particulières d'acide nucléique et les affinités de ces interactions sont connues. Naturellement, le procédé de la présente invention n'est pas limité à l'utilisation de ces protéines liant l'ADN connues ou leurs fragments. A partir de la présente description, il sera évident à l'homme de métier, que le présent procédé peut s'appliquer aisément à l'utilisation de nouveaux TBA présentant au moins les attributs requis, notés ci-dessus. Ainsi par exemple, dans le document WO 92/20698, une molécule liant l'ADN, spécifique de séquence, comprenant un conjugué d'oligonucléotide formé par l'attachement covalent d'un médicament liant l'ADN à un oligonucléotide formant triplex est décrit. Le procédé de cette description peut être utilisé pour produire de nouveaux TBA à utiliser selon la présente description, pourvu que les TBA ainsi formés rencontrent les critères décrits ci-dessus. En outre, les procédés des brevets US N°5 096 815, 5 198 346 et WO 88/06601, peuvent être utilisés pour générer de nouveaux TBA, à utiliser selon le procédé de l'invention. Des anticorps spécifiques ou des parties de ceux-ci peuvent être utilisés (voir par exemple, Blais 1994).

Lorsque le TBA est une protéine, ou un complexe de protéines, il convient de comprendre que l'un quelconque d'un certain nombre de procédés de routine peut être utilisé pour produire le TBA. Le TBA peut être isolé de

son environnement naturel dans la nature, ou si ceci est non faisable, il peut être produit par les techniques standard de la biologie moléculaire. Ainsi, avec le NF-kB comme exemple, l'utilisation de parties liant l'ADN des sous-unités p50 ou p65, cet assemblage de liaison peut être produit selon les procédés de recombinaison connus dans la technique (voir par exemple Ghosh [1990] Cell 62 : 1019-1029, décrivant le clonage de la sous-unité liant l'ADN p50 de NF-kB et l'homologie de cette protéine avec *rel* et *dorsal*).

Beaucoup de protéines liant l'ADN ou un autre acide nucléique sont connues, lesquelles peuvent être utilisées comme ou dans des TBA selon l'invention. Une fois que la séquence des acides aminés d'une protéine quelconque liant l'ADN, l'ARN:ADN, l'ARN ou un autre acide nucléique, est connue, une séquence d'ADN appropriée, codant la protéine, peut être préparée par des moyens enzymatiques, ou une copie d'ADNc de l'ARNm codant la protéine provenant d'une source tissulaire appropriée peut être utilisée. De plus, des copies génomiques codant la protéine peuvent être obtenues et les introns épissés selon des procédés connus dans la technique. En outre, les TBA peuvent être chimiquement synthétisés.

Une fois que l'on a obtenu la séquence codante appropriée, une mutagenèse dirigée peut être utilisée pour altérer la séquence des acides aminés codées, pour produire des protéines liant l'acide nucléique, mutantes, présentant des caractéristiques de liaison plus désirables que celles de la protéine liant l'acide nucléique, initiale. Comme exemple de ce processus, la séquence des acides aminés des parties liant l'ADN du NF-kB peut être altérée, de manière à produire une molécule NF-kB', qui lie plus fermement le site de liaison du NF-

kB (voir les exemples ci-dessous, détection du VIH et blocage du VIH).

Pour donner un aperçu plus détaillé de cet aspect de l'invention, les considérations suivantes doivent être notées. Avec le NF-kB comme exemple, on peut préparer un TBA à l'aide de la molécule NF-kB naturelle. Cependant, parce que cette molécule est présente en quantités extrêmement faible dans les cellules et parce que les sous-unités de cette protéine liant l'ADN ont été clonées, il serait plus raisonnable de préparer de grandes quantités du complexe via des moyens de recombinaison de l'ADN comme cela a déjà été réalisé pour cette protéine (voir par exemple, Ghosh [1990] Cell 62 : 1019-1029). Le NF-kB est un inducteur pléiotrope de gènes impliqués dans les réponses immunes, inflammatoires et de régulation de la croissance à des attaques pathogènes primaires (virales, bactériennes ou stress) ou des attaques pathogènes secondaires (cytokine inflammatoire). Le NF-kB est une protéine liant l'ADN dimère, comprenant une sous-unité p50 et une sous-unité p65, les deux étant en contact et se liant à des séquences spécifiques d'ADN. A l'état inactivé, le NF-kB réside dans le cytoplasme cellulaire, complexé à un inhibiteur spécifique, I-kB, pour former un hétérodimère cytoplasmique. Par activation, l'inhibiteur est décomplexé, et le dimère p50-p65 est relocalisé via un signal spécifique de localisation nucléaire (NLS) dans le noyau de la cellule, où il peut lier l'ADN et effectuer son rôle comme activateur de la transcription de nombreux gènes (voir Grimm et Baeuerle [1993] Biochem. J. 290 : 297-308, pour une revue de l'état de la technique concernant le NF-kB).

Le dimère p50-p65 se lie avec une affinité picomolaire à des séquences appariées au consensus

GGGAMTNYCC (SEQ ID N°117), avec des affinités légèrement différentes en fonction de la séquence exacte. Il convient de noter que les homodimères de p50 et p65 ont été également observés. Ces homodimères présentent des propriétés biochimiques différentes, ainsi que des affinités légèrement différentes pour les séquences de liaison dans et similaires au consensus ci-dessus. Ainsi, en fonction des caractéristiques désirées de liaison du TBA, un hétérodimère p50-p65, un homodimère p50-p50 ou un homodimère p65-p65 ou des fragments des dimères mentionnés peuvent être utilisés.

Une voie, par laquelle différents nouveaux TBA peuvent être produits, est représentée schématiquement à la figure 9. Les unités de reconnaissance d'acide nucléique du TBA peuvent être assemblées et associées avec des unités similaires ou non, de reconnaissance d'acide nucléique de TBA, via un « chaperon ». Le chaperon est une structure sur laquelle les différents éléments de reconnaissance du TBA sont construits et qui confère des propriétés désirables aux unités de reconnaissance d'acide nucléique. Le chaperon est composé d'une séquence quelconque, qui fournit des séquences d'assemblage, de sorte que des unités de reconnaissance d'acide nucléique, identiques ou différentes, sont rapprochées et associées de manière stable les unes avec les autres. Ainsi, par exemple, dans le cas d'un TBA destiné à lier fermement des TBR NF-kB, un TBA est assemblé en fournissant des séquences cro de lambda comme séquences d'assemblage, liées à des séquences liant l'acide nucléique de p50 ou p65 de NF-kB. Les séquences liant l'acide nucléique p50 ou p65 sont liées aux séquences cro à l'extrémité carboxy ou amino de cro et à l'extrémité carboxy ou amino de l'unité de reconnaissance

d'acide nucléique du p50 ou du p65. Des séquences de liaison sont le cas échéant fournies pour permettre un espacement approprié des unités de reconnaissance d'acide nucléique pour la liaison optimale du TBR.

5 Les séquences d'assemblage, exemplifiées ci-dessus par les séquences cro et CI (SEQ ID N°104-108), comprennent tout oligopeptide stable, qui se lie naturellement et fortement à de telles séquences. Ainsi, dans le cas de cro, il est bien connu qu'un dimère de cro
10 lie les sites opérateur du bactériophage lambda (Anderson et coll. [1981] Nature 290 : 754-758 ; Harrison et Aggarwal [1990] Ann. Rev. Biochem. 59 : 933-969). Les unités monomères de cro s'associent fermement et spécifiquement l'une avec l'autre. Ainsi, par liaison des
15 séquences d'unité de reconnaissance de liaison d'ADN aux séquences cro, on obtient une association proche et ferme.

Les séquences lieu optionnelles comprennent toute séquence d'acides aminés, qui n'interfère pas avec
20 l'assemblage TBA ou la liaison de l'acide nucléique, et qui n'est pas labile pour libérer l'unité de reconnaissance d'acide nucléique du TBA complet. Il est désirable, mais non nécessaire, que les séquences lieu soient liées de manière covalente aux autres composants
25 de l'assemblage de liaison. L'association doit être spécifique de manière à aider à l'assemblage et la préparation des assemblages de liaison. Des exemples de telles séquences comprennent, mais ne sont pas limités aux séquences bien connues, comme différents domaines de
30 liaison dans les protéines de structure. Ainsi par exemple, dans la protéine répresseur lambda, il y a une séquence de liaison entre le domaine liant l'ADN et le domaine de dimérisation, qui est utile pour cet objet.

Beaucoup d'autres de ces séquences sont connues et leur séquence précise n'est pas critique pour la présente invention, pourvu qu'une expérimentation de routine est réalisée pour assurer la stabilité et la non-interférence avec la liaison de l'acide nucléique cible. Des exemples de telles séquences sont données ici, en tant que Met Ser et SEQ ID N°99-102. L'insertion de sites spécifiques, connus de protéolyse dans ces lieux est également une partie de la présente invention. La présence de tels sites dans les séquences lieu va procurer des avantages de préparation, permettant l'assemblage de différentes molécules à la structure du chaperon.

En plus des unités de reconnaissance de l'acide nucléique, des séquences optionnelles de liaison et des séquences d'assemblage, les nouveaux TBA de l'invention ont le cas échéant, des séquences d'asymétrie ou PILOTE de TNA et une ou plusieurs unités OSA. Les séquences d'asymétrie sont proposées pour encourager ou prévenir certaines associations désirables ou indésirables. Par exemple, dans le cas où un TBA ayant des unités de reconnaissance d'ADN p50 homodimères est désiré, des séquences d'asymétrie sont fournies pour rompre l'association naturelle plus forte des sous-unités p50 et sous-unités p65 de NF-kB, sans rompre les séquences d'assemblage pour la mise en commun des sous-unités p50. Des exemples de telles séquences sont donnés ici sous la forme des SEQ ID N°85-92 et SEQ ID N°105 et 106.

Dans une autre configuration, les séquences de la sous-unité p50 de NF-kB sont mise en association proche avec les séquences de l'unité de reconnaissance d'ADN du facteur de transcription SP1. Ceci est désirable dans le cas où un motif de liaison NF-kB/SP1 est d'importance, comme dans le LTR de VIH où un motif d'au moins six sites

de reconnaissance de protéine liant l'ADN, deux NF-kB, trois SP1 et un site TATA sont connus. Vu qu'il est connu également, que le deuxième site NF-kB et le premier site SP1 sont important pour la régulation de la transcription du VIH (Perkin et coll. [1993] Embo J. 12 : 3551-3558), cette configuration particulière du TBA est utile non seulement dans la détection du VIH, mais également comme agent thérapeutique ou prophylactique contre une infection par le VIH (voir ci-dessous). De manière similaire, la longue région de contrôle (LTR) du papillomavirus humain peut être utilisée comme région de contrôle clé selon ce procédé.

Au vu des différents éléments qui peuvent être associés, à la manière d'une cassette, selon ce procédé de formation de TBA, une variété essentiellement non limitée de TBA est produite. A la figure 10, une série de différentes molécules, indiquées « VIH-détection I-IV » est exemplifiée, où « CHAP » représente le chaperon, « nfkb » représente les sous-unités NF-kB, « spl » représente l'unité de reconnaissance d'acide nucléique du facteur de transcription SP1, et « TATA » représente un dimère de l'unité de reconnaissance d'ADN d'une protéine liant l'ADN à séquence TATA (TBP), également connue comme protéine liante TATA, ou TBP. Ces configurations sont encore exemplifiées ci-dessous et font partie de la présente invention.

Dans une autre configuration encore, la structure modulaire représenté à la figure 9 est adaptée pour la détection et/ou le traitement ou la prophylaxie d'un pathogène complètement différent. A la figure 11, dans manière similaire aux molécules « VIH-détection I-IV » décrites ci-dessus, une série de molécules « HPV-détection I-IV » est produite. Dans cette forme de

réalisation, on tire avantage des propriétés de liaison à l'ADN de la protéine E2 du papillomavirus humain (HPV). En outre, on tire avantage des rôles de SP1 et de TBP en procurant des unités spécifiques de reconnaissance de l'ADN, adaptées pour lier ces séquences dans le génome HPV. Dans la formation des TBA spécifiques E2 à utiliser dans la détection d'une infection par HPV, il peut être désirable d'utiliser l'une quelconque de SEQ ID N°75-84 ou 93-98 comme unités de reconnaissance de l'ADN E2. Un TBA contenant un domaine liant l'ADN dimère E2 bovin et dimère E2 humain peut être particulièrement utile.

Les différentes séquences décrites ci-dessus peuvent être liés chimiquement à l'aide de matériaux de départ purement oligopeptidiques, ou elles peuvent être liées par recombinaison d'acides nucléiques codant, via le code génétique bien connu, les différents sous-éléments. Dans le cas d'une production par recombinaison, la liaison des séquences codant cro aux séquences des unités de reconnaissance d'acide nucléique pour former les TBA est avantageuse parce que non seulement, le cro agit comme séquences d'assemblage dans le chaperon, mais il agit également pour diriger le repliement approprié des éléments de reconnaissance de l'acide nucléique. Des séquences exemplaires pour les chaperons sont données ici comme SEQ ID N°104-108. De plus, dans le cas où des structures d'ordre supérieur, comprenant plusieurs sites de liaison, sont désirées, comme dans le TBA pentamère NF-kB/NF-kB/SP1/SP1/SP1, une conception appropriée des séquences d'asymétrie permet la préparation de telles structures.

De la manière précédente, on prépare des TBA, qui lient leurs sites de liaison de même origine avec une affinité élevée. Par exemple, on s'attend à ce que les

composants liant l'ADN NF-kB des TBA de la figure 10 lient le LTR de VIH avec une affinité allant de 10^{-8} à 10^{-12} molaire. Des séquences utiles comme unités de reconnaissance de l'ADN sont proposées comme SEQ ID N°63-71, 73-84, 93-98 et 104-108 et encore exemplifiées ci-dessous.

Au vu de la description précédente de l'assemblage dirigé des protéines liant l'acide nucléique à l'aide des séquences d'assemblage et d'asymétrie (ou pilote), l'homme de métier conviendra qu'un procédé généralement applicable pour l'assemblage des structures protéiques est proposé par l'invention. La généralité de ce procédé est démontrée encore, en considérant, à titre d'exemple, l'utilisation d'une interaction anticorps-épitope dans l'assemblage des structures désirées. Par la spécificité, une structure de protéine liant l'ADN peut être assemblée en liant une sous-unité p50 de NF-kB à un antigène, comme un hormone stimulant les mélanocytes (MSH) circularisée (par des liens disulfure). Cette molécule pro-MSH peut alors être liée à un anticorps anti-MSH pour donner un nouvel assemblage liant l'acide nucléique, l'antigène et l'anticorps agissant comme séquences d'assemblage.

La structure modulaire proposée à la figure 9 révèle qu'une grande variété de TBA peut être assemblée à l'aide de différentes combinaisons de composants. Ainsi, des formes de réalisation représentatives de cette structure générale sont données comme SEQ ID N°109-116.

7. Les Assemblages de Liaison d'Amplification (BBA) et leur préparation

Un BBA peut être toute substance qui lie un BBR particulier, formé par hybridation de PNA et de BNA particuliers, y compris lorsque plusieurs BNA (jusqu'à et

y compris « n » BNA, à savoir BNA_n , où « n » est théoriquement $0-\infty$, mais se situe pratiquement dans l'intervalle allant de 1 à 100) sont polymérisés sur le PNA pour l'amplification du signal, pourvu que le BBA ait les attributs suivants :

(a) Le BBA doit lier les BBR de sorte qu'il est très spécifique du BBR intéressant. Ainsi, le BBA doit différencier les BBR présents dans l'hybride PNA-BNA et les séquences duplex similaires dans les hybrides BNA-CNA ou d'autres CNA. Ainsi, lorsqu'un mésappariement même de une seule base ou des différences de conformation avec ou sans mésappariement de base se présentent dans la production de l'hybride PNA- BNA_n ou PNA- BNA_n -HNA, le BBA doit lier l'hybride avec une avidité suffisamment faible pour que lors du lavage du complexe TBA-TNA-PNA- BNA_n , le BBA soit déplacé des séquences CNA, mais pas des séquences BBR.

(b) Le BBA doit lier avidement les BBR. Des affinités de liaison dans la gamme de 10^{-5} à environ 10^9 ou plus sont généralement considérées comme suffisantes.

Des exemples de BBA comprennent, mais sans limitation, cro et la protéine répresseur du bactériophage lambda, CI. En outre, voir le brevet US N°4 556 643, qui suggère d'autres séquences d'ADN et des protéiques liantes spécifiques comme des répresseurs, des histones, des enzymes modifiant l'ADN et une protéine catabolite activateur de gène. Voir également le document EP 0 453 301, qui suggère une série de protéines liant spécifiquement des séquences de nucléotides (NSSBP) comme le répresseur de la tétracycline, le répresseur lac, et le répresseur du tryptophane. Chacun de ces BBA a été reconnu dans la technique comme liant des séquences particulières, connues d'acide nucléique et les affinités

de ces interactions sont connues. Naturellement, le procédé de la présente invention n'est pas limité à l'utilisation de ces BBA connus. A partir de la présente description, l'homme de métier peut aisément appliquer l'utilisation de nouveaux BBA présentant au moins les attributs requis, indiqués ci-dessus du présent procédé.

Des exemples de nouveaux BBA utiles selon cet aspect de l'invention, comprennent de nouvelles protéines basées sur le motif d'un ADN ou ARN connu ou un protéine liant l'ADN:ARN comme cro ou la protéine répresseur CI de λ . De préférence, de telles modifications sont faites pour améliorer la manipulation de ces composants de l'invention. Ainsi, il peut être désirable d'ajouter une concentration élevée de cro à un dosage. Une des qualités négatives de cro est qu'à hautes concentrations, la liaison de cro à son ADN cible entre en compétition avec les interactions cro-cro. Ainsi, par exemple, un cro chaperonné ou muté peut être produit, lequel n'a pas ces défauts. Des exemples de tels chaperons altérés sont SEQ ID N°105-106 et 108. Des procédés connus dans la technique, comme la production de nouvelles protéines liant la cible à l'aide de populations diverses d'acides nucléiques et la sélection de bactériophages liants des cibles particulières, présélectionnées (à savoir, ladite technologie de présentation sur phage, voir la discussion ci-dessus pour la production de nouveaux TBA) peuvent être utilisés pour produire de tels nouveaux BBA ainsi que les nouveaux TBA mentionnés ci-dessus.

Lorsque le BBA est une protéine, ou un complexe de protéines, il convient de noter que l'un quelconque d'une certain nombre de procédés de routine peut être utilisé pour produire le BBA. Le BBA peut être isolé de son environnement naturel, ou si ceci est non réalisable,

produit par les techniques standard de la biologie moléculaire. Ainsi par exemple, la séquence de la protéine cro est connue et n'importe quel clone moléculaire du bactériophage lambda peut être utilisé pour obtenir les acides nucléiques appropriés codant cro pour une production de celui-ci par recombinaison. En outre, les TBA décrits ici peuvent être utilisés comme des BBA, pourvu que différents TBA sont utilisés pour lier les TBR et BBR.

10

8. Utilisation des BBA et BBR pour localiser et amplifier la localisation des complexes PNA-TNA-TBA (voir figure 8)

Dans une forme de réalisation de l'invention, la liaison très spécifique et ferme des TBA composés de composants liant l'acide nucléique, est utilisée pour produire un dosage en sandwich, amplifiable d'acide nucléique. Selon un aspect de cette forme de réalisation, un support solide est revêtu d'un premier TBA pour créer un TBA immobilisé. En solution, un PNA et un TNA sont mis en contact dans des conditions d'hybridation, puis mis en contact avec le TBA immobilisé. Seules les interactions PNA-TNA, qui forment le TBR spécifique, reconnu par le TBA immobilisé, sont retenues lors du lavage de la surface solide qui lie le complexe TBA-TBR.

15

20

La détection du TBR lié est réalisée par liaison d'Acides Nucléiques d'Amplification, BNA, au 1/2 BBR présents sur les PNA dans des conditions d'hybridation. De cette manière, même si un seul complexe TBA-TBR est lié au TBA immobilisé, un grand signal amplifié peut être produit par polymérisation de plusieurs BNA au TNA immobilisé. Chaque BNA qui lie le TNA, forme un BBR, qui peut être lié par des BBA, qui, comme les TBA immobilisés sur la surface solide, peuvent être choisis pour leur

25

30

liaison très ferme et spécifique à des structures particulières d'acide nucléique. Ainsi, selon cette forme de réalisation, le TBA immobilisé peut contenir la partie liant l'ADN du NF-kB, qui lie de manière très spécifique et ferme, les sites de liaison NF-kB formés par hybridation du TNA et du PNA pour former un tel site.

Parce qu'il est bien connu qu'il existe des sites de liaison NF-kB dans le génome humain normal et dans les longues répétitions terminales du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), la présente invention propose un procédé de différenciation entre les sites humains « normaux » et les sites présents dans des cellules à cause d'une infection par VIH. Par conséquent, dans un test destiné à déterminer la présence ou l'absence de l'ADN de VIH dans un échantillon d'ADN humain, les sites de liaison NF-kB de VIH peuvent être envisagés comme le TNA, et les sites de liaison NF-kB humains normaux peuvent être envisagés comme les CNA. Selon le procédé de l'invention, la discrimination entre ces TNA et CNA est réalisée en tirant avantage du fait que dans la LTR de VIH, il existe deux sites de liaison NF-kB, suivis de trois sites SP1 (voir par exemple, Koken et coll. [1992] Virology 191 : 968-972), alors que des sites de liaisons NF-kB cellulaires avec les mêmes séquences ne sont pas trouvés en tandem.

Dans les cas où le TNA contient plus d'un 1/2 TBR et qu'il est désirable de rechercher les applications thérapeutiques et prophylactiques des TBA, il peut être désirable d'utiliser plus d'un TBA, chacun avec la capacité de lier un TBR dans le complexe TNA-PNA. Dans ce cas, il peut être avantageux de sélectionner, comme composants des TBA, des domaines liant l'ADN ou liant l'ARN avec moins d'affinité pour son TBA que le domaine

liant l'ADN ou liant l'ARN de type sauvage. Etant donné que les TBA qui sont impliqués dans la liaison à plusieurs TBR peuvent être assemblés avant liaison à leur TBR ou assemblés après liaison à leur TBR, les TBA individuel ne vont pas bloquer les TBR correspondants dans les autres génomes que le génome cible à moins que les TBR soient spatialement capables de lier le complexe TBA assemblé. Une caractéristique de l'assemblage multimère des TBA, qui est spécifiquement revendiqué ici en tant que partie de l'invention, est que l'on s'attend à ce qu'un tel assemblage multimère a une affinité très réduite pour un seul site dans le TNA. Cependant, vu que la liaison est fortement accrue par rapport à un TBA quelconque, on doit s'attendre à ce que le complexe TBA n'entre pas en compétition pour la liaison de n'importe quel TBR unique avec les protéines natives correspondantes *in situ*, mais lie fermement les séquences dans l'hybride TNA-PNA contenant les TBR pour chacun des composants liant l'acide nucléique assemblés dans le TBA. Le complexe TBA doit être assemblé et les lieurs ajustés dans les TBA individuels de manière à permettre aux régions liant l'acide nucléique présentes dans le complexe TBA à atteindre et lier simultanément ces cibles.

Une fois que les hybrides TNA-PNA se sont formés et ont été mis en contact avec le TBA immobilisé, l'acide nucléique non lié est lavé de la surface immobilisée et les hybrides immobilisés sont détectés. Ceci est réalisé par l'une quelconque de plusieurs manières. Dans un aspect de l'invention, le PNA est marqué avec un OSA, comme un radionucléide, des billes colorées, ou une enzyme capable de former un produit réactionnel coloré. En outre, en plus d'avoir un ou plusieurs 1/2 TBR, le PNA

peut également contenir au moins un 1/2 BBR. Les séquences des 1/2 BBR sont choisies de manière à être complémentaires aux séquences 1/2 BBr uniques dans les BNA. Dans la forme de réalisation décrite ci-dessus, par exemple, où le TBA est NF-kB et le TBR formé par hybridation TNA-PNA est un ou plusieurs sites NF-kB, le 1/2 BBR peut fournir des séquences hybridables (à savoir, complémentaires, simple brin) aux opérateurs gauches ou droits du bactériophage lambda (voir par exemple, Ptashne [1982] Scientific American 247 : 128-140, et les références y citées pour les séquences de ces opérateurs). Ceux-ci peuvent être polymérisés sur le 1/2 BBR du PNA de manière vectorielle (voir figures 2 et 3) pour donner jusqu'à « n » BBR et chaque BBR forme un site de liaison cro. Un cro marqué de manière enzymatique, radioactive ou autre, est mis en contact avec le complexe TBA-TNA-PNA-(BNA)_n. De cette manière, un signal très sélectif et amplifié est produit. Le signal produit avec un PNA ayant un seul 1/2 TBR indique la réussite du dosage par liaison TBA-TBR et polymérisation des BNA pour produire un signal à partir des sites cellulaires (à savoir, des CNA). L'absence de signal lorsqu'un TBA dimérisé est utilisé, indique que dans le TNA, il n'y a pas de LTR de VIH car aucun site de liaison NF-kB double n'est présent. D'autre part, la présence du signal avec le NF-kB dimère indique une infection par VIH. Comme exemple spécifique de la description précédente de cette forme de réalisation de l'invention, voir l'exemple 6 décrivant un kit de test VIH.

Naturellement, l'homme de métier reconnaîtra que la description précédente peut être soumise à plusieurs modifications dans le choix des PNA, TNA, TBA, BNA et BBA. De plus, dans des systèmes autres que le VIH,

l'homme de métier reconnaîtra que le procédé général décrit ci-dessus peut s'appliquer de manière similaire. Cependant, ces autres applications peuvent être plus simples que le procédé décrit ci-dessus lorsque les TBA
5 utilisés ne peuvent pas reconnaître n'importe quel site cellulaire normal et donc, avoir recours à la dimérisation ou d'autres procédés de discrimination entre les TNA et les CNA peut être moins critique. Dans la conception des sondes et assemblages de liaison pour ces
10 autres systèmes, l'homme de métier sera guidé par les principes et considérations suivants.

Dans la forme de réalisation décrite ci-dessus, le recours à l'utilisation des parties liant l'ADN de la protéine NF-kB comme TBA et des éléments de liaison
15 reconnaissant NF-kB comme TBR, est que ces éléments forment un « point de contrôle » important pour la répllication du VIH. A savoir, il est connu que le VIH doit utiliser le NF-kB comme caractéristique critique dans son cycle de vie répllicative. Des points de contrôle
20 similaires pour d'autres pathogènes sont choisis et utilisés comme base pour la détection selon les procédés décrits ici.

A partir de la description précédente des caractéristiques générales de l'invention et de son mode
25 de fonctionnement, l'homme de métier reconnaîtra qu'il existe une multiplicité de modes spécifiques de mise en pratique de l'invention. A titre d'exemple, le procédé de l'invention peut être adapté à un procédé et des dispositifs utilisant les kits de test chromatographique
30 décrits dans les brevets US N°4 690 691 et 5 310 650 (les brevets '691 et '650). Dans ces brevets, un milieu poreux est utilisé pour immobiliser un TNA ou une sonde de capture, et un solvant être utilisé pour transporter une

phase mobile contenant un PNA marqué, si le TNA est immobilisé, ou le TNA, sir une sonde de capture est immobilisée, dans la « zone de capture ». Une fois que le TNA est lié dans la zone de capture, par immobilisation directe de celui-ci ou par capture, un PNA marqué est chromatographié sur la zone de capture et tout marqueur lié est détecté.

L'adaptation de la présente invention à un tel système procure l'amélioration de l'utilisation d'un Assemblage de Liaison de Cible dans la zone de capture, et par conséquent, la capture de seulement les séquences TBR parfaitement appariées ou d'autres confirmations d'acide nucléique représentant des TBR, liés spécifiquement par le TBA dans les duplex TNA-PNA en vertu de la discrimination sensible précédemment décrite par le TBA entre les TNA et CNA.

Une fois que les hybrides TNA-PNA sont liés au TBA immobilisé, le signal est amplifié par addition de BNA ou chromatographie de BNA sur la zone de capture. Finalement, le signal peut être encore amplifié par addition de BBA ou chromatographie de BBA marqués sur la zone de capture. De cette manière, la facilité de réalisation des étapes d'analyse décrites dans les brevets '691 et '650 est améliorée en procurant la capacité supplémentaire d'augmenter la spécificité et par amplification, la sensibilité du procédé décrit dans ces brevets.

