

12

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 31.05.02.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la demande : 05.12.03 Bulletin 03/49.

56 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

60 Références à d'autres documents nationaux apparentés : Division demandée le 22/01/03 bénéficiant de la date de dépôt du 31/05/02 de la demande initiale n° 02 06698.

71 Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE Etablissement de caractère scientifique technique et industriel — FR.

72 Inventeur(s) : DIVE VINCENT, MENEZ ANDRE, STOCKLIN RETO, BEAU FABRICE, CZARNY BERTRAND et COTTON JOEL.

73 Titulaire(s) :

74 Mandataire(s) : CABINET ORES.

54 METHODE DE CRIBLAGE DE BANQUES DE BIOMOLECULES ET SES APPLICATIONS.

57 Procédé de criblage, sans amplification, de banques de biomolécules radioactives, produits des banques de biomolécules obtenues ainsi qu'application du procédé à l'identification de molécules capables de se fixer sélectivement à un tissu ou à un organe particulier, utiles au développement de nouveaux composés thérapeutiques, d'agents de contraste pour l'imagerie médicale et au ciblage de médicaments.

Le procédé de criblage d'une banque de biomolécules est caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes:

(1) l'administration, à au moins un animal, de ladite banque de biomolécules, dont chaque biomolécule est préalablement marquée, par un isotope radioactif convenable,

(2) le sacrifice d'au moins l'un des animaux et l'analyse de la distribution tissulaire de la radioactivité des biomolécules administrées, à partir de coupes de tissus ou d'organes prélevés, à l'aide d'imageurs convenables,

(3) la sélection de coupes de tissus ou d'organes dans le(s) quel(s) un signal de radioactivité est détecté,

(4) l'isolement, à partir desdites coupes de tissus ou d'organes, sélectionnées à l'étape (3) de fractions radioactives, par des techniques d'extraction et/ ou de chromatographie et

(5) la caractérisation à partir des fractions radioactives obtenues à l'étape (4) de ladite ou desdites biomolécules, par des techniques d'analyse convenables, telles que la chromatographie et/ ou la spectrométrie de masse.

En variante, quand cela est possible, l'étape (2) comprend l'analyse, de la distribution tissulaire de la radioactivité des biomolécules administrées, à l'aide d'imageurs convenables, in vitro, à partir d'un échantillon biologique préalablement extrait et sélectionné dans le groupe constitué par des cellules et des coupes de tissus ou d'organes. Cette variante ne nécessite donc pas le sacrifice de l'animal.



## METHODE DE CRIBLAGE DE BANQUES DE BIOMOLECULES RADIOACTIVES ET SES APPLICATIONS

La présente invention est relative à un procédé de criblage, sans  
5 amplification, de banques de biomolécules radioactives, aux produits des banques de  
biomolécules obtenues ainsi qu'à l'application du procédé à l'identification de molé-  
cules capables de se fixer sélectivement à un tissu ou à un organe particulier, utiles au  
développement de nouveaux composés thérapeutiques, d'agents de contraste pour  
l'imagerie médicale et au ciblage de médicaments.

10 Dans le cadre de la mise au point de nouveaux médicaments, les  
composés obtenus par synthèse chimique ou bien issus du règne vivant (substances  
naturelles), sont habituellement évalués dans des tests *in vitro*. Ces cribles ont pour  
principales fonctions d'identifier des composés capables d'interagir à haute affinité  
avec toutes cibles d'intérêt thérapeutique (récepteurs, enzymes, etc) ou bien d'isoler  
15 des composés peu actifs, mais qui entreront dans des programmes d'optimisation.  
Alors que ces cribles permettent de repérer des milliers de composés très originaux,  
seule une infime fraction de ceux-ci fera l'objet d'études chez l'animal, étape  
incontournable pour aboutir à des produits utiles en santé humaine. L'absence de prise  
en compte dans tous ces tests de criblage *in vitro* des paramètres essentiels pour le  
20 devenir d'une substance testée chez l'animal, telles que la stabilité métabolique, les  
propriétés de distribution tissulaire et d'élimination, explique en grande partie les  
échecs de cette stratégie. La recherche d'une meilleure efficacité dans le dévelop-  
pement de substances utiles en santé humaine nécessite la mise au point de nouveaux  
procédés de criblage.

25 Des méthodes de criblage, comprenant une étape de sélection *in vivo*,  
ont été décrites. Par exemple, R. PASQUALINI et al. (Nature, 1996, 380, 364-  
366) décrivent l'injection à des souris, de banques de peptides générés par *phage*  
*display* ; à l'aide de cette technique, les Auteurs de cet article ont montré que l'on  
pouvait identifier des ligands se fixant spécifiquement à certains organes, après ampli-  
30 fication préalable. Toutefois, le succès de cette approche dépend essentiellement de la  
possibilité de ré-amplifier les quelques phages qui sont retenus *in vivo*, afin d'avoir  
accès aux séquences peptidiques présentées par les protéines des phages sélectionnés  
*in vivo*.

La méthode décrite dans ce document devrait, selon ses Auteurs,  
35 être applicable à des banques basées sur des principes différents de celui du *phage*  
*display* ; dans ce cas, la seule exigence est la capacité à identifier le composé dans le

tissu après sa liaison ; toutefois, PASQUALINI et al. précisent, que pour cribler des molécules chimiques, la présence d'une étiquette (*tag*), permettant une étape d'amplification, telle qu'une séquence d'acide nucléique, est indispensable.

La technique définie dans l'article R. PASQUALINI et al. (Nature, 1996, précité) permet ainsi de sélectionner des peptides aptes à se lier de manière spécifique à des tumeurs ; par exemple, lorsque de tels peptides sont couplés à de la doxorubicine, ils augmentent l'efficacité de cette drogue vis-à-vis des tumeurs et réduisent en outre sa toxicité. Une telle application est notamment décrite dans l'article au nom de W. Arap et al. (Science, 1998, 279, 377-380).

Dans la Demande Internationale PCT WO 97/10507, au nom de *La Jolla Cancer Research Foundation*, les Inventeurs E. RUOSLAHTI et R. PASQUALINI, décrivent une méthode d'obtention d'une molécule apte à se diriger spécifiquement vers un organe ou un tissu sélectionné, laquelle méthode comprend les étapes suivantes :

- administration à un sujet d'une banque de molécules diverses,
- recueil ou récupération d'un échantillon de l'organe ou du tissu sélectionné
- amplification des phages, et
- identification d'une molécule apte à atteindre l'organe ou le tissu sélectionné.

Il est précisé que lesdites molécules diverses peuvent être liées à une étiquette, telle qu'un support.

Dans le contexte de cette Demande Internationale PCT :

. Le terme « banque » signifie une collection de molécules, telles que des molécules organiques, des peptides, des protéines, des acides nucléiques.

. L'étiquette attachée aux molécules constituant la banque, peut être une étiquette commune à plusieurs molécules ou une étiquette spécifique. Les étiquettes décrites dans cette Demande sont notamment : des microbilles de plastique, des oligonucléotides, des bactériophages ou des molécules telles que la biotine ou l'hémagglutinine.

L'identification des molécules qui atteignent leur organe cible pourrait être, par exemple, réalisée par spectrométrie de masse, seule ou en combinaison avec une chromatographie en phase gazeuse ; une chromatographie liquide haute performance peut également être effectuée sur l'organe cible ou des méthodes d'extraction sélective peuvent être utilisées.

A titre d'exemple, il est précisé que lorsque la banque comprend une population de molécules chimiques organiques qui sont liées à des étiquettes spécifiques constituées par des oligonucléotides, identifiables par PCR, il est préférable d'éliminer de l'échantillon l'ADN génomique, pour réduire les PCR « parasites ».

5 Il est également précisé que, de manière générale, suffisamment de phages atteignent l'organe cible, ce qui permet effectivement leur identification après amplification, puis identification de la séquence peptidique.

De manière plus précise, les exemples concernent le criblage d'une banque de phages portant des peptides et l'identification des peptides qui atteignent le  
10 cerveau, le rein ou une tumeur.

Toutefois, le procédé décrit par l'équipe de E. RUOSLAHTI est essentiellement limité aux peptides et présente de nombreux inconvénients.

En particulier :

- la présentation de peptides à la surface des phages impose des  
15 contraintes stériques et conformationnelles altérant nécessairement les interactions entre les séquences peptidiques présentées et la cible potentielle. De plus, la faible capacité des phages à pouvoir diffuser dans différents tissus, mais aussi l'existence des mécanismes d'élimination *in vivo* dirigés contre ce genre de particules, constitue des limitations importantes de l'approche *phage display* ;

20 - ce sont des phages qui sont identifiés à l'étape de criblage *in vivo*. Cependant, la fixation d'un phage ne garantit pas que le peptide, ayant la séquence portée par le phage, conservera les propriétés de distribution du phage. Cette situation est d'autant plus probable si l'on considère la différence de taille entre le phage et le peptide seul. Ainsi, dans la pratique, alors qu'un grand nombre de phages peut être  
25 identifié par le crible, il n'est pas garanti qu'un seul peptide possèdera les propriétés de distribution du phage ;

- après extraction des phages, ceux-ci doivent être re-amplifiés par transfection de bactéries ; cette contrainte introduit une étape supplémentaire dans le procédé ;

30 - les phages générant de nombreuses interactions non-spécifiques, le procédé décrit par le groupe de E. RUOSLAHTI doit inclure plusieurs étapes de sélection *in vivo* (en général trois étapes) ; ceci rend le procédé très lourd à mettre en œuvre et a l'inconvénient que le criblage *in vivo* implique l'utilisation d'animaux différents et donc une variabilité pouvant introduire des biais importants ;

- ce procédé ne permet pas de prendre en compte le métabolisme et les données pharmacocinétiques (distribution et élimination) des composés, car l'étape de criblage *in vivo* s'effectue sur les phages et non sur les composés eux-mêmes ;

5       - ce procédé détermine la sélectivité de la distribution tissulaire du phage sélectionné et non pas du peptide lui-même ; ceci est dû au fait que le groupe de E. RUOSLAHTI utilise des anticorps reconnaissant les phages pour établir la distribution tissulaire de ceux-ci ; il n'y a pas d'autres moyens pour suivre la distribution tissulaire des peptides.

10       En conséquence, eu égard à ces inconvénients, le procédé décrit par le groupe de E. RUOSLAHTI présente un intérêt limité dans le domaine du développement de molécules utiles en santé humaine.

D'autres méthodes, mettant également en œuvre une étape *in vivo*, ont également été proposées :

15       - le Brevet US 5,770,455 décrit un procédé de synthèse d'une banque de produits obtenue par chimie combinatoire. Il est précisé que ces méthodes constituent un outil puissant pour trouver rapidement de nouveaux ligands.

20       Plusieurs stratégies de synthèse par chimie combinatoire sont décrites (stratégies « *spatially-adressable* », stratégies « *split-bead* » et stratégies recombinantes) et diffèrent par les conditions de synthèse : forme des tubes de réaction, type de polymère, contrôle des constantes physiques (temps, température, traitement en phase solide ou en phase liquide, type de mélange et méthode de détermination de la structure des différents membres de la banque).

Les étiquettes proposées dans ce document sont spécifiques pour chaque produit (« *identifier tag* »).

25       Il s'agit donc d'une méthode qui a l'inconvénient majeur d'être lourde à mettre en œuvre.

30       - la Demande Internationale PCT WO 99/56789 décrit la sélection d'agents de contraste à partir d'une banque obtenue par chimie combinatoire ; de manière plus précise, chaque produit de la banque comprend un marqueur détectable ; il est précisé que ne sont identifiés *in vivo* que les marqueurs ayant le profil de distribution ou le profil d'élimination souhaité. Les marqueurs doivent pouvoir être détectés sans prélèvement d'échantillon et sans nécessiter le sacrifice de l'animal ; les marqueurs appropriés sont notamment des chromophores, des atomes lourds, des étiquettes radioactives et des particules magnétiques ; toutefois, la banque de molécules doit  
35       contenir une pluralité de marqueurs qui doivent pouvoir être distingués entre eux. Malgré cette préconisation, cette Demande Internationale PCT WO 99/56789 admet

qu'il s'agit d'une situation idéale, difficile à obtenir ; il est en particulier reconnu que le rapport : différents membres de la banque:différents marqueurs doit être idéalement de 1:1, mais peut être aussi bas que 10000:1, avec des rapports compris entre 1:1 et 1:1000, 1:1 et 1:200, 1:1 et 1:50 et 1:1 et 1:25. Dans de tels cas, c'est-à-dire lorsque  
5 les différents membres de la banque n'ont pas chacun une étiquette unique, des techniques de détection indirecte des marqueurs sont proposées pour identifier les membres de la banque qui répondent aux profils recherchés. Par ailleurs, dans cette Demande, il est, de préférence, préconisé de détecter les marqueurs dans un fluide biologique (sang, urine, liquide cérébro-spinal, bile etc...) ; dans ce contexte, le marqueur sera de préférence capable d'être amplifié (oligonucléotide, phage), ce qui  
10 implique qu'il vaut mieux que chaque membre de la banque soit étiqueté de manière unique ; on en revient donc aux techniques exposées ci-dessus et à leurs inconvénients. Dans cette Demande, la technique décrite n'est effectivement applicable qu'en cas d'étiquetage unique avec amplification ou bien en utilisant des techniques de  
15 détection indirecte, par le biais de liaisons spécifiques à des récepteurs.

Dans l'ensemble des techniques antérieurement décrites, les composés à cribler sont couplés avec une étiquette permettant leur identification ultérieure ; cependant, la présence de telles étiquettes peut empêcher, par encombrement stérique, l'interaction du composé à cribler avec sa cible.

20 En conséquence, la Demanderesse s'est donnée pour but de pourvoir à un procédé qui réponde mieux aux besoins de la pratique que les procédés de l'Art antérieur, notamment en ce qu'il permet :

- de sélectionner, à partir d'un mélange pouvant contenir plusieurs milliers de composés, les molécules capables de cibler un tissu ou un organe chez  
25 l'animal vivant, par analyse directe de la distribution tissulaire des composés à cribler eux-mêmes et

- d'identifier des molécules, douées de propriétés particulières, en vue de leur utilisation en imagerie médicale ou bien à des fins thérapeutiques.

30 De manière plus précise, la présente invention a pour objet un procédé de criblage d'une banque de biomolécules, qui comprend :

(1) l'administration, à au moins un animal, de ladite banque de biomolécules, dont chaque biomolécule est préalablement marquée, notamment, mais pas exclusivement par remplacement d'un atome présent dans ladite biomolécule par l'un de ses isotopes radioactifs,

(2) le sacrifice d'au moins l'un des animaux et l'analyse de la distribution tissulaire de la radioactivité des biomolécules administrées, à partir de coupes de tissus ou d'organes prélevés, à l'aide d'imageurs convenables,

5 (3) la sélection de coupes de tissus ou d'organes dans le(s)quel(s) un signal de radioactivité est détecté,

(4) l'isolement, à partir desdites coupes de tissus ou d'organes, sélectionnées à l'étape (3) de fractions radioactives, par des techniques d'extraction et/ou de chromatographie et

10 (5) la caractérisation à partir des fractions radioactives obtenues à l'étape (4) de ladite ou desdites biomolécules, par des techniques d'analyse convenables, telles que la chromatographie et/ou la spectrométrie de masse.

En variante, quand cela est possible, l'étape (2) comprend l'analyse, de la distribution tissulaire de la radioactivité des biomolécules administrées, à l'aide d'imageurs convenables, *in vitro*, à partir d'un échantillon biologique préalablement extrait et sélectionné dans le groupe constitué par des cellules et des coupes  
15 de tissus ou d'organes. Cette variante ne nécessite donc pas le sacrifice de l'animal.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux du procédé de criblage selon l'invention, préalablement à l'étape (2), ledit procédé comprend une étape (1') d'analyse de la distribution tissulaire de la radioactivité des biomolécules administrées, en soumettant au moins l'un des animaux, à une imagerie externe, notamment au  
20 moyen d'appareils de détection incorporant des caméras adaptées à détecter la nature des particules émises par l'isotope radioactif sélectionné ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{99}\text{Tc}$  :  $\beta$ -imageur ;  $^{18}\text{F}$ ,  $^{11}\text{C}$  : tomographe à émission de positions, PET ;  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  : gamma-caméra).

25 Au cours de l'étape (1) du procédé selon l'invention, chaque banque ou librairie de molécules radioactives est injectée, sous forme de mélange ou non, à un ou plusieurs animaux, de préférence par voie intra-péritonéale (I.P.) ou voie intraveineuse (I.V.) ; la capacité des différentes molécules à cibler un tissu ou un organe est alors révélée par détection de la radioactivité au niveau des différents organes ou tissus  
30 [étapes (1') et (2)]. Les modalités de détection dépendent de la nature de l'atome radioactif choisi pour effectuer le radiomarquage des molécules, en particulier de la nature du rayonnement émis par le traceur radioactif. Le moment où s'effectue l'observation est un paramètre variable.

L'étape (1') présente de nombreux avantages :

35 - elle permet de faire un test sur l'animal vivant et d'obtenir ainsi des données pharmacocinétiques et des données concernant l'identification des ligands





Les étapes (3) à (5) concernent l'identification chimique des composés radioactifs présents dans un tissu ou un organe donné. Ces étapes montrent tout d'abord que la radioactivité observée est due uniquement à la présence de molécules présentes dans la librairie de départ.

5 De manière plus particulière, l'étape (4) permet, notamment à l'aide de chromatographies appropriées sur un appareil muni d'un détecteur de radioactivité, d'isoler les différentes fractions contenant de la radioactivité ; ces fractions sont ensuite soumises à une analyse en spectroscopie de masse (étape (5), afin de déterminer la structure chimique des produits radioactifs. Cette étape (5) permet donc formel-  
10 lement d'identifier si le produit isolé était contenu dans la banque ou librairie de départ.

Ainsi, le procédé selon l'invention permet d'identifier des composés doués de deux propriétés essentielles : stabilité métabolique et distribution tissulaire. Ces étapes permettent, en particulier, d'extraire les composés présents dans les diffé-  
15 rents tissus, dans le but d'effectuer la caractérisation de leur structure chimique. Le choix de mettre en œuvre des molécules radioactives est crucial, puisque le suivi de la radioactivité constitue un moyen très sensible pour suivre, tout au long des étapes d'extraction, voir de purification, la présence des composés d'intérêt.

Une fois les différentes étapes d'extraction réalisées, l'identité de la  
20 structure chimique des composés est réalisée par spectrométrie de masse ou toute autre méthode analytique convenable, comme l'HPLC.

De manière plus précise, les molécules radioactives sont injectées sous forme de mélange et ce afin de pouvoir cribler un grand nombre de composés. L'intensité de marquage, à un moment donné, est fonction de l'affinité du composé  
25 pour un site particulier, modulée par sa pharmacocinétique. Ainsi, les expériences de criblage sont, de préférence, réalisées à des moments différents. Cela permet d'établir la pharmacocinétique et d'évaluer les applications ultérieures envisagées pour ces composés.

Selon les techniques d'observation utilisées pour repérer la présence  
30 de molécules radioactives au niveau d'un organe ou d'un tissu, on pourra :

- soit faire l'analyse sur l'animal vivant : cas d'atomes radioactifs émetteurs de positons, tels que le fluor 18 ou le technétium 99 émetteur de rayons  $\gamma$ , en ayant recours à des appareils de détection incorporant des caméras adaptées à la détection de ce type de rayonnement,

35 - soit réaliser une détection après sacrifice de l'animal et procéder à des détections de radioactivité à partir de coupes de tissu.

Dans tous les cas, pour une analyse fine, on procèdera au sacrifice d'au moins un animal.

Il n'y a pas de restriction quant aux types d'animaux qui peuvent être utilisés. En pratique, tous les animaux couramment utilisés en pharmacologie  
5 pourront faire l'objet d'une étude.

Conformément à l'invention, préalablement à l'étape (1), ladite banque de biomolécules marquées est préparée par :

- synthèse d'un mélange desdites biomolécules par voie chimique ou enzymatique (peptides L ou D, pseudo-peptides, acides nucléiques, lipides, composés  
10 organiques) (synthèse combinatoire), et  
- marquage desdites biomolécules par des isotopes radioactifs, tels que le tritium ( $^3\text{H}$ ), le carbone 14 ( $^{14}\text{C}$ ), l'iode 131 ( $^{131}\text{I}$ ), l'iode 125 ( $^{125}\text{I}$ ), le phosphore 32 ( $^{32}\text{P}$ ), le fluor 18 ( $^{18}\text{F}$ ), le soufre 35 ( $^{35}\text{S}$ ), le technétium 99 ( $^{99}\text{Tc}$ ) ou l'indium 113 ( $^{113}\text{In}$ ).

De manière plus précise, la synthèse de grandes collections de molécules radioactives est réalisée par synthèse combinatoire dans le cas de bio-polymères (peptides, pseudo-peptides, nucléotides, polymères mixtes nucléotide-peptide). Les approches de déconvolution (fractionnements itératifs pour séparer les différentes biomolécules d'un mélange), dans le cas des peptides, décrites dans la littérature faci-  
20 litent l'identification des molécules d'intérêt. Des molécules non-peptidiques obtenues par synthèse en phase solide parallèle massive peuvent être mises en œuvre dans le procédé selon l'invention, dans la mesure où elles peuvent être modifiées en vue de l'incorporation d'un atome radioactif.

Les molécules citées ci-dessus étant synthétisées en phase solide, l'introduction d'atomes radioactifs est relativement aisée. Dans le cas des peptides, par exemple, la synthèse en phase solide aboutit à un peptide dont l'extrémité amine N-terminale peut être libérée, alors que toutes les fonctions réactives portées sur les chaînes latérales de ces polymères sont encore protégées. Cette propriété permet ainsi d'introduire de façon très sélective des groupements porteurs d'atomes radioactifs par  
30 simple acylation de la fonction amine N-terminale du polymère encore greffé sur le support solide, notamment en utilisant les nombreux dérivés radiomarqués au tritium, disponibles dans le commerce, comme le propionate de succinimide ou l'anhydride acétique, qui permettent une acylation des fonctions amine, aboutissant au radiomarquage par le tritium des composés porteurs de telles fonctions amine. Des composés  
35 analogues permettent d'introduire du  $^{14}\text{C}$ , par acylation de la fonction amine. Le

radiomarquage de peptides au  $^{18}\text{F}$  ou au  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  peut être réalisé comme décrit par exemple dans HEPPELER A. et al. (*Curr. Med. Chem.*, 2000, 7, 971-994).

Les synthèses de ces biopolymères peuvent être aussi conçues afin de pouvoir, après les étapes de criblage *in vivo*, recevoir un atome radioactif particulier. Ainsi, on peut synthétiser des banques de peptides dont tous les éléments incorporent une tyrosine iodée, avec de l'iode non-radioactif, et dont les extrémités N-terminales sont marquées au tritium. Après criblage *in vivo*, les molécules d'intérêt pourront être re-synthétisées, mais cette fois en incorporant sur la tyrosine de l'iode radioactif. La présence de la tyrosine iodée étant déjà présente lors des étapes de criblage, la molécule radioactive finale conservera nécessairement toute l'activité biologique. Cet exemple est applicable à différents types de biopolymères dans lesquels on incorpore un synthon porteur d'atomes non-radioactifs, mais qui une fois le crible réalisé pourront être remplacés par leurs isotopes radioactifs. Une telle stratégie s'applique notamment au technétium 99 ou au fluor 18.

Des molécules d'origine naturelle, correctement radiomarquées, peuvent être aussi criblées par la même démarche. On peut ainsi cribler des extraits de micro-organismes dont toutes les molécules sont radiomarquées à l'aide de différents isotopes radioactifs ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ , par exemple). Une biomasse radiomarquée peut être obtenue lorsqu'on cultive ces micro-organismes en présence de nutriments radiomarqués. Des extraits naturels, comme des venins (TAKEDA M. et al., *Toxicon*, 1974, 12, 633-641 ; KOCHVA E. et al., *Toxicon*, 1982, 20, 3, 615-636) peuvent être obtenus sous forme radiomarquée, à condition que des acides aminés radioactifs soient fournis à l'animal, afin de permettre l'incorporation de ceux-ci dans les toxines produites dans la glande à venin, par exemple. Des stratégies de radiomarquage de produits naturels peuvent être développées, afin de produire en masse des produits radiomarqués utilisables dans le procédé de criblage selon l'invention.

De manière avantageuse, les étapes (1) à (5) sont réalisées simultanément sur plusieurs animaux pour lesquels, les quantités administrées à l'étape (1) sont différentes et l'analyse de la distribution de la radioactivité des molécules selon l'étape (2) est réalisée à des moments différents selon l'animal.

De manière surprenante, un tel procédé permet d'établir la présence d'interactions spécifiques entre une ou des biomolécules contenues dans le mélange constitué par la banque de biomolécules avec un (des) site(s) spécifique(s) localisés au niveau d'un organe ou d'un tissu et ce sans la présence d'étiquettes particulières, ni nécessité d'amplification préalable des composés.

Le procédé selon l'invention présente notamment les avantages suivants :

5 - il n'est pas limité aux séquences peptidiques, mais concerne tous types de bio-polymères, ainsi que des molécules non peptidiques et des substances naturelles, notamment extraites de végétaux.

10 - le radiomarquage ne constitue pas une contrainte, car de nombreux procédés de radiomarquage ont été décrits dans la littérature, pour ce qui concerne différentes familles de composés obtenus par synthèse chimique ou enzymatique ; de plus, dans le cas de substances naturelles, il est possible selon le type d'organismes produisant les composés d'intérêt, de mettre en place des stratégies qui aboutissent à la production de composés radioactifs bio-synthétiques. De telles stratégies reposent sur l'introduction de molécules radioactives capables d'entrer dans un cycle métabolique de l'organisme considéré. On peut citer, par exemple, le procédé de radiomarquage de peptides, tel que décrit dans (TAKEDA M. et al. (précité) ou KOCHVA E. et al. (également précité).

15 - le criblage *in vivo* avec des bibliothèques de petites molécules (par opposition aux phages), en favorisant la pénétration tissulaire, permet un criblage bien plus efficace de l'ensemble des récepteurs présents dans l'organisme. Une bien meilleure exploitation de la diversité moléculaire contenue dans les banques considérées est donc possible avec ce type de criblage. Les phénomènes de clairance éliminant les phages de l'organisme ne constituent plus une limitation importante.

20 - l'identité chimique des composés est la même aux différentes étapes du criblage, ce qui n'est pas le cas, comme précisé ci-dessus, dans le procédé développé par l'équipe de E. RUOSLHATI.

25 - il permet l'observation directe de la distribution tissulaire des composés à cribler.

- il évite la présence d'étiquettes qui peuvent empêcher, par encombrement stérique, l'interaction du produit à cribler avec sa cible.

- il ne nécessite pas d'étape d'amplification et

30 - il permet l'étude du métabolisme et de la pharmacocinétique (distribution et élimination) des composés à cribler.

De manière surprenante, en combinant : le radiomarquage de bibliothèques de produits de synthèse, la chimie combinatoire, les techniques d'observation de la radioactivité chez l'animal et les procédés d'extraction de molécules, à partir d'organes ou de tissus, permettant leur analyse par spectrométrie de masse ou par  
35 d'autres méthodes analytiques convenables, il est effectivement possible d'identifier

des ligands dont les propriétés de biodisponibilité, de toxicité et de métabolisme seront compatibles avec leur utilisation ultérieure dans un contexte *in vivo* et ce, contrairement à ce qui est exposé dans l'art antérieur, dans lequel des étiquettes plus sophistiquées que la radioactivité sont considérées comme les seules permettant effectivement de détecter les molécules étiquetées. En effet, il est possible d'observer un produit radiomarqué sur un animal vivant, si l'on utilise des émetteurs de radioactivité très énergétiques et dont les temps de demi-vie sont assez courts, pour ne pas compromettre la vie de l'animal. Ce type de traceur est donc très avantageux, par rapport à des traceurs moins énergétiques ; cependant, la faible durée de vie de ces traceurs peut être incompatible avec les analyses *ex vivo* ; dans ce cas, des traceurs de longue durée de vie comme le tritium, même s'ils ne peuvent servir pour une observation extérieure de l'animal, s'avèrent très avantageux, d'autant que la manipulation de ce type de traceurs est peu contraignante, en termes de sécurité.

A l'inverse des criblages mis en œuvre sur des organes ou sur des cellules isolées, le criblage, comprenant une étape effectuée sur l'animal vivant, garantit l'intégrité fonctionnelle des récepteurs ciblés par les ligands, dans la mesure où l'expression des gènes est modifiée dans les systèmes de culture cellulaire. Enfin, comparée aux approches de ciblage reposant sur l'utilisation d'anticorps, le procédé selon l'invention peut être mis en œuvre avec des molécules de faibles poids moléculaire (1000 Da en moyenne). Cette propriété, par rapport aux anticorps, implique une meilleure pénétration tissulaire et donc une meilleure exploitation du répertoire des récepteurs s'exprimant sélectivement au niveau d'un tissu ou d'un organe.

De plus, compte tenu de la taille des composés recherchés, ceux-ci n'induiront pas de réponse immunitaire de la part de l'hôte.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, l'isolement de la ou des biomolécules radioactives associée(s) au(x)dit(s) organes selon l'étape (4) est effectué, conformément aux étapes suivantes :

- prélèvement des organes dans lesquels une radioactivité a été détectée,
- broyage desdits organes dans un tampon convenable
- centrifugation de chaque broyat et récupération de la solution
- filtration de la solution
- ajustement du pH
- séparation par fractions et récupération des fractions radioactives.

De manière plus précise, dans le cas de peptides, cette étape d'isolement peut comprendre, après la centrifugation des broyats, la récupération de la solution et la filtration de cette dernière :

- une acidification du filtrat
- 5           - un passage du filtrat sur une colonne contenant de la silice greffée avec des groupements hydrophobes, permettant, la mise en place, de techniques d'élution dite de phase inverse ; selon la présence de charges positives ou négatives, dans les composés de la banque ou librairie, des procédés de chromatographie mettant en jeu l'échange d'ions pourront être avantageusement mis en place,
- 10           - collecte de l'éluat par fractions et
- sélection des fractions contenant une substance radioactive,
- concentration sous vide des fractions radioactives
- filtration sur une membrane de filtration apte à retenir les produits de poids moléculaires supérieurs à ceux de la librairie d'origine,
- 15           - concentration du filtrat puis
- analyse des échantillons par chromatographie haute pression (HPLC) en utilisant des colonnes remplies avec un support phase inverse ; au sortir de la colonne de séparation, la présence de produits radioactifs est détectée en utilisant un détecteur classique de radioactivité.
- 20           Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, à l'étape (5), l'analyse par spectrométrie de masse est associée à une analyse de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

Selon encore un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, les biomolécules de la banque selon l'étape (1) présentent la formule générale suivante : propyl-<sup>3</sup>H-NH-Yaa-(R,S)Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>(R,S)</sub>Leu-Yaa'-NH<sub>2</sub>,  
25           dans laquelle Yaa et Yaa' représentent des positions dans lesquelles figurent les 20 acides aminés naturels.