L'homme de métier reconnaîtra également que le procédé de la présente invention peut être réalisé dans des plaques de microtitrage ou par automatisation. L'utilisation de machines comprenant le procédé de l'invention tombe naturellement dans le cadre de la présente description et des revendications annexées. Par

exemple, l'invention peut être adaptée à l'utilisation d'instruments comme l'analyseur de table IMx de Abbott Laboratories (Abbott Park, IL). Le IMx est actuellement conçu pour effectuer un immunodosage de polarisation par fluorescence (FPZA, voir Kier [1983] KCLA 3 : 13-15) et un immunodosage enzymatique de microparticules (MEZA, voir Laboratory Medicine, volume 20, N°1, janvier 1989, pages 47-49). Le procédé MEZA est facilement transformé en un procédé de détection d'acide nucléique à l'aide de la présente invention en utilisant un TBA comme molécule de capture, revêtu sur des microparticules ayant une taille inférieure au micron ($< 0,5 \mu\text{m}$ en moyenne), en suspension dans une solution. Les microparticules revêtues du TBA sont pipetées dans une cellule de réaction. L'IMx pipette alors l'échantillon (PNA-TNA hybridé) dans la cellule de réaction, pour former un complexe avec le TBA. Après une période d'incubation appropriée, la solution est transférée dans une matrice inerte en fibres de verre, pour laquelle les particules ont une forte affinité et à laquelle les microparticules adhèrent. Avant ou après filtration du mélange réactionnel sur la matrice en fibres de verre, on ajoute les BNA et BBA, ou un autre moyen d'amplification et de détection de signal, lequel dépend de la formation spécifique des hybrides TNA-PNA. Le complexe immobilisé est lavé et le matériau non lié s'écoule au travers de la matrice en fibres de verre.

Les complexes liés sont détectés à l'aide de BBA marqués à la phosphatase alcaline ou de BBA marqués d'une autre manière (de manière radioactive, enzymatique, par fluorescence). Dans le cas de BBA marqués à la phosphatase alcaline, le substrat fluorescent phosphate de 4-méthylumbélliféryle ou un réactif analogue peut être

ajouté. En variante, l'enzyme peut être contournée par marquage direct des BBA avec ce réactif ou un réactif similaire. Dans chaque cas, la fluorescence ou un autre signal est proportionnel à la quantité d'hybrides PNA-TNA présents.

La fluorescence est détectée sur la surface de la matrice à l'aide d'un fluoromètre de surface, comme décrit par le fabricant du IMx. Avec des ajustements mineurs, qui peuvent être réalisés par expérimentation de routine pour optimiser un instrument comme l'IMx pour l'hybridation d'acide nucléique et des interactions acide nucléique-TBA, la présente invention est complètement adaptable aux analyses automatisées d'échantillons de TNA.

9. Autres applications diagnostiques de l'invention

Alors que la description précédente permet l'utilisation de la présente invention selon un certain nombre de modes différents, beaucoup d'utilités supplémentaires de l'invention sont aisément appréciées, par exemple dans un système à retard de mobilité.

Dans cette forme de réalisation de l'invention, une amélioration du dosage bien connu de déplacement de mobilité électrophorétique (EMSA) est réalisée de la manière suivante (voir figures 12a et 12b) :

Un échantillon d'ADN est fragmenté, par clivage statistique ou par traitement avec des endonucléases de restriction spécifiques. L'ADN dans l'échantillon est alors séparé en deux fractions aliquotes égales et un TNA spécifique est ajouté à la première fraction aliquote, mais pas à la deuxième. Les première et deuxième fractions aliquotes sont alors soumises à électrophorèse dans un gel d'acrylamide ou agarose, et le motif des

bandes d'ADN (visualisées par liaison de bromure d'éthidium ou en étant marquées de manière radioactive avec l'électrophorèse) est alors comparé pour les deux fractions aliquotes. Les fragments d'ADN ayant des sites de liaison, pour lesquels le TBA est spécifique, sont retardés au niveau de leur migration dans le milieu d'électrophorèse. En utilisant un TBA approprié, tout nombre d'ADN ou d'autres séquences d'acide nucléique peut être traqué de cette manière.

Dans une modification du EMSA décrit ci-dessus, le TNA fragmenté est hybridé au PNA et fractionné selon une première dimension. L'ADN fragmenté est alors mis à réagir avec un TBA approprié et le changement de mobilité des fragments d'ADN est noté. L'amplification du retard est possible en ajoutant des BBA comme décrit ci-dessus. (Voir par exemple, Vijg et les références y citées pour des techniques connues d'électrophorèse d'acide nucléique en deux (2) dimensions, que l'on peut appliquer dans la présente invention).

Les exemples suivants sont proposés pour encore guider l'homme de métier sur les procédés de mise en pratique de l'invention. Les techniques standard de recombinaison de l'ADN sont décrites dans Sambrook, Fritsch et Maniatis (1989) Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2^{ème} édition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, et des testes plus récents ne sont pas décrits car ceci est à présent bien connu de l'homme de métier.

Exemple 1 - Préparation de PNA et marquage des PNA

Des acides nucléiques sonde, PNA, peuvent être préparés à l'aide de moyens bien connus dans la technique. Ainsi, des PNA polynucléotide simple brin de

séquence définie peuvent être préparés via une synthèse chimique en phase solide selon Merrifield. Les PNA peuvent être préparés par synthèse automatisée à l'aide d'une technologie commercialisée, comme des résines et des machines produites ou commercialisées par Applied Biosystems, ABI ou d'autres fabricants. En variante, par des procédés connus de recombinaison d'ADN, des séquences particulières de PNA sont synthétisées *in vivo*, par exemple par clonage d'un PNA duplex dans un vecteur, qui peut se répliquer dans *E. coli*, de grandes quantités du PNA duplex peuvent être préparées. Des multimères du PNA peuvent être clonés dans le vecteur, de sorte que pour chaque mole du vecteur, plusieurs moles de PNA sont libérées par digestion du vecteur avec un fragment de restriction flanquant la séquence du PNA. Suite à la synthèse ou la production par recombinaison, les PNA sont purifiés par des procédés bien connus comme l'électrophorèse sur gel ou la chromatographie liquide à haute pression (HPLC). Si le PNA est produit sous forme de duplex, avant utilisant dans un dosage d'hybridation pour la détection de séquences cibles d'acide nucléique, les brins du PNA sont séparés par chauffage ou un autre procédé, connu dans la technique.

La séquence spécifique des bases du PNA est choisie pour refléter la séquence à détecter dans un TNA, avec la condition que selon l'invention, le PNA contient une séquence 1/2 TBR, qui est celle qui fait que, lors de l'hybridation du PNA au TNA, un TBR est formé. Vu qu'il existe un nombre essentiellement non limité de telles séquences connues dans la technique, le choix de la séquence du PNA est réalisé par le chercheur pour chaque application donnée. La séquence du LTR de VIH est une de ces séquences, qui par hybridation d'un PNA codant des

parties du LTR, avec des TNA codant le LTR de VIH, on forme des TBR capables de lier les protéine liant l'ADN NF-kB et SP1.

5 En plus des séquences qui vont former un TBR par hybridation, le PNA peut également contenir un 1/2 BBR. Cette séquence est celle qui, par hybridation avec un acide nucléique d'amplification, un BNA, forme un BBR qui est capable de lier un BBA. Le BBA est de préférence, une protéine liant l'ADN, ayant une affinité élevée pour la
10 séquence BBR.

Dans cet exemple particulier, l'hybridation entre un PNA ayant un 1/2 TBR, SEQ ID N°4 et, à l'extrémité 3' de cette séquence, une séquence 1/2 BBR représentée en SEQ ID N°35. Le PNA codant ces séquences est utilisé sans
15 marquage ou est marqué avec un isotope radioactif, comme ³²P, ³⁵S ou un isotope similaire, selon les procédés connus dans la technique. En variante, le PNA est lié à une bille de 0,01 à 10 µm, qui peut être colorée pour une détection visuelle aisée. Ce marqueur forme le OSA comme
20 décrit dans la description. Cette sonde s'hybride aux séquences LTR de VIH pour former un TBR, qui lie le NF-kB. En outre, le PNA s'hybride à des BNA ayant un 1/2 BBR complémentaire pour former un opérateur gauche de bactériophage lambda, qui lie cro ou des protéines
25 répresseur de lambda.

De manière similaire à ce qui a été décrit ci-dessus, on utilise des PNA où le 1/2 TBR est l'un quelconque parmi SEQ ID N°5 ou SEQ ID N°7-34 et un 1/2 BBR tel que SEQ ID N°35 ou SEQ ID N°36 se trouve à
30 l'extrémité 3' ou 5' du 1/2 TBR.

Exemple 2 - Préparation et marquage des BNA

De manière similaire aux procédés décrits à l'exemple 1 pour la préparation et le marquage des PNA, on prépare des BNA et on les marque selon des procédés connus dans la technique. Comme décrit dans le brevet US N°4 556 643, incorporé ici à titre de référence (voir en particulier l'exemple 1), on peut produire en masse des séquences d'acide nucléique codant des séquences liant l'acide nucléique particulières, par clonage dans un vecteur répliquable. De plus, de manière similaire à cette description, les séquences 1/2 TBR et 1/2 BBR peuvent être produites de manière colinéaire de cette manière, avec la distinction cependant, que selon la présente invention, la séquence 1/2 TBR elle-même, forme un site de reconnaissance d'un composant liant l'acide nucléique et le 1/2 BBR, tout en formant un site de reconnaissance d'un composant liant l'acide nucléique, propose également un moyen d'amplification du signal produit par liaison du 1/2 TBR à des séquences complémentaires dans le TNA, en veillant à la polymérisation des BNA sur le PNA lié au TNA. Pour réaliser ceci, une séquence telle que SEQ ID N°35, qui code l'opérateur gauche du bactériophage lambda, est disposée avec des séquences supplémentaires, de sorte qu'une séquence en saillie est créée sur une ou les deux extrémités du BNA par hybridation avec le PNA.

Comme exemple spécifique, une polymérisation vectorielle de BNA sur le TNA est procurée par SEQ ID N°40-43. Dans cet exemple, SEQ ID N°40 code deux 1/2 TBR, qui vont s'hybrider à deux 1/2 TBR dans un TNA pour former deux sites de liaison NF-kB, alors qu'en même temps, on procure un 1/2 BBR, opérateur gauche du bactériophage lambda, qui est terminé en outre, à l'extrémité 3', par le site de reconnaissance de l'enzyme

de restriction PstI. En plus du BNA, SEQ ID N°41, avec le
1/2 BBR complémentaire au 1/2 BBR sur le PNA, SEQ ID
N°40, complète le BBR, alors qu'en même temps, il
complète le site de reconnaissance PstI, pour laisser
5 quatre bases en saillie pour l'hybridation avec des BNA
supplémentaires. De même, SEQ ID N°42 est ajouté, qui a
une séquence de quatre paires de bases à l'extrémité 3',
qui est complémentaire à la saillie de quatre bases
restant de l'hybridation de SEQ ID N°40 et 41. En outre,
10 SEQ ID N°42 est munie d'une séquence de cinq bases à son
extrémité 5', qui fait partie d'un site de reconnaissance
BamHI. Le polymère en croissance de BNA est prolongé
encore par addition du BNA de SEQ ID N°43, qui est
complémentaire à SEQ ID N°42, en complétant le BBR, alors
15 qu'en même temps, il complète le site de reconnaissance
BamHI et laisse une saillie de quatre bases, qui peut
encore s'hybrider à des BNA de séquences complémentaires.
De cette manière, les BNA peuvent considérablement
s'hybrider de manière à fortement amplifier le signal
20 d'un seul événement d'hybridation PNA-TNA.

Comme avec les PNA décrits à l'exemple 1, les BNA
peuvent être utilisés sous forme non marquée ou peuvent
être marqués à l'aide de procédés connus dans la
technique et décrits à l'exemple 1. Il convient de noter
25 également que, plutôt que produire le polymère BNA par
addition séquentielle de BNA au complexe PNA-TNA, le
polymère BNA peut être préformé et ajouté directement au
complexe PNA-TNA. Un procédé simple pour réaliser un tel
polymère BNA comprend la production par recombinaison
30 d'un vecteur, dans lequel les multimères des BNA sont
produits avec un site unique de restriction à une
extrémité du polymère. Ce polymère de BNA, contenant
plusieurs BBR, est coupé du vecteur et s'hybride à un 1/2

BBR simple brin, restant dans le PNA lors de l'hybridation du PNA au TNA. Ceci est réalisé en procurant une séquence simple brin dans le PNA, complémentaire à une saillie, produite dans le polymère BNA, lorsqu'il est excisé du vecteur de production.

Exemple 3 - Production des HNA et leur utilisation pour le coiffage des polymères BNA

Les HNA de l'invention sont produits selon des procédés connus dans la technique, pour la production de polynucléotide comme décrit aux exemples 1 et 2 pour les PNA et BNA. Dans la production des HNA, cependant, la séquence du HNA est spécifiquement conçue de sorte qu'une partie sensible du HNA forme un palindrome auto-complémentaire pour former une épingle à cheveux, alors qu'en même temps, on laisse sous forme simple brin, assez de bases pour pouvoir s'hybrider à des séquences simple brin dans la chaîne en croissance des BNA décrite à l'exemple 2.

Dans cet exemple, un HNA de SEQ ID N°44 est proposé pour coiffer l'extension des BNA sur le PNA de l'exemple 2, après addition du BNA de SEQ ID N°43. Ceci est réalisé parce que SEQ ID N°44, tout en ayant une séquence palindrome, qui forme une épingle à cheveux stable, a également une séquence à l'extrémité 5' du HNA, qui complète la séquence BamHI formée par l'hybridation de SEQ ID N°42 et de SEQ ID N°3. Naturellement, le terminaison du polymère après addition de seulement 3 BNA est réalisée pour des objets de simplicité de la démonstration de l'invention. Comme décrit ci-dessus, cette polymérisation peut être poursuivie essentiellement de manière indéfinie, pour amplifier le signal de l'événement d'hybridation PNA-TNA. Une fois que le HNA

s'hybride à la chaîne en croissance de BNA, le polymère est coiffé au plus aucune extension du polymère n'est possible.

5 Exemple 4 - Préparation des TBA et BBA, marquage et immobilisation de ceux-ci

Les TBA et BBA, qui peuvent être utilisés selon la présente invention, comprennent toute substance qui peut lier spécifiquement les TBR et BBR formés par hybridation des PNA, TNA et BNA. L'utilisation de protéines liant 10 l'ADN forme un exemple de telles substances.

Pour cet exemple, le TBA est le dimère de la partie liant l'ADN de p50, et le BBA est la protéine cro de lambda. Ces protéines peuvent être produites selon des 15 procédés connus dans la technique. Le gène de ces deux protéines a été cloné. Ainsi, ces protéines sont produites par recombinaison et purifiées selon des procédés connus dans la technique. De plus, ces protéines sont marquées, avec un radio-isotope, comme l'iode 20 radioactif, ou avec une enzyme, comme la bêta-galactosidase ou la peroxydase de raifort, ou avec un colorant fluorescent comme la fluorescéine ou la rhodamine, selon des procédés connus dans la technique. En outre, le TBA, le BBA ou les deux peuvent être 25 immobilisés sur une surface solide, comme le surface d'une plaque de microtitrage ou la surface d'une bille, comme une bille colorée d'un diamètre allant de 0,01 à 10 µm. Les marqueurs sur les TBA et BBA peuvent être identiques ou différentes.

30 Dans cet exemple, le TBA contenant le domaine liant l'ADN dimère p50 est marqué avec la rhodamine, alors que le BBA, cro, est marqué avec la fluorescéine. Ainsi, par hybridation des PNA, TNA, BNA et HNA comme décrit dans la

description du présent brevet et les exemples précédents et suivants, les hybrides d'acide nucléique, s'ils sont formés, sont mis en contact avec un excès de TBA marqué et de cro. La fluorescence de ces marqueurs est mesurée selon des procédés connus et la détection des deux signaux est une indication de la présence des séquences 1/2 TBR dans le TNA. Le signal différentiel produit par la fluorescence du NF-kB et du cro est une mesure du degré auquel la polymérisation des BNA sur l'hybride PNA-TNA a résulté en une amplification du signal. Une amplification d'une à plus de mille fois est envisagée selon le procédé de l'invention.

Exemple 5 - Hybridation de deux PNA avec un TNA et distinction entre un TNA et un CNA

Les PNA, PNA1, SEQ ID N°40 et PNA2, SEQ ID N°45, sont utilisés en un excès molaire d'environ 10 fois par rapport à la concentration des TNA dans un échantillon à tester. Pour cet exemple, un duplex isolé LTR de VIH, dont un brin a la séquence SEQ ID N°37, représenté à la figure 7 et l'autre brin est complémentaire à la séquence représentée à la figure 7, est utilisé comme TNA. Un CNA duplex isolé est utilisé dans cet exemple, dont un brin a la même séquence que SEQ ID N°37, excepté que dans le premier site de liaison NF-kB représenté à la figure 7, au centre du site de liaison, position 1 à la figure 7, à la place d'un « T », il y a un « A », la complémentarité de ce brin avec le PNA de SEQ ID N°40 fait défaut en cette position.

SEQ ID N°40 et SEQ ID N°45 sont toutes deux ajoutées à des réactions séparées, la première contenant le TNA décrit ci-dessus et la deuxième contenant le CNA décrit ci-dessus. On solubilise les échantillons dans un tampon

d'hybridation approprié, comme Tris 10 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM. On chauffe les échantillons à environ 90°C pendant environ cinq minutes pour séparer les brins des duplex TNA et CNA dans les échantillons, et on laisse les échantillons refroidir pour permettre aux brins des PNA, TNA et CNA de s'anneler.

Une fois que l'hybridation est complète, ce qui peut être déterminé par des procédés connus comme par calcul du $t_{1/2}$ sur base des compositions de base et de la température d'annelage d'après des procédés connus, on polymérise le PNA de SEQ ID N°40 par addition des BNA comme à l'exemple 2 et on polymérise la sonde PNA2 SEQ ID N°45 avec des BNA en commençant avec la saillie du site de reconnaissance de SphI. Après addition des BNA et une brève période d'hybridation, on ajoute les échantillons séparés à des billes revêtues de NF-kB immobilisé de manière covalente et on laisse le NF-kB se lier aux TBR formés dans les échantillons de TNA et de CNA. Après environ 15 minutes de liaison, on lave les échantillons deux fois avec environ trois volumes d'un tampon de lavage approprié, comme Tris 10 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, ou un autre tampon prédéterminé pour ne pas interférer avec l'activité de liaison du NF-kB ou de la protéine répresseur CI du bactériophage lambda. Après chaque lavage, on laisse les billes se déposer par gravité ou brève centrifugation. Ceci élimine tout acide nucléique qui n'a pas un site de liaison NF-kB parfait, formé par hybridation des séquences PNA1 et TNA.

Après le lavage final, la protéine répresseur CI du bactériophage lambda avec un isotope radioactif, comme l'iode radioactif, ou marquée avec une enzyme, comme la peroxydase de raifort, avec des billes colorées ou avec un marqueur fluorescent, est ajoutée à chaque

échantillon. Les échantillons sont alors lavés plusieurs fois (environ 3) avec plusieurs volumes (environ 2) d'un tampon de lavage approprié comme Tris 10 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, ou un autre tampon prédéterminé pour ne pas interférer avec l'activité de liaison du NF-kB ou de la protéine répresseur CI du bactériophage lambda. Après chaque lavage, on laisse les billes se déposer par gravité ou brève centrifugation. Après le dernier dépôt ou la dernière centrifugation, le marqueur lié est quantifié par détection de la radioactivité liée, de la couleur libérée dans un dosage enzymatique, de la couleur liée aux billes, ou par détection de la fluorescence. En variante, un anticorps anti-CI peut être ajouté et on réalise un immunodosage enzymatique en sandwich standard ou un radioimmunos dosage pour détecter le répresseur lié. En outre, comme témoin négatif (arrière-plan), toutes les manipulations ci-dessus sont réalisées en tandem avec un échantillon dans lequel on utilise des billes n'ayant pas de NF-kB immobilisé.

Il résulte du dosage ci-dessus que les échantillons témoin et contenant le CNA ont de faibles signaux similaires alors que l'échantillon contenant le TNA a un signal bien supérieur à l'arrière-plan.

25 Exemple 6 - Kit de test pour la détection du VIH

A. Contenu du kit

1. Plaque de microtitrage
2. Solution à 1 mg/ml de NF-kB produit par recombinaison, dans un sérum physiologique tamponné tris.
- 30 3. Tube contenant des PNA simple brin de VIH (un mélange d'oligonucléotides prémélangés codant deux 1/2 sites de liaison NF-kB, à savoir un mélange de SEQ ID N°7 et 8).

4. Tube contenant le PNA génomique humain simple brin, SEQ ID N°1.
5. Tube de nucléase (PstI).
6. Tube de protéase.
- 5 7. Tube contenant les BNA prépolymérisés, 100 unités récurrentes de O_R du bactériophage lambda, coiffées d'un HNA, mais avec des 1/2 BBR libres pour la liaison aux hybrides PNA-TNA.
8. Tube de peroxydase de raifort (hrp) conjuguée à
10 cro.
9. Tube de substrat coloré de hrp.
10. Sérum tamponné Tris, 100 ml.
11. Bistouri.
12. Tubes de réaction A, B, C, chacun contenant
15 250 µl d'eau distillée.
13. Compte-gouttes médical.

B. Procédure de dosage

(a) La plaque de microtitrage (article 1) est
20 revêtue de la solution de NF-kB produit par recombinaison (article 2) à une concentration de 1 mg/ml dans le sérum tamponné tris, pendant une nuit à 4°C, sous agitation.

(b) On prélève trois gouttes de sang du patient à
tester par ponction du doigt avec le bistouri
25 (réactif 11), et on dispose une goutte de sang dans chacun des tubes de réaction A, B et C (réactif 12).

(c) On place dans chaque tube, une goutte de la
solution de protéase (réactif 6) avec le compte-gouttes
médical (article 13), on agite les tubes et on laisse au
30 repose pendant 5 minutes.

(d) On ajoute une goutte de nucléase (article 5) à
chacun des tubes A-C à l'aide du compte-gouttes médical,

on agite les tubes et on laisse au repos pendant 10 minutes.

5 (e) On ajoute une goutte de l'article 3 au tube A (échantillon à tester) ; une goutte de l'article 4 est ajoutée au tube B (témoin positif), et une goutte de sérum (article 12) est ajoutée au tube C comme témoin négatif. On chauffe les tubes à 50°C dans de l'eau chaude et on laisse refroidir à température ambiante pendant une heure.

10 (f) Alors que l'hybridation s'effectue à l'étape (d), on évacue l'excès de protéine de la surface et de la plaque de microtitrage, de l'étape (a), et la plaque est rincée avec le sérum tamponné tris (tube 10).

15 (g) On transfère le contenu des tubes A-C de l'étape (e) dans trois puits de la plaque de microtitrage et on laisse au repos pendant 1 heure avec agitation.

(h) Les puits avec le contenu des tubes A-C sont rincés avec le sérum tamponné tris et vidés.

20 (i) On ajoute une goutte de l'article 7 à chaque puits et on laisse s'hybrider avec les sites 1/2 BBR liés à la plaque, pendant une heure, puis on rince trois fois avec le sérum tamponné tris.

25 (j) On ajoute une goutte de l'article 8 à chaque puits et on laisse le cro se lier aux BNA liés pendant 10 minutes, puis on effectue cinq lavages de 1 ml avec le sérum tamponné tris.

(k) On ajoute une goutte du substrat de hrp à chaque puits et on laisse la couleur se développer.

30 C. Résultats

Si les puits A et B présentent tous deux un développement de couleur, alors que le puits C pas, le test est valide et le sujet a été infecté par le VIH. Si

seul le puits A présente un développement de couleur ou si le puits C présente un développement de couleur, le test a été réalisé de manière incorrecte et est non valide. Si les puits A et C ne présentent pas de développement de couleur, mais bien le puits B, le test est valide et l'individu n'a pas été infecté par le VIH.

Exemple 7 - Production de différents nouveaux TBA

On prépare de nouveaux TBA à utiliser selon la présente invention, de la manière suivante :

(a) NFkb/NF-kB (VIH-détection I). Un acide nucléique codant l'une quelconque parmi SEQ ID N°63-71 ou une protéine liant l'ADN NF-kB similaire, est fusionné en cadre, à une séquence de nucléotides, codant une séquence d'assemblage, comme cro, de sorte que la séquence de reconnaissance d'ADN NF-kB soit codée à l'extrémité amino ou carboxy de la séquence cro. Le cas échéant, une séquence lieur est disposée entre la séquence NF-kB et la séquence cro. A l'autre extrémité de cro, une séquence signal de localisation nucléaire, comme SEQ ID N°72, est le cas échéant fournie. De plus, des séquences d'asymétrie sont le cas échéant, insérées à l'extrémité cro non utilisée par la séquence de reconnaissance NF-kB. Des exemples de TBA complets sont donnés ci-dessous.

25

(b) NFkb/SP1 (VIH-détection II). De manière similaire à ce qui est décrit en (a) ci-dessus, une séquence codante recombinée, codant un domaine de reconnaissance NF-kB est préparée. Dans une construction séparée, plutôt que SEQ ID N°63-72, on incorpore la séquence codante de la partie de reconnaissance de l'ADN de SP1. Une telle séquence va coder tout ou une partie fonctionnelle de SEQ ID N°73, qui est la partie du

30

facteur de transcription SP1 présentant la liaison de l'ADN (voir Kadonaga et coll. [1987] Cell 51 : 1079-1090). Le vecteur codant NF-kB et le vecteur codant SP1 sont alors co-transfectés dans un système d'expression approprié comme bien connu dans la technique. Une unité de reconnaissance NF-kB monomère est ajoutée pour compléter le dimère de reconnaissance NF-kB après assemblage des unités de reconnaissance SP1 et NF-kB par le chaperon. Les séquences d'asymétrie préviennent la formation de dimères NF-kB ou SP1 et dirigent au contraire, la formation d'hétérodimères NF-kB-SP1 (à savoir, VIH-détection II), qui sont alors isolés du système d'expression (cellules mammaliennes ou bactériennes) par des procédés connus.

15

(c) TBA SP1/SP1 (VIH-détection III). Comme décrit en (b) ci-dessus, une construction de TBA codant SP1 est préparée. Cependant, seule cette construction est transfectée dans le système d'expression et les séquences d'asymétrie permettant la formation de dimères SP1-SP1 sont incorporées.

20

(d) SP1-TATA (VIH-détection IV). Comme décrit en (b) ci-dessus, un TBA codant SP1 recombiné est produit. En outre, un recombiné codant un TBA ayant la séquence de liaison, SEQ ID N°74, ou une séquence codant une unité de reconnaissance TATA, est préparée avec des séquences d'asymétrie complémentaires à celles incluses dans la construction codant le TBA SP1. Ces constructions sont co-transfectées et les hétérodimères sont isolés par des procédés standards, y compris la purification par affinité sur une colonne d'ADN ayant les régions de liaison de cible SP1-TATA appropriées.

30

(e) SP1-E2 (HPV-détection I). Une construction codant SP1 est préparée comme en (b) ci-dessus. Une construction codant un TBA E2 est préparée en utilisant
5 une séquence codant l'une quelconque de SEQ ID N°75-84 et 94-98, qui sont des unités de reconnaissance de l'ADN E2 du papillomavirus (voir Hegde et coll. [1992] Nature 359 : 505-512) ou des unités de reconnaissance similaires, et on co-transforme ou co-transfecte avec la
10 construction codant le TBA SP1. L'unité de reconnaissance E2 monomère est ajoutée au dimère de reconnaissance E2 complet après l'assemblage de l'unité de reconnaissance E2-SP1 par le chaperon. On isole l'hétérodimère HPV-détection I selon des procédés connus.

15

(f) E2-E2 (HPV-détection II). Comme décrit ci-dessus en (e), une construction codant le TBA E2 est préparée, excepté que des séquences d'asymétries sont incorporées, lesquelles permettent la formation de dimères E2. Les
20 dimères exprimés sont alors isolés par des procédés connus, y compris l'affinité pour un site de liaison de E2 dimère sur une colonne d'affinité d'ADN.

(g) E2-TATA (HPV-détection III). Comme décrit ci-dessus en (e) et (d), on prépare les TBA liant E2 et TATA (respectivement), excepté que des séquences d'asymétries sont incorporées, lesquelles amplifient la formation des
25 hétérodimères plutôt que des homodimères. Ces constructions sont alors co-exprimées et les
30 hétérodimères sont isolés.

(h) TATA-TATA (HPV-détection IV). Comme décrit ci-dessus en (a) et (d), une construction codant le TBA

liant TATA est préparée à l'aide de séquences d'asymétries qui encouragent la formation d'homodimères et l'homodimère est isolé.

5 (i) Autres TBA. Comme décrit ci-dessus pour les TBA de VIH et de HPV, des TBA pour tout pathogène ou maladie donnée peuvent être produits en identifiant des protéines liant l'ADN spécifiques et en formant une construction d'expression à l'aide des séquences lieu, d'assemblage
10 et d'asymétrie appropriées.

Exemple 8

De manière similaire au dosage décrit à l'exemple 5, un dosage plus rigoureux est produit en utilisant la
15 protéine de liaison duplex NF-kB-SP1, préparée selon l'exemple 6. Ainsi, les sondes représentées à la figure 7 et utilisées à l'exemple 5 peuvent être allongées pour réduire la distance intersonde et ainsi, réduire la flexibilité de l'ADN dans le TNA.

20

Exemple 9 - Production de TBA « d'ordre supérieur »

Par l'utilisation appropriée des séquences d'asymétrie, on produit des TBA qui sont dimères, trimères, tétramères, pentamères, ou hexamères d'unités
25 particulières de reconnaissance d'ADN. De cette manière, un TBA hexamère est produit en préparant d'abord, un TBA dimère p50 NF-kB à l'aide de séquences d'asymétrie, qui permettent la formation du dimère. En outre, les séquences d'asymétrie permettent la tétramérisation du dimère p50 avec un dimère SP1-SP1. Finalement, des
30 séquences d'asymétrie supplémentaires dirigent l'hexamérisation avec un dimère présentant des séquences de localisation nucléaire. Ceci est réalisé en

incorporant par exemple, des séquences d'asymétrie pour l'insuline, qui forme de nature, des hexamères. Cette formation d'hexamère est dirigée par les séquences SEQ ID N°85(A) et 86(B), 87(A) et 88(B), 89(A) et 90(B), 91(A) et (92(B) (voir figures 13 et 14).

A cause de l'affinité extrêmement élevée pour le LTR de VIH, qui peut être générée à l'aide d'un TBA multimère, les composés ayant cette structure et qui peuvent être utilisés pour cet objet sont indiqués ici comme « verrou-VIH ».

Un verrou-VIH optimal est défini par empreinte (selon des procédés bien connus dans la technique) de TBA liées aux TBR dans le LTR du VIH, pour confirmer que l'affinité de liaison de chaque protéine liant l'ADN contribuant à la formation du complexe TBA multimère est déplacée par rapport à l'affinité de n'importe quelle séquence cible naturelle (à savoir les CNA), de laquelle l'unité de reconnaissance de l'ADN du TBA dérive. Toute perte concomitante d'affinité de liaison pour le TBR de VIH est plus que compensée par la formation du multimère comme décrit ci-dessous.

Il peut y avoir une compétition entre la liaison de chaque composant du TBA pour son TBR et l'assemblage, via les séquences d'asymétrie pour former le multimère. Ceci est évité en ajustant les lieurs entre les chaperons et les séquences d'asymétrie dans chaque composant du TBA, de sorte que ces événements en compétition sont non couplés. La réduction résultante de la dimension de diffusion (augmentation efficace de concentration) des composants d'asymétrie et d'assemblage du TBA résulte en une formation efficace du complexe multimère.

Sur base de l'empreinte, la longueur et la composition des lieurs sont ajustées pour atteindre une

discrimination optimale entre les séquences VIH cibles et les séquences naturelles. De cette manière, bien que chaque composant TBA va avoir une faible affinité pour les séquences CNA et TBR, le complexe multimère va avoir une affinité extrêmement élevée pour le TBR maintenant étendu, reconnu par le complexe multimère (le carré de l'affinité de chaque TBR reconnu par chaque composant TBA du TBA multimère), tout en ayant encore une faible affinité pour les CNA. De la même manière, d'autres complexes TBA multimères, outre le verrou-VIH, sont préparés.

Des TBA qui peuvent être formés de cette manière, comprennent les séquences suivantes, qui sont assemblées en liant les sous-unités de protéine ou les séquences d'acide nucléique codant ces sous-unités, de la manière suivante :

<u>Lien de séquences des groupes</u>	
A	I + II + III
B	IV + V + III
C	IV + III

Où les groupes I-V consistent en des séquences choisies parmi :

25

Groupe Choisi parmi les séquences

- I L'une quelconque des SEQ ID N°85-92
- II Met Ser, liés à l'une quelconque des SEQ ID N°104-106, chacune étant liée à SEQ ID N°99
- III SEQ ID N°100, liée à l'une quelconque des SEQ ID N°75-84 ou 94-98 ; SEQ ID N°101, liée à SEQ ID N°74 ou 93 ; ou SEQ ID N°102, liée à SEQ ID N°74 ou 93 ; ou l'une quelconque de SEQ ID N°72, 103, 73 ou 63-71.
- IV L'une quelconque des SEQ ID N°104-106
- V SEQ ID N°99

Des exemples spécifiques de tels TBA sont SEQ ID N°109-116, assemblés comme suit :

	<u>SEQ ID N°</u>	<u>Lien des SEQ ID</u>
A	109	85 + Met Ser + 104 + 99 + 100 + 94
A	110	85 + Met Ser + 104 + 99 + 72
A	111	86 + Met Ser + 105 + 99 + 102 + 74
A	112	86 + Met Ser + 106 + 99 + 73
A	113	89 + Met Ser + 106 + 99 + 63
C	114	106 + 64
C	115	105 + 64
B	116	106 + 99 + 73

5

De cette manière, par le choix des séquences d'asymétrie, des séquences d'assemblage et des unités de reconnaissance d'ADN appropriées, beaucoup de TBA différents peuvent être formés. En outre, des ensembles de ceux-ci, comme SEQ ID N°114 et 115, vont s'associer les uns aux autres, mais des dimères de SEQ ID N°114 ou

10

115 ne vont pas se former par répulsion des charges dans les séquences d'assemblage mutées (SEQ ID N°104 est cro ; SEQ ID N°105 est un nouveau cro muté, chargé négativement, et SEQ ID N°106 est un nouveau cro muté, chargé positivement).

Naturellement, étant donné la séquence des acides aminés de ces TBA, l'homme de métier peut produire des clones d'acide nucléique recombinés codant celles-ci, et de tels clones recombinés forment naturellement une partie de la présente invention.

Exemple 10 - Test VIH utilisant le « verrou-VIH »

Selon le même procédé que celui utilisé à l'exemple 6, le « verrou-VIH » produit selon l'exemple 9 est utilisé comme TBA, réactif 2, avec des résultats similaires.

Exemple 11 - Test VIH utilisant le « verrou-VIH » lors d'un don de sang

Lorsque la quantité de sang à tester n'est pas limitée, comme lorsque des échantillons de sang pour un don doivent être testés pour la contamination par le VIH, des tests similaires à l'exemple 6 sont effectués, mais pour chaque tube A-C, environ 5 ml de sang sont rassemblés en culot dans une centrifugeuse de table. Les autres réactifs sont multipliés si nécessaire pour manipuler une plus grande quantité de TNA présent dans l'échantillon.

Exemple 12 - « Verrou-VIH » comme agent thérapeutique anti-VIH

Le « verrou-VIH » produit selon l'exemple 9 est formulé sous forme d'une solution à 1 mg/ml dans des

liposomes et injecté de manière intraveineuse, à un sujet qui a été testé et pour lequel on a confirmé qu'il est infecté par le VIH. Une dose d'environ 0,1 mg à 100 mg de « verrou-VIH » par kg de masse corporelle est injectée en
5 une période de 24 heures, puis la concentration du p24 de VIH dans le sérum du patient est contrôlée. Le traitement est répété aussi souvent que nécessaire, comme lorsque des élévations du P24 sérique se produisent.

10 Exemple 13 - Utilisation d'une construction TBA de VIH comme agent thérapeutique

Un vecteur rétroviral recombiné ou similaire est utilisé pour administrer une construction codant un TBA liant le LTR de VIH à un patient infecté. Le vecteur code
15 un chaperon, comme cro, et des séquences d'ADN pour lier des parties de p50. Le même vecteur code également un chaperon sur lequel un TBA de SP1 se replie. Des séquences d'asymétrie sont fournies, de sorte que lors de la coexpression du TBA p50 et du TBA SP1 dans une seule
20 cellule infectée par le VIH in vivo, une association immédiate se produit entre ces TBA, alors que l'on prévient en même temps toute association entre la partie liant l'ADN de p50 et des monomères p50 ou p65 endogènes. Des séquences NLS sont également proposées dans les TBA,
25 de sorte que par formation du dimère, le TBA est immédiatement relocalisé dans le noyau de la cellule et se lie spécifiquement aux séquences intégrées de VIH, prévenant ainsi la transcription depuis ce locus.

Pour cet objet, il est désirable de sélectionner des
30 séquences codant des domaines liant l'ADN de sorte que les monomères exprimés sont assemblés en un TBA, qui ne se lie pas aux séquences humaines naturelles. Ainsi, c'est seulement par liaison des composants du TBA à leurs

séquences cibles que l'association entre tous les composants du TBA se produit pour former un complexe qui lie fermement et spécifiquement le LTR de VIH.

5 Exemple 14 - Test diagnostique pour le papillomavirus humain

Le diagnostic du papillomavirus humain tire avantage de la différence connue entre les HPV bénin et carcinogène pour donner un test qui indique la
10 susceptibilité aux malignités chez un patient. Les papillomavirus sont un groupe de petits virus à ADN, associés à des tumeurs bénignes de cellules épithéliales squameuses chez les vertébrés supérieurs. Au moins 27 types humains distincts de papillomavirus (HPV) ont été
15 trouvés ; beaucoup de ceux-ci ont été associés à des lésions cliniques spécifiques. Quatre de celles-ci, HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18 et HPV-33 ont été associées aux lésions du tractus génital humain. De manière générale, les ADN de HPV-6 et de HPV-11 sont associés à des lésions
20 bénignes du tractus génital. HPV-16, HPV-18 et HPV-33 sont également associés à des lésions pré malignes et malignes et sont transcrits dans la plupart des lignées cellulaires établies des carcinomes du col. HPV-16, HPV-18 et HPV-33 sont vraisemblablement seulement deux
25 membres d'un grand ensemble d'ADN de HPV associés à des carcinomes malins du col humain.

Des modèles animaux ont montré que des lésions bénignes par papillomavirus peuvent progresser en lésions malignes en présence de co-carcinogènes. L'ADN de HPV a
30 été trouvé dans des métastases de carcinomes du col. Dans les lésions cervicales malignes, l'ADN de HPV est habituellement intégré dans le génome humain, mais il peut également y avoir de l'ADN de HPV

extrachromosomique. L'intégration du HPV pour former le provirus résulte habituellement en la rupture du cadre de lecture ouvert (ORF) viral E2. Malgré la rupture du ORF E2, l'examen de lignées cellulaires provenant de plusieurs carcinomes du col a montré le HPV-16 et le HPV-18 actifs au niveau de la transcription et intégrés. Lorsque les génomes HPV-16, qui sont présents dans les lignées cellulaires de carcinome du col SiHa et CaSki, sont examinés, on trouve des différences dans l'intégration du HPV-16. Dans la lignée SiHa, l'intégration du génome HPV-16 se produit aux bases 3132 et 3384, rompant les ORF E1 et E2 avec une délétion de 0,3 kb. Une délétion supplémentaire de 50 paires de bases de l'ADN de HPV-16 résulte en la fusion des ORF E2 et E4. La partie 5' de l'ADN de HPV-16, consistant en l'ORF E2 rompu, est ligaturée à des séquences flanquées droites humaines continues. En outre, une seule guanine supplémentaire est détectée au nucléotide 1138 au centre de l'ORF E1. L'addition d'une paire de base résulte en la fusion des ORF E1a et E1b en un seul ORF E1.

Le génome complet de HPV-16 est disponible sur GenBank, Numéro d'accès K02718 ; le génome complet de HPV-33 est disponible sur GenBank, Numéro d'accès M12732 ; le génome complet de HPV-18 est disponible sur GenBank, Numéro d'accès X05015.

Comme criblage préliminaire, le fait qu'une infection par HPV est établie pour un échantillon donné de biopsie cervicale par simple analyse de type « oui/non » à l'aide par exemple, de l'un quelconque ou de tous les PNA de SEQ ID N°46-53 et un TBA E2 décrit ci-dessus (à savoir, fragmentation d'ADN, liaison du PNA, immobilisation avec le TBA, et détection du signal avec les BNA et BBA).

Une fois que l'on trouve qu'un échantillon de biopsie est positif pour le HPV, on obtient une information supplémentaire sur la malignité potentielle du HPV Par analyse de l'état d'intégration du virus dans le génome humain.

1. Fragmenter l'ADN dans l'échantillon de biopsie cervicale et l'hybrider à une sonde de blocage ayant la séquence SEQ ID N°60. Cet échantillon va lier tous les fragments de l'ADN qui n'ont pas épissé le fragment de 0,3 kb.

2. Exposer l'ADN dans l'échantillon de biopsie à un PNA ayant la séquence SEQ ID N°61. Cette sonde va seulement lier les fragments qui ont été délétés du fragment de 0,3 kb (la sonde de blocage va prévenir la formation d'une boucle des grands segments de délétion si présents).

3. Un PNA de SEQ ID N°62 est hybridé à SEQ ID N°41 pour former un BBR, qui va lier cro ou le répresseur CI de λ comme BBA, pour laisser une partie simple brin, capable de s'hybrider au site TATA sur SEQ ID N°61. Ceci s'additionne pour former un TBR sur l'extrémité 5' de la grande délétion.

4. Le TBR est immobilisé par un TBA ayant une unité de reconnaissance d'ADN protéine liant TATA.

5. Les fragments liés sont détectés par addition de BNA et de BBA comme décrit ci-dessus.

La détection du signal dans ce dosage indique qu'un grand fragment est délété dans le HPV présent dans le TNA. Vu que cette délétion est corrélée à la malignité, ce dosage procure une vue sur le potentiel de malignité de l'infection par HPV. Cette conclusion peut être confirmée en réalisant un dosage analogue basé sur la

délétion du fragment de 52 paires de bases, qui est également corrélé à une malignité induite par HPV.

L'unité de reconnaissance TBP utilisée dans le TBA pour ce dosage peut être choisi, par exemple, à partir
5 d'une séquence telle que SEQ ID N°70 ou SEQ ID N°93.

Exemple 15 - production par recombinaison de HIV-LOCK™

Phase un - Préparation de l'ADN pour produire le HIV-Lock™. Une mutation in vitro des régions codantes
10 des composants clonés, naturels du HIV-Lock™, qui doivent être modifiés, est réalisée avec un kit MutaGene Phagemid. Le protocole modifié comprend l'utilisation d'un plasmide Blue-script, contenant chacun des composants de liaison de HIV-Lock™. Ceux-ci sont
15 transformés dans des cellules compétentes et des phagemides contenant l'uracile sont mis à croître. L'ADN simple brin est extrait et utilisé comme matrice du brin mutagène. Des oligonucléotides contenant les mutations désirées, y compris l'incorporation d'un nouveau site de
20 restriction, sont synthétisés et traités avec la polynucléotide kinase et l'ATP. Les oligonucléotides traités par la kinase sont annelés à la matrice simple brin, et un brin mutagène est synthétisé et ligaturé selon le protocole MutaGene, à l'exception que la
25 Sequenase 2.0 fournit la polymérase. Des banques sont criblées à l'aide de séquences contenant des nucléotides marques g-³²P, complémentaires aux mutations introduites et par isolement de l'ADN de plasmide et identification des mutants par la présence du site de restriction
30 introduit. On confirme les mutations, également par le séquençage avec un kit Sequenase. L'ADN HIV-Lock™ est cloné dans le système d'expression baculovirus avec un promoteur du polyèdre.

Phase deux - Production des protéines HIV-Lock™ à l'aide du baculovirus. On met en culture des cellules Sf-9 jusqu'à une densité pré-déterminée (environ 1 x 10⁶ cellules/ml, phase log), on infecte avec le baculovirus contenant les instructions HIV-Lock™ et on récolte pour obtenir les protéines recombinées comprenant le HIV-Lock™. Dans le processus à plus grande échelle, on agrandit les cultures depuis des flacons à des flacons de type « spinner » et ensuite, à des bioréacteurs. Après infection, les cellules sont récoltées à 12, 24, 36 et 48 heures pour la protéine. Des indices de viabilité sont contrôlés pendant tout le processus.

Phase trois - Purification des protéines HIV-Lock™. Les protéines récoltées sont d'abord séparées des particules par ultracentrifugation à écoulement pour faciliter la purification en aval. Le produit centrifugé est filtré de manière stérile. Les extraits sont centrifugés à 40 000 tpm à 4°C pendant 30 minutes et des fractions aliquotes sont immunoprécipitées avec l'anticorps polyclonal de lièvre contre un des composants du HIV-Lock™. Les protéines immunoprécipitées sont passées sur un gel de SDS-PAGE à 10%.

Phase quatre - Test des protéines de HIV-Lock™ contre l'ADN de VIH. Les dosages de déplacement de mobilité sont réalisés en utilisant une sonde d'oligonucléotide comprenant des éléments de la longue répétition terminale de VIH et des fragments contenant le NFkB liant l'ADN, associé à la chaîne légère kappa et la régulation de microglobuline. L'oligonucléotide est

annelé à son brin complémentaire et marqué de manière terminale avec l'ATP g-³²P.

L'empreinte est réalisée en combinant de petites quantités (10^{-15} M) d'ADN de LTR de VIH radiomarké à une
5 quantité légèrement plus élevée du HIV-LockTM dans un tampon à température ambiante pendant 10 minutes. On ajoute le dithiothréitol avant l'addition de la protéine. Le fer (II), l'EDTA, le peroxyde d'hydrogène et l'ascorbate de sodium sont ajoutés et on incube le
10 mélange réactionnel. Un agent de traitement est ajouté et les produits sont analysés par électrophorèse sur gel dénaturant. Ceci est réalisé pour différentes concentrations en protéine. Le gel résultant est imagé à l'aide d'un balayeur phosphoimageur et le fichier d'image
15 à haute résolution est analysé pour déduire l'affinité de liaison du HIV-LockTM pour l'ADN de VIH par rapport à l'ADN cellulaire.

Plusieurs itérations de conception et de test peuvent être réalisées pour affiner la liaison du HIV-LockTM et d'autres TBA du VIH et d'autres organismes. Ce
20 procédé permet la conception d'assemblages de liaison tels que l'assemblage de liaison n'est pas compétitif avec les protéines de type sauvage pour un seul site de liaison dans les échantillons de génome. Le développement de TBA pour d'autres organismes et de TNA pour des
25 séquences dans ces organismes peut être réalisé à l'aide du procédé ci-dessus. Ce procédé est valide pour produire des assemblages de liaison pour tous les TBR d'acide nucléique comprenant des hybrides ADN-ADN, ADN-ARN et
30 ARN-ARN et les combinaisons de ces hybrides.

Exemple 16 - Procédé d'identification de molécules liant l'acide nucléique pour la production de TBA et BBA de l'invention

5 Dans le procédé de l'invention, les assemblages de liaison de cible et les assemblages de liaison d'amplification sont assemblés par identification de molécules liant l'acide nucléique, et liaison de parties liant l'acide nucléique des molécules de telle manière que l'on obtienne des TBA qui différencient des séquences
10 cibles particulières de séquences mêmes très apparentées. Un procédé d'identification de molécules liant l'acide nucléique implique les étapes suivantes :

1. Obtention d'un échantillon biologique contenant l'acide nucléique cible. Ceci peut être par exemple, un
15 organisme ou un extrait tissulaire infecté avec un pathogène.

2. Fragmentation de l'échantillon de manière à exposer les acides nucléiques et à réduire la taille des acides nucléiques présents dans l'échantillon.

20 3. Mise en contact d'une première fraction aliquote des acides nucléiques fragmentés avec un milieu tampon témoin et mise en contact d'une deuxième fraction aliquote des acides nucléiques fragmentés avec le milieu tampon témoin contenant un profil connu de molécules
25 liant l'acide nucléique.

4. Analyse des deux fractions aliquotes pour identifier les fragments qui ont un comportement altéré dans la fraction aliquote mise en contact avec les molécules liant la cible, par opposition à la fraction
30 aliquote témoin. Ceci est réalisé par électrophorèse sur gel à une dimension, électrophorèse sur gel à deux dimensions, chromatographie liquide à haute performance, chromatographie sur papier ou tout autre moyen qui révèle

un comportement différent des fragments d'acide nucléique lorsqu'ils sont liés à une molécule liant l'acide nucléique par opposition au cas où le fragment d'acide nucléique n'est pas lié.

5 5. Identification et isolement des fragments qui
présentent un comportement altéré par mise en contact
avec la molécule liant l'acide nucléique et séquençage du
fragment d'acide nucléique pour déterminer si des motifs
connus de molécule liant l'acide nucléique sont présents,
10 ou identification directe de la molécule liant l'acide
nucléique liée à l'acide nucléique. Ce dernier cas peut
être réalisé par exemple, par mise en contact d'une
grille à deux dimensions des acides nucléiques soumis à
électrophorèse avec des anticorps marqués de manière
15 différentielle, qui oient les différentes molécules liant
l'acide nucléique.

 Dans ce procédé, les motifs acide nucléique
préférables sont utilisés pour des objets diagnostiques
ou thérapeutiques, où l'acide nucléique cible a plus
20 d'une cible de molécule liant l'acide nucléique,
utilisable. De cette manière, un assemblage de liaison de
cible complexe peut être généré, qui tire avantage de la
proximité de différents motifs moléculaires liant l'acide
nucléique pour amplifier la spécificité du TBA assemblé à
25 partir des composants individuels, liant l'acide
nucléique, identifiés. Les différentes parties liant
l'acide nucléique des molécules liant l'acide nucléique
sont alors assemblées en les TBA complets comme décrit
ci-dessus, par exemple pour HIV-Lock™.

30

Exemple 17 - Procédé d'identification de séquences
spécifiques d'ARN dans un échantillon

Selon les procédés et compositions décrits dans la présente invention, n'importe quelle séquence d'acide nucléique peut être spécifiquement identifiée. L'identification de l'ARN de VIH cible dans un échantillon est réalisée par obtention d'un échantillon de sang de patient ou d'un autre fluide ou extrait biologique, qui peut contenir l'ARN de VIH, et le test de la présence de sites de liaison TAR. Tat est un régulateur positif de la réplication du VIH, qui lie la région TAR de l'ARN du VIH. La forme naturelle la plus petite, complètement active de tat de VIH est longue de 72 acides aminés, SEQ ID N°118 ici. Tat contient au moins deux domaines fonctionnels, et transactive l'expression des gènes depuis la longue répétition terminale de VIH (LTR de VIH). Tat lie une structure tige-boucle d'ARN, formée par l'auto-hybridation de séquences dans TAR, qui est juste en 5' du LTR de VIH. L'ARN TAR de VIH forme un renflement dinucléotide et deux structures tige-boucle (Rhim et coll. 1994 Virology 202 : 202-211) ient cette structure avec une plus faible avidité que les variants Tat où Ala58 est une thréonine ou où His65 est un résidu Asp (Derse et coll., 1993, Virology 194 : 530-536). L'utilisation de ces faits dans le présent procédé est réalisée par :

25 1. Fragmentation d'un échantillon biologique pour exposer les acides nucléiques et réduire la complexité de taille des acides nucléiques.

30 2. Mise en contact d'un TBA avec l'échantillon, qui identifie un hybride de la séquence de protéine liant TAR et d'une séquence flanquée proche dans le génome VIH. Le TBA utilisé pour cet objet est assemblé sur le cro comme chaperon à l'aide du Tat comme molécule liant spécifiquement l'ARN de VIH. Pour procurer la spécificité

du site TAR de HIV par rapport aux sites TAR très apparentés, qui peuvent être présents par d'autres pathogènes comme le cytomégalovirus, le TBA a également un composant anticorps, qui reconnaît la région liant la cible hybride ADN-ARN, formée lorsqu'un acide nucléique sonde se lie à l'ARN de LTR du VIH.

3. Elimination de tout « croisement » produit par liaison du Tat à la région TAR de l'ARN de VIH par des contaminants (ARN cousins) comme la séquence TAR de CMV, par mise en contact de la réaction avec un excès de variant Tat (les variants Ala58 en Thr ou His65 en Asp), qui lie plus avidement. De cette manière, les événements uniques de liaison dus au TBA liant un ARN cousin sont en compétition avec l'échantillon d'acide nucléique par la variant Tat. D'autre part, par choix approprié de l'affinité de la double liaison attendue suite à l'anticorps et au Tat, le TBA n'est pas déplacé des vraies cibles. Ce procédé est illustré à la figure 16. Dans un autre aspect du même procédé, le TBA peut être celui qui, plutôt que d'utiliser un variant de Tat, utilise un anticorps qui reconnaît ce segment d'acide nucléique, et le TBA utilisé est un TBA double anticorps.

Dans une version alternative de ce procédé, un acide nucléique sonde peut être utilisé, qui s'hybride à l'ARN de LTR de VIH. Ainsi, un segment duplex des sites sp1 de LTR peut être créé comme partie de la région de liaison de cible. Cette région de l'ARN de VIH flanque la région TAR, qui est en 5' du LTR, mais très proche. Un TBA contenant Tat et deux unités de liaison Sp1 est chaperonné pour donner Tat liant TAR et Sp1 liant les sites de liaison Sp1. L'amplification et la détection sont alors réalisées par addition des BNA, BBA et HNA appropriés. Dans une autre alternative encore, des PNA

ayant SEQ ID N°38 et SEQ ID N°39 (voir figure 7) peuvent être utilisés. Un TBA est utilisé, lequel contient une ou plusieurs unités de liaison Sp1 et une unité anticorps, qui lie l'hybride ADN-ARN produit par l'ARN de l'échantillon et le PNA SEQ ID N°38. Les BNA, BBA et HNA appropriés sont ajoutés pour amplifier le signal.

Naturellement, l'homme de métier conviendra que d'autres combinaisons de TBA et TNA peuvent être utilisées pour optimiser les procédés exemplifiés ici.

Il convient de comprendre que les séquences proposées ici ne sont qu'exemplaires et que d'autres séquences similaires, suggérées par celles-ci, peuvent être utilisées dans les procédés de l'invention. Il convient de comprendre également que bien que n'importe quelle séquence proposée ici puisse être conçue linéaire, elle peut être utilisée sous forme circulaire ou autre et bien qu'elle soit conçue comme non anti-sens, elle peut être utilisée sous forme codante ou non codante ou pour lier des séquences complémentaires codantes ou non codantes.