Un tel procédé trouve de nombreuses applications ; on peut citer notamment :

- 30           - la mise au point de nouveaux agents de contraste pour l'imagerie médicale ; les composés criblés, étant dès le départ, porteurs d'atomes radioactifs, les molécules une fois sélectionnées peuvent être directement utilisées pour réaliser une imagerie médicale ou bien modifiées par l'addition d'agents de contraste, compatibles avec une observation *in vivo* par des techniques appropriées. A cet égard, les librairies
- 35           de molécules tritiées, dans lesquelles toutes les molécules seraient porteuses d'un atome de fluor 19 sont particulièrement intéressantes. Une fois la sélection réalisée par

criblage *in vivo*, les molécules identifiées pourront être synthétisées en incorporant cette fois-ci le fluor 18, permettant ainsi l'utilisation des molécules comme agents de contraste pour l'imagerie basée sur la détection de positons par des tomographes adaptés.

5                               - l'élaboration de composés à usage thérapeutique ; en effet, outre leur capacité à se fixer au niveau des sites bien précis dans un organisme vivant, certaines des molécules identifiées, peuvent présenter des activités biologiques propres et pourront servir ainsi de base au développement de composés thérapeutiques.

10                           - le ciblage de médicaments ou de toute autre molécule d'intérêt (vectorisation vers un site spécifique par couplage chimique d'un médicament avec une biomolécule sélectionnée). On peut en effet envisager pour cibler une substance d'intérêt vers un tissu ou un organe particulier, coupler chimiquement cette substance d'intérêt aux molécules identifiées par le procédé selon l'invention et pouvoir ainsi la vectoriser vers un espace tissulaire puis un site spécifique.

15                           - l'identification de nouveaux récepteurs s'exprimant sélectivement dans un tissu ou un organe donné.

Le procédé selon l'invention permet l'identification de nouveaux récepteurs s'exprimant sélectivement dans un tissu ou un organe donné. Ce type d'information et d'identification peut être extrêmement précieux pour le développe-  
20                           ment de nouvelles stratégies thérapeutiques. La caractérisation dans une même étape à la fois d'un ligand sélectif et de son récepteur sélectif associé, non encore identifié, représente un atout précieux pour isoler ce récepteur, en développant une colonne d'affinité sur laquelle sera greffé le ligand spécifique de ce récepteur. Ce même ligand représente une structure de départ à partir de laquelle d'autres ligands pourront être  
25                           conçus, notamment en vue d'applications thérapeutiques.

Un tel procédé permet donc également d'étudier différentes pathologies. En effet, des pathologies qui entraînent la sur-expression de certains récepteurs, peu ou pas exprimés chez l'individu sain, pourront être aisément détectés par le procédé selon l'invention. Ainsi, la mise en évidence de marquages sélectifs entre  
30                           animaux sains et malades est extrêmement utile en termes de diagnostic, de thérapie, d'imagerie et de ciblage de médicaments vers le tissu ou l'organe malade. Cette approche concerne à titre d'exemple la capacité à identifier des composés chimiques capables de se lier sélectivement sur une tumeur primaire ou secondaire, sans marquer les tissus ou organes sains de l'animal.

35                           On doit à cet égard noter que l'injection des mêmes banques à des animaux sains, par différence, devrait être un moyen de caractériser l'expression de

récepteurs propres à une pathologie et donc par là même de mettre en évidence de marqueurs spécifiques à une pathologie donnée.

De manière préférée, la synthèse desdites biomolécules ou ligands est réalisée en phase solide, à l'aide de techniques connues en elles-mêmes, avec introduction, par exemple d'un groupement  $CT_3-CT_2-CO$ , en N-terminal par acétylation de la fonction  $NH_2$ -terminale des peptides liés au support solide par de l'anhydride acétique tritié.

La présente invention a également pour objet un kit pour la mise en œuvre dudit procédé de criblage selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 10 - au moins une banque de biomolécules marquées, dont chaque biomolécule est préalablement marquée, notamment mais pas exclusivement, par remplacement d'un atome présent dans ladite biomolécule par l'un de ses isotopes radioactifs,
- des moyens de détection des produits radiomarqués, notamment
- 15 sélectionnés dans le groupe constitué par des imageurs adaptées à la détection du rayonnement à détecter sur coupes d'organes ou de tissus et
- des moyens d'analyse des produits radiomarqués détectés : HPLC et/ou spectrométrie de masse.

La présente invention a également pour objet une méthode d'identification et d'étude de molécules cibles (ou récepteurs) s'exprimant sélectivement dans un organe ou un tissu, à l'aide d'une banque de biomolécules, qui comprend :

- (1) l'administration, à au moins un animal, de ladite banque de biomolécules, dont chaque biomolécule est préalablement marquée, notamment mais
- 25 pas exclusivement par remplacement d'un atome présent dans ladite biomolécule par l'un de ses isotopes radioactifs,
- (2) le sacrifice d'au moins l'un des animaux et l'analyse de la distribution tissulaire de la radioactivité des biomolécules administrées, par prélèvement et analyse de coupes de différents tissus de l'animal, à l'aide d'imageurs convenables,
- 30 (3) la sélection de coupes de tissus ou d'organes dans le(s)quel(s) une radioactivité est détectée,
- (4) l'isolement, à partir desdites coupes de tissus ou d'organes, sélectionnés à l'étape (3) de fractions radioactives, par des techniques d'extraction et/ou de chromatographie,



(5) la caractérisation à partir des fractions radioactives obtenues à l'étape (4) de ladite ou desdites biomolécules, par des techniques d'analyse convenables, telles que la chromatographie et/ou la spectrométrie de masse,

(6) la mise en contact de la ou des biomolécules obtenues à l'étape (5) avec un échantillon d'organe ou de tissu sélectionné et prélevé, conformément à l'étape (2), dans des conditions permettant la liaison entre la biomolécule isolée à l'étape (4) et la molécule cible et la formation d'un complexe et

(7) l'isolement de ladite molécule cible à partir dudit complexe.

En variante, quand cela est possible, l'étape (2) comprend l'analyse de la distribution tissulaire de la radioactivité des biomolécules administrées, à l'aide d'imageurs convenables, *in vitro*, à partir d'un échantillon biologique préalablement extrait et sélectionné dans le groupe constitué par des cellules et des coupes de tissus ou d'organes. Cette variante ne nécessite donc pas le sacrifice de l'animal.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux de ce procédé, préalablement à l'étape (2), ledit procédé comprend une étape (1') d'analyse de la distribution tissulaire de la radioactivité des biomolécules administrées, en soumettant au moins l'un des animaux, à une imagerie externe, notamment au moyen d'appareils de détection incorporant des caméras adaptées à détecter la nature des particules émises par l'isotope radioactif sélectionné ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{99}\text{Tc}$  :  $\beta$ -imageur ;  $^{18}\text{F}$ ,  $^{11}\text{C}$  : tomographe à émission de positons, PET ;  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  : gamma-caméra etc...).

L'étape (7) de ce procédé, en particulier, permet d'étudier plus précisément les propriétés des composés qui ont été identifiés. Chaque molécule sélectionnée par le crible *in vivo* est à nouveau synthétisée, radiomarquée et étudiée afin d'illustrer ses capacités de distribution tissulaire, par les mêmes méthodes qui ont servi au criblage.

La présente invention a pour objet un vecteur de ciblage d'une molécule d'intérêt vers un espace tissulaire et/ou un site spécifique, caractérisé en ce qu'il comprend une biomolécule sélectionnée à l'aide du procédé de criblage d'une banque de biomolécules, tel que défini ci-dessus et dont la distribution tissulaire vers ledit site a été identifiée par ce procédé.

La présente invention a également pour objet une composition site-spécifique, caractérisée en ce qu'elle comprend (i) une molécule d'intérêt à cibler vers ledit site, couplée à une biomolécule spécifique dudit site, dont la distribution tissulaire a été identifiée à l'aide du procédé de criblage d'une banque de biomolécules, tel que défini ci-dessus et (ii) au moins un excipient pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention a également pour objet l'utilisation des biomolécules marquées, sélectionnées à l'aide du procédé de criblage d'une banque de biomolécules, tel que défini ci-dessus, pour la préparation d'une composition destinée à être utilisée en imagerie médicale.

5                    Selon un mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, les biomolécules marquées sont associées à un agent de contraste convenable.

La présente invention a également pour objet un procédé d'identification d'au moins une cible (par exemple un récepteur) d'une molécule d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comprend au moins :

10                    (1) le couplage de la molécule d'intérêt avec une biomolécule radiomarquée, spécifique de ladite cible, sélectionnée à l'aide du procédé de criblage d'une banque de biomolécules, tel que défini ci-dessus, pour obtenir un conjugué radioactif,

15                    (2) l'administration, à au moins un animal, du conjugué obtenu à l'étape (1) et

(3) l'analyse, *in vitro*, à partir d'un échantillon biologique, de la liaison d'au moins une cible dudit échantillon biologique avec la molécule d'intérêt couplée à ladite biomolécule radiomarquée.

20                    La présente invention a également pour objet un procédé de criblage *in vivo* par compétition, de biomolécules non marquées, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :

(1) l'administration d'une biomolécule marquée dont la distribution tissulaire a été identifiée à l'aide du procédé de criblage d'une banque de biomolécules, tel que défini ci-dessus, à au moins un animal,

25                    (2) une première analyse de la distribution tissulaire de la biomolécule radioactive administrée à l'étape (1), en soumettant au moins l'un des animaux, à une imagerie externe, notamment au moyen d'appareils de détection incorporant des caméras adaptées à détecter la nature des particules émises par l'isotope radioactif sélectionné,

30                    (3) l'administration d'une banque de biomolécules non marquées,  
(4) une deuxième analyse de la distribution tissulaire de la biomolécule radioactive, en soumettant au moins l'un des animaux, à une imagerie externe, notamment au moyen d'appareils de détection incorporant des caméras adaptées à détecter la nature des particules émises par l'isotope radioactif sélectionné,

(5) l'établissement de la cinétique de déplacement de la biomolécule marquée par au moins l'une des biomolécules non marquées, par comparaison avec la première analyse de distribution de la biomolécule marquée et

(6) la détection d'au moins une biomolécule non marquée ayant déplacé la cinétique de la biomolécule marquée, par fractionnements itératifs (méthode de déconvolution) et caractérisation de ladite biomolécule par des techniques d'analyse convenables, telles que la chromatographie et/ou la spectrométrie de masse.

En variante, quand cela est possible, les étapes (2) et (4) comprennent l'analyse de la distribution tissulaire de la radioactivité des biomolécules administrées, à l'aide d'imageurs convenables, *in vitro*, à partir d'un échantillon biologique préalablement extrait et sélectionné dans le groupe constitué par des cellules et des coupes de tissus ou d'organes.

La présente invention a en outre pour objet un composé de la banque de biomolécules de formule générale  $\text{propyl-}^3\text{H-NH-Yaa}_{-(R,S)}\text{Phe(PO}_2\text{-CH}_2\text{)}_{(R,S)}\text{Leu-Yaa'-NH}_2$ , dans laquelle Yaa représente Arg et Yaa' représente Leu, susceptible d'être obtenu par le procédé de criblage d'une banque de biomolécules, tel que défini ci-dessus..

De manière surprenante, ce composé de formule :

$\text{propyl-NH-Arg-Phe(PO}_2\text{-CH}_2\text{)Leu-Ala NH}_2$ ,

qui a été sélectionné par le procédé selon l'invention présente notamment les propriétés suivantes :

. il est un inhibiteur puissant *in vivo* des peptidases à zinc ACE (enzyme de conversion de l'angiotensine I) et NEP (endopeptidases neutre ou néprilysine) et trouve donc application dans les pathologies cardiovasculaires. ;

- il peut passer la barrière hémato-encéphalique et par conséquent peut avoir, les applications telles que définies ci-dessus, notamment lorsqu'il est marqué : (1) en imagerie médicale, (2) dans un procédé de ciblage d'une molécule d'intérêt, par couplage de cette molécule d'intérêt à ce peptide dans l'espace cérébral, (3) dans un procédé de criblage de molécules spécifiquement exprimées dans le cerveau.

D'autres peptides phosphiniques, de formules générales différentes avaient déjà été décrits (Demande de Brevet français n°89 14978 ; Demande de Brevet français n°91 05403 ; Demande de Brevet français n°95 01328 ; Demande de Brevet français n°98 08464), dont certains (voir Demande de Brevet français n°98 08464) présentent une activité inhibitrice vis-à-vis de l'ACE ; toutefois, de manière surprenante alors que selon l'art antérieur, les structures chimiques de la plupart des compo-

sés se comportant comme des inhibiteurs mixtes de l'ACE et la NEP, présentent un groupement carboxylate libre à leur extrémité C-terminale, considéré comme un groupe essentiel pour l'obtention d'une interaction forte entre l'inhibiteur et ces deux peptidases (Bralet et al, *Tips*, 2001, 22, 3, 106-109 ; Weber, *The Lancet*, 2001, 358, 1525-1532 ; Fink, *Exp. Opin. Ther. Patents*, 1996, 6, 11, 1147-1164), le composé  
 5 propyl-NH-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> ne comporte pas un tel groupement, bien qu'il présente effectivement cette activité mixte.

Ledit peptide présente les applications telles que définies ci-dessus, à savoir :

- 10 - médicament,
- vecteur de ciblage d'une molécule d'intérêt, plus spécifiquement dans l'espace cérébral,
- composition site spécifique en imagerie médicale,
- utilisation dans un procédé d'identification d'au moins une cible  
 15 (un récepteur, par exemple),
- utilisation dans un procédé de criblage direct *in vivo* par compétition, de biomolécules non marquées.

De manière plus précise :

La présente invention a également pour objet un médicament,  
 20 caractérisé en ce qu'il comprend au moins le composé propyl-NH-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> et au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention a également pour objet un vecteur de ciblage ou de transfert ciblé de médicament, caractérisé en ce qu'il est constitué par le composé propyl-NH-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub>.

25 La présente invention a également pour objet le composé tel que défini ci-dessus (propyl-NH-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub>), marqué à l'aide d'un isotope radioactif sélectionné dans le groupe constitué par le tritium (<sup>3</sup>H), le carbone 14 (<sup>14</sup>C), le carbone 11 (<sup>11</sup>C) ou le phosphore 32 (<sup>32</sup>P).

La présente invention a pour objet une composition destinée à  
 30 l'imagerie médicale, caractérisée en ce qu'elle comprend le composé tel que défini ci-dessus (propyl-NH-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub>), marqué à l'aide d'un isotope radioactif et éventuellement couplé à un autre composé ainsi qu'au moins un excipient pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention a également pour objet l'utilisation du  
 35 composé marqué, tel que défini ci-dessus, pour la préparation d'une composition destinée à être utilisée en imagerie médicale.

La présente invention a, en outre, pour objet un procédé d'identification d'au moins une cible d'une molécule d'intérêt, tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que la biomolécule radiomarquée est le peptide propyl-NH-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> radiomarqué.

5 Dans ce cas, la cible est de préférence située dans l'espace cérébral.

La présente invention a également pour objet un procédé de criblage *in vivo* par compétition de biomolécules non marquées, tel que défini ci-dessus, dans lequel, la biomolécule radiomarquée est le peptide propyl-NH-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> radiomarqué.

10 Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé selon l'invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 illustre la distribution théorique des masses de la librairie de formule générique propyl-<sup>3</sup>H-NH-Yaa-(R,S)Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)(R,S)Leu-Yaa'-NH<sub>2</sub>, dans laquelle Yaa et Y'aa représentent des positions dans lesquelles figurent les 20 acides aminés naturels, aboutissant à la synthèse de 400 molécules différentes (1600 si l'on décompte les diastéréoisomères dus à la présence de centre asymétrique au niveau des résidus Phe et Leu.

20 - la Figure 2 représente le spectre de masse expérimental de la librairie de formule générique propyl-<sup>3</sup>H-NH-Yaa-(R,S)Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)(R,S)Leu-Yaa'-NH<sub>2</sub>.

- la Figure 3 représente un exemple des structures chimiques observées dans les spectres MS/MS lors de la fragmentation du peptide phosphinique propyl-<sup>3</sup>H-Phe-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> (sélection du composé de masse à 595).

25 - la Figure 4 illustre le spectre MS/MS du peptide propyl-<sup>3</sup>H-Phe-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub>.

- la Figure 5 représente une autoradiographie réalisée au β-imageur d'une coupe sagittale du corps entier d'une souris à laquelle on a administré une solution contenant une librairie de peptides phosphiniques, répondant à la formule générique propyl-<sup>3</sup>H-NH-Yaa-(R,S)Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)(R,S)Leu-Yaa'-NH<sub>2</sub>, l'animal ayant été sacrifié 1 h après l'injection.

30 - les Figures 6 à 8 représentent des spectres de masse de différents extraits d'organes (rein, poumon et cœur) après injection I.P. de la librairie de peptides phosphiniques.

35 - les Figures 9 et 10 représentent les fragments obtenus lorsque le peptide propyl-<sup>3</sup>H-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> est soumis à un spectre MS/MS.

- les Figures 11 à 13 illustrent les pics de fragmentation obtenus à partir des extraits de rein, de poumon et de cœur dans une expérience de fragmentation MS/MS en sélectionnant le produit de masse à 595. Ces figures démontrent la présence du produit propyl-NH-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> dans ces trois extraits d'organes

- les Figures 14 à 19 illustrent des spectres HPLC correspondant au peptide propyl-<sup>3</sup>H-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> sous forme pure, puis dans les différents extraits d'organes (foie, rein, poumon, cœur et cerveau).

- la Figure 20 illustre des images d'autoradiographie de différentes coupes d'organes réalisées à partir d'une souris à laquelle on a administré le peptide propyl-<sup>3</sup>H-NH-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> et sacrifiée une heure après l'injection du produit et

- la figure 21 montre des images d'autoradiographie de différentes coupes d'organes réalisées après injection du peptide propyl-<sup>3</sup>H-NH-Tyr-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Pro-NH<sub>2</sub> à une souris. L'animal a été sacrifié 1 h après l'injection du produit.

- la figure 22 illustre l'inhibition de l'ACE par le composé propyl-NH-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub>.

- la figure 23 illustre l'inhibition de la NEP par le composé propyl-NH-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub>.

- la figure 24 illustre l'inhibition de l'ACE par les sous-banques de formule générique : propyl-NH-Yaa-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Yaa'-NH<sub>2</sub> (concentration de chaque banque : 500 nM),

- la figure 25 illustre l'inhibition de la NEP par les sous-banques de formule générique : propyl-NH-Yaa-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Yaa'-NH<sub>2</sub> (concentration de chaque banque : 250 nM).

### **EXEMPLE 1: Banque ou librairie de pseudo-peptides phosphiniques radiomarqués**

#### **- Synthèse et radiomarquage des librairies de pseudo-peptides phosphiniques**

##### **a) Radiomarquage de la librairie**

La synthèse de librairies de peptides phosphiniques repose sur des protocoles publiés (A. YIOTAKIS et al., J. Org. Chem., 1996, 61, 19, 6601-6605 ; J. JIRACEK et al., J. Biol. Chem., 1995, 270, 37, 21701-21706 ; J. JIRACEK et al., J. Biol. Chem., 1996, 271, 32, 19606-19611 ; V. DIVE et al., PNAS, 1999, 96, 4330-4335). La librairie est synthétisée sur phase solide, en utilisant une résine Rink-amide (J. JIRACEK et al., J. Biol. Chem., 1996 et V. DIVE et al., PNAS, 1999, précités),

avec un protocole split & combine (J. JIRACEK et al., J. Biol. Chem., 1995 et J. JIRACEK et al., J. Biol. Chem., 1996, précités). En fin de protocole de synthèse, la structure générique des peptides sur la résine est du type : Fmoc-NH-Yaa-NH-(R,S)Phe(PO(Oad)-CH<sub>2</sub>)<sub>(R,S)</sub>Leu-Yaa'-CONH-R.

5 Yaa et Yaa' représentent une position substituée par 20 aminoacides différents, R la résine.

Le groupe Fmoc est clivé, afin de générer une fonction N-terminale libre, permettant l'incorporation du réactif radioactif par acylation de la fonction N-terminale. Les peptides phosphiniques ont été radiomarqués par incorporation sur leur  
10 fonction N-terminale libre de propionate de N-succinimidyle-T5, composé ayant une radioactivité spécifique de 97 Ci/mmol. Pour 16,6 µmoles de peptides phosphiniques (masse moléculaire moyenne de 607, correspondant à 10 mg de peptide en final, après déprotection), 10,3 nmoles de propionate de N-succinimidyle-T5 ont été incorporées aux peptides, correspondant à une incorporation d'une radioactivité de 1 mCi par  
15 librairie.

La réaction d'acylation est complétée par du propionate de N-succinimidyle froid, mis en excès. Afin rinçage de la résine, les peptides phosphiniques sont clivés par des protocoles classiques de déprotection et de clivage(J. JIRACEK et al., J. Biol. Chem., 1996 et V. DIVE et al., PNAS, 1999, précités). Les  
20 solvants de clivage sont éliminés par évaporations successives. Les peptides portés à sec sont repris dans 50 µl de DMSO, 15 µl de NaHCO<sub>3</sub> 1M et 50 µl de PBS. Le pH de la solution est ajusté à 7 avec la solution de NaHCO<sub>3</sub> 1M. Le volume final est ajusté avec du PBS, à 500 µl. Cette solution est utilisée pour l'injection aux animaux. Le spectre de masse de la librairie (figure 2), ainsi que différentes expériences de  
25 fragmentations MS/MS sur cette librairie montrent une très bonne représentation de tous les composés attendus théoriquement.

#### b) Caractéristiques de la librairie obtenue

On obtient ainsi des librairies de peptides phosphiniques radiomarqués au tritium. La librairie synthétisée, selon le protocole défini ci-dessus a pour  
30 formule générique propyl-<sup>3</sup>H-NH-Yaa-(R,S)Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>(R,S)</sub>Leu-Yaa'-NH<sub>2</sub>, dans laquelle Yaa et Yaa' représentent une position dans laquelle figure un mélange équimolaire de 20 aminoacides. Cette librairie comporte donc 400 composés, formellement 1600 si l'on prend en compte la présence de deux centres asymétriques dans ces structures. Les composés ont été radiomarqués sur l'extrémité N-terminale par incorporation d'acide propylique tritié du type C<sup>3</sup>H<sub>3</sub>C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>-COOH, incorporant dans sa  
35 structure cinq atomes de tritium.

La figure 1 illustre la distribution théorique des masses de la librairie de formule générique  $\text{propyl-NH-Yaa}_{(R,S)}\text{Phe(PO}_2\text{-CH}_2\text{)}_{(R,S)}\text{Leu-Yaa'-NH}_2$

Une enveloppe théorique correspondant aux masses des différents peptides phosphiniques contenus dans la librairie est représentée dans cette figure. On remarque que cette enveloppe n'est pas continue, mais est constituée de massifs distincts, traduisant une distribution par groupe des différentes masses des produits de cette librairie.

La figure 2 illustre le spectre de masse expérimental (ES-MS = *Electro Spray Mass Spectroscopy*) de la librairie de formule générique  $\text{propyl-NH-Yaa}_{(R,S)}\text{Phe(PO}_2\text{-CH}_2\text{)}_{(R,S)}\text{Leu-Yaa'-NH}_2$ .

Lorsque l'on compare l'enveloppe théorique (figure 1) avec le spectre de masse expérimental correspondant à la librairie (figure 2), on remarque la très bonne correspondance entre données théoriques et expérimentales. Cette concordance indique une très bonne représentativité de tous les peptides phosphiniques dans cette librairie. Les expériences MS/MS de fragmentation des pics observés dans le spectre MS, permet de montrer l'existence des peptides phosphiniques théoriquement attendus dans cette librairie.

#### **Caractérisation des peptides phosphiniques par spectrométrie de masse :**

Le choix d'un groupement protecteur de type  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CO}$ , plutôt que celui traditionnellement utilisé en chimie peptidique  $\text{CH}_3\text{-CO}$ , s'est révélé utile lors de la caractérisation des molécules par spectrométrie de masse. Chaque peptide phosphinique dans cette librairie se caractérise par la nature des résidus d'acides aminés présents respectivement en position N et C-terminale. Cette librairie se caractérise par la présence de paires de peptides, qui ont exactement la même masse, le même contenu en acides aminés, seule leur séquence varie, comme illustré ci-dessous :

Par exemple, les deux peptides suivants ne peuvent être distingués l'un de l'autre selon leur masse, qui est identique :

Propyl-**Asp**-Phe( $\text{PO}_2\text{-CH}_2$ )Leu-**Ala**- $\text{NH}_2$

Propyl-**Ala**-Phe( $\text{PO}_2\text{-CH}_2$ )Leu-**Asp**- $\text{NH}_2$

Les techniques de fragmentation MS/MS pratiquées sur un certain nombre de peptides phosphiniques permettent de conclure qu'il est possible, sans ambiguïté, d'identifier la structure chimique des composés, même dans le cas où, à une même masse correspondent au minimum deux peptides. Cette propriété est due au



mode de fragmentation de ce type de peptide phosphinique, qui permet en particulier d'identifier la nature du résidu en position N-terminale.

La figure 3 illustre un exemple des structures chimiques observées dans les spectres MS/MS, lors de la fragmentation du peptide phosphinique propyl-  
5 Phe-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub>.

La figure 4 illustre le spectre MS/MS du peptide propyl-Phe-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub>.

Comme illustré dans ces figures 3 et 4, le résidu en position N-terminale apparaît toujours sous la forme d'une entité portant le groupe propylate  
10 (pro-Phe-CO<sup>+</sup>, pic D des figures 3 et 4). L'observation de cette entité dans les spectres MS/MS permet donc, dans la plupart des cas, de déterminer quelle est la nature de l'acide aminé en position N-terminale du peptide, et par conséquent celle du résidu en position C-terminale, la masse du peptide étant connue. Une autre espèce est aussi systématiquement observée (pro-Phe-Phe (PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu CO<sup>+</sup>, pic C des figures 3 et  
15 4) ; son observation vient corroborer la nature du résidu en position N-terminale de la séquence (résidu Phe dans l'exemple).

Ces caractéristiques du mode de fragmentation des peptides phosphiniques présents dans cette librairie tiennent à l'introduction du groupe propylate. Grâce à ces caractéristiques, on peut aussi identifier la structure chimique des compo-  
20 sés, même dans les cas où à une même masse correspondent plusieurs peptides phosphiniques.

On remarquera la présence d'un pic à 120 de masse dans les spectres MS/MS lorsque les peptides phosphiniques sont fragmentés (pic E, des figures 3 et 4). L'observation de ce pic, qui est caractéristique d'un peptide phosphinique, est très  
25 utile pour repérer la présence d'un peptide phosphinique dans des extraits d'organes.

#### **- Injection de la librairie à des animaux et observation de la distribution tissulaire des peptides tritiés.**

a) Injection des librairies obtenues à des animaux.

Les souris utilisées pour les expériences sont des femelles Balb/C.  
30 Les peptides phosphiniques de la librairie (10 mg, radioactivité variant de 0,8 à 1 mCi) sont solubilisés dans une solution de PBS, contenant 10 % de DMSO. Si l'on considère la présence de 400 molécules dans cette librairie, la quantité de chaque produit injecté est de l'ordre de 25 µg par animal, représentant une dose de 1,25 mg/kg pour des souris de 20 g. Dans le cas d'injection d'un seul produit, les doses utilisées ont été  
35 de 20 mg/kg, pour une radioactivité totale variant de 100 à 150 µCi. Les injections sont réalisées à différents moments (5 min, 1 h, 3 h et 24 h).

#### b) Réalisation des coupes d'organes

Immédiatement après le sacrifice des animaux, les différents organes ou tissus sont prélevés, rincés dans une solution de PBS et plongés dans de l'heptane refroidi à  $-70^{\circ}\text{C}$  (mélange eutectique d'heptane et carboglace). Les coupes congelées de tissus, d'une épaisseur de  $25\text{ }\mu\text{m}$ , sont réalisées à l'aide d'un microtome à  $-20^{\circ}\text{C}$ .  
Après séchage, les coupes sont analysées au  $\beta$ -imageur.

#### c) Résultats

##### \* Analyse des coupes au $\beta$ -imageur.

Les librairies de peptides phosphiniques radiomarqués sont injectées par voie intra-péritonéale à des souris, conformément au protocole décrit ci-dessus.

Après un certain temps (1 h ou 15 min), les animaux sont sacrifiés. Des coupes de corps entiers sont réalisées et analysées par autoradiographie sur  $\beta$ -imageur, appareil capable de détecter le rayonnement  $\beta$  du tritium. Ces expériences indiquent, aussi bien à 15 min ou 1 h après injection de la librairie, que de la radioactivité est observée au niveau de différents organes ; la figure 5 illustre une autoradiographie réalisée au  $\beta$ -imageur d'une coupe sagittale du corps entier d'une souris à laquelle a été administrée une solution contenant la librairie de peptides phosphiniques et qui a été sacrifiée 1 h après l'injection.

Outre dans le foie et le rein, de la radioactivité est observée au niveau du cœur et des poumons par exemple. D'autre part des expériences où les animaux ont été sacrifiés ultérieurement confirment que cette librairie ne possède pas de composés induisant une mortalité ou une toxicité sur les animaux pour les périodes d'observation effectuées. On peut donc conclure que durant ces expériences les fonctions vitales des animaux ont été préservées. Cet aspect est important, puisqu'il garantit que les composés qui seront identifiés doivent interagir avec des « récepteurs » exprimés physiologiquement.

#### - Extraction des peptides phosphiniques :

##### a) Protocole

Les organes sont prélevés rapidement après le sacrifice de l'animal et déposés dans une solution de PBS à  $4^{\circ}\text{C}$ . Quelques minutes après, les organes sont transférés dans un potter contenant 2 ml de PBS à  $4^{\circ}\text{C}$ , puis broyés manuellement. Le broyat est transféré dans un tube à centrifuger contenant 15 ml de PBS. Après centrifugation 30 min à 4.000 tours/min, la phase supérieure est séparée du culot de cellules et passée sur filtres  $0,45\text{ }\mu\text{m}$ . Ce filtrat, après avoir été acidifié, est chargé sur une cartouche contenant 5 g de phase C18, cette cartouche ayant été préalablement rincée sur une solution aqueuse contenant 0,1 % de TFA.

Le protocole d'élution consiste à passer d'abord 20 ml d'eau contenant 0,1 % de TFA, puis 30 ml d'une solution aqueuse contenant 50 % d'acétonitrile et 0,1% de TFA, puis 20 ml d'une solution aqueuse contenant 80% d'acétonitrile et 0,1% de TFA.

5 L'éluat sortant de la cartouche de C18 est collecté par fractions de 2 ml. Un comptage de radioactivité permet d'identifier les fractions contenant des peptides phosphiniques radiomarqués.

Les fractions radioactives sont concentrées sous vide et les produits sont repris dans de l'eau, puis les différentes solutions sont passées sur une membrane  
10 de filtration retenant les produits ayant un poids moléculaire supérieur à 5000 Da. La solution ainsi filtrée est concentrée sous vide jusqu'à un volume de 100 µl.

Ces échantillons sont alors prêts pour être analysés, soit par chromatographie haute performance, couplée à un système de détection de radioactivité pour observer les peptides phosphiniques radioactifs, soit par spectrométrie de  
15 masse.