LISTE DES SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE :

(i) DEPOSANT :

5 Nom du déposant : The Gene Pool, Inc.
 Adresse : 300 Queen Anne Avenue N., Suite 392
 Ville : Seattle
 Etat/Province : Washington
 Pays : Etats-Unis
10 Code postal/Zip : 98109-4599
 Numéro de téléphone : (206) 526-8617
 Numéro de télécopie :

 (ii) TITRE DE L'INVENTION : Procédé de détection
15 d'acide nucléiques avec une composition de séquence
 spécifique

 (iii) NOMBRE DE SEQUENCES : 118

20 (iv) ADRESSE DE CORRESPONDANCE :

 (A) NOM : Saliwanchik & Saliwanchik
 (B) RUE : 2421 N.W. 41st St., Suite A-1
 (C) VILLE : Gainesville
 (D) ETAT : Floride
25 (E) PAYS : Etats-Unis
 (F) ZIP : 32606

(v) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

 (A) TYPE DE SUPPORT : disquette
30 (B) ORDINATEUR : IBM PC compatible
 (C) SYSTEME D'EXPLOITATION : PC-DOS/MS-DOS
 (D) LOGICIEL : PatentIn Release #1.0, version
 #1.25

(v) DONNEES SUR LA DEMANDE ACTUELLE :

(A) NUMERO DE LA DEMANDE :

(B) DATE DE DEPOT :

5 (C) CLASSIFICATION :

(viii) INFORMATION SUR LE REPRESENTANT LEGAL :

(A) NOM : Bencen, Gerard H

10 (B) NUMERO D'ENREGISTREMENT : 35 746

(C) NUMERO DE REFERENCE : GP-100.c1

(ix) INFORMATION DE TELECOMMUNICATION :

(A) TELEPHONE : (904)375-8100

15 (B) TELECOPIE : (904)372-5800

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°1 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 13 paires de bases

20 (B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

25 (iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°1

30

TGGGGATTCC CCA

13

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°2 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- 5 (A) LONGUEUR : 13 paires de bases
(B) TYPE : acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS : double
(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

10 (iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°2

15

AAGGGACTTT CCC

13

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°3 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- 20 (A) LONGUEUR : 13 paires de bases
(B) TYPE : acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS : double
(D) CONFIGURATION : linéaire

25 (ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

30

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°3

AGGGGACTTT CCG

13

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°4 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- 5 (A) LONGUEUR : 15 paires de bases
(B) TYPE : acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS : double
(D) CONFIGURATION : linéaire

10 (ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

15

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°4

GCTGGGGACT TTCCA

15

20 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°5 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- 25 (A) LONGUEUR : 15 paires de bases
(B) TYPE : acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS : double
(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

30

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°5

ACAAGGGACT TTCCG**15**

5 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°6 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 13 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

10 (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

15

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°6

CCGGGTTTTTC CCC**13**

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°7 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 27 paires de bases

25 (B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

30

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°7

5

AAGGGACTTT CCGCTGGGGA CTTTCCA

27

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°8 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

10

(A) LONGUEUR : 27 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

15

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°8

AAGGGACTTT CCGCTGGGGA CTTTCCG

27

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°9 :

25

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 26 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

30

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

5 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°9

GCTGGGGACT TTCCAGGGAG GCGTGG

26

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°10 :

10 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 26 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

15

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

20 (iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°10

GCTGGGGACT TTCCAGGGGA GGTGTG

26

25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°11 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 26 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

30 (C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

5 (iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°11

GCTGGGGACT TTCCGGGGAG CGTGGC

26

10

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°12 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 26 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

15 (C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

20 (iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°12

25

GCTGGGGACT TTCCGGGGAG GCGCGG

26

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°13 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

30 (A) LONGUEUR : 26 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

5 (iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°13

10

GCTGGGGACT TTCCAGAGAG GCGTGG

26

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°14 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

15 (A) LONGUEUR : 26 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

20 (ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

25

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°14

GCTGGGGACT TTCCAGGGGA GGCGTG

26

30 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°15 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 26 paires de bases

- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : double
- (D) CONFIGURATION : linéaire

5 (ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

10

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°15

GCTGGGGACT TTCCAGGGAG GCGTGG

26

15 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°16 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 26 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

20

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

25

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°16

30

GCTGGGGACT TTCCAGGGAG GCTGCC

26

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°17 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 33 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

5 (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

10

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°17

15

TTCCAGGGA GCGTGGCCT GGC GGGACT GGG

33

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°18 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 33 paires de bases

20 (B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

25

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

30

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°18

CGTGGCCTGG GCGGACTGG GGAGTGGCGT CCC

33

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°19 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 45 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

5 (C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

10 (iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°19

15

CTACAAGGGA CTTCCGCTG GGGACTTCC AGGGAGCGT GGCCT

45

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°20 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

20 (A) LONGUEUR : 46 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

25 (ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

30

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°20

CAGCAAGGGA CTTCCGCTG GGGACTTCC AGGGAGCGT TGGCCT

46

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°21 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

5

(A) LONGUEUR : 46 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

10

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

15

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°21

CATCAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTC AGGGGAGGTG TGGCCT

46

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°22 :

20

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 46 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

25

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

30

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°22

CAACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTC AGGGGAGGTG TGGCCT

46

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°23 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- 5 (A) LONGUEUR : 45 paires de bases
(B) TYPE : acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS : double
(D) CONFIGURATION : linéaire

10 (ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

15

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°23

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTC AGGGAGGCGT GGCAT

45

20 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°24 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 44 paires de bases
(B) TYPE : acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS : double
25 (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

30

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°24

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTC GGGAGCGTG GCCT

44

5 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°25 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 44 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

10 (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

15

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°25

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTC GGGAGGCGC GCCT

20

44

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°26 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 45 paires de bases

25 (B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

30

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°26

5

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTC AGAGAGGCGT GGACT

45

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°27 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

10

(A) LONGUEUR : 46 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

15

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°27

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTC AGGGGAGGCG TGGACT

46

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°28 :

25

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 46 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

30

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

5 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°28

CTACAGGGGA CTTCCGCTG GGGACTTTC AGGGAGGCGT GGGGAG

46

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°29 :

10 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
(A) LONGUEUR : 43 paires de bases
(B) TYPE : acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS : double
(D) CONFIGURATION : linéaire

15

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

20 (iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°29

CTACAGGGGA CTTCCGCTG GGGACTTTC AGGGAGGCTG CCT

43

25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°30 :

30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
(A) LONGUEUR : 48 paires de bases
(B) TYPE : acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS : double
(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

5 (iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°30

CTTCCGCTG GGGACTTTC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGACTGGG

48

10

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°31 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 45 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

15 (C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

20 (iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°31

25

TTCCAGGGA GGCCTGGCCT GGGCGGACT GGGGAGTGGC GTCCC

45

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°32 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

30 (A) LONGUEUR : 59 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

5 (iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

10 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°32

CTACAAGGGA CTTCCGCTG GGGACTTCC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGA CTGGGG 59

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°33 :

15 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
 (A) LONGUEUR : 59 paires de bases
 (B) TYPE : acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS : double
 (D) CONFIGURATION : linéaire

20 (ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

25 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°33

TTCCGCTGG GGGACTTCCA GGGAGGCGTG GCCTGGGCGG GACTGGGGAG TGGCGTCCC 59

30 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°34 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
 (A) LONGUEUR : 70 paires de bases

- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : double
- (D) CONFIGURATION : linéaire

5 (ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

10

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°34

CTACAAGGGA CTTTCGGCTG GGGACTTCC AGGGAGGCGT GGCCTGGCG GGACTGGGA 60
GTGGCGTCCC 70

15 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°35 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 61 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

20

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

25

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°35

TATCACCGCC AGTGGTATTT ATGTCAACAC CGCCAGAGAT AATTTATCAC CGCAGATGGT 60

30

T

61

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°36 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- 5 (A) LONGUEUR : 64 paires de bases
(B) TYPE : acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS : double
(D) CONFIGURATION : linéaire

10 (ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

15 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°36

TATCACCGCA AGGATAAAT ATCTAACACC GTGCGTGTG ACTATTTTAC CTCTGGCGGT 60
GATA 64

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°37 :

20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 70 paires de bases
(B) TYPE : acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS : double
(D) CONFIGURATION : linéaire

25

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

30 (iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°37

CTACAAGGGA CTTCCGCTG GGGACTTTC AGGGAGGCGT GCCTGGGCG GGACTGGGA 60
GTGGCGTCCC 70

5 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°38 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 37 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : double
- 10 (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

15 (iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°38

20 **CTACAAGGGA CTTCCGCTG GGGACTTTC AGGGAGG** 37

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°39 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 22 paires de bases
- 25 (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : double
- (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

30

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°39

5

CGGGACTGGG GAGTGGCGTC CC

22

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°40 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

10

(A) LONGUEUR : 103 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

15

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°40

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTC AGGGAGGTAT CACCGCCAGT GGTATTTATG 60

TCAACACCCG CAGAGATAAT TTATCACCGC AGATGGTTCT GCA 103

25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°41 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 62 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

30

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) MÅ

(iii) HYPOTHETIQUE : non

5 (iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°41

GAACCATCTG CGGTGATAAA TTATCTCTGG CGGTGTGAC ATAAATACCA CTGGCGGTGA 60
TA 62

10

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°42 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 71 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

15 (C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

20 (iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°42

25

GATCCAACCA TCTGCGGTGA TAAATTATCT CTGGCGGTGT TGACATAAAT ACCACTGGCG 60
GTGATACTGC A 71

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°43 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

30 (A) LONGUEUR : 63 paires de bases

- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : double
- (D) CONFIGURATION : linéaire

5 (ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

10

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°43

GTATCACCGC CAGTGGTATT TATGTCAACA CCGCCAGAGA TAATTTATCA CCGCAGATGG 60
TTG 63

15 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°44 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 21 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

20

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

25

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°44

30

GATCCGGGGG GATACCCCC G

21

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°45 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 91 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

5 (C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

10 (iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°45

15

CGGGACTGGG GAGTGGCGTC CCTATCACCG CAAGGGATAA ATATCTAACA CCGTGCCTGT 60**TGACTATTTT ACCTCTGGCG GTGATAGCAT G 91**

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°46 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

20 (A) LONGUEUR : 53 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

25 (ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

30

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°46

CTAAGGGCGT AACCGAAATC GGTGAACCG AAACCGGTTA GTATAAAAGC AGA

53

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°47 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- 5 (A) LONGUEUR : 54 paires de bases
(B) TYPE : acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS : double
(D) CONFIGURATION : linéaire

10 (ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

15

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°47

AAAAGGGAGT AACCGAAAAC GGTCGGGACC GAAAACGGTG TATATAAAG ATGT

54

20 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°48 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- 25 (A) LONGUEUR : 54 paires de bases
(B) TYPE : acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS : double
(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

30

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°48

AGTAGGGTGT AACCGAAAGC GGTCAACCG AAAACGGTGC ATATATAAAG CAAA

54

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°49 :

- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
- (A) LONGUEUR : 24 paires de bases
 - (B) TYPE : acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS : double
 - (D) CONFIGURATION : linéaire

10

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

15

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°49

GCTTCAACCG AATTCGGTTG CATG

24

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°50 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
- (A) LONGUEUR : 24 paires de bases
 - (B) TYPE : acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS : double
 - (D) CONFIGURATION : linéaire

25

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

30

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°50

TGTGCAACCG ATTTCCGGTTG CCTT**24**

5

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°51 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 24 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

10 (C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

15 (iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°51

20

TATGCAACCG AAATAGGTTG GGCA**24**

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°52 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

25 (A) LONGUEUR : 24 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

30 (ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°52

5

TGCCTAACCG TTTTCGGTTA CTG

24

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°53 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

10

(A) LONGUEUR : 24 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

15

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°53

GGACTAACCG TTTTAGGTCA TATT

24

25 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°54 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 52 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

30

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°54

GACGACTATC CAGCGACCAA GATCAGAGCC AGACACCGGA AACCCCTGCC AC

52

10 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°55 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 53 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

15

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

20

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°55

25

GACGACACCGG TATCCGCTAC TCAGCTTGTT AACAGCTAC AGCACACCCC CTC

53

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°56 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 60 paires de bases

30

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

5

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°56

10 **GACGACGACC TGCAGACACC ACAGACACCG CCCAGCCCCT TACAAAGCTG TTCTGTGCAG** 60

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°57 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- 15 (A) LONGUEUR : 68 paires de bases
 (B) TYPE : acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS : double
 (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

20

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

25

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°57

CATACCAAAG CCGTCGCCTT GGGCACCGAA GAAACACAAC CACTAAGTTG TTGCACAGAG 60
ACTCAGTG 68

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°58 :

30

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 77 paires de bases

- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : double
- (D) CONFIGURATION : linéaire

5 (ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

10

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°58

TAATGTAATT GATTGTAATG ACTCTATGTG CAGTACCAGT ACCGTATTCC AGCACCGTGT 60
CCGTGGGCAC CGCAAAG 77

15 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°59 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 80 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

20

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

25

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°59

ACAGACAACG ATAACCGACC ACCACAAGCA GCGGCCAAC ACCCCGCCTT GGACAATAGA 60
ACAGCACGTA CTGCAACTAA 80

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°60 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 266 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°60

CATATGCAAT ACAATGCATT ATACAAACTG GACACATATA TATATTTGTG AAGAAGCATC	60
AGTAACTGTG GTAGAGGGTC AAGTTGACTA TTATGGTTTA TATTATGTTC ATGAAGGAAT	120
ACGAACATAT TTTGTGCAGT TTAAAGATGA TGCAGAAAAA TATAGTAAAA ATAAAGTATG	180
GGAAGTTCAT GCGGGTGGTC AGGTAATATT ATGTCCTACA TCTGTGTTTA GCAGCAACGA	240
AGTATCCTCT CCTGAAATTA TTAGGC	266

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°61 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 95 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°61

5

AGGATGTATA AAAAAACATG GATATACAGT GGAAGTGCAG TTTGATGGAG ACATATGCTA 60
TTAGGCAGCA CTTGGCCAAC CACCCCGCCG CGACC 95

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°62 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

10

- (A) LONGUEUR : 81 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : double
- (D) CONFIGURATION : linéaire

15

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°62

CATGTTTTTT TATACATCCA TATCACCGCC AGTGGTATTT ATGTCAACAC CGCCAGAGAT 60
AATTTATCAC CGCAGATGGT T 81

25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°63 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 322 acides aminés
- (B) TYPE : acide aminé
- (D) CONFIGURATION : linéaire

30

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

(iii) HYPOTHETIQUE : non

5 (iv) ANTI-SENS : non

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°63

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

10

Gly	Lys	His	Cys	Glu	Asp	Gly	Val	Cys	Thr	Val	Thr	Ala	Gly	Pro	Lys
		115					120					125			
Asp	Met	Val	Val	Gly	Phe	Ala	Asn	Leu	Gly	Ile	Leu	His	Val	Thr	Lys
	130					135					140				
Lys	Lys	Val	Phe	Glu	Thr	Leu	Glu	Ala	Arg	Met	Thr	Glu	Ala	Cys	Ile
145					150					155					160
Arg	Gly	Tyr	Asn	Pro	Gly	Leu	Leu	Val	His	Ser	Asp	Leu	Ala	Tyr	Leu
				165					170						175
Gln	Ala	Glu	Gly	Gly	Gly	Asp	Arg	Gln	Leu	Thr	Asp	Arg	Glu	Lys	Glu
			180					185					190		
Ile	Ile	Arg	Gln	Ala	Ala	Val	Gln	Gln	Thr	Lys	Glu	Met	Asp	Leu	Ser
		195					200					205			
Val	Val	Arg	Leu	Met	Phe	Thr	Ala	Phe	Leu	Pro	Asp	Ser	Thr	Gly	Ser
	210					215					220				
Phe	Thr	Arg	Arg	Leu	Glu	Pro	Val	Val	Ser	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asp	Ser
225					230					235					240
Lys	Ala	Pro	Asn	Ala	Ser	Asn	Leu	Lys	Ile	Val	Arg	Met	Asp	Arg	Thr
				245					250						255
Ala	Gly	Cys	Val	Thr	Gly	Gly	Glu	Glu	Ile	Tyr	Leu	Leu	Cys	Asp	Lys
			260					265					270		
Val	Gln	Lys	Asp	Asp	Ile	Gln	Ile	Arg	Phe	Tyr	Glu	Glu	Glu	Glu	Asn
		275					280					285			
Gly	Gly	Val	Trp	Glu	Gly	Phe	Gly	Asp	Phe	Ser	Pro	Thr	Asp	Val	His
	290					295					300				
Arg	Gln	Phe	Ala	Ile	Val	Phe	Lys	Thr	Pro	Lys	Tyr	Lys	Asp	Val	Asn
305					310					315					320
Ile	Thr														

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°64 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

5

(A) LONGUEUR : 325 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

5

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°64

Met Ala Glu Asp Asp Pro Tyr Leu Gly Arg Pro Glu Gln Met Phe His
 1 5 10 15
 Leu Asp Pro Ser Leu Thr His Thr Ile Phe Asn Pro Glu Val Phe Gln
 20 25 30
 Pro Gln Met Ala Leu Pro Thr Ala Asp Gly Pro Tyr Leu Gln Ile Leu
 35 40 45
 Glu Gln Pro Lys Gln Arg Gly Phe Arg Phe Arg Tyr Val Cys Glu Gly
 50 55 60
 Pro Ser His Gly Gly Leu Pro Gly Ala Ser Ser Glu Lys Asn Lys Lys
 65 70 75 80
 Ser Tyr Pro Gln Val Lys Ile Cys Asn Tyr Val Gly Pro Ala Lys Val
 85 90 95
 Ile Val Gln Leu Val Thr Asn Gly Lys Asn Ile His Leu His Ala His
 100 105 110
 Ser Leu Val Gly Lys His Cys Glu Asp Gly Ile Cys Thr Val Thr Ala
 115 120 125
 Gly Pro Glu Asp Cys Val His Gly Phe Ala Asn Leu Gly Ile Leu His
 130 135 140
 Val Thr Lys Lys Lys Val Phe Glu Thr Leu Glu Ala Arg Met Thr Glu
 145 150 155 160
 Ala Cys Ile Arg Gly Tyr Asn Pro Gly Leu Leu Val His Pro Asp Leu
 165 170 175
 Ala Tyr Leu Gln Ala Glu Gly Gly Gly Asp Arg Gln Leu Gly Asp Arg
 180 185 190
 Glu Lys Glu Leu Ile Arg Gln Ala Ala Leu Gln Gln Thr Lys Glu Met
 195 200 205
 Asp Leu Ser Val Val Arg Leu Met Phe Thr Ala Phe Leu Pro Asp Ser
 210 215 220
 Thr Gly Ser Phe Thr Arg Arg Leu Glu Pro Val Val Ser Asp Ala Ile
 225 230 235 240
 Tyr Asp Ser Lys Ala Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val Arg Met
 245 250 255
 Asp Arg Thr Ala Gly Cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr Leu Leu
 260 265 270
 Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr Glu Glu
 275 280 285

Glu Glu Asn Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser Pro Thr
290 295 300

Asp Val His Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys Tyr Lys
305 310 315 320

Asp Ile Asn Ile Thr
325

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°65 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

5

(A) LONGUEUR : 268 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

10

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

15

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°65

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

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°66 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 263 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

5 (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

(iii) HYPOTHETIQUE : non

10

(iv) ANTI-SENS : non

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

15

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°66

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

Pro Pro His Arg Pro His Pro His Glu Leu Val Gly Lys Asp Cys Arg
 85 90 95
 Asp Gly Tyr Tyr Glu Ala Asp Leu Cys Pro Asp Arg Ser Ile His Ser
 100 105 110
 Phe Gln Asn Leu Gly Ile Gln Cys Val Lys Lys Arg Asp Leu Glu Gln
 115 120 125
 Ala Ile Ser Gln Arg Ile Gln Thr Asn Asn Asn Pro Phe His Val Pro
 130 135 140
 Ile Glu Glu Gln Arg Gly Asp Tyr Asp Leu Asn Ala Val Arg Leu Cys
 145 150 155 160
 Phe Gln Val Thr Val Arg Asp Pro Ala Gly Arg Pro Leu Leu Leu Thr
 165 170 175
 Pro Val Leu Ser His Pro Ile Phe Asp Asn Arg Ala Pro Asn Thr Ala
 180 185 190
 Glu Leu Lys Ile Cys Arg Val Asn Arg Asn Ser Gly Ser Cys Leu Gly
 195 200 205
 Gly Asp Glu Ile Phe Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Glu Asp Ile
 210 215 220
 Glu Val Tyr Phe Thr Gly Pro Gly Trp Glu Ala Arg Gly Ser Phe Ser
 225 230 235 240
 Gln Ala Asp Val His Arg Gln Val Ala Ile Val Phe Arg Thr Pro Pro
 245 250 255
 Tyr Ala Asp Pro Ser Leu Gln
 260

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°67 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

5

- (A) LONGUEUR : 263 acides aminés
 (B) TYPE : acide aminé
 (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

10

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

5 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°67

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

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°68 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
- (A) LONGUEUR : 299 acides aminés
 - (B) TYPE : acide aminé
 - (D) CONFIGURATION : linéaire

5

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

(iii) HYPOTHETIQUE : non

10

(iv) ANTI-SENS : non

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°68

Met Phe Pro Asn Gln Asn Asn Gly Ala Ala Pro Gly Gln Gly Pro Ala
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Gln Gln Ser Leu Asn Tyr Asn Gly Leu Pro Ala Gln Gln
 20 25 30
 Gln Gln Gln Leu Ala Gln Ser Thr Lys Asn Val Arg Lys Lys Pro Tyr
 35 40 45
 Val Lys Ile Thr Glu Gln Pro Ala Gly Lys Ala Leu Arg Phe Arg Tyr
 50 55 60
 Glu Cys Glu Gly Arg Ser Ala Gly Ser Ile Pro Gly Val Asn Ser Thr
 65 70 75 80
 Pro Glu Asn Lys Thr Tyr Pro Thr Ile Glu Ile Val Gly Tyr Lys Gly
 85 90 95
 Arg Ala Val Val Val Val Ser Cys Val Thr Lys Asp Thr Pro Tyr Arg
 100 105 110
 Pro His Pro His Asn Leu Val Gly Lys Glu Gly Cys Lys Lys Gly Val
 115 120 125
 Cys Thr Leu Glu Ile Asn Ser Glu Thr Met Arg Ala Val Phe Ser Asn
 130 135 140
 Leu Gly Ile Gln Cys Val Lys Lys Lys Asp Ile Glu Ala Ala Leu Lys
 145 150 155 160
 Ala Arg Glu Glu Ile Arg Val Asp Pro Phe Lys Thr Gly Phe Ser His
 165 170 175
 Arg Phe Gln Pro Ser Ser Ile Asp Leu Asn Ser Val Arg Leu Cys Phe
 180 185 190
 Gln Val Phe Met Glu Ser Glu Gln Lys Gly Arg Phe Thr Ser Pro Leu
 195 200 205
 Pro Pro Val Val Ser Glu Pro Ile Phe Asp Lys Lys Ala Met Ser Asp
 210 215 220
 Leu Val Ile Cys Arg Leu Cys Ser Cys Ser Ala Thr Val Phe Gly Asn
 225 230 235 240
 Thr Gln Ile Ile Leu Leu Cys Glu Lys Val Ala Lys Glu Asp Ile Ser
 245 250 255
 Val Arg Phe Phe Glu Glu Lys Asn Gly Gln Ser Val Trp Glu Ala Phe
 260 265 270
 Gly Asp Phe Gln His Thr Asp Val His Lys Gln Thr Ala Ile Thr Phe
 275 280 285
 Lys Thr Pro Arg Tyr His Thr Leu Asp Ile Thr
 290 295

- (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°69 :
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
- 5 (A) LONGUEUR : 261 acides aminés
(B) TYPE : acide aminé
(D) CONFIGURATION : linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE : peptide
- 10 (iii) HYPOTHETIQUE : non
- (iv) ANTI-SENS : non
- 15 (v) TYPE DE FRAGMENT : interne
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°69

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

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°70 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 262 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

5

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

(iii) HYPOTHETIQUE : non

10

(iv) ANTI-SENS : non

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°70

15

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

(iv) ANTI-SENS : non

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

5 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°71

Met	Ser	Asn	Lys	Lys	Gln	Ser	Asn	Arg	Leu	Thr	Glu	Gln	His	Lys	Leu
1			5					10						15	

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

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°72 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 17 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

5 (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

(iii) HYPOTHETIQUE : non

10

(iv) ANTI-SENS : non

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

15 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°72

Cys Asp Thr Asp Asp Arg His Arg Ile Glu Glu Lys Arg Lys Arg Lys
1 5 10 15

Thr

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°73 :

20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 168 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

25 (ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

30

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(iv) ANTI-SENS : non

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°74

Ser	Gly	Ile	Val	Pro	Gln	Leu	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Thr	Val	Asn	Leu	1	5	10	15
Gly	Cys	Lys	Leu	Asp	Leu	Lys	Thr	Ile	Ala	Leu	Arg	Ala	Arg	Asn	Ala	20	25	30	
Glu	Tyr	Asn	Pro	Lys	Arg	Phe	Ala	Ala	Val	Ile	Met	Arg	Ile	Arg	Glu	35	40	45	
Pro	Arg	Thr	Thr	Ala	Leu	Ile	Phe	Ser	Ser	Gly	Lys	Met	Val	Cys	Thr	50	55	60	
Gly	Ala	Lys	Ser	Glu	Glu	Gln	Ser	Arg	Leu	Ala	Ala	Arg	Lys	Tyr	Ala	65	70	75	80
Arg	Val	Val	Gln	Lys	Leu	Gly	Phe	Pro	Ala	Lys	Phe	Leu	Asp	Phe	Lys	85	90	95	
Ile	Gln	Asn	Met	Val	Gly	Ser	Cys	Asp	Val	Lys	Phe	Pro	Ile	Arg	Leu	100	105	110	
Glu	Gly	Leu	Val	Leu	Thr	His	Gln	Gln	Phe	Ser	Ser	Tyr	Glu	Pro	Glu	115	120	125	
Leu	Phe	Pro	Gly	Leu	Ile	Tyr	Arg	Met	Ile	Lys	Pro	Arg	Ile	Val	Leu	130	135	140	
Leu	Ile	Phe	Val	Ser	Gly	Lys	Val	Val	Leu	Thr	Gly	Ala	Lys	Val	Arg	145	150	155	160
Ala	Glu	Ile	Tyr	Glu	Ala	Phe	Glu	Asn	Ile	Tyr	Pro	Ile	Leu	Lys	Gly	165	170	175	
Phe	Arg	Lys	Thr	Thr	180														

10

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°75 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 85 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé
 (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

5

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

10

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°75

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

15

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°76 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 87 acides aminés

20

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°77

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

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°78 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

10

(A) LONGUEUR : 84 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

15

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

20

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°78

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

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°80 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- 5 (A) LONGUEUR : 84 acides aminés
 (B) TYPE : acide aminé
 (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

10

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

15

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°80

```

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

```

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°81 :

5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 84 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

10 (ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

15

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°81

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

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°82 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

5

- (A) LONGUEUR : 80 acides aminés
 (B) TYPE : acide aminé
 (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

10

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

15

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°82

```

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

```

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°83 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

5

(A) LONGUEUR : 80 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

10

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

15

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°83

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

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°84 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- 5 (A) LONGUEUR : 81 acides aminés
 (B) TYPE : acide aminé
 (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

10

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

15

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°84

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

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°85 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

5

(A) LONGUEUR : 21 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

10

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

15

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°85

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
 1 5 10 15
 Glu Asn Tyr Cys Asn
 20

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°86 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 30 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

5

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

(iii) HYPOTHETIQUE : non

10

(iv) ANTI-SENS : non

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°86

15

Phe	Val	Asn	Gln	His	Leu	Cys	Gly	Ser	His	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Tyr
1				5				10						15	
Leu	Val	Cys	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Thr		
			20				25						30		

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°87 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

20

(A) LONGUEUR : 21 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

25

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

30

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°87

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Ala Ser Val Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
 1 5 10 15
 Glu Asn Tyr Cys Asn
 20

5

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°88 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 30 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

10

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

(iii) HYPOTHETIQUE : non

15

(iv) ANTI-SENS : non

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°88

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
 20 25 30

25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°89 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 24 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

(iii) HYPOTHETIQUE : non

5

(iv) ANTI-SENS : non

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

10

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°89

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Ile
 1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
 20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°90 :

15

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 33 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

20

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

25

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°90

Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Ile Cys Gly Arg Glu Leu Val
1 5 10 15

Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser Lys Arg Ser
20 25 30

Leu

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°91 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

5

(A) LONGUEUR : 24 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

10

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

15

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°91

Glu Glu Lys Met Gly Thr Ala Lys Lys Cys Cys Ala Ile Gly Cys Ser
1 5 10 15

Thr Glu Asp Phe Arg Met Val Cys
20

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°92 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 40 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

25

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

(iii) HYPOTHETIQUE : non

5 (iv) ANTI-SENS : non

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°92

10

Arg Pro Asn Trp Glu Glu Arg Ser Arg Leu Cys Gly Arg Asp Leu Ile
1 5 10 15

Arg Ala Phe Ile Tyr Leu Cys Gly Gly Thr Arg Trp Thr Arg Leu Pro
20 25 30

Asn Phe Gly Asn Tyr Pro Ile Met
35 40

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°93 :

15 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 182 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

20 (ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

25

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°93

Ser	Gly	Ile	Val	Pro	Thr	Leu	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Thr	Val	Asn	Leu
1				5					10					15	
Asp	Cys	Lys	Leu	Asp	Leu	Lys	Ala	Ile	Ala	Leu	Gln	Ala	Arg	Asn	Ala
			20					25					30		
Glu	Tyr	Asn	Pro	Lys	Arg	Phe	Ala	Ala	Val	Ile	Met	Arg	Ile	Arg	Glu
		35					40					45			
Pro	Lys	Thr	Thr	Ala	Leu	Ile	Phe	Ala	Ser	Gly	Lys	Met	Val	Cys	Thr
	50					55						60			
Gly	Ala	Lys	Ser	Glu	Asp	Phe	Ser	Lys	Met	Ala	Ala	Arg	Lys	Tyr	Ala
65					70					75					80
Arg	Ile	Val	Gln	Lys	Leu	Gly	Phe	Pro	Ala	Lys	Phe	Lys	Asp	Phe	Lys
				85					90						95
Ile	Gln	Asn	Ile	Val	Gly	Ser	Cys	Asp	Val	Lys	Phe	Pro	Ile	Arg	Leu
			100					105						110	
Glu	Gly	Leu	Ala	Tyr	Ser	His	Ala	Ala	Phe	Ser	Ser	Tyr	Glu	Pro	Glu
		115					120					125			
Leu	Phe	Pro	Gly	Leu	Ile	Tyr	Arg	Met	Lys	Val	Pro	Lys	Ile	Val	Leu
	130					135						140			
Leu	Ile	Phe	Val	Ser	Gly	Lys	Ile	Val	Ile	Thr	Gly	Ala	Lys	Met	Arg
145					150					155					160
Asp	Glu	Thr	Tyr	Lys	Ala	Phe	Glu	Asn	Ile	Tyr	Pro	Val	Leu	Ser	Glu
				165					170						175
Phe	Arg	Lys	Ile	Gln	Gln										
			180												

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°94 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

5

(A) LONGUEUR : 84 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

10

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

5 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°94

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

Phe Met ser ile

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°95 :

10 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 84 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

15 (ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

20

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°95

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

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°96 :

- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
- (A) LONGUEUR : 83 acides aminés
 - (B) TYPE : acide aminé
 - (D) CONFIGURATION : linéaire
- 10 (ii) TYPE DE MOLECULE : peptide
- (iii) HYPOTHETIQUE : non
- (iv) ANTI-SENS : non
- 15 (v) TYPE DE FRAGMENT : interne
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°96

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

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°97 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- 5 (A) LONGUEUR : 84 acides aminés
 (B) TYPE : acide aminé
 (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

10

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

15

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°97

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

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°98 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

5

(A) LONGUEUR : 89 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

10

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

15

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°98

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

Arg Gln Gly Gln Ala Gln Ile Leu Ile Thr Phe Gly Ser Pro Ser Gln
 50 55 60

Arg Gln Asp Phe Leu Lys His Val Pro Leu Pro Pro Gly Met Asn Ile
 65 70 75 80

Ser Gly Phe Thr Ala Ser Leu Asp Phe
 85

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°99 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- 5 (A) LONGUEUR : 7 acides aminés
 (B) TYPE : acide aminé
 (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