Cette étape révèle la présence de dérivés phosphiniques, contenus dans la librairie de départ, capables de se distribuer dans certains organes. Pour être en mesure d'identifier les dérivés phosphiniques retenus dans ces organes, différents protocoles d'extraction des dérivés phosphiniques ont été testés, en utilisant notam-  
20 ment la détection de la radioactivité, comme précisé ci-dessus, pour suivre la présence des composés de la librairie, tout au long des étapes de la procédure d'extraction. L'utilisation du protocole de fractionnement, a permis l'analyse de ces extraits à la fois par HPLC couplée à une détection de radioactivité et par spectrométrie de masse. Une utilisation optimale de la spectrométrie de masse, en particulier la sensibilité de la  
25 méthode, repose sur la qualité des échantillons qui seront soumis à l'analyse. Les protocoles de préparation des échantillons sont donc extrêmement importants à cette étape, mais peuvent varier, selon les fonctions chimiques portées par les produits de la librairie. Par exemple, dans le cas des pseudo-peptides phosphiniques, après rinçage, avec H<sub>2</sub>O, 0,1 % TFA, tous les pseudo-peptides phosphiniques de la librairie peuvent  
30 être élués avec 50 % CH<sub>3</sub>CN, alors qu'à 80 % CH<sub>3</sub>CN, on élue beaucoup de produits endogènes qui peuvent interférer avec les analyses ultérieures.

b) Analyse des spectres de masse d'extraits d'organes issus d'animaux ayant reçu par injection i.p. la librairie des peptides phosphiniques

L'analyse de spectres de masse des différents extraits préparés à  
35 partir de différents organes et tissus (rein, foie, poumon, cœur, cerveau, tumeur) indi-

que qu'en dehors du rein, aucun signal propre aux peptides phosphiniques n'apparaît dans les spectres de masse de ces différents extraits.

Ces résultats sont illustrés aux figures 6 à 8.

La figure 6 représente un spectre de masse de l'extrait rénal, dans lequel on observe la présence de nombreux pics caractéristiques de peptides phosphiniques (à comparer à la figure 2).

La figure 7 représente un spectre de masse de l'extrait pulmonaire, dans lequel on observe l'absence de pics caractéristiques de peptides phosphiniques.

La figure 8 représente un spectre de masse de l'extrait de cœur, dans lequel on observe l'absence de pics caractéristiques de peptides phosphiniques.

Toutefois, on observe que les résultats obtenus par analyse de spectre de masse et par HPLC sont divergents ; en effet, on détecte la présence de pics caractéristiques de peptides phosphiniques par HPLC dans les extraits provenant des poumons et du cœur. Cette dichotomie provient du fait qu'en spectrométrie de masse, les pics de masse pouvant correspondre aux produits recherchés peuvent être masqués par les pics de masse provenant des composés endogènes contenus dans les organes, qui sont encore présents après les étapes d'extraction. Sur la base de ces résultats, des spectrométries de masse en tandem MS/MS de fragmentation sont systématiquement réalisées, afin de mettre en évidence la présence de peptides phosphiniques dans les différents extraits.

Ces spectrométries de masse MS/MS permettent de fragmenter un peptide à une masse donnée et donc de ne faire apparaître, dans le spectre MS/MS, que les fragments d'un tel peptide (signature spectrale). Ces expériences s'avèrent donc beaucoup plus efficaces pour mettre en évidence la présence d'un produit, même si celui-ci n'apparaît pas dans le spectre MS.

Ces spectrométries de masse MS/MS ont permis d'identifier la présence d'un peptide phosphinique dans les poumons et le cœur, à savoir le propyl-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub>. Ce peptide apparaît aussi dans le rein et dans le foie ; cependant dans ces organes, d'autres peptides phosphiniques sont aussi observés. Les figures 9 et 10 représentent les fragments obtenus lorsque le peptide propyl-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> est soumis à un spectre MS/MS. L'observation des pics de fragmentation caractéristiques du peptide propyl-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> dans les extraits rénaux (figure 11), pulmonaires (figure 12) et cardiaques (figure 13) permet de conclure à la présence de ce peptide dans ces organes.

La sélection du produit propyl-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> par cette approche de criblage d'une banque de peptides, a conduit à préparer ce peptide sous forme pure, afin d'établir en détail ses propriétés de distribution tissulaire.

L'étude de la distribution tissulaire du peptide propyl-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> radiomarké, injecté sous forme pure, montre que ce composé est effectivement capable de se distribuer dans différents tissus, chez la souris (20mg/kg, 100μCi, puis sacrifice de la souris 1 h après l'injection en I.P. du produit, comme en témoignent les images des différents organes, obtenues par autoradiographie : on observe ce produit au niveau du cœur, du cerveau, du foie, des poumons et des reins. De façon très intéressante, on observe que ce peptide est capable de franchir la barrière hémato-encéphalique, puisqu'il est observé au niveau du cerveau. Les mêmes procédures d'extraction et d'analyse structurale démontrent que toute la radioactivité observée par autoradiographie correspond à la présence du peptide propyl-Arg-Phe(PO<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> sous forme intacte (figure 20).

Les figures 14 à 19 représentent des: spectres HPLC, avec détection de radioactivité, correspondant au produit propyl-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> pur tritié, et aux différents extraits d'organes provenant d'une souris ayant reçu le peptide propyl-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> (20 mg/kg, 100 μCi) et sacrifiée 1 h après l'injection du produit.

Afin d'illustrer la capacité du peptide propyl-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> à, d'une part cibler certains organes comme le cœur et les poumons, et d'autre part à s'accumuler dans ces organes, une autre molécule a été mise en œuvre dans les mêmes conditions comme contrôle négatif ; il s'agit d'une autre molécule de la librairie décrite ci-dessus, à savoir le propyl-Tyr-Phe(PO<sub>2</sub>.CH<sub>2</sub>)Leu-Pro-NH<sub>2</sub>.

L'étude de sa distribution tissulaire, dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour le composé propyl-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> montre que le composé propyl-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>.CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> se différencie très nettement du peptide propyl-Tyr-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Pro-NH<sub>2</sub> tant dans sa capacité à s'accumuler au niveau du cœur et des poumons, que dans sa capacité à apparaître au niveau du cerveau.

La figure 21 représente des images d'autoradiographie de différentes coupes d'organes réalisées à partir d'une souris ayant reçu le peptide propyl-Tyr-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Pro-NH<sub>2</sub> (20 mg/kg, 100 μCi), sacrifiée 1 h après l'injection du produit.

**EXEMPLE 2 : Propriétés et identification des cibles potentielles du peptide phosphinique propyl-NH-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> :**

La distribution tissulaire particulière du peptide phosphinique propyl-NHArg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub>, notamment au niveau du cerveau, a conduit à faire l'hypothèse que ce composé pouvait interagir avec des peptides à zinc du type, enzyme de conversion de l'angiotensine I (ACE) ou/et endopeptidase neutre (NEP, néprilysine). En effet, de manière générale, les peptides phosphiniques ont la capacité à interagir spécifiquement avec des protéases ou peptidases à zinc (voir Demande de brevet français n°98 08464 ; en outre, ces deux peptidases à zinc sont connues pour avoir des distributions tissulaires compatibles avec celle observée pour le produit phosphinique propyl-NH-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> (Cadwell et al., Science, 1975, 191, 1050-1051 ; Roques et al., Tips, 1990, 11, 245-249).

C'est la raison pour laquelle le pouvoir inhibiteur du peptide phosphinique propyl-NH-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> a été évalué vis-à-vis des formes purifiées de ces deux peptidases (mesure des K<sub>i</sub> selon Dive et al., PNAS, 1999, 96, 4330-4335). Comme le montre les figures 22 et 23, ce peptide présente des IC<sub>50</sub> égales à 30 nM et 100 nM, respectivement, vis-à-vis de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et de la NEP, correspondant à des valeurs de constantes d'inhibition K<sub>i</sub> de 15nM et 30nM. Ce composé se comporte donc comme un inhibiteur extrêmement puissant vis-à-vis de ces deux peptidases.

Ces deux peptidases étant considérées comme peu sélectives, il peut apparaître surprenant, qu'après le criblage *in vivo*, seul le peptide propyl-NH-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> ait été identifié par ce procédé de criblage.

Afin de mieux connaître les propriétés inhibitrices des différentes molécules contenues dans la banque de départ, vis-à-vis de l'ACE et la NEP, le pouvoir inhibiteur de sous-banques contenant des mélanges discrets de formule générique :



dans lesquels la position notée Aaa contient un acide aminé particulier, alors que dans la position Yaa figure un mélange de 20 acides naturels, a été évalué.

La figure 24 présente le pourcentage d'inhibition des mélanges de peptides phosphiniques, répondant à la formule générique ci-dessus, vis-à-vis de l'ACE, selon la nature du résidu en position Aaa. Les résultats reportés dans cette figure indiquent très clairement que de nombreux peptides phosphiniques présents dans ces sous-banques apparaissent comme des inhibiteurs puissants de l'ACE. De manière intéressante, on voit que parmi les résidus en position Aaa, optimisant le

pouvoir inhibiteur des composés vis-à-vis de l'ACE, figurent les résidus His, Arg et Tyr.

Lorsque les mêmes sous-banques sont testées sur la NEP (figure 25), il apparaît aussi que de nombreux peptides contenus dans les sous banques doivent se  
5 comporter comme des inhibiteurs très puissants de la NEP. On notera que plusieurs types d'acide animé en position Aaa optimisent les interactions enzyme-inhibiteur.

Sur la base de ces données *in vitro*, il est clair que le produit propyl-NH-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> ne correspond certainement pas à l'inhibiteur le plus puissant *in vitro*, contenu dans la banque vis-à-vis de ces deux peptidases.

10 Cela montre clairement l'intérêt du procédé selon l'invention ; en effet, sur la base du seul crible *in vitro*, il est impossible de sélectionner, par exemple le seul composé effectivement efficace ; en effet, à l'aide du test *in vitro*, on sélectionne de nombreux composés de la banque, ayant la capacité d'agir comme des inhibiteurs puissants, alors que le procédé selon l'invention, qui inclut une étape *in vivo*,  
15 va être beaucoup plus sélectif, dans la mesure où seul le composé apte à agir *in vivo* est ainsi sélectionné.

Sur la base de la capacité du composé propyl-NHArg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> à inhiber de façon puissante *in vivo* des peptidases ACE et NEP, les applications d'un tel produit dans les pathologies cardiovasculaires peuvent être  
20 attendues.

La stabilité métabolique du composé propyl-NH-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Ala-NH<sub>2</sub> et sa très bonne distribution tissulaire, notamment dans des régions connues pour exprimer ces deux peptidases à zinc laisse prédire une excellente capacité de ce produit à inhiber *in vivo* ces deux peptidases. En conséquence, un tel produit  
25 trouvera des applications importantes dans les pathologies cardiovasculaires chez l'homme.

### **REVENDEICATIONS**

1°) Procédé de criblage d'une banque de biomolécules, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

5 (1) l'administration, à au moins un animal, de ladite banque de biomolécules, dont chaque biomolécule est préalablement marquée, par un isotope radioactif convenable,

(2) le sacrifice d'au moins l'un des animaux et l'analyse de la distribution tissulaire de la radioactivité des biomolécules administrées, à partir de coupes de tissus ou d'organes prélevés, à l'aide d'imageurs convenables,

10 (3) la sélection de coupes de tissus ou d'organes dans le(s)quel(s) un signal de radioactivité est détecté,

(4) l'isolement, à partir desdites coupes de tissus ou d'organes, sélectionnées à l'étape (3) de fractions radioactives, par des techniques d'extraction et/ou de chromatographie et

15 (5) la caractérisation à partir des fractions radioactives obtenues à l'étape (4) de ladite ou desdites biomolécules, par des techniques d'analyse convenables, telles que la chromatographe et/ou la spectrométrie de masse.

2°) Procédé de criblage d'une banque de biomolécules, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

20 (1) l'analyse de la distribution tissulaire de la radioactivité des biomolécules de ladite banque de biomolécules, préalablement administrée à au moins un animal, à l'aide d'imageurs convenables, *in vitro*, à partir d'un échantillon biologique préalablement extrait et sélectionné dans le groupe constitué par des cellules et des coupes de tissus ou d'organes,

25 (2) la sélection des cellules ou des coupes de tissus ou d'organes dans le(s)quel(s) un signal de radioactivité est détecté,

(3) l'isolement, à partir desdites cellules ou desdites coupes de tissus ou d'organes, sélectionnées à l'étape (2) de fractions radioactives, par des techniques d'extraction et/ou de chromatographie et

30 (4) la caractérisation à partir des fractions radioactives obtenues à l'étape (3) de ladite ou desdites biomolécules, par des techniques d'analyse convenables, telles que la chromatographe et/ou la spectrométrie de masse.

35 3°) Utilisation du procédé selon la revendication 1 pour identifier et étudier des molécules cibles s'exprimant sélectivement dans un organe ou un tissu, laquelle utilisation comprend, après la caractérisation de ladite ou desdites biomolécules, la mise en contact de la ou des biomolécules caractérisées avec un échantillon d'organe ou de tissu dans lequel un signal de radioactivité a été détecté,



dans des conditions permettant la liaison entre la biomolécule isolée et la molécule cible et la formation d'un complexe et l'isolement de ladite molécule cible à partir dudit complexe.

4°) Utilisation du procédé selon la revendication 2 pour identifier et  
5 étudier des molécules cibles (ou récepteurs) s'exprimant sélectivement dans un organe ou un tissu, laquelle utilisation comprend, après la caractérisation de ladite ou desdites biomolécules, la mise en contact de la ou des biomolécules caractérisées avec un échantillon de cellule, d'organe ou de tissu dans lequel un signal de radioactivité a été détecté, dans des conditions permettant la liaison entre la biomolécule et la molécule  
10 cible et la formation d'un complexe et l'isolement de ladite molécule cible à partir dudit complexe.

5°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'au cours de l'étape (1), la banque de molécules radioactives est injectée à l'animal, de préférence par voie intra-péritonéale (I.P.) ou voie intra-veineuse (I.V.).

15 6°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 2 et 5, caractérisé en ce que les isotopes radioactifs sont sélectionnés dans le groupe constitué par le tritium ( $^3\text{H}$ ), le carbone 14 ( $^{14}\text{C}$ ), le carbone 11 ( $^{11}\text{C}$ ), l'iode 131 ( $^{131}\text{I}$ ), l'iode 125 ( $^{125}\text{I}$ ), le phosphore 32 ( $^{32}\text{P}$ ), le fluor 18 ( $^{18}\text{F}$ ), le soufre 35 ( $^{35}\text{S}$ ), le technétium 99 ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) ou l'indium 113 ( $^{113}\text{In}$ ).

20 7°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 2, 5 et 6, caractérisé en ce que préalablement à l'étape d'analyse de la distribution tissulaire de la radioactivité de biomolécules *in vitro*, ledit procédé comprend une étape d'analyse de la distribution tissulaire de la radioactivité desdites biomolécules, en soumettant au moins l'un des animaux, à une imagerie externe, notamment au moyen d'appareils de  
25 détection incorporant des caméras adaptées à détecter la nature des particules émises par l'isotope radioactif sélectionné.

8°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 2 et 5 à 7, caractérisé en ce que la distribution tissulaire de la radioactivité est révélée au moyen d'appareils de détection incorporant des imageurs adaptés à détecter la nature des  
30 particules émises par l'isotope radioactif sélectionné.

9°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les molécules radioactives sont injectées sous forme de mélange.

10°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 2 et 5 à 9, caractérisé en ce que préalablement à l'étape (1), ladite banque de biomolécules mar-  
35 quées est préparée par :

- synthèse d'un mélange desdites biomolécules par voie chimique ou enzymatique et

- marquage desdites biomolécules par lesdits isotopes radioactifs.

11°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les étapes (1) à (5) sont réalisées simultanément sur plusieurs animaux pour lesquels, les quantités administrées à l'étape (1) sont différentes et où l'analyse de la distribution de la radioactivité des molécules selon l'étape (2) est réalisée à des moments différents selon l'animal.

12°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'isolement de la ou des biomolécules radioactives associée(s) au(x)dit(s) organes selon l'étape (4) comprend les étapes suivantes :

- 10 - broyage desdits tissus ou organes dans un tampon convenable
- centrifugation de chaque broyat et récupération de la solution
- filtration de la solution
- ajustement du pH et
- séparation par fractions et récupération des fractions radioactives.