10

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

15

(v) TYPE DE FRAGMENT : C-terminal

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°99

Ser Asn Lys Lys Thr Thr Ala
 1 5

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°100 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- 25 (A) LONGUEUR : 4 acides aminés
 (B) TYPE : acide aminé
 (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

5 (v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°100

Asn Ser Asn Thr

1

10

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°101 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 4 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

15

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

(iii) HYPOTHETIQUE : non

20

(iv) ANTI-SENS : non

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

25

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°101

Ser Gly Asn Thr

1

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°102 :

30

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 6 acides aminés

Cys Tyr Pro Glu Ile Lys Asp Lys Glu Glu Val Gln Arg Lys Arg
 1 5 10 15

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°104 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

5

(A) LONGUEUR : 66 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : protéine

10

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

15

(v) TYPE DE FRAGMENT : N-terminal

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°104

Met Glu Gln Arg Ile Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys
 20 25 30

Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly
 35 40 45

Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr
 50 55 60

Thr Ala
 65

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°105 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 66 acides aminés

- (B) TYPE : acide aminé
- (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : protéine

5

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

10

(v) TYPE DE FRAGMENT : N-terminal

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°105

Met Glu Gln Glu Ile Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys
 20 25 30

Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly
 35 40 45

Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr
 50 55 60

Thr Ala
 65

15

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°106 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 66 acides aminés

20

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : protéine

25

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

(v) TYPE DE FRAGMENT : N-terminal

5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°106

```

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

```

10 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°107 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 96 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

15

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

(iii) HYPOTHETIQUE : non

20

(iv) ANTI-SENS : non

(v) TYPE DE FRAGMENT : N-terminal

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°107

25

```

ser Thr Lys Lys Lys Pro Leu Thr Gln Glu Gln Leu Glu Asp Ala Arg
1          5          10          15

Arg Leu Lys Ala Ile Tyr Glu Lys Lys Lys Asn Glu Leu Gly Leu Ser
          20          25          30

Gln Glu Ser Val Ala Asp Lys Met Gly Met Gly Gln Ser Gly Val Gly
          35          40          45

Ala Leu Phe Asn Gly Ile Asn Ala Leu Asn Ala Tyr Asn Ala Ala Leu
50          55          60

Leu Ala Lys Ile Leu Lys Val Ser Val Glu Glu Phe Ser Pro Ser Ile
65          70          75          80

Ala Arg Glu Ile Tyr Glu Met Tyr Glu Ala Val Ser Met Glu Pro Ser
          85          90          95

```

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°108 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

5

(A) LONGUEUR : 96 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

10

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

15

(v) TYPE DE FRAGMENT : N-terminal

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°108

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

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°109 :

- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
- (A) LONGUEUR : 180 acides aminés
 - (B) TYPE : acide aminé
 - (D) CONFIGURATION : linéaire

10 (ii) TYPE DE MOLECULE : protéine

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

15

(v) TYPE DE FRAGMENT : N-terminal

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°109

Gly	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys	Thr	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	Tyr	Gln	Leu
1				5					10					15	
Glu	Asn	Tyr	Cys	Asn	Met	Ser	Met	Glu	Gln	Arg	Ile	Thr	Leu	Lys	Asp
			20					25					30		
Tyr	Ala	Met	Arg	Phe	Gly	Gln	Thr	Lys	Thr	Ala	Lys	Asp	Leu	Gly	Val
		35					40					45			
Tyr	Gln	Ser	Ala	Ile	Asn	Lys	Ala	Ile	His	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile	Phe
	50					55					60				
Leu	Thr	Ile	Asn	Ala	Asp	Gly	Ser	Val	Tyr	Ala	Glu	Glu	Val	Lys	Pro
65					70					75					80
Phe	Pro	Ser	Asn	Lys	Lys	Thr	Thr	Ala	Ser	Asn	Lys	Lys	Thr	Thr	Ala
				85					90						95
Asn	Ser	Asn	Thr	Thr	Pro	Ile	Val	His	Leu	Lys	Gly	Asp	Ala	Asn	Thr
			100					105					110		
Leu	Lys	Cys	Leu	Arg	Tyr	Arg	Phe	Lys	Lys	His	Cys	Thr	Leu	Tyr	Thr
		115					120					125			
Ala	Val	Ser	Ser	Thr	Trp	His	Trp	Thr	Gly	His	Asn	Val	Lys	His	Lys
		130				135					140				
Ser	Ala	Ile	Val	Thr	Leu	Thr	Tyr	Asp	Ser	Glu	Trp	Gln	Arg	Asp	Gln
145					150					155					160
Phe	Leu	ser	Gln	Val	Lys	Ile	Pro	Lys	Thr	Ile	Thr	Val	ser	Thr	Gly
				165					170						175
Phe	Met	ser	Ile												
			180												

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°110 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

5

(A) LONGUEUR : 113 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : protéine

10

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

(v) TYPE DE FRAGMENT : N-terminal

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°110

5

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

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°111 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

10

(A) LONGUEUR : 292 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : protéine

15

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

20

(v) TYPE DE FRAGMENT : N-terminal

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°111

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

Gln Asn Met Val Gly Ser Cys Asp Val Lys Phe Pro Ile Arg Leu Glu
 210 215 220
 Gly Leu Val Leu Thr His Gln Gln Phe Ser Ser Tyr Glu Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Gly Leu Ile Tyr Arg Met Ile Lys Pro Arg Ile Val Leu Leu
 245 250 255
 Ile Phe Val Ser Gly Lys Val Val Leu Thr Gly Ala Lys Val Arg Ala
 260 265 270
 Glu Ile Tyr Glu Ala Phe Glu Asn Ile Tyr Pro Ile Leu Lys Gly Phe
 275 280 285
 Arg Lys Thr Thr
 290

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°112 :

5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 273 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

10 (ii) TYPE DE MOLECULE : protéine

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

15

(v) TYPE DE FRAGMENT : N-terminal

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°112

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

Phe

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°113 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

5

(A) LONGUEUR : 421 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : protéine

10

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

(v) TYPE DE FRAGMENT : N-terminal

15

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°113

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

His Leu Asn Thr Ala Leu Thr His Ser Ile Phe Asn Ala Glu Leu Tyr
 115 120 125

Ser Pro Glu Ile Pro Leu Ser Thr Asp Gly Pro Tyr Leu Gln Ile Leu
 130 135 140

Glu Gln Pro Lys Gln Arg Gly Phe Arg Phe Arg Tyr Val Cys Glu Gly
 145 150 155 160

Pro Ser His Gly Gly Leu Pro Gly Ala Ser Ser Glu Lys Asn Lys Lys
 165 170 175

Ser Tyr Pro Gln Val Lys Ile Cys Asn Tyr Val Gly Pro Ala Lys Val
 180 185 190

Ile Val Gln Leu Val Thr Asn Gly Lys Asn Ile His Leu His Ala His
 195 200 205

Ser Leu Val Gly Lys His Cys Glu Asp Gly Val Cys Thr Val Thr Ala
 210 215 220

Gly Pro Lys Asp Met Val Val Gly Phe Ala Asn Leu Gly Ile Leu His
 225 230 235 240

Val Thr Lys Lys Lys Val Phe Glu Thr Leu Glu Ala Arg Met Thr Glu
 245 250 255

Ala Cys Ile Arg Gly Tyr Asn Pro Gly Leu Leu Val His Ser Asp Leu
 260 265 270

Ala Tyr Leu Gln Ala Glu Gly Gly Gly Asp Arg Gln Leu Thr Asp Arg
 275 280 285

Glu Lys Glu Ile Ile Arg Gln Ala Ala Val Gln Gln Thr Lys Glu Met
 290 295 300

Asp Leu Ser Val Val Arg Leu Met Phe Thr Ala Phe Leu Pro Asp Ser
 305 310 315 320

Thr Gly Ser Phe Thr Arg Arg Leu Glu Pro Val Val Ser Asp Ala Ile
 325 330 335

Tyr Asp Ser Lys Ala Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val Arg Met
 340 345 350

Asp Arg Thr Ala Gly Cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr Leu Leu
 355 360 365

Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr Glu Glu
 370 375 380

Glu Glu Asn Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser Pro Thr
 385 390 395 400

Asp Val His Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys Tyr Lys
 405 410 415

Asp Val Asn Ile Thr
420

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°114 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- 5 (A) LONGUEUR : 391 acides aminés
(B) TYPE : acide aminé
(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : protéine

10

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

15

(v) TYPE DE FRAGMENT : N-terminal

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°114

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

Asp Arg Glu Lys Glu Leu Ile Arg Gln Ala Ala Leu Gln Gln Thr Lys
 260 265 270
 Glu Met Asp Leu Ser Val Val Arg Leu Met Phe Thr Ala Phe Leu Pro
 275 280 285
 Asp Ser Thr Gly Ser Phe Thr Arg Arg Leu Glu Pro Val Val Ser Asp
 290 295 300
 Ala Ile Tyr Asp Ser Lys Ala Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val
 305 310 315 320
 Arg Met Asp Arg Thr Ala Gly Cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr
 325 330 335
 Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr
 340 345 350
 Glu Glu Glu Glu Asn Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser
 355 360 365
 Pro Thr Asp Val His Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys
 370 375 380
 Tyr Lys Asp Ile Asn Ile Thr
 385 390

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°115 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

5

(A) LONGUEUR : 391 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : protéine

10

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

15

(v) TYPE DE FRAGMENT : N-terminal

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°115

Met Glu Gln Glu Ile Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys
 20 25 30
 Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly
 35 40 45
 Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr
 50 55 60
 Thr Ala Met Ala Glu Asp Asp Pro Tyr Leu Gly Arg Pro Glu Gln Met
 65 70 75 80
 Phe His Leu Asp Pro Ser Leu Thr His Thr Ile Phe Asn Pro Glu Val
 85 90 95
 Phe Gln Pro Gln Met Ala Leu Pro Thr Ala Asp Gly Pro Tyr Leu Gln
 100 105 110
 Ile Leu Glu Gln Pro Lys Gln Arg Gly Phe Arg Phe Arg Tyr Val Cys
 115 120 125
 Glu Gly Pro Ser His Gly Gly Leu Pro Gly Ala Ser Ser Glu Lys Asn
 130 135 140
 Lys Lys Ser Tyr Pro Gln Val Lys Ile Cys Asn Tyr Val Gly Pro Ala
 145 150 155 160
 Lys Val Ile Val Gln Leu Val Thr Asn Gly Lys Asn Ile His Leu His
 165 170 175
 Ala His Ser Leu Val Gly Lys His Cys Glu Asp Gly Ile Cys Thr Val
 180 185 190
 Thr Ala Gly Pro Glu Asp Cys Val His Gly Phe Ala Asn Leu Gly Ile
 195 200 205
 Leu His Val Thr Lys Lys Lys Val Phe Glu Thr Leu Glu Ala Arg Met
 210 215 220
 Thr Glu Ala Cys Ile Arg Gly Tyr Asn Pro Gly Leu Leu Val His Pro
 225 230 235 240
 Asp Leu Ala Tyr Leu Gln Ala Glu Gly Gly Gly Asp Arg Gln Leu Gly
 245 250 255
 Asp Arg Glu Lys Glu Leu Ile Arg Gln Ala Ala Leu Gln Gln Thr Lys
 260 265 270
 Glu Met Asp Leu Ser Val Val Arg Leu Met Phe Thr Ala Phe Leu Pro
 275 280 285

Asp Ser Thr Gly Ser Phe Thr Arg Arg Leu Glu Pro Val Val Ser Asp
 290 295 300
 Ala Ile Tyr Asp Ser Lys Ala Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val
 305 310 315 320
 Arg Met Asp Arg Thr Ala Gly Cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr
 325 330 335
 Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr
 340 345 350
 Glu Glu Glu Glu Asn Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser
 355 360 365
 Pro Thr Asp Val His Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys
 370 375 380
 Tyr Lys Asp Ile Asn Ile Thr
 385 390

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°116 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- 5 (A) LONGUEUR : 241 acides aminés
 (B) TYPE : acide aminé
 (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : protéine

10

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

15

(v) TYPE DE FRAGMENT : N-terminal

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°116

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

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°117 :

5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 10 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(D) CONFIGURATION : double

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

5

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

10

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°117

GGGAMTNYCC

10

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID N°118 :

15

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 72 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

20

(ii) TYPE DE MOLECULE : protéine

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(iv) ANTI-SENS : non

25

(v) TYPE DE FRAGMENT : N-terminal

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID N°118

Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala His Gln Asn Ser Gln Thr
 50 55 60

His Gln Ala Ser Leu Ser Lys Gln
65 70

Revendications

1. Acide nucléique sonde (PNA) comprenant deux séquences différentes qui sont:

- 5 (a) une séquence monocaténaire (1/2 TBR) capable de former, dans des conditions d'hybridation, un hybride (TBR) avec un acide nucléique cible (TNA); et
- (b) une séquence monocaténaire (1/2 BBR) capable de former, dans des conditions d'hybridation, un hybride (BBR) avec une séquence monocaténaire présente dans un
- 10 acide nucléique d'amplification (BNA); dans lequel ledit TBR est capable de se lier avec une forte affinité à une substance (TBA) capable de distinguer un hybride apparié (TBR) d'un hybride possédant des nucléotides non appariés, et ledit BBR est
- 15 capable de se lier avec une forte affinité à une substance (BBA) capable de distinguer un hybride apparié (BBR) d'un hybride possédant des nucléotides non appariés.

2. PNA selon la revendication 1, dans lequel le TBR

20 est constitué d'un ou plusieurs sites de reconnaissance pour une protéine de liaison d'acide nucléique, une protéine de liaison d'ADN, une protéine de liaison d'hybride ADN-ARN ou une protéine de liaison d'ARN.

3. PNA selon la revendication 2, dans lequel le TBR

25 est un site de reconnaissance pour une protéine de liaison d'acide nucléique présent dans le génome d'un pathogène, ou est un site de liaison associé à un état pathogène dans un génome de vertébré, ou est un site de reconnaissance pour protéine de liaison d'acide nucléique

30 présent dans le génome d'un organisme qui contamine un processus de fermentation.

4. PNA selon la revendication 2, dans lequel le TBR est le LTR de HIV ou une portion de celui-ci.

5. Procédé de détection ou de localisation d'une séquence de TNA spécifique, comprenant les étapes consistant à:

- 5 (a) hybrider ledit TNA avec le PNA de la revendication 1;
- (b) hybrider ledit PNA avec un BNA contenant un 1/2 BBR dont la séquence est complémentaire à une séquence de 1/2 BBR dans le PNA;
- 10 (c) ajouter les produits des étapes (a) et (b) contenant un TBR et un BBR à une surface, un liquide ou un autre milieu contenant un TBA;
- (d) ajouter des BBA au mélange dans l'étape (c), ledit BBA comprenant
- 15 (i) une molécule ou une portion d'une molécule capable de se lier sélectivement à un BBR;
- (ii) un indicateur décelable; et
- (e) détecter un signal produit par l'indicateur attaché au BBA.

20 6. Procédé selon la revendication 5, dans lequel ledit indicateur est une protéine, y compris des enzymes capables de catalyser des réactions conduisant à la production de produits de réaction colorés; un radionucléide; des billes colorées.

25 7. Procédé *in vitro* d'amplification du signal obtenu par liaison du PNA de la revendication 1 à un TNA, qui comprend les étapes consistant à lier des BNA à l'hybride PNA-TNA, et à lier des BBA marqués aux BNA.

30 8. Procédé pour détecter ou localiser des séquences d'acides nucléiques spécifiques avec une grande sensibilité et une grande spécificité, qui comprend les étapes consistant à:

- (a) ajouter des PNA tels que définis dans la revendication 1, contenant un 1/2 BBR et un 1/2 TBR, à un

- échantillon contenant ou soupçonné de contenir des TNA contenant des séquences de 1/2 TBR, pour former un complexe présentant des régions de liaison cibles, des TBR, formées par l'hybridation de 1/2 TBR complémentaires présents respectivement dans les PNA et les TNA;
- 5 (b) lier les TBR formés au cours de l'étape (a) à un TBA immobilisé, pour former un complexe TBA-TNA-PNA;
- (c) ajouter des acides nucléiques d'amplification, BNA, contenant des régions de liaison d'amplification, 1/2 BBR, au complexe formé au cours de l'étape (b) de telle sorte que les 1/2 BBR dans les BNA s'hybrident avec les séquences de 1/2 BBR présentes dans les PNA, ou à des 1/2 BBR présents dans les BNA déjà liés au PNA, pour former des BBR, de telle sorte qu'il se forme des complexes TBA-TNA-PNA-(BNA)_n;
- 10 (d) ajouter des acides nucléiques en épingle à cheveux, HNA, contenant des séquences de 1/2 BBR, au complexe formé au cours de l'étape (c); de telle sorte que les 1/2 BBR dans les HNA s'hybrident avec toute séquence de 1/2 BBR disponible, présente dans les BNA du complexe de l'étape (c), encapsulant ainsi les extensions des BNA sur les complexes TBA-TNA-PNA-(BNA)_n de l'étape (c) pour former des complexes TBA-TNA-PNA-(BNA)_n-HNA;
- 20 (e) ajouter des groupes de liaison d'amplification, BBA, reliés à des fractions indicatrices, aux complexes TBA-TNA-PNA-(BNA)_n-HNA formés au cours de l'étape (d), pour former des complexes TBA-TNA-PNA-(BNA-BBA)_n-HNA; et
- (f) détecter les signaux produits par les fractions indicatrices liées aux TBA, PNA, BNA, BBA ou HNA dans les complexes TBA-TNA-PNA-(BNA-BBA)_n-HNA de l'étape (e);
- 30 le TNA comprenant:
- (i) une ou plusieurs séquences d'acide nucléique de 1/2 TBR spécifique, dont la présence ou

l'absence dans un échantillon particulier doit être confirmée;

le BNA comprenant:

- 5 (i) un 1/2 BBR, comme présenté à la figure I (IIb), qui possède une séquence qui est complémentaire à une séquence de 1/2 BBR dans un PNA et qui est capable de former, dans des conditions d'hybridation, un hybride, BBR, avec le PNA;
- 10 (ii) un OSA qui n'est pas un support attaché et/ou un indicateur, ou un support attaché ou un autre moyen de localisation comprenant, sans y être limité, un attachement à des billes, des polymères et des surfaces, et/ou des
- 15 (iii) des sites d'hybridation, 1/2 BBR, additionnels pour d'autres BNA; et
- (iv) des séquences, 1/2 BBR, qui peuvent s'hybrider sur des BNA déjà hybridés sur le PNA;

20 le BBA comprenant:

- (i) une molécule ou une portion d'une molécule qui est capable de se lier sélectivement à un BBR; et
- (ii) un OSA qui n'est pas un support attaché et/ou
- 25 un indicateur, ou un support attaché ou un autre moyen de localisation comprenant, sans y être limité, un attachement à des billes, des polymères et des surfaces, et/ou des indicateurs;

30 et le TBA comprenant

- (i) une molécule ou une portion d'une molécule qui est capable de se lier sélectivement à un TBR; et

(ii) aucun support attaché et/ou indicateur, ou un support attaché ou un autre moyen de localisation comprenant, sans y être limité, un attachement à des billes, des polymères et des surfaces, et/ou des indicateurs.

5
10
15
20
25

9. Procédé d'hybridation en phase solide pour détecter la présence d'un polynucléotide cible en utilisant un PNA tel que défini dans la revendication 1, impliquant l'immobilisation d'un polynucléotide cible, s'il est présent dans un échantillon de test, directement ou en passant par une structure de capture intermédiaire, sur une phase solide à un site de capture; avant, pendant ou après ladite immobilisation, attacher une étiquette décelable audit polynucléotide cible, s'il est présent; et détecter ladite étiquette, si elle existe, au site de capture; dans lequel l'immobilisation comprend l'utilisation d'un groupe de liaison cible (TBA) qui ne se lie qu'à un hybride unique de l'acide nucléique cible, et un acide nucléique sonde (PNA) comprenant un 1/2 BBR capable de fixer un acide nucléique d'amplification (BNA) contenant un 1/2 BBR monocaténaire complémentaire qui, lors d'une hybridation avec le 1/2 BBR dans le PNA, forme un BBR capable de fixer des groupes de liaison d'amplification (BBA) marqués, les termes TBA, BNA, BBR et BNA étant tels que définis dans la revendication 1.

30

10. Kit d'essai diagnostique ou judiciaire pour la détection d'une séquence d'acide nucléique cible dans un échantillon d'acide nucléique, qui comprend une première et une seconde sondes d'acide nucléique et une première et une seconde protéines de liaison d'acide nucléique, dans lequel la première sonde possède une séquence complémentaire de la séquence cible et une séquence supplémentaire;

le première protéine de liaison est spécifique pour le premier duplex sonde-cible;

la seconde sonde est complémentaire à la séquence additionnelle de la première sonde; et

5 la seconde protéine de liaison se lie spécifiquement au duplex première sonde-seconde sonde, et est marquée avec une étiquette détectable.

10 11. Kit selon la revendication 10, dans lequel la première sonde est complémentaire au LTR de HIV et, lors d'une hybridation de la première sonde avec LTR de HIV, il se forme un site de liaison pour NF-kB, ou une sous-unité de celui-ci, SP1, une protéine de liaison à TATA, HIV-Detect I, II, III ou IV, ou HIV-Lock.

15 12. Kit selon la revendication 11, dans lequel première protéine de liaison est NF-kB, une sous-unité de celui-ci, SP1, une protéine de liaison à TATA, HIV-Detect I, II, III ou IV, ou HIV-Lock.

20 13. Kit selon l'une quelconque des revendications 10 à 12, dans lequel la première sonde, en plus d'être complémentaire au LTR de HIV, comprend une séquence codant l'opérateur de gauche ou de droite du bactériophage lambda, et la seconde sonde comprend une séquence complémentaire à ladite séquence codant l'opérateur gauche ou droit du bactériophage lambda de
25 telle sorte que, lors d'une hybridation de la première et de la seconde sondes, il se forme un site de liaison pour le répresseur cI du bactériophage lambda, le répresseur *cro* du bactériophage lambda, ou un dérivé ou un homologue de ceux-ci.

30 14. Kit selon la revendication 13, dans lequel la seconde protéine de liaison est le répresseur cI du bactériophage lambda, le répresseur *cro* du bactériophage lambda, ou un dérivé ou un homologue de ceux-ci.