13°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 2 et 5 à 12, caractérisé en ce qu'à l'étape de caractérisation des biomolécules, l'analyse par spectrométrie de masse est associée à une analyse de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

14°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 2 et 5 à 13, caractérisé en ce que les biomolécules de la banque présentent la formule générale suivante :  $\text{propyl-}^3\text{H-NH-Yaa}_{(R,S)}\text{Phe(PO}_2\text{-CH}_2\text{)}_{(R,S)}\text{Leu-Yaa'-NH}_2$ , dans laquelle Yaa et Yaa' représentent des positions dans lesquelles figurent les 20 acides aminés naturels.

15°) Kit pour la mise en œuvre dudit procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 2 et 5 à 14, caractérisé en ce qu'il comprend :

- au moins une banque de biomolécules, dont chaque biomolécule est préalablement marquée par un isotope radioactif convenable,
- des moyens de détection des produits radiomarqués et
- des moyens d'analyse des produits radiomarqués détectés.

1/25

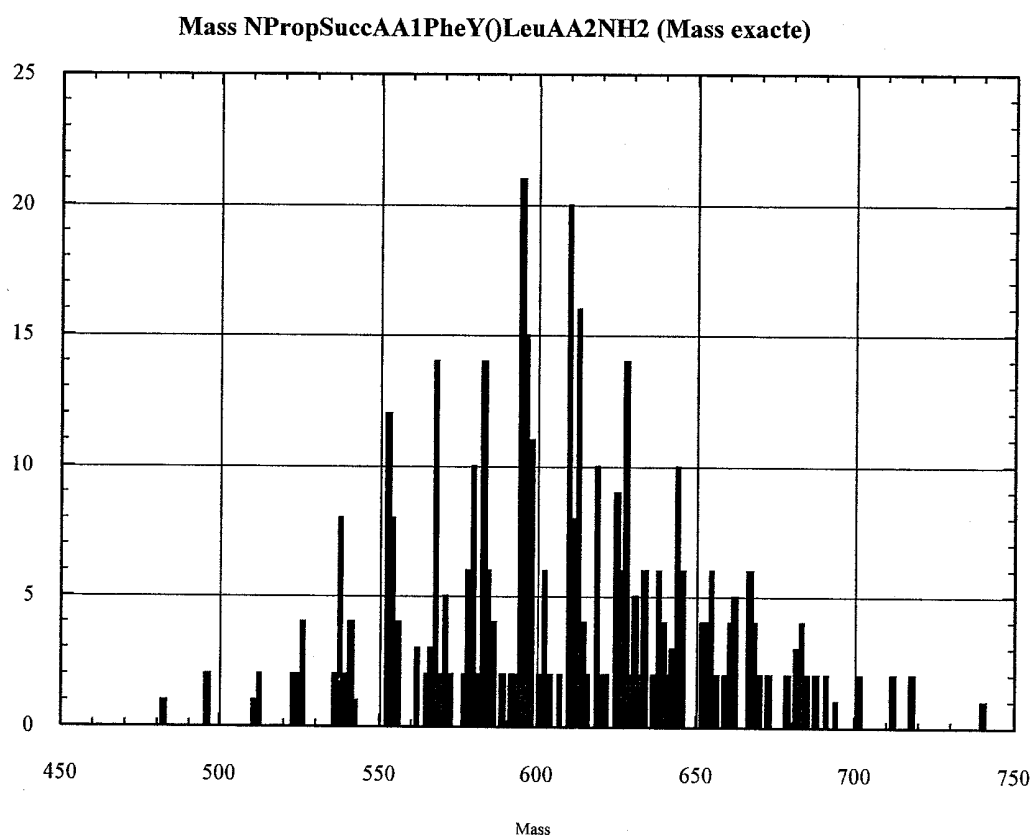


FIGURE 1

2/25

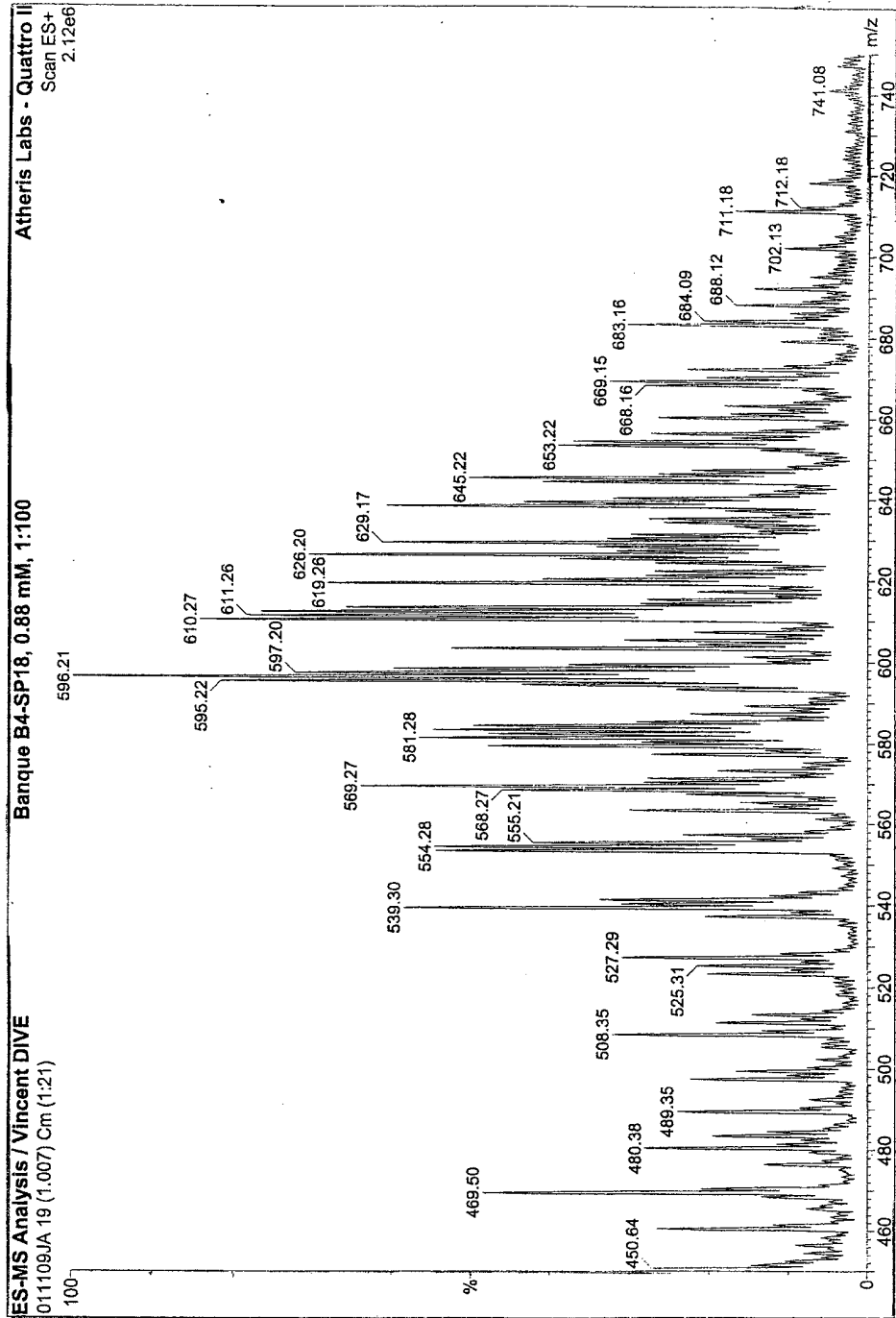


FIGURE 2

3/25

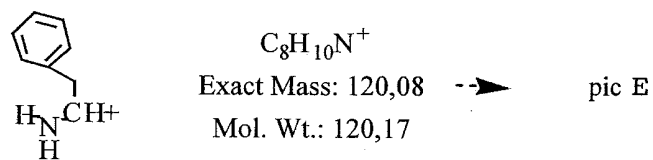
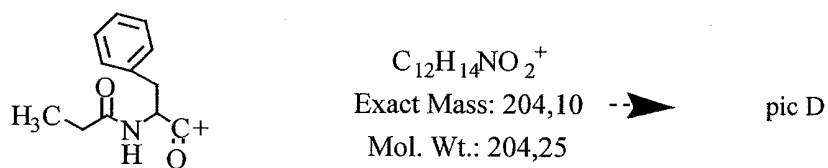
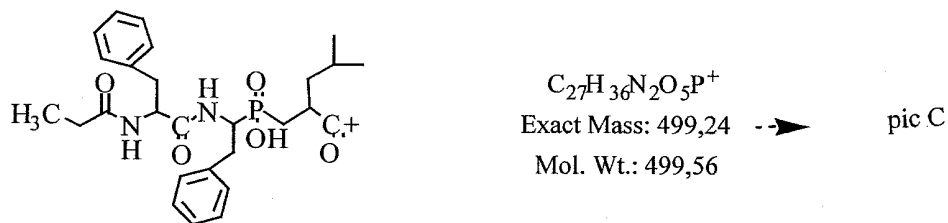
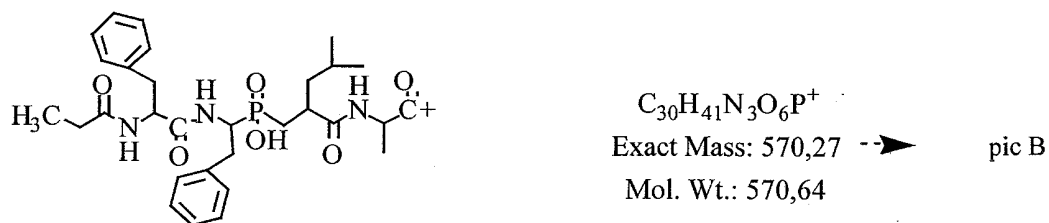
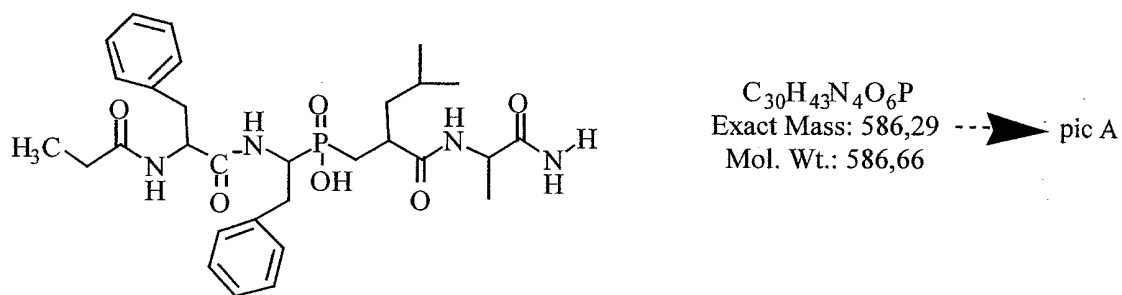


FIGURE 3

4/25

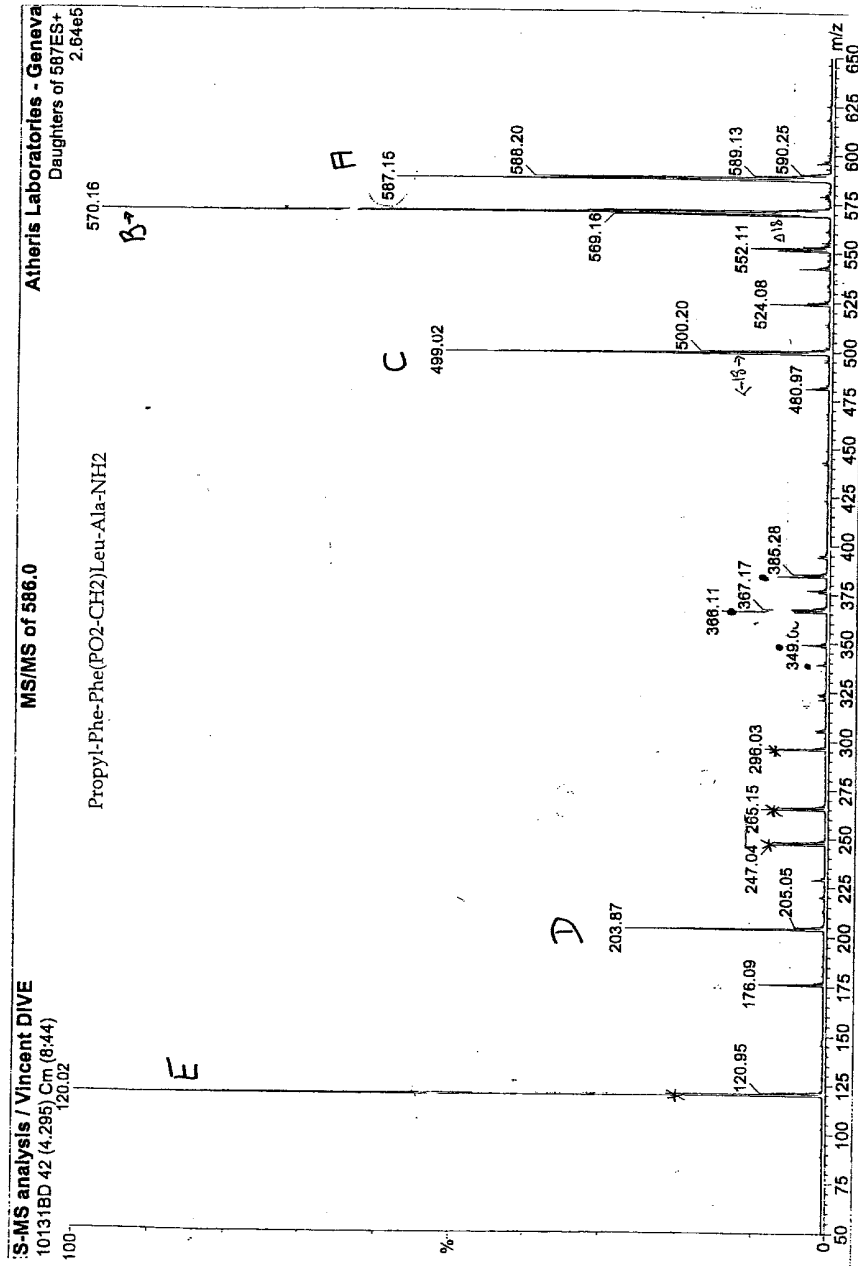


FIGURE 4

5/25



FIGURE 5

6/25

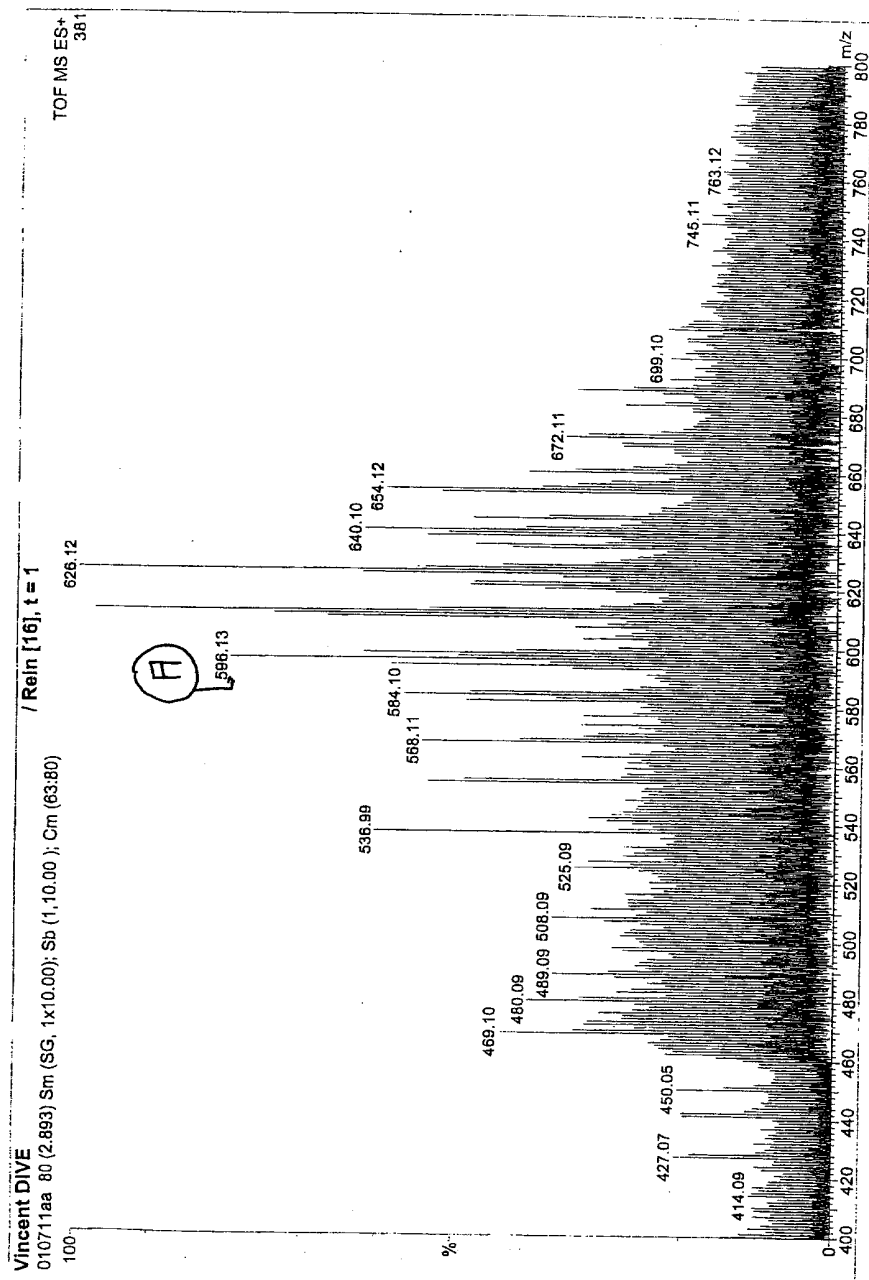


FIGURE 6



7/25

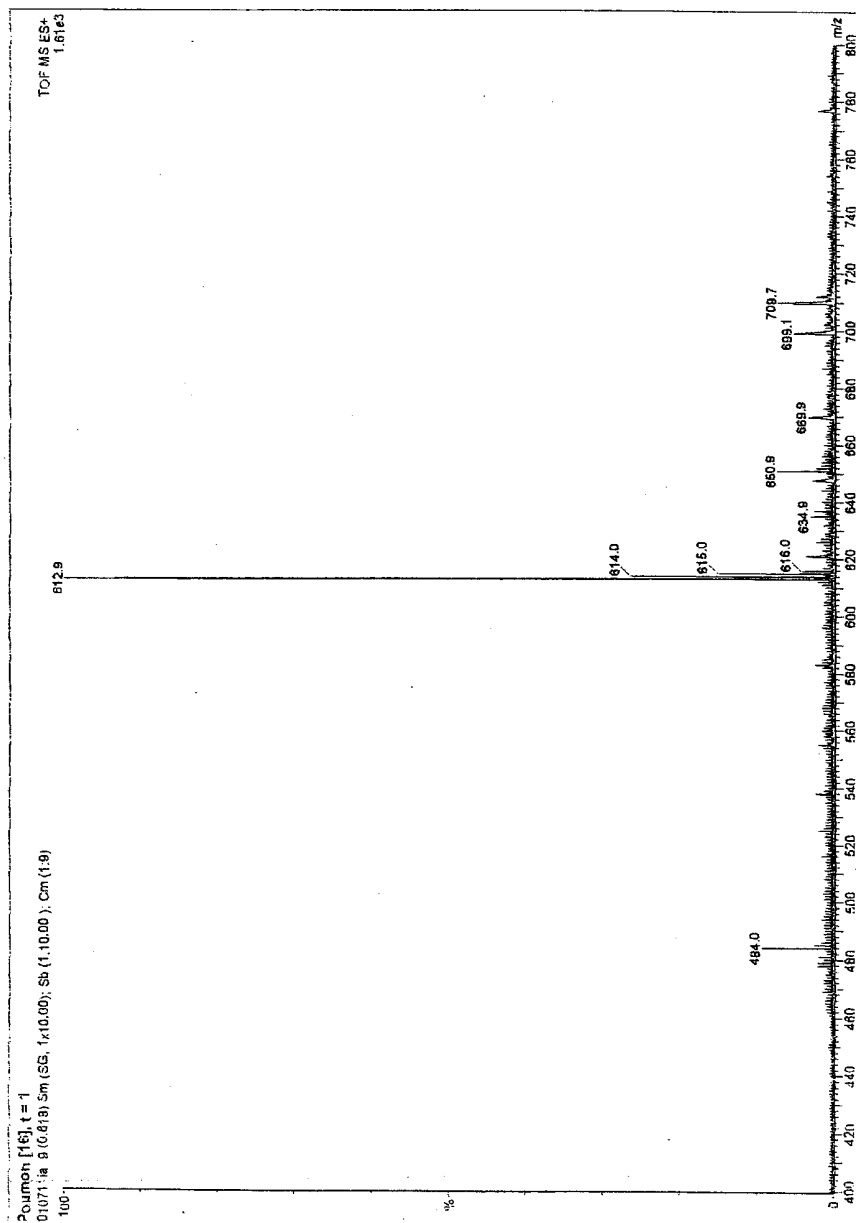


FIGURE 7

8/25

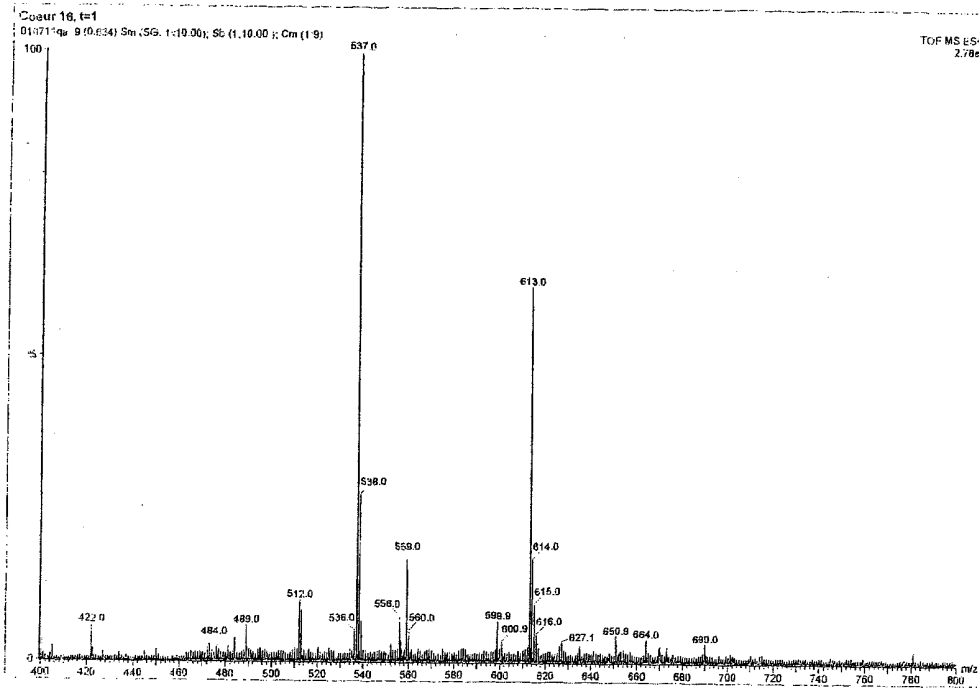


FIGURE 8

9/25

fragments observés dans le spectre de masse MS/MS

dans le cas du peptide

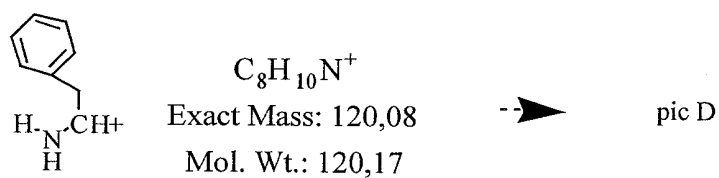
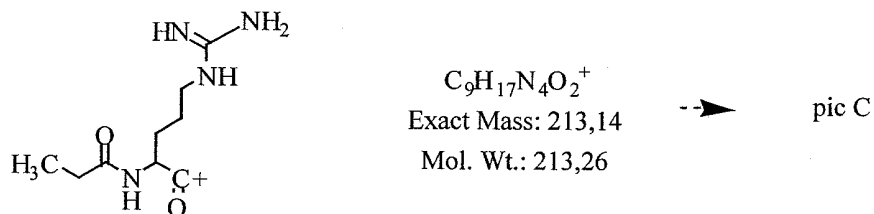
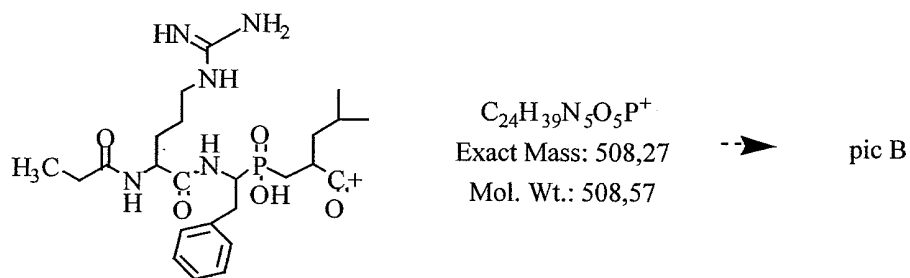
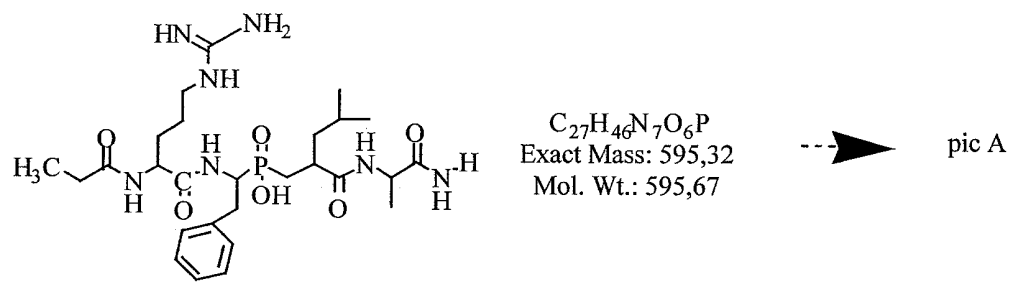
propyl-Arg-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-AlaNH<sub>2</sub>