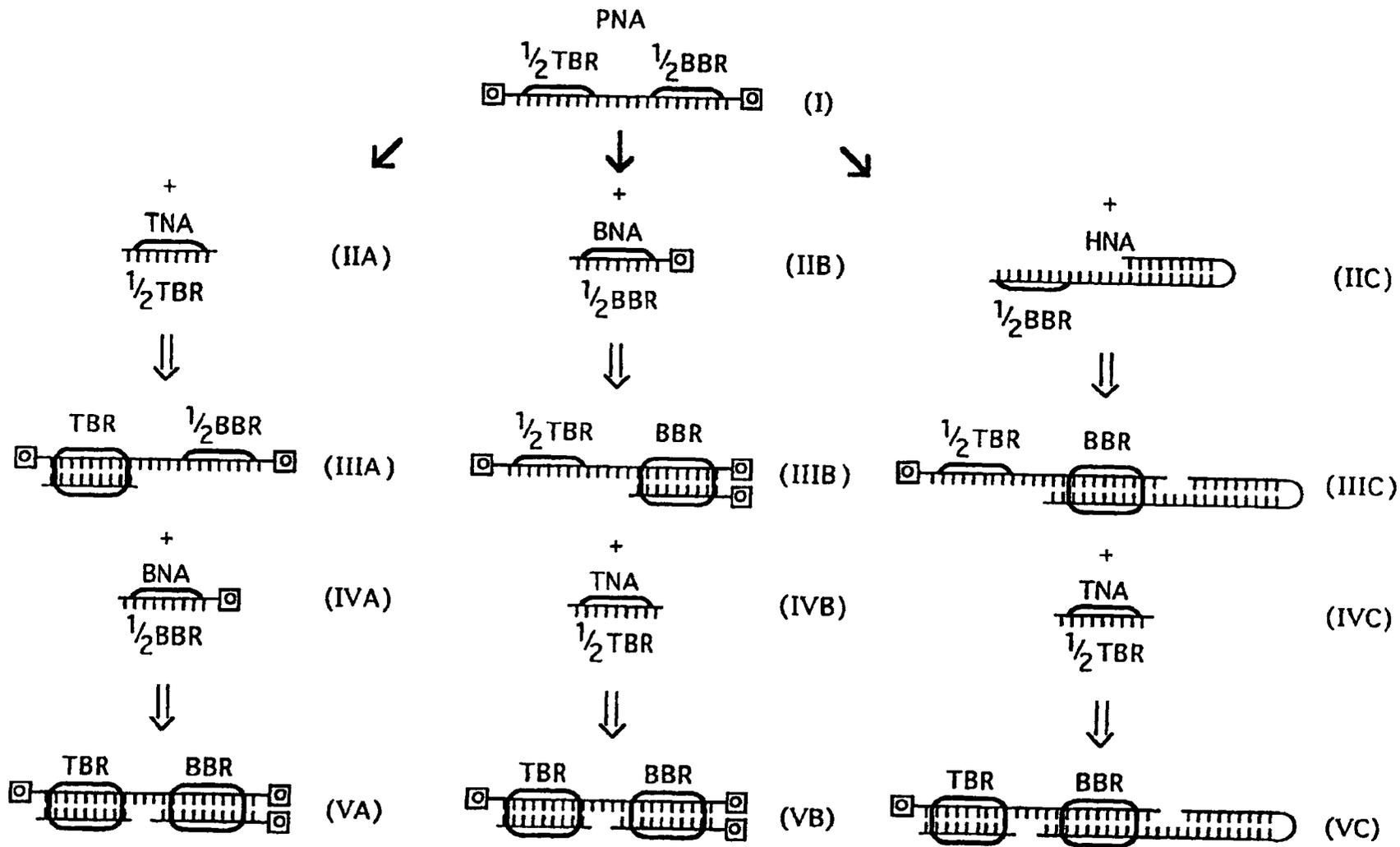


FIGURE 1

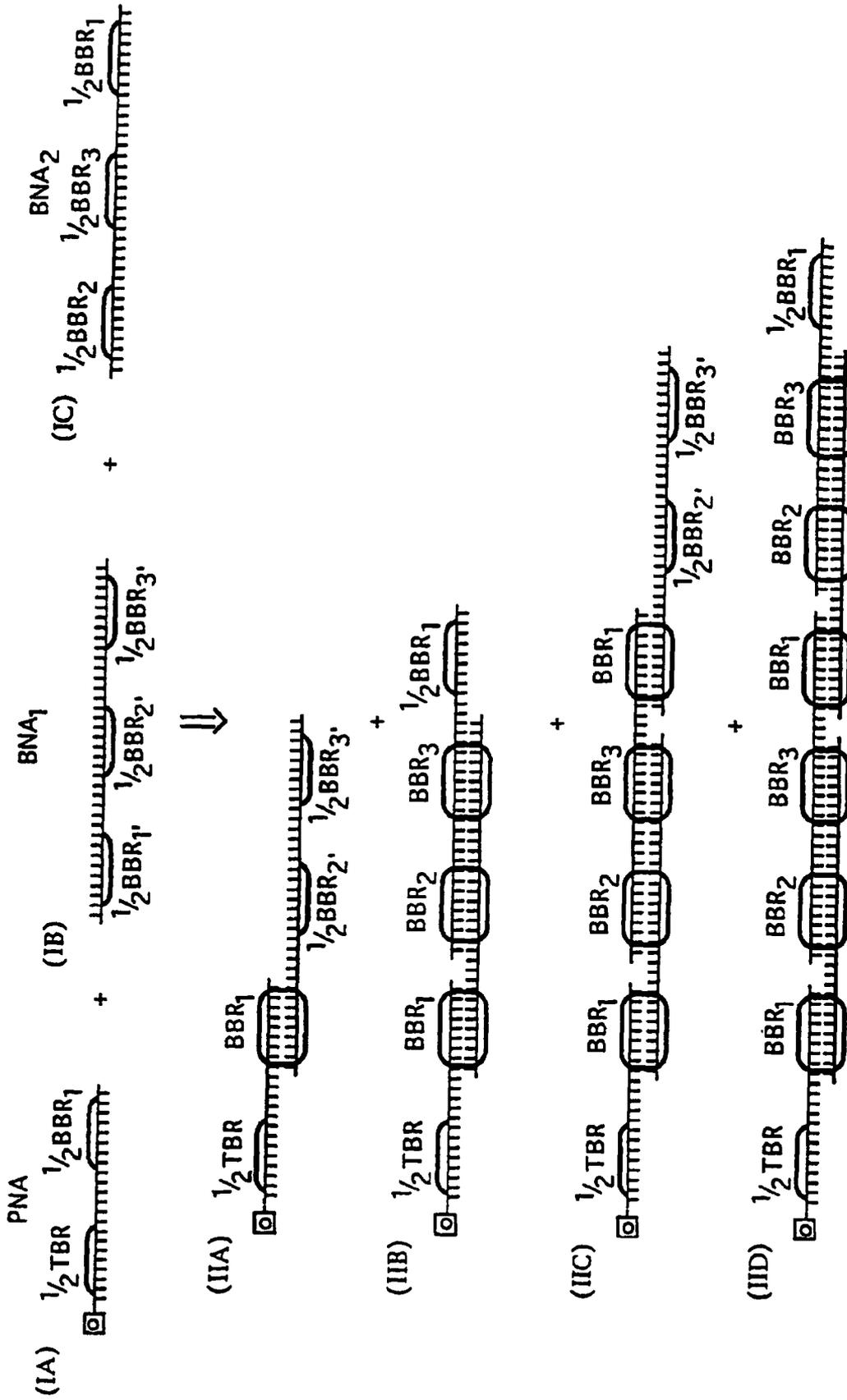


FIGURE 2A

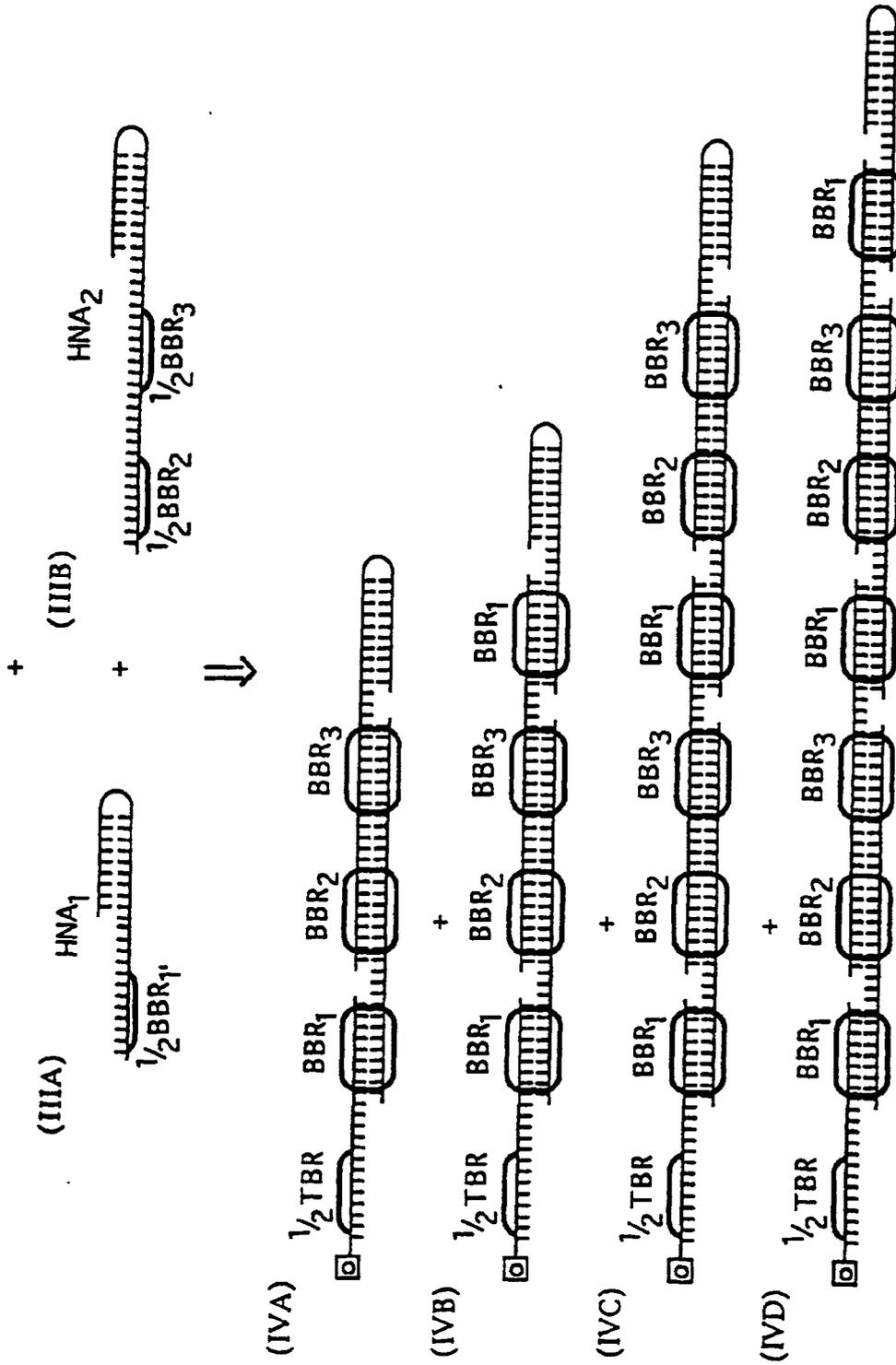


FIGURE 2B

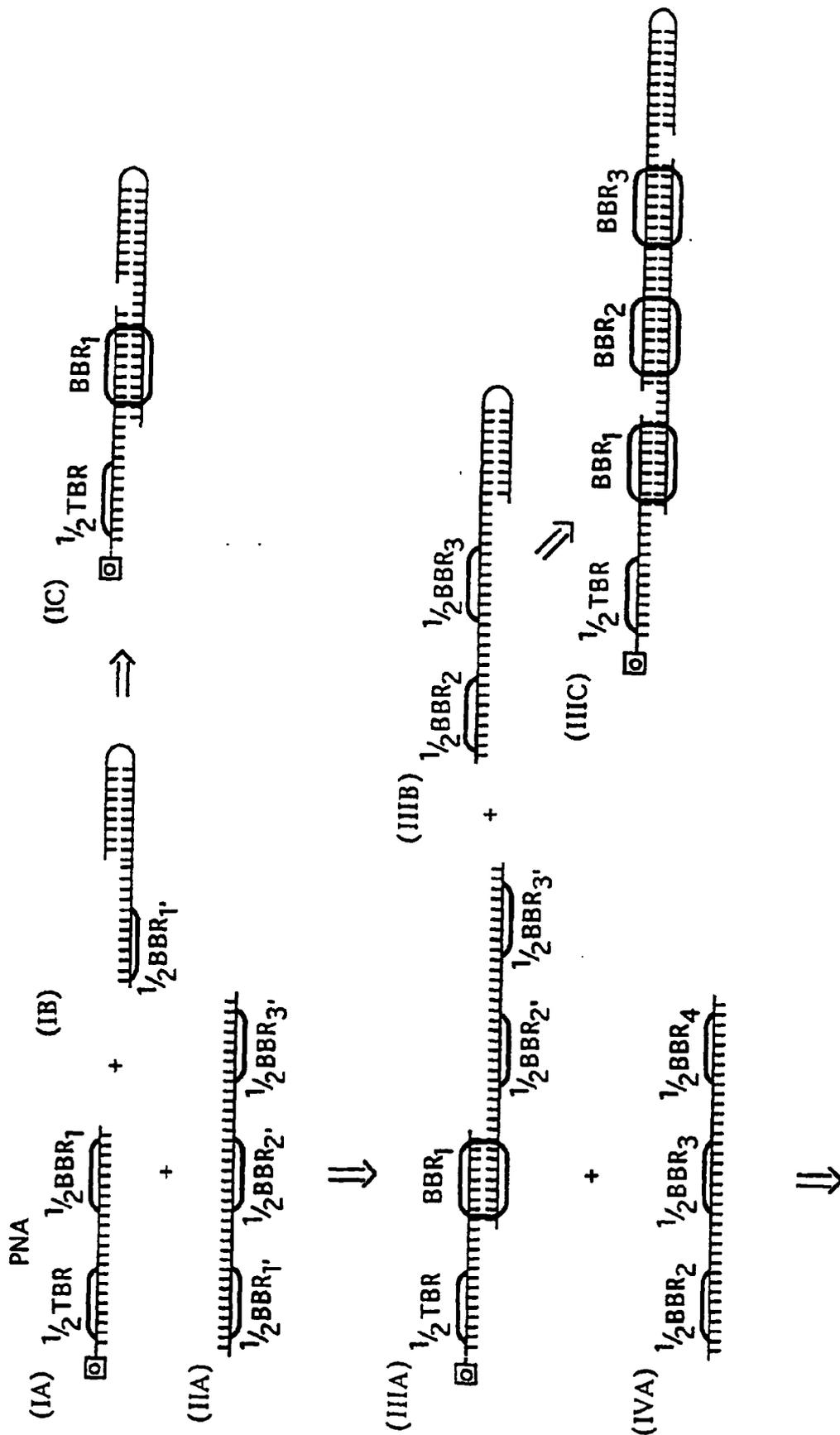


FIGURE 2C

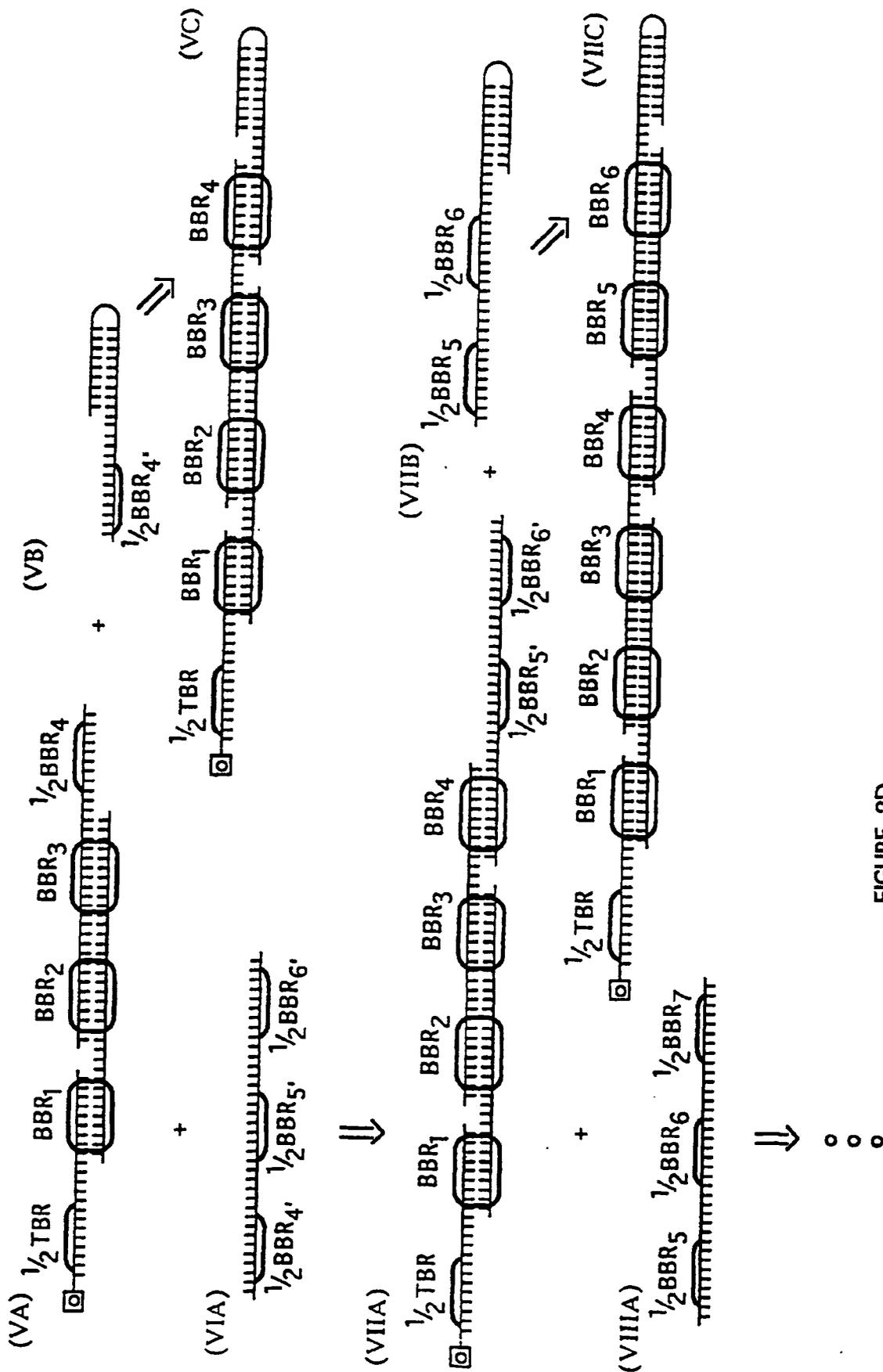


FIGURE 2D

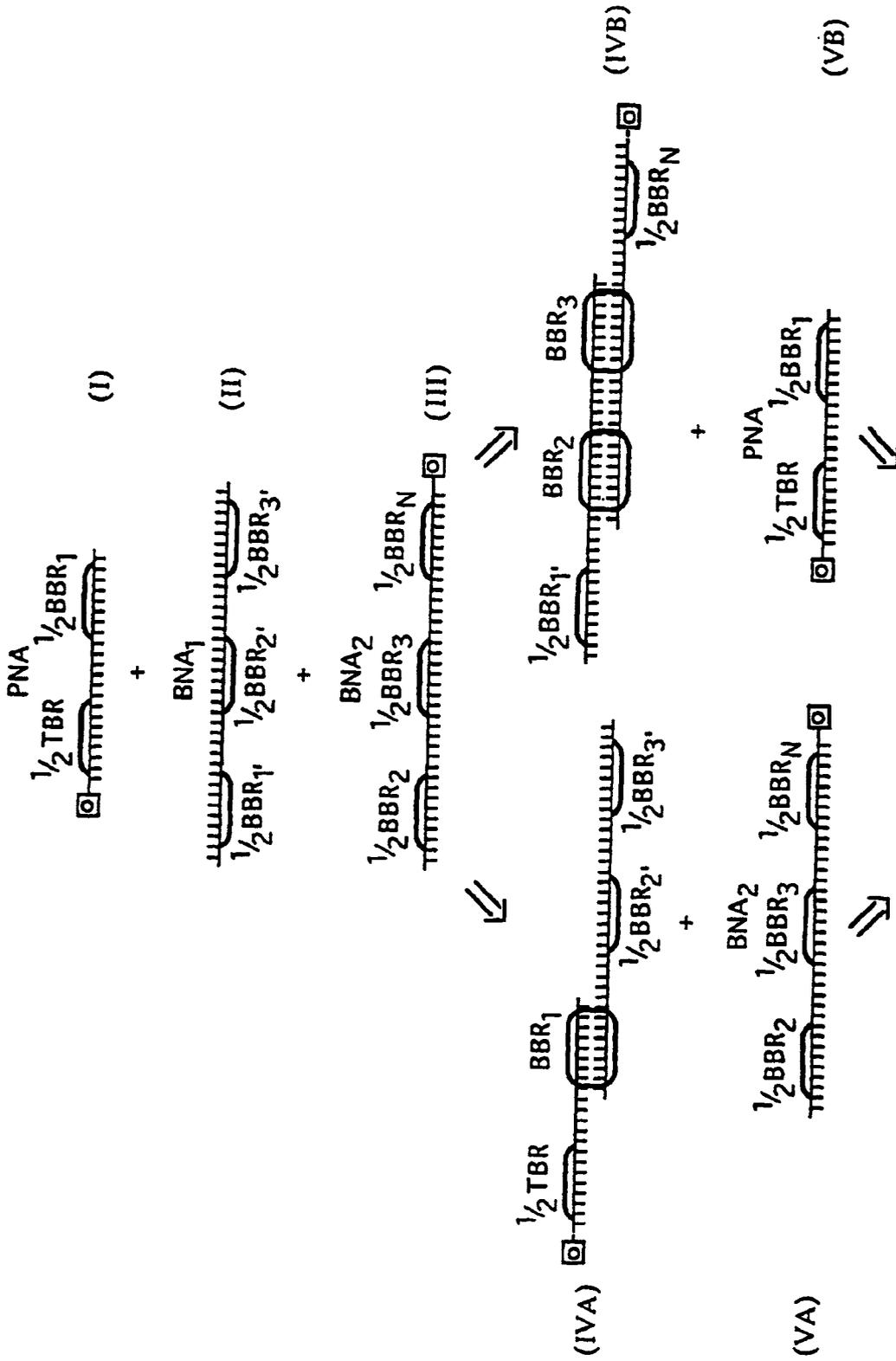


FIGURE 3A

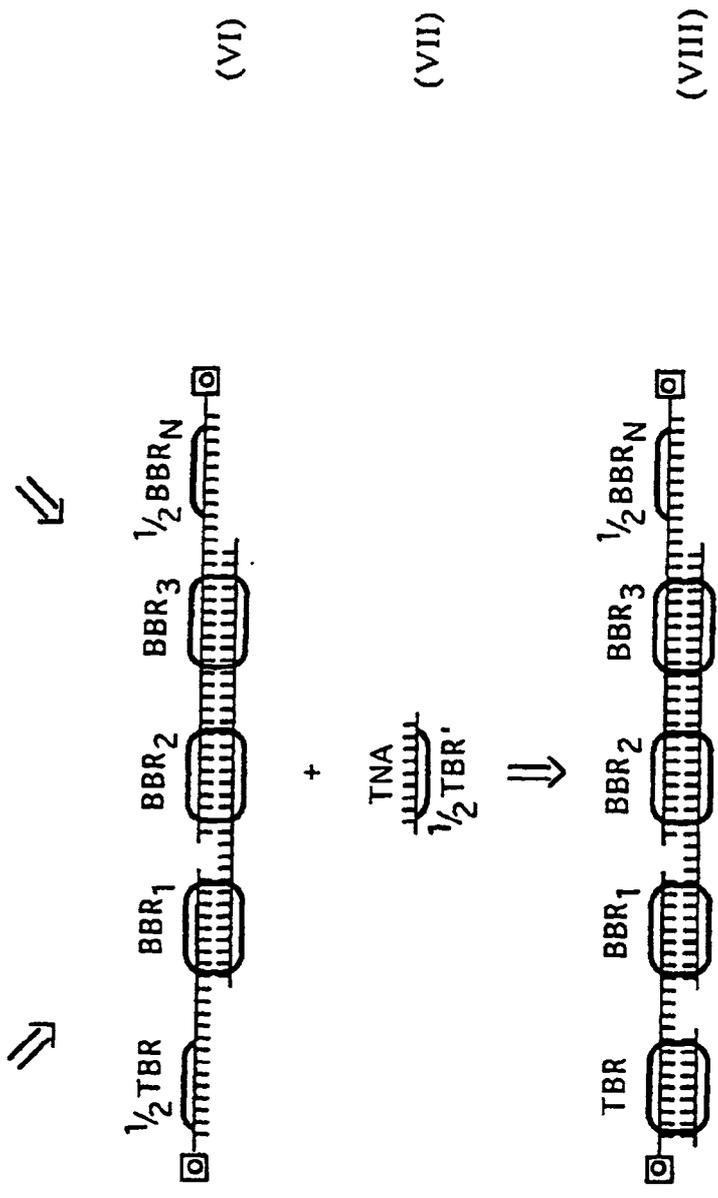


FIGURE 3 B

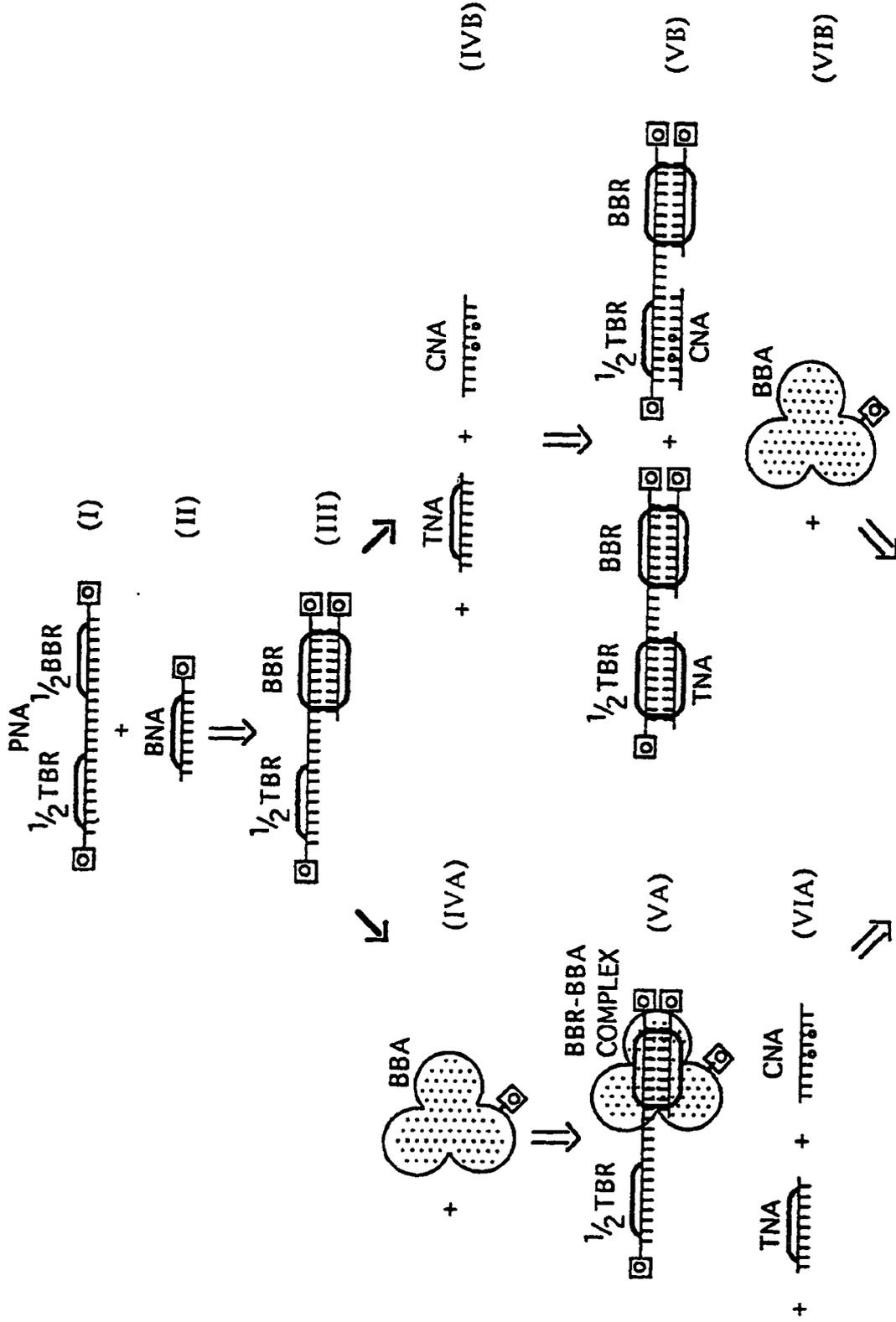


FIGURE 4A

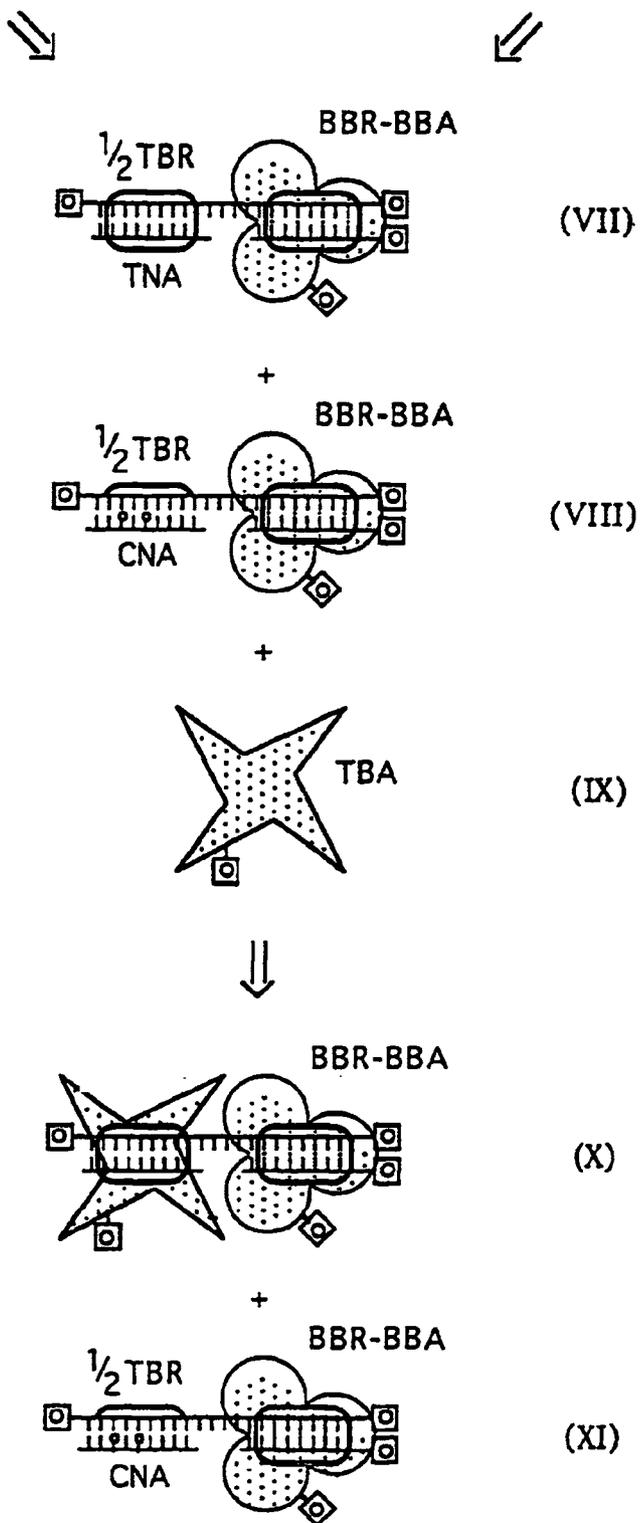


FIGURE 4B

10/29

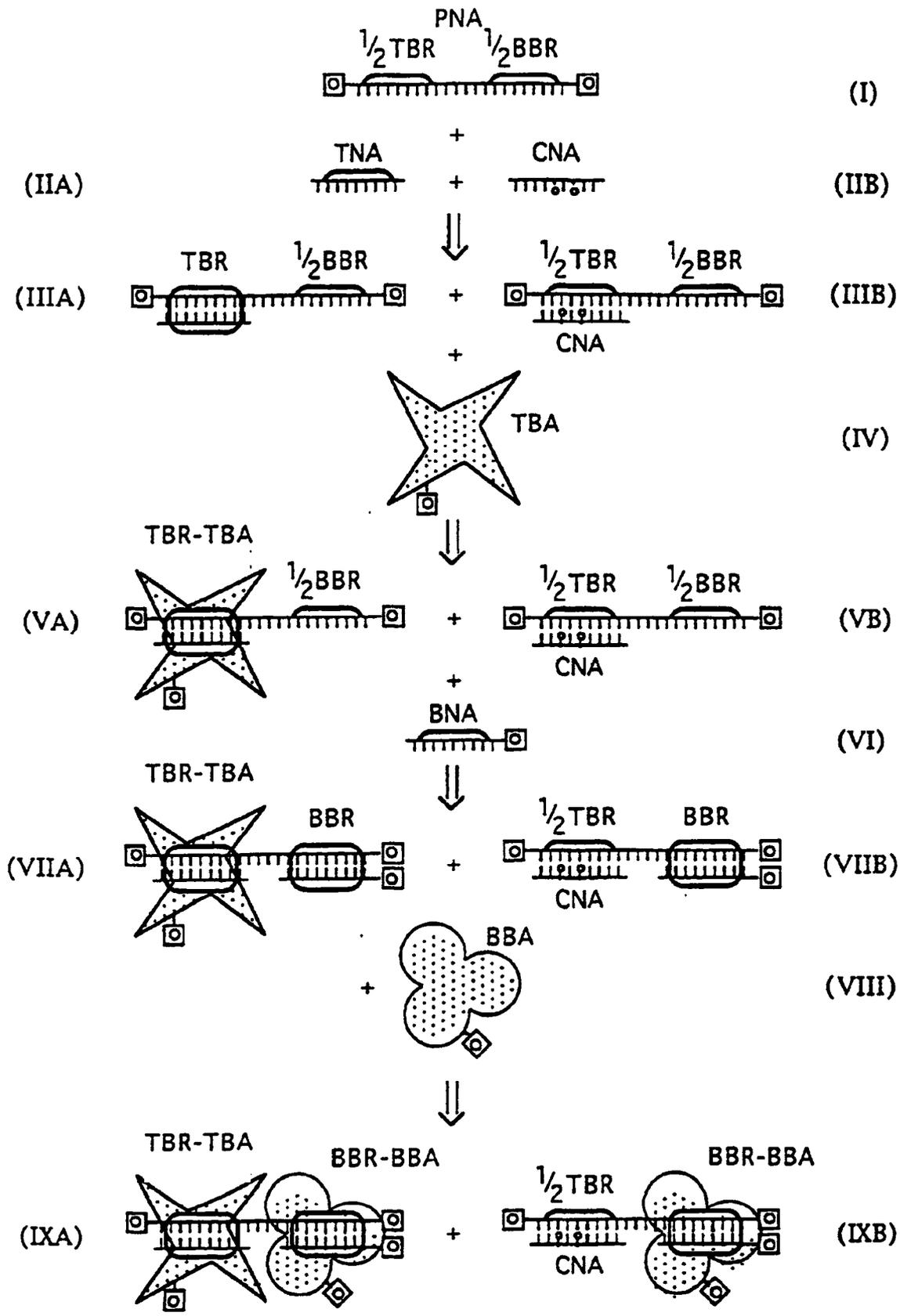
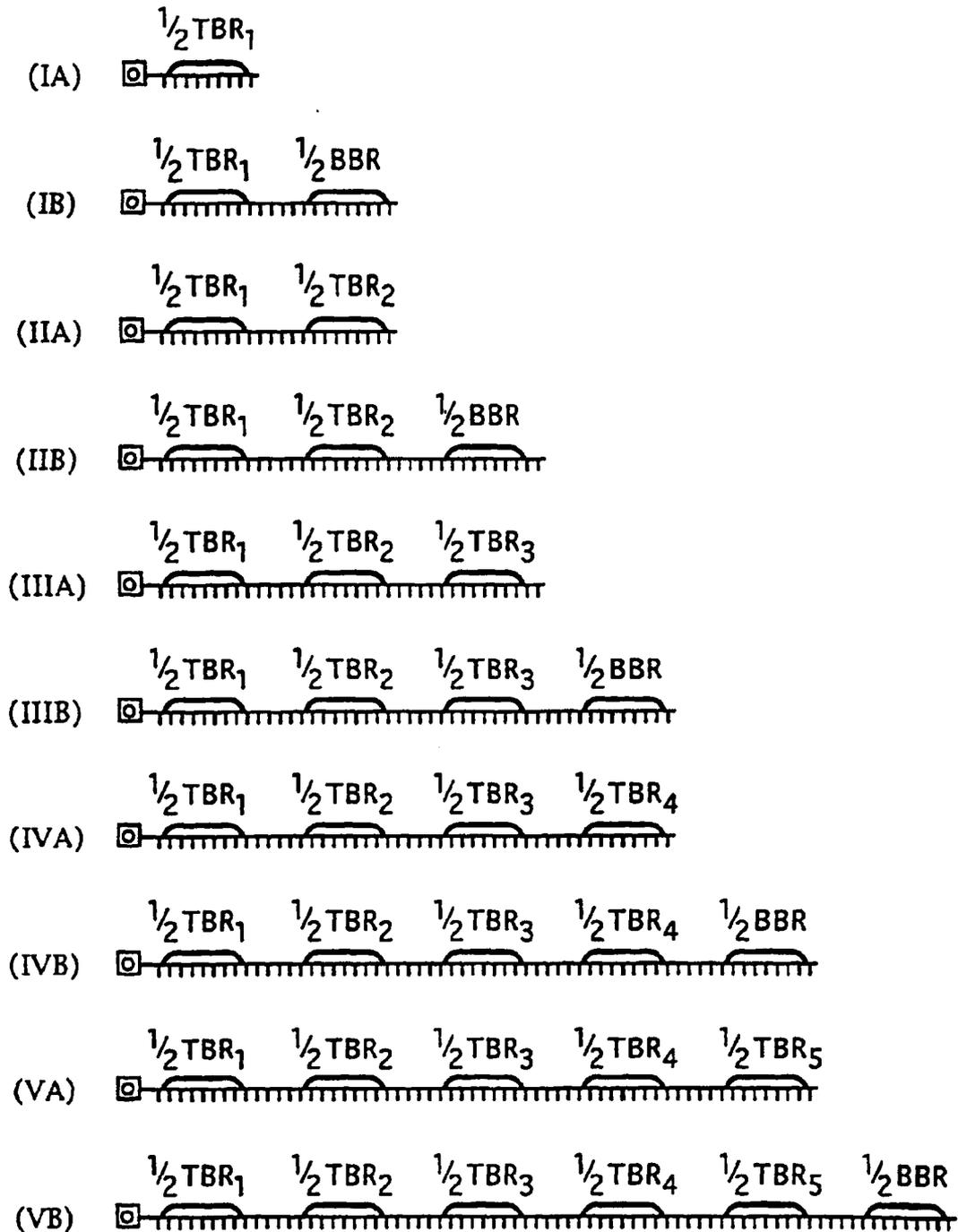
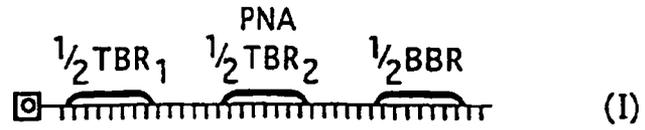


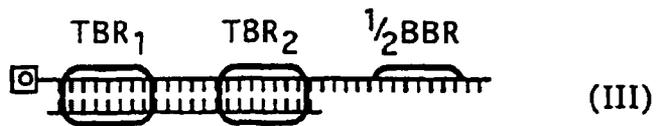
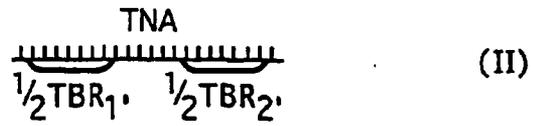
FIGURE 4C



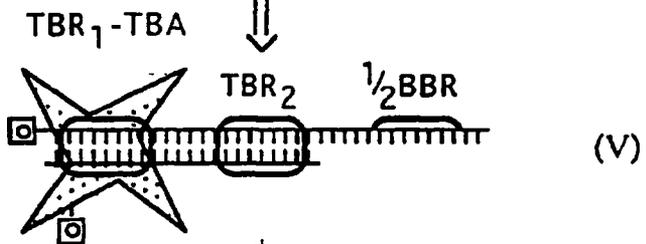
12/29



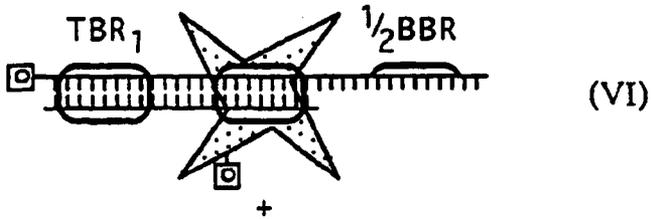
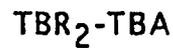
+



+



+



+

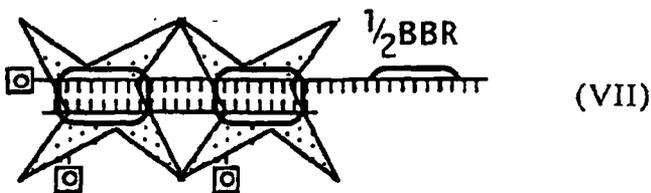
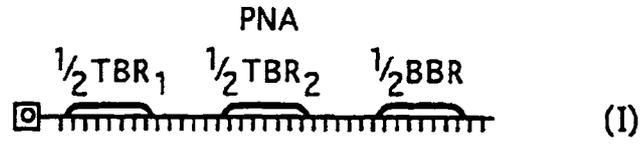
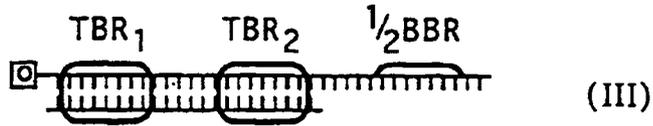
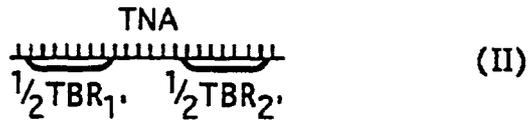


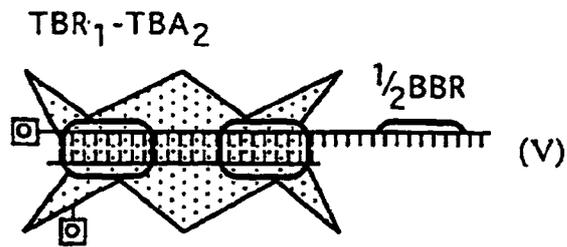
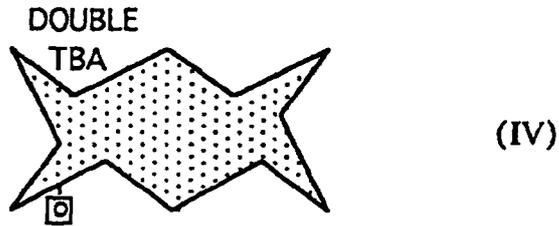
FIGURE 6A



+



+



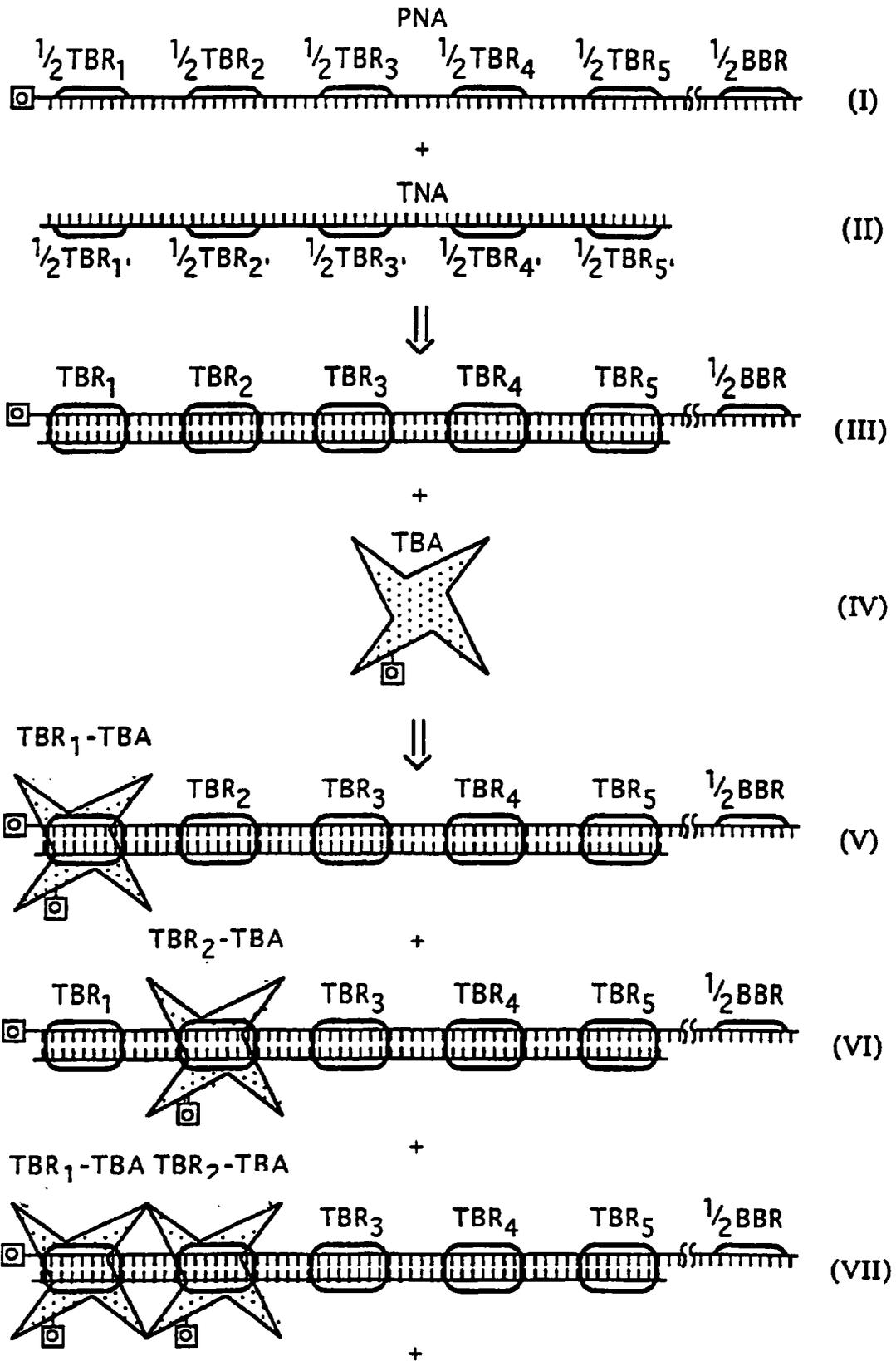


FIGURE 6C

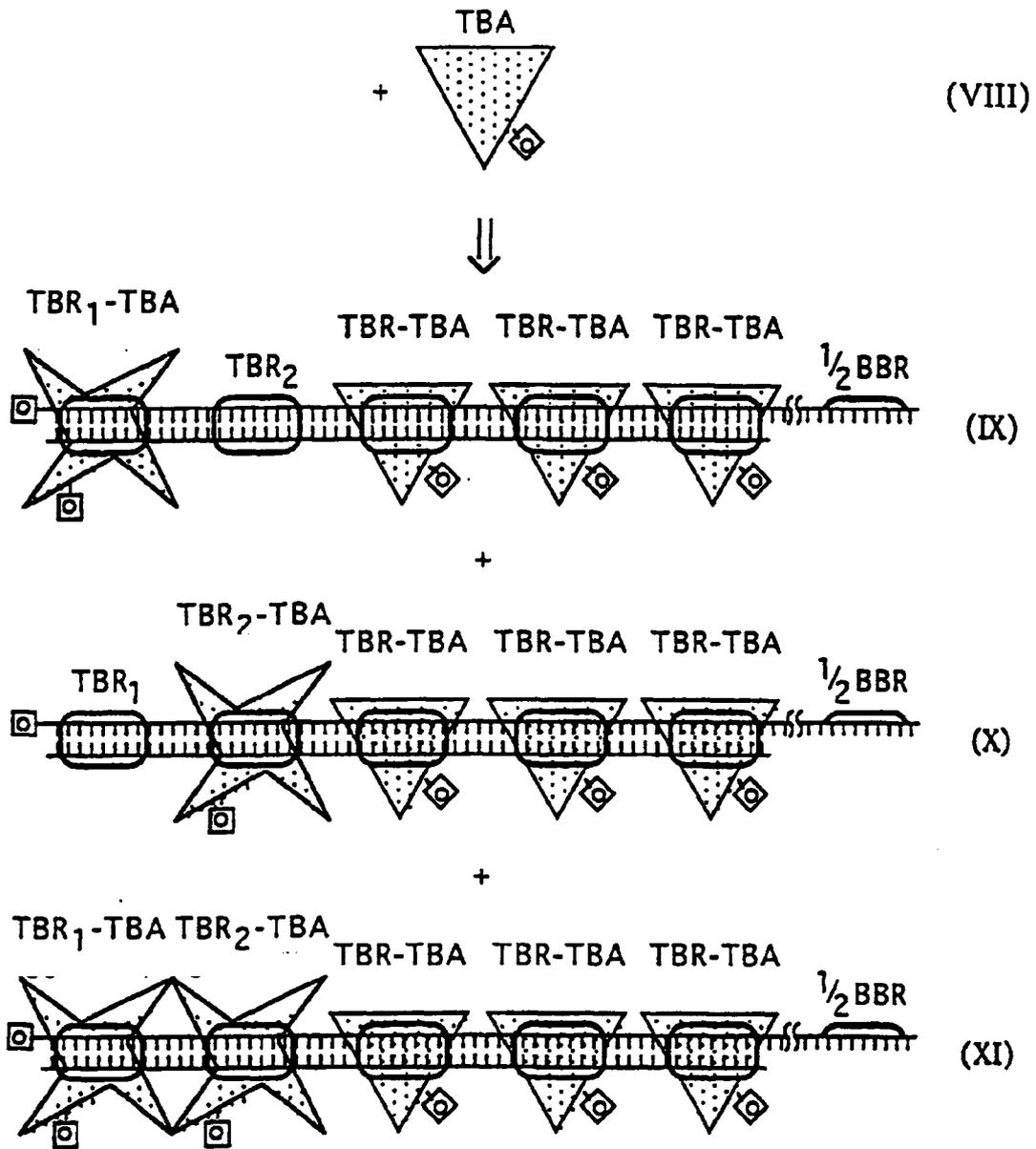


FIGURE 6D

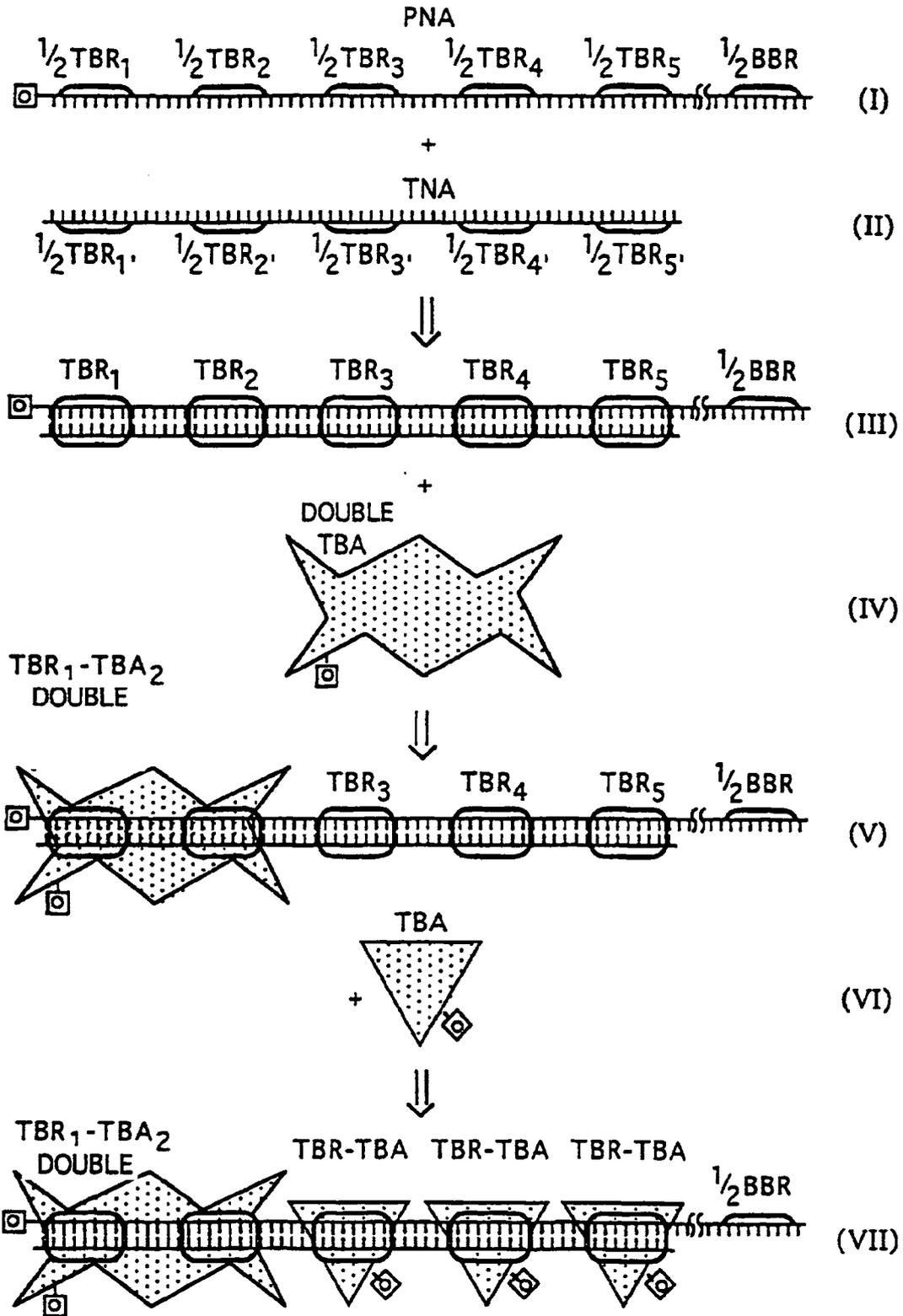


FIGURE 6E

SEQ. ID: 37:

12345678901234567890123456789012345678901234567890
CTACAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGGGAGGCGTGGCCTGGGCGGGACTGGGGAGTGGCGTCCC
+++++
NF-kB NF-kB SP1 SP1 SP1

HIV Test Kit PNA1 (+++ from above), SEQ.ID:38:

CTACAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGGGAGG

HIV Test Kit PNA2 (=== from above), SEQ. ID:39:

###CGGGACTGGGGAGTGGCGTCCC###

La séquence à bouts collants de PNA2 est complémentaire
à l'une des extrémités de l'ADN opérateur formé à partir de :

###OL1-OL2-OL3
OL1'-OL2'-OL3'***

or

###OR3-OR2-OR1
OR3'-OR2'-OR1'***

FIGURE 7

ECHANTILLON D'ACIDE NUCLEIQUE DOUBLE BRIN, FRAGMENTE

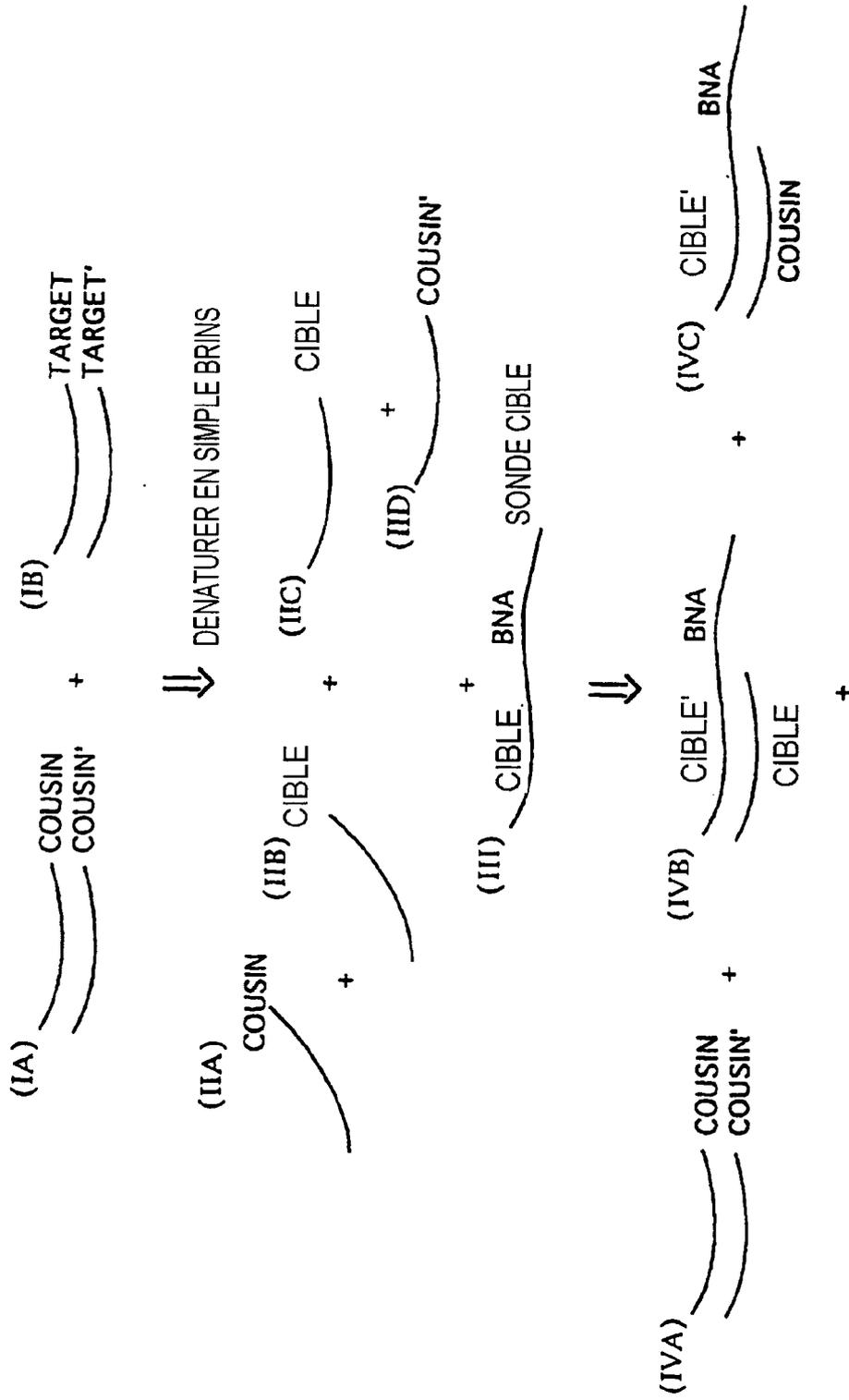


FIGURE 8A

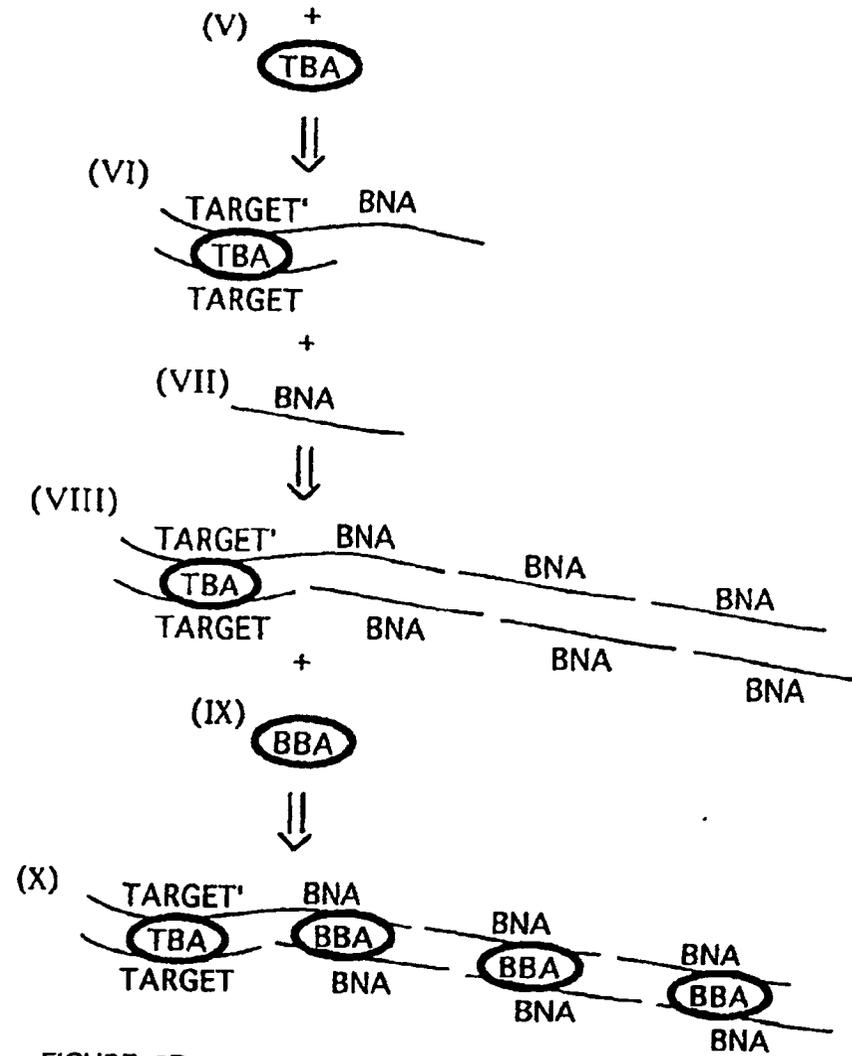
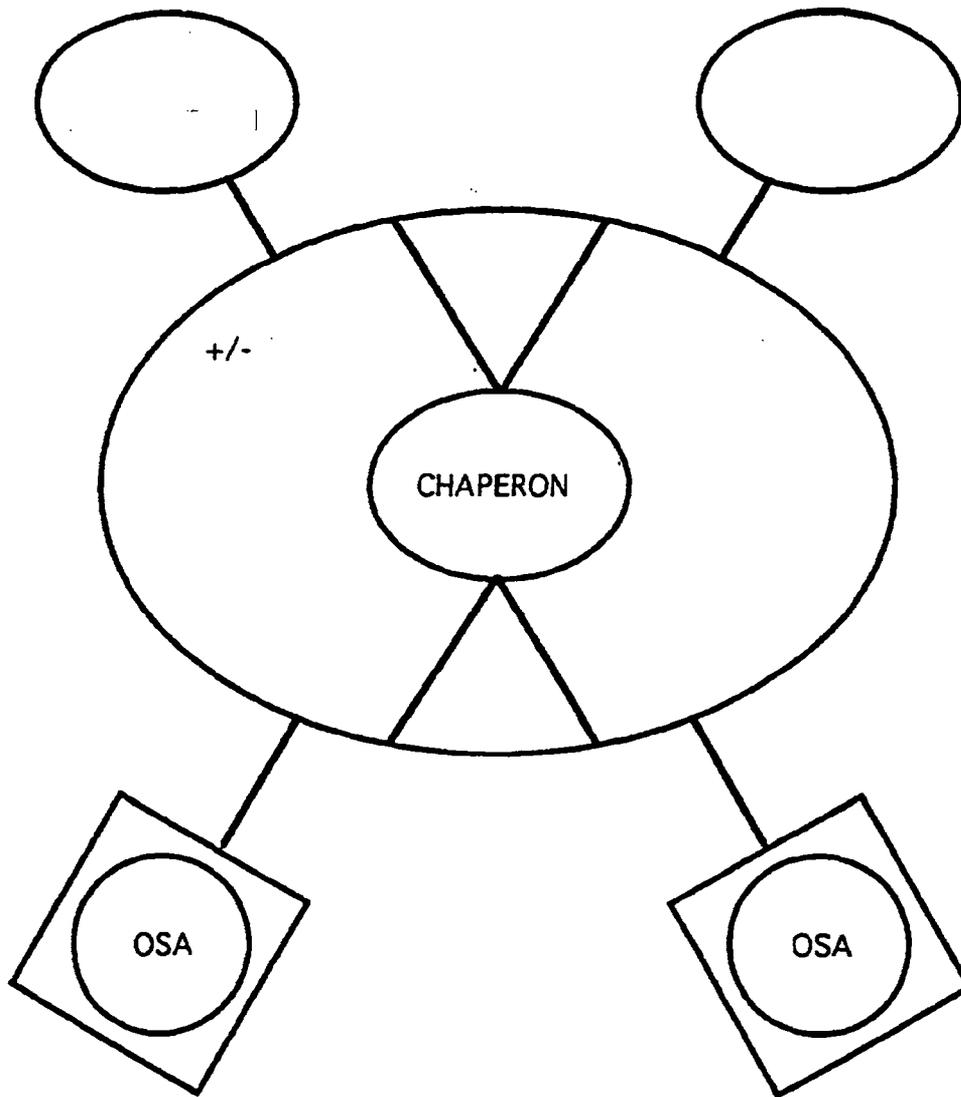
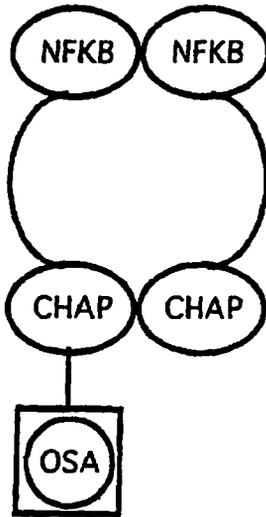


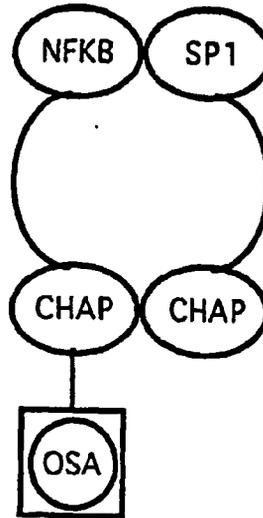
FIGURE 8B

TBA: TARGET BINDING ASSEMBLY

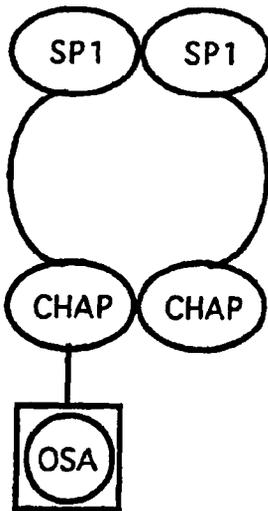




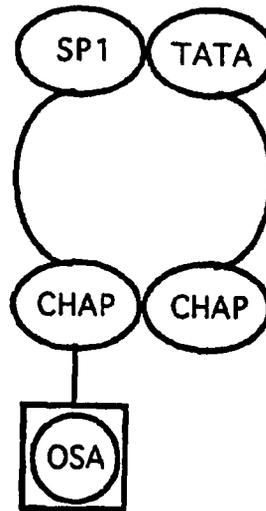
HIV-DETECT I



HIV-DETECT II

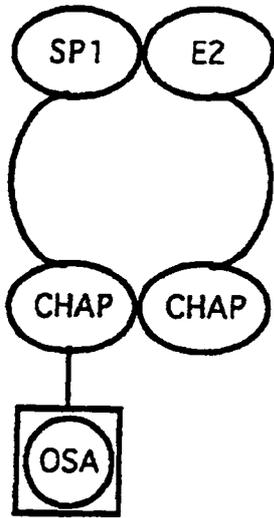


HIV-DETECT III

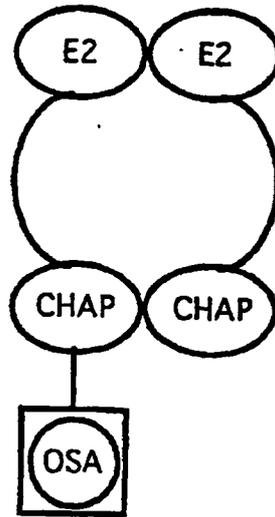


HIV-DETECT IV

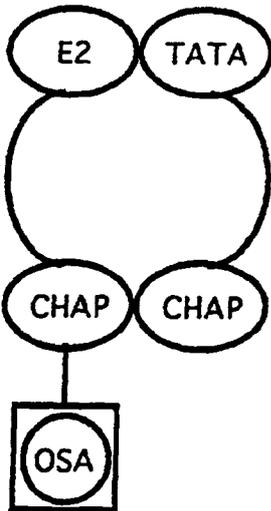
FIGURE 10



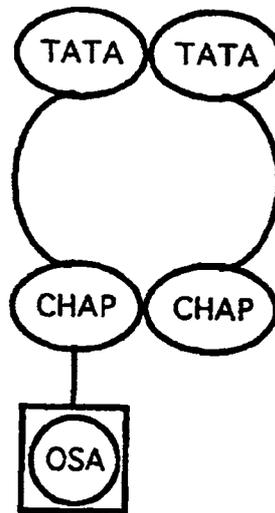
HPV-DETECT I



HPV-DETECT II



HPV-DETECT III



HPV-DETECT IV

FIGURE 11

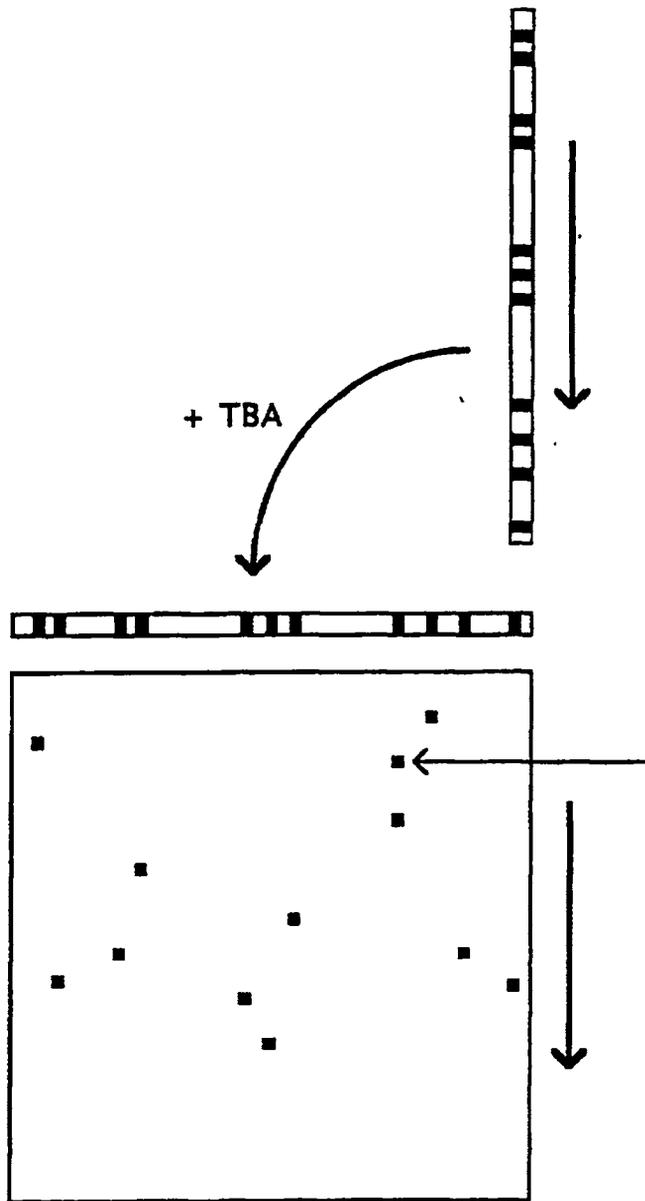


FIGURE 12A

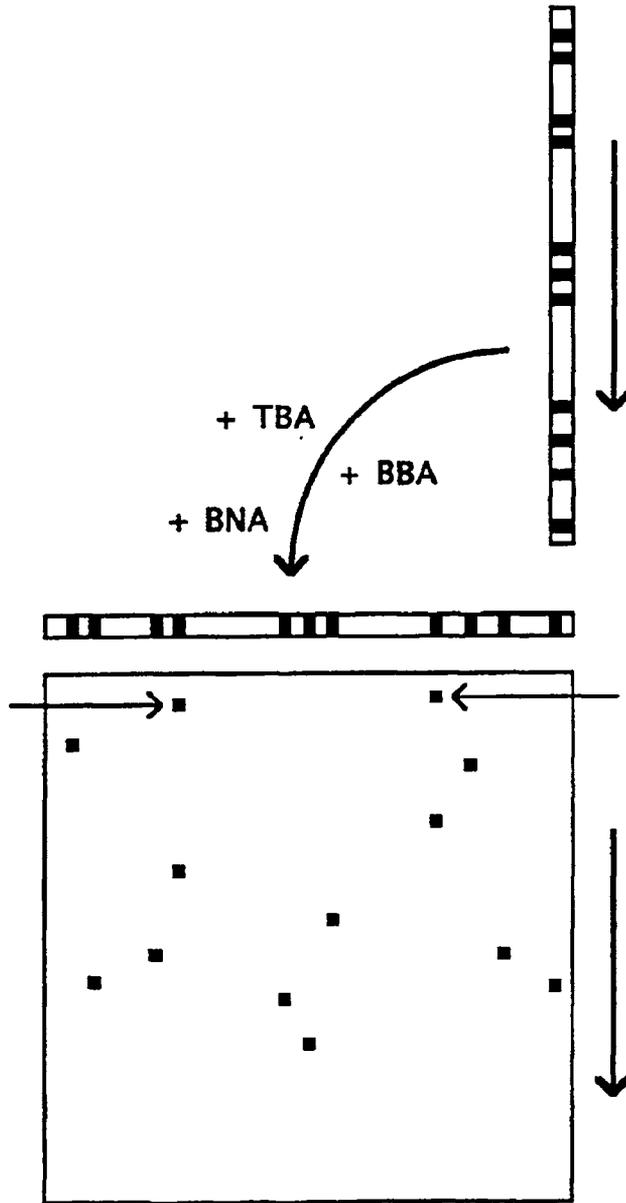


FIGURE 12B

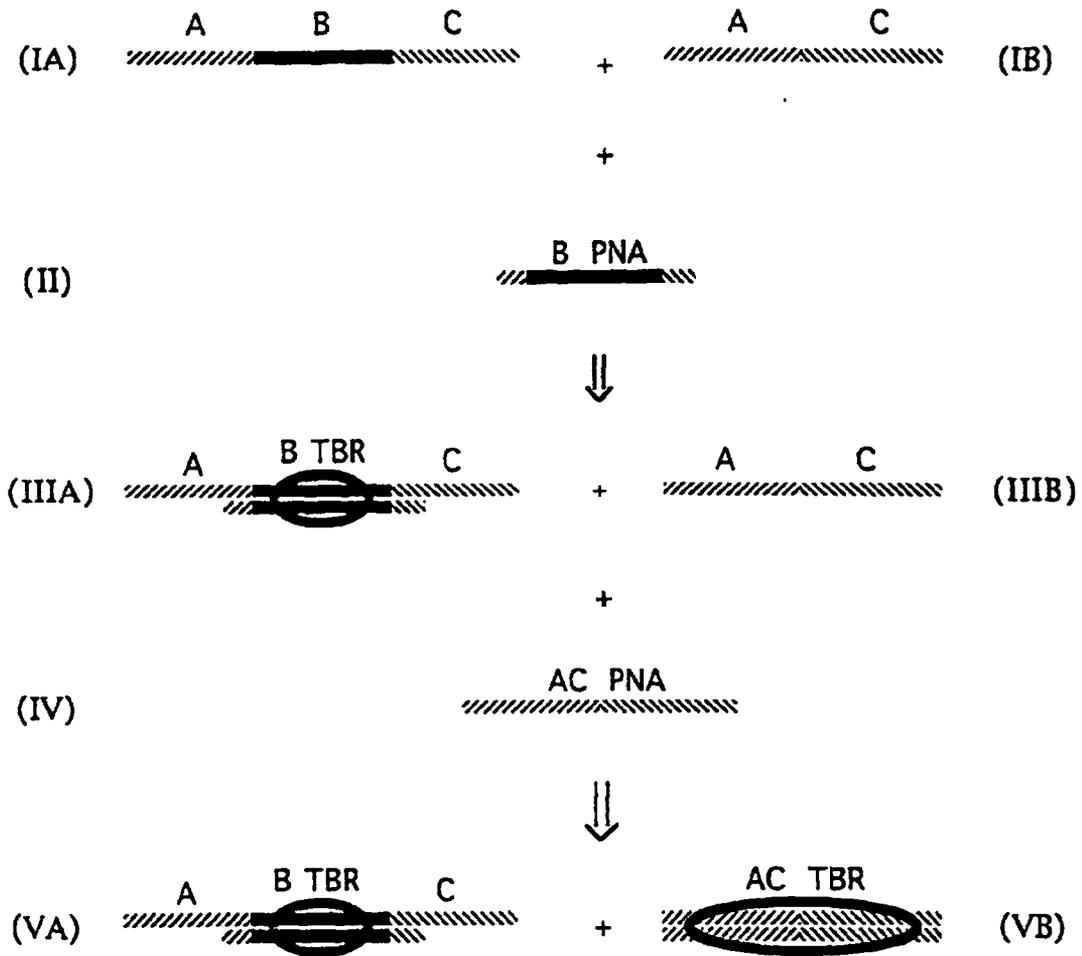


FIGURE 13

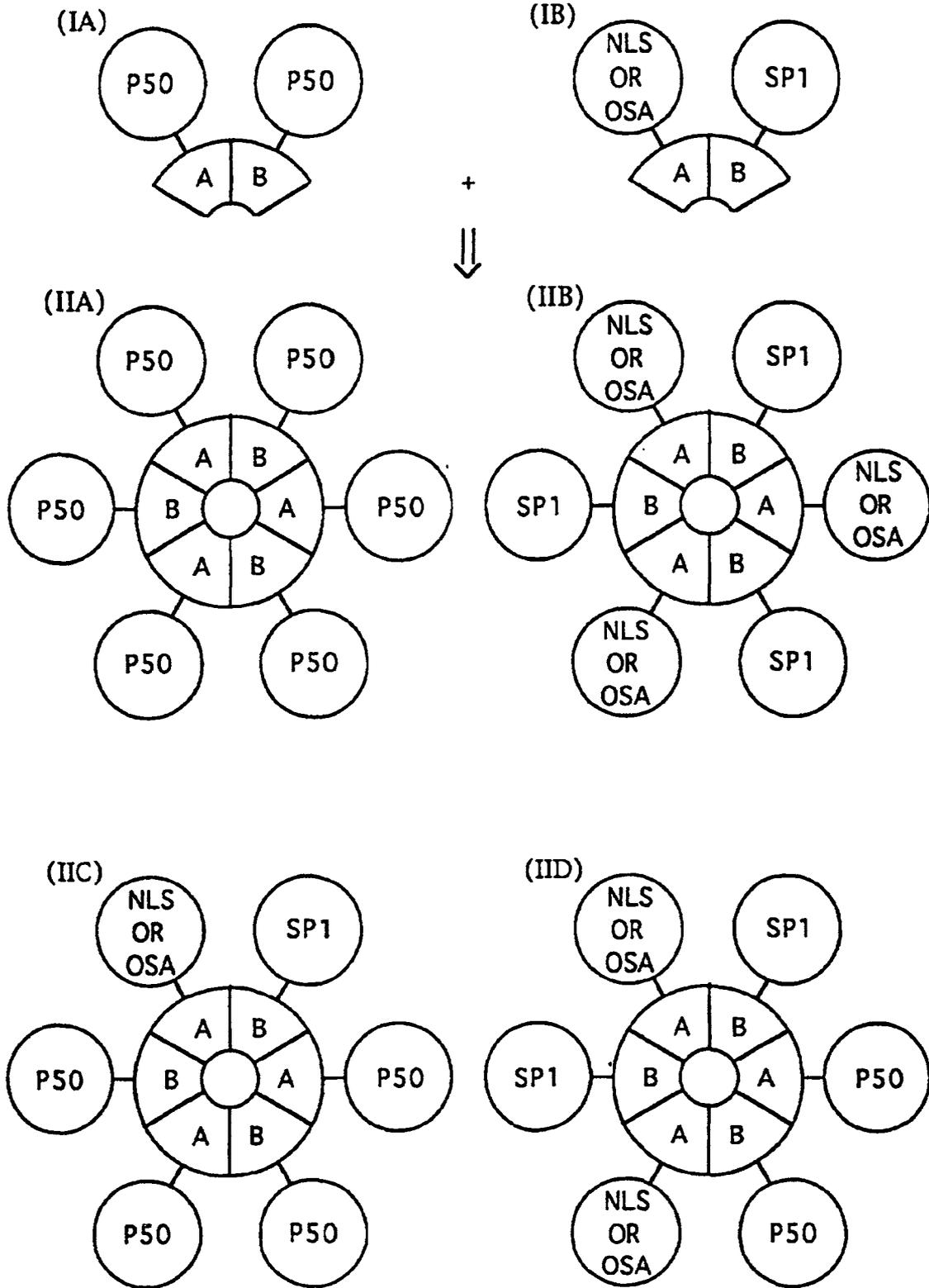


FIGURE 14

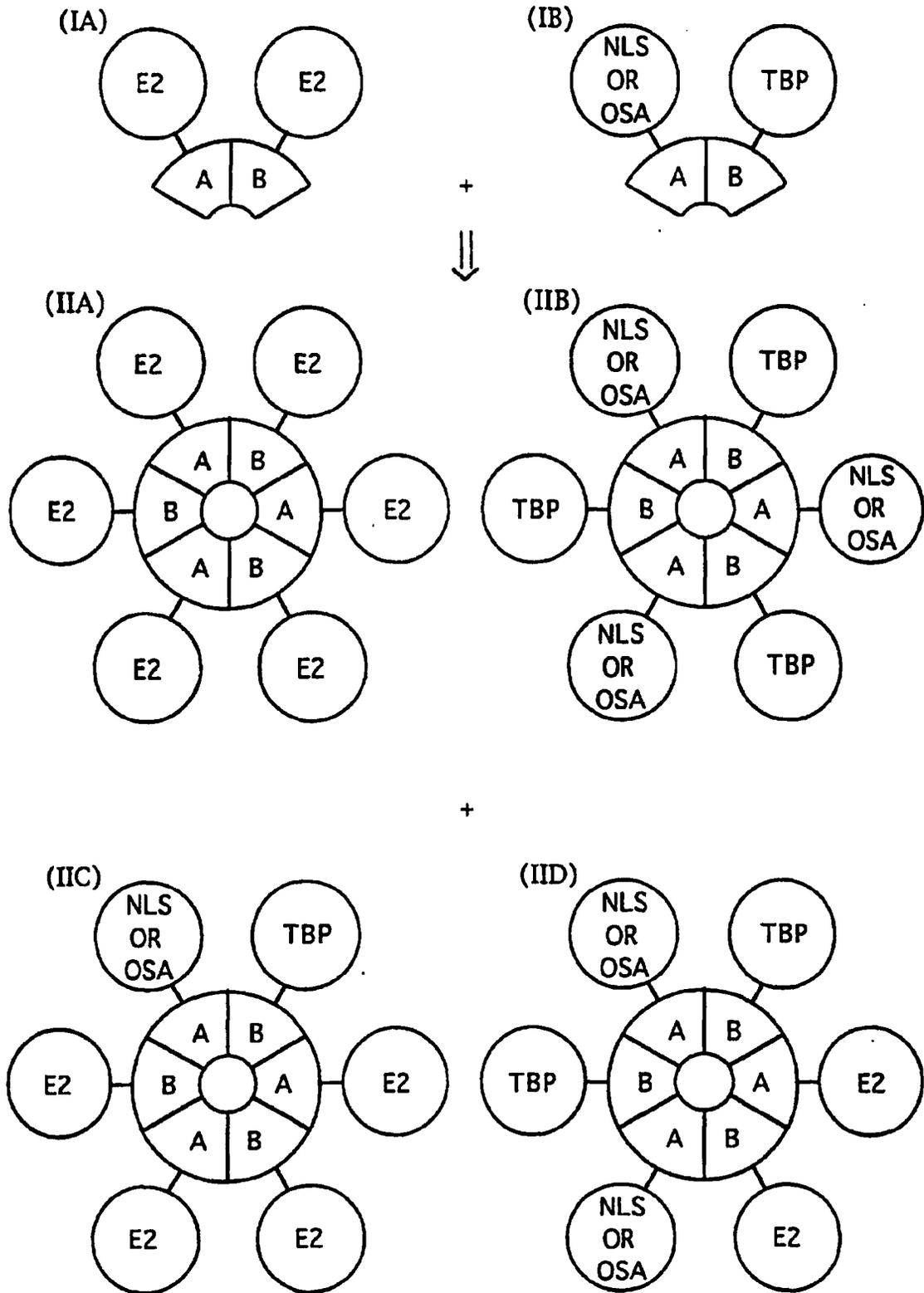


FIGURE 15

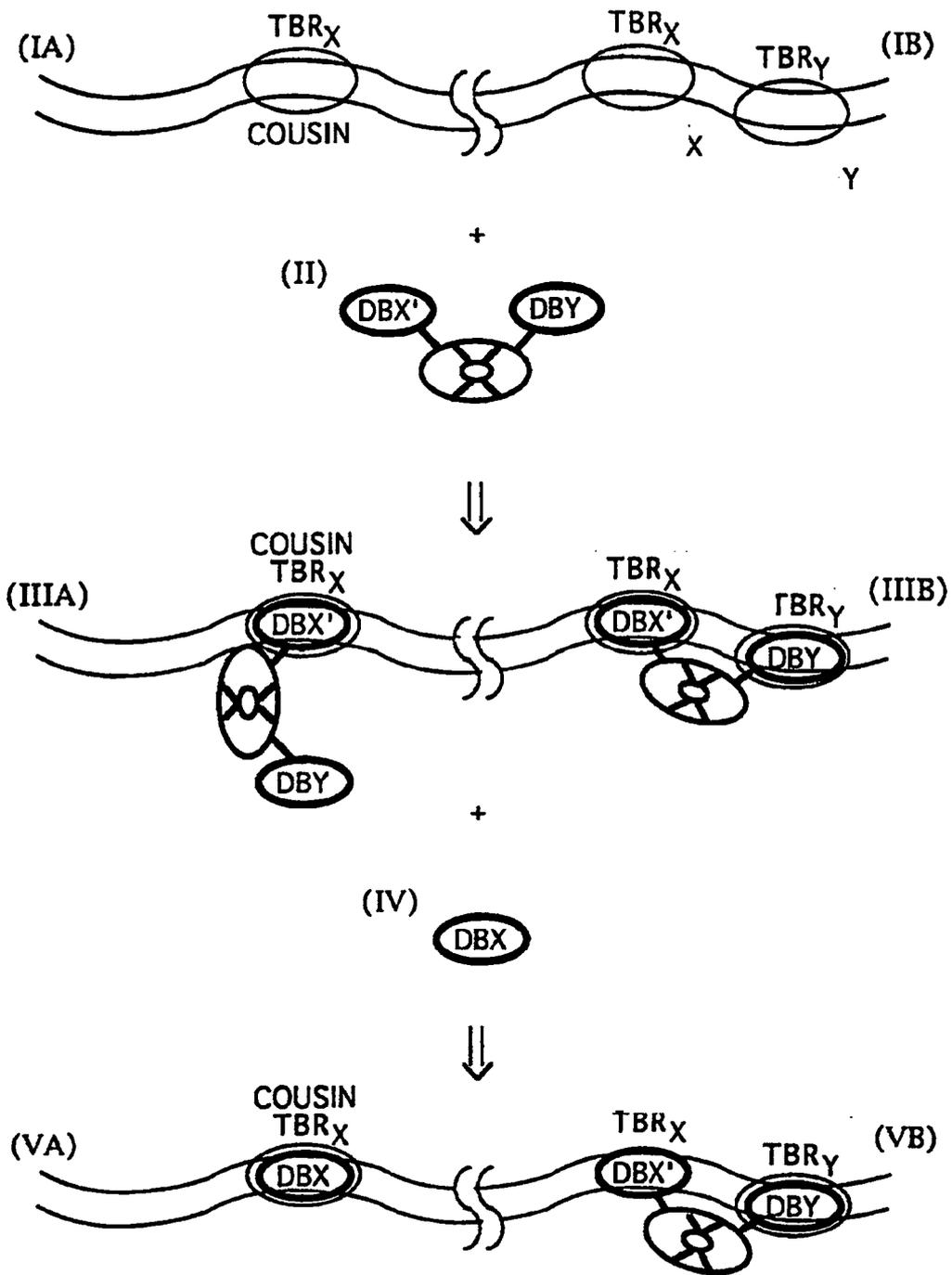


FIGURE 16

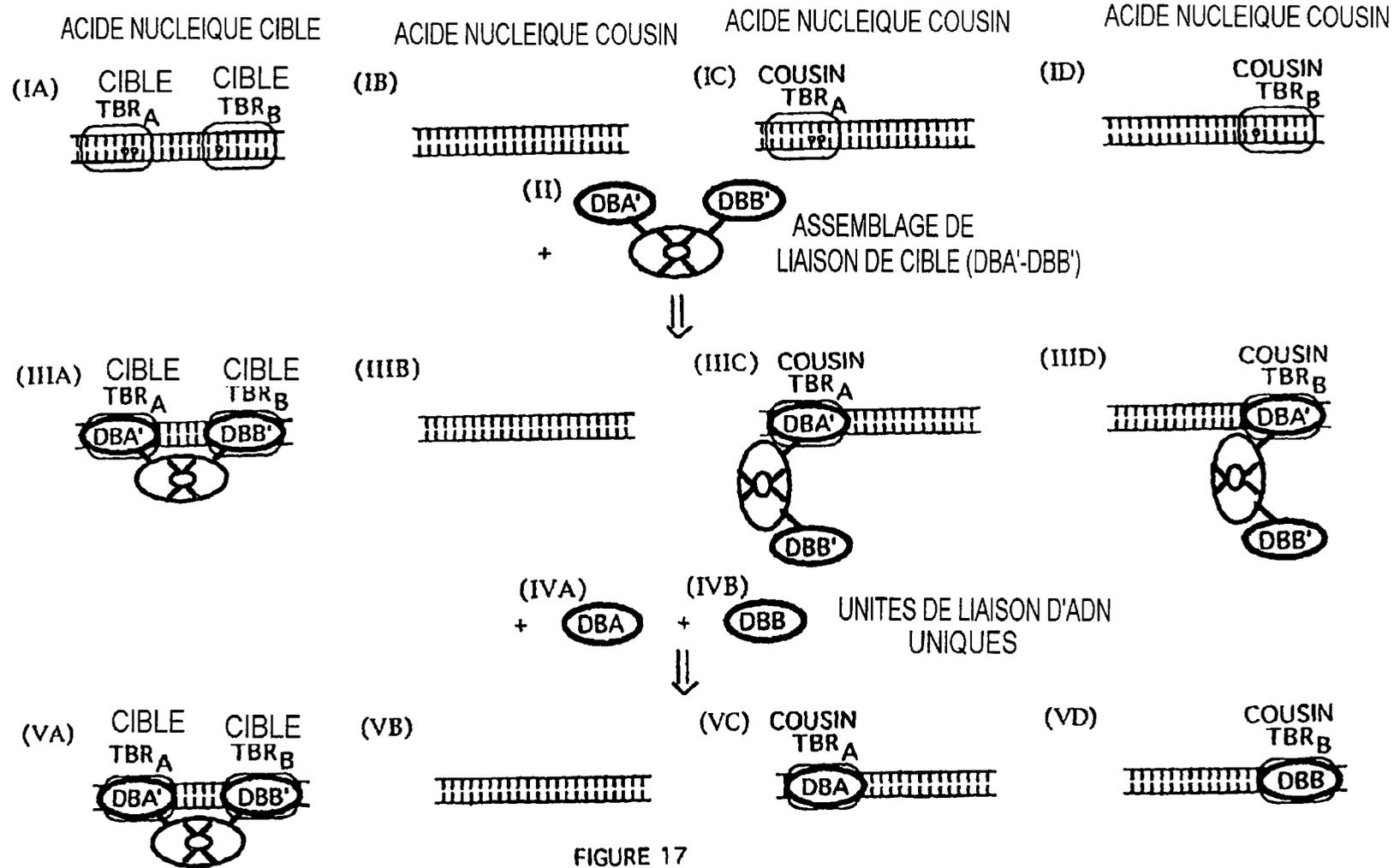


FIGURE 17