FIGURE 9

10/25

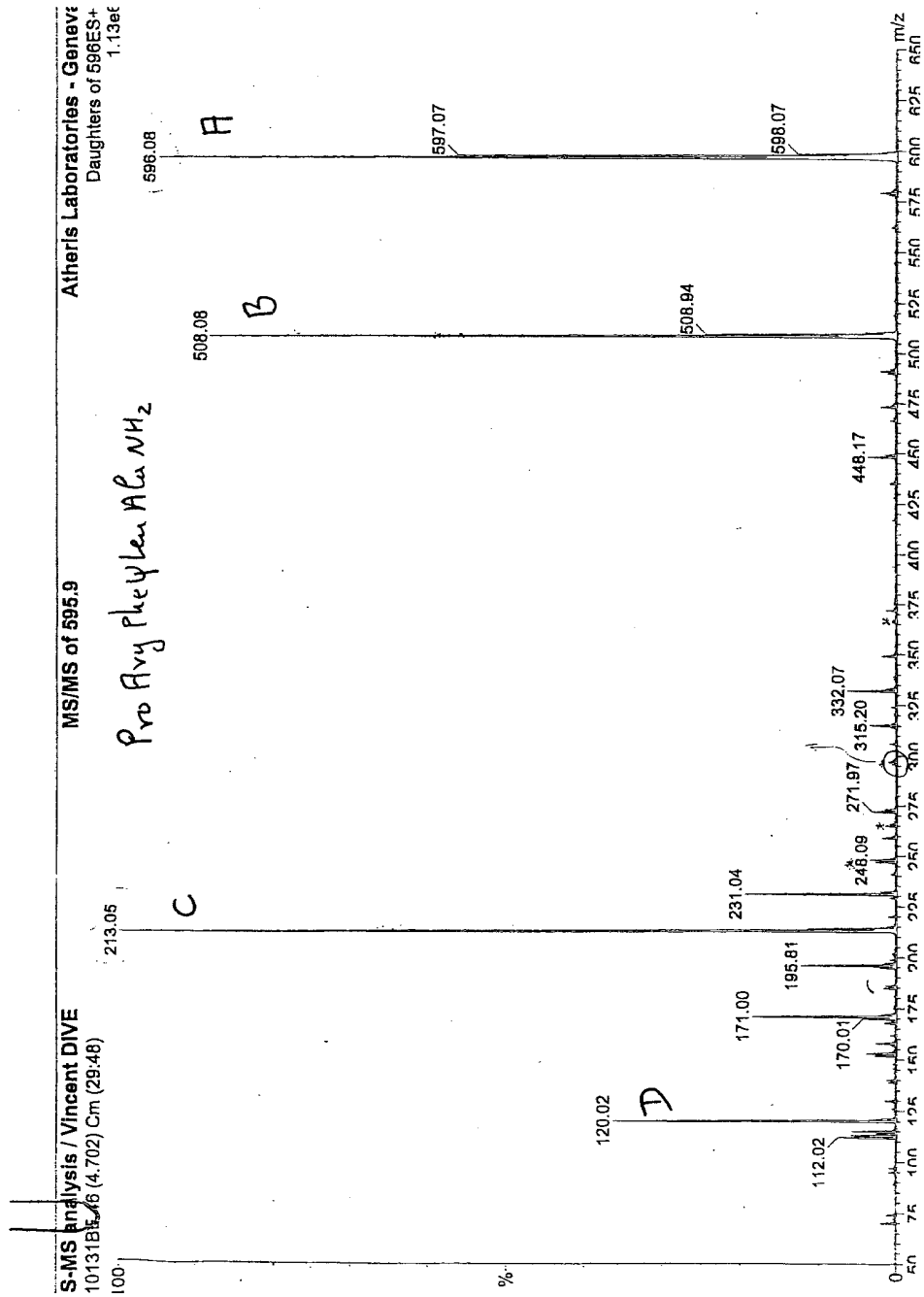


FIGURE 10

11/25

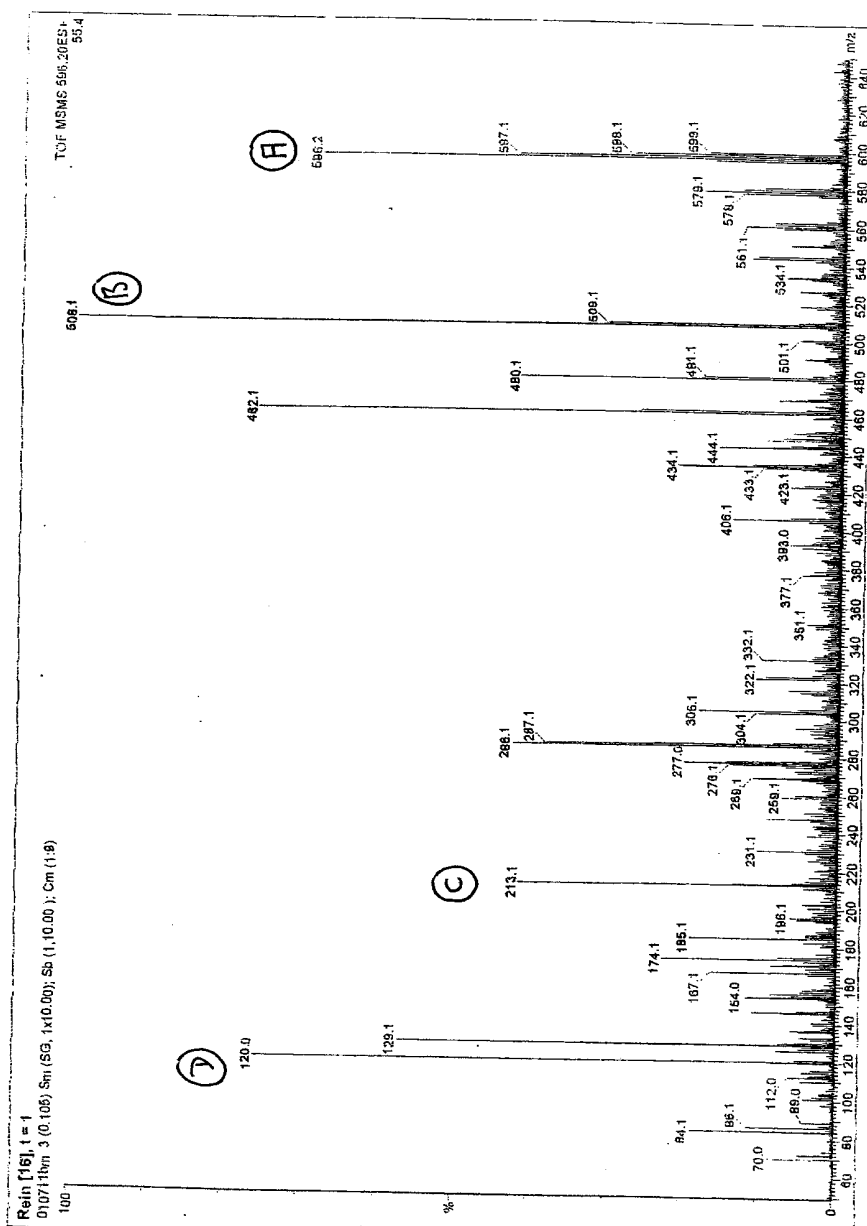


FIGURE 11

12/25

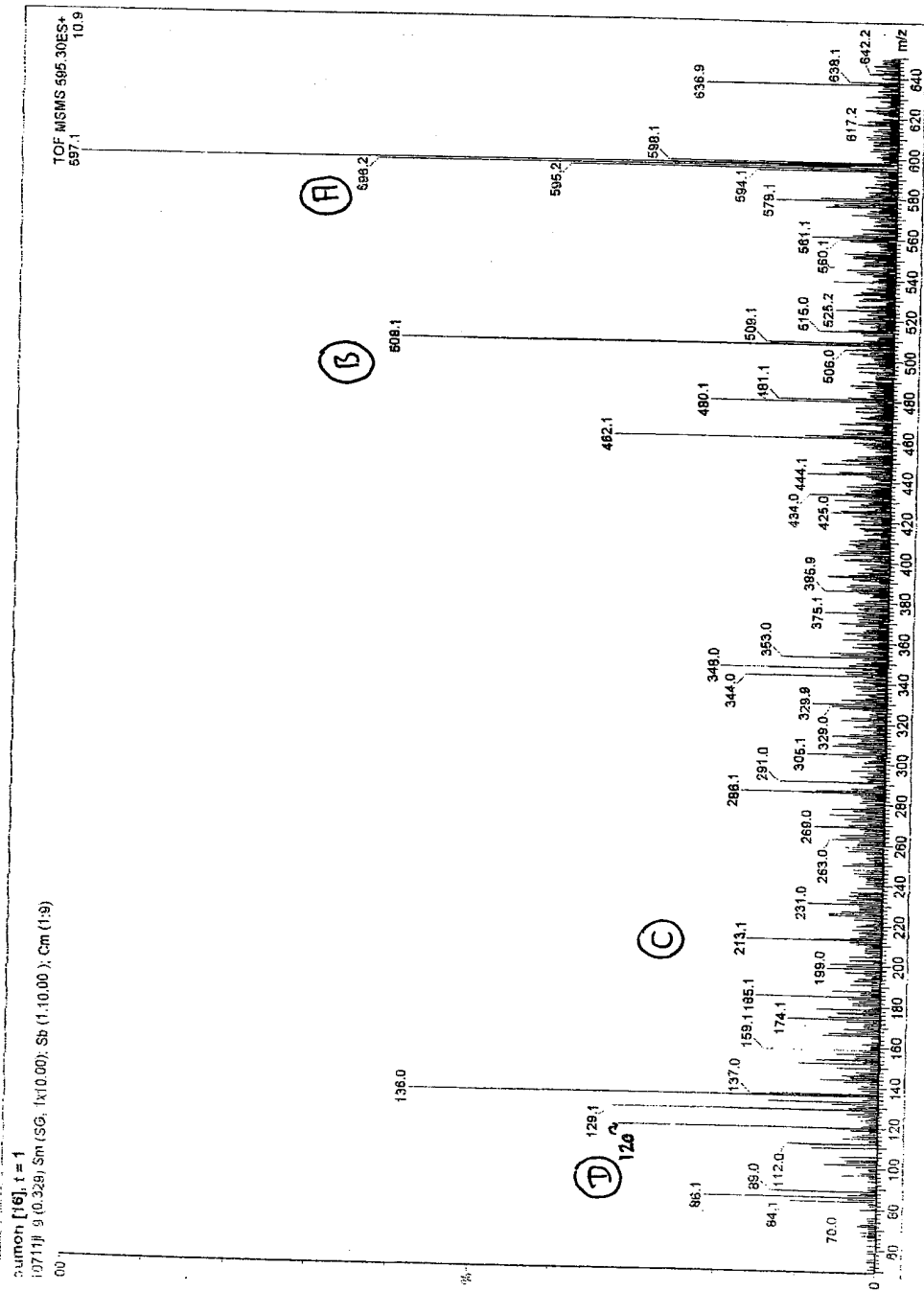


FIGURE 12

13/25

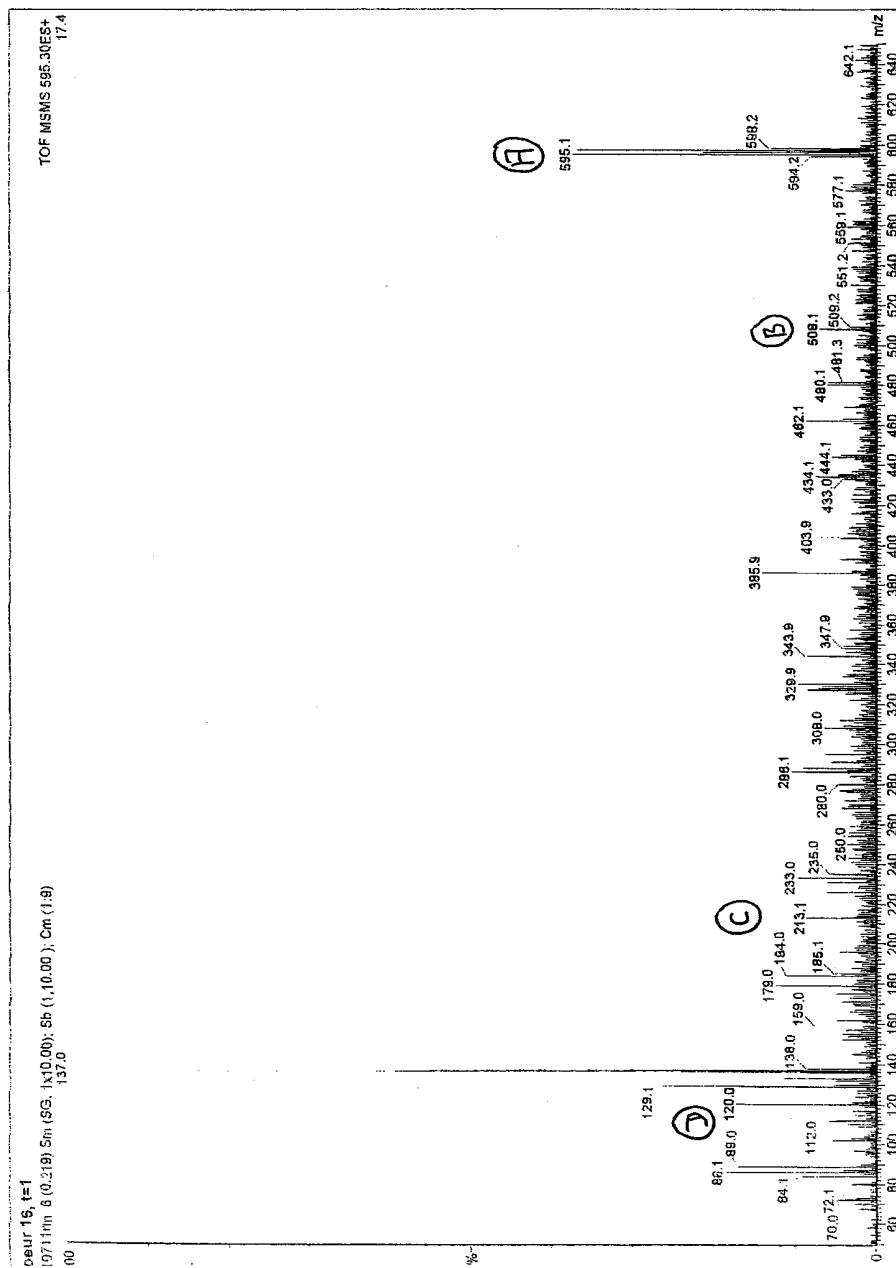


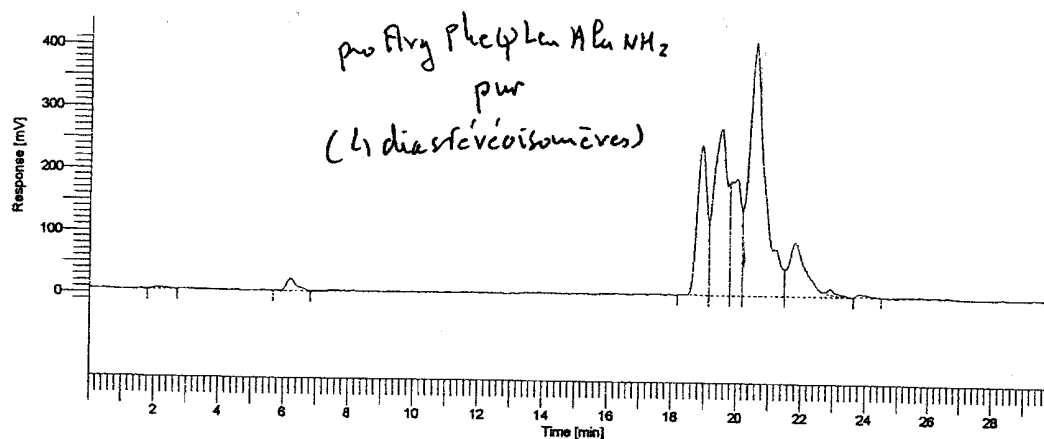
FIGURE 13

14/25

Software Version : 6.2.0.0.0:B27 *Pr Arg*  
 Sample Name : ~~Arginine~~ injecté  
 Instrument Name : nci900  
 Rack/Vial : 0/0  
 Sample Amount : 1.000000  
 Cycle : 2

Date : 1/29/02 2:17:37 PM  
 Data Acquisition Time : 1/29/02 1:10:27 PM  
 Channel : A  
 Operator : cea  
 Dilution Factor : 1.000000

Result File : D:\resultats\argb026.rst  
 Sequence File : D:\sequences\PrArg\_cinetique\_radio.seq



## Radio

Peak #	Temps [min]	Composé	Surface [uV*sec]	Area [%]	Hauteur [uV]
1	2.181		69973.00	0.20	2346.11
2	6.208		422254.03	1.19	20522.71
3	18.895		4942110.20	13.98	240842.65
4	19.460		7949066.10	22.48	263842.35
5	19.975		4494517.82	12.71	187093.54
6	20.670		13881764.45	39.26	321391.90
7	21.931		3298387.13	9.33	71643.55
8	22.889		199863.26	0.57	10354.37
9	23.806		101979.62	0.29	4715.00
			35359915.61	100.00	1.12e+06

Missing Component Report  
 Component Expected Retention (Calibration File)

All components were found

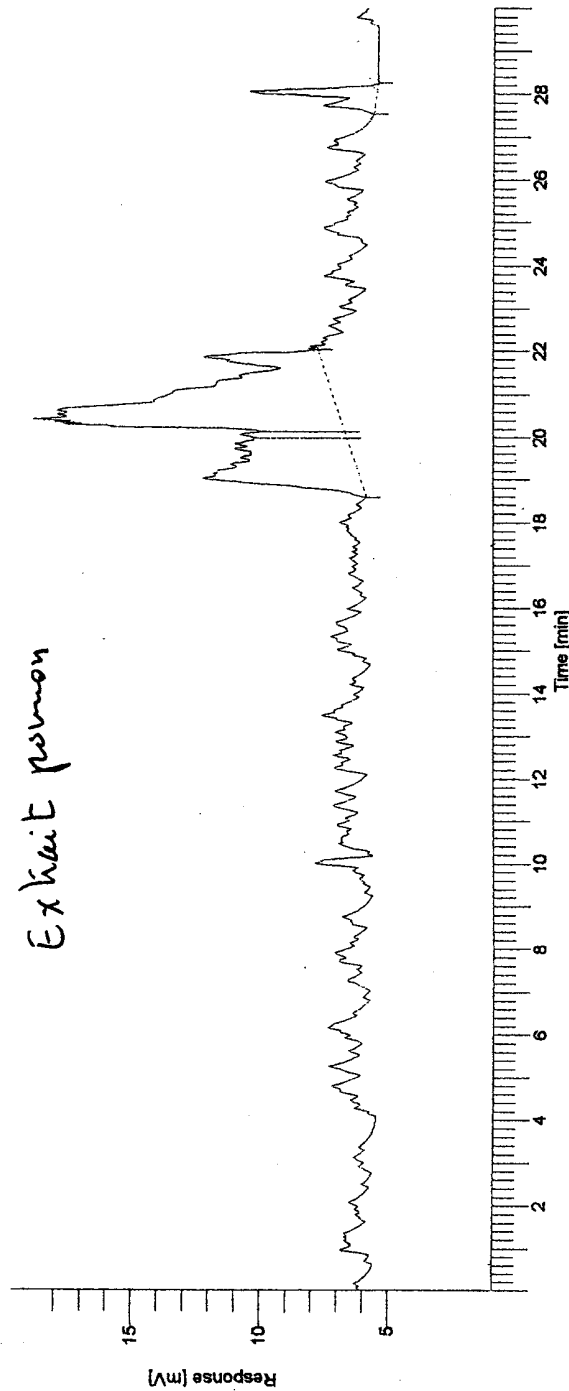
FIGURE 14



15/25

Software Version : 6.2.0.0.B27  
 Sample Name : poumon P16  
 Instrument Name : nci900  
 Rack/Vial : 0/0  
 Sample Amount : 1.000000  
 Cycle : 2  
 Date : 2/14/02 1:57:27 PM  
 Data Acquisition Time : 1/28/02 1:11:49 PM  
 Channel : A  
 Operator : cea  
 Dilution Factor : 1.000000

Result File : D:\resultats\argb006.rst  
 Sequence File : D:\sequences\PrArg\_organes\_radio.seq



## Radio

Peak #	Temps [min]	Composé	Surface [μV*sec]	Area [%]	Hauteur [μV]
1	19.347		327898.96	30.48	4837.84
2	20.364		670964.31	62.37	11131.38
3	28.004		76931.42	7.15	4655.50
			1075794.69	100.00	20624.72

Missing Component Report  
 Component Expected Retention (Calibration File)

All components were found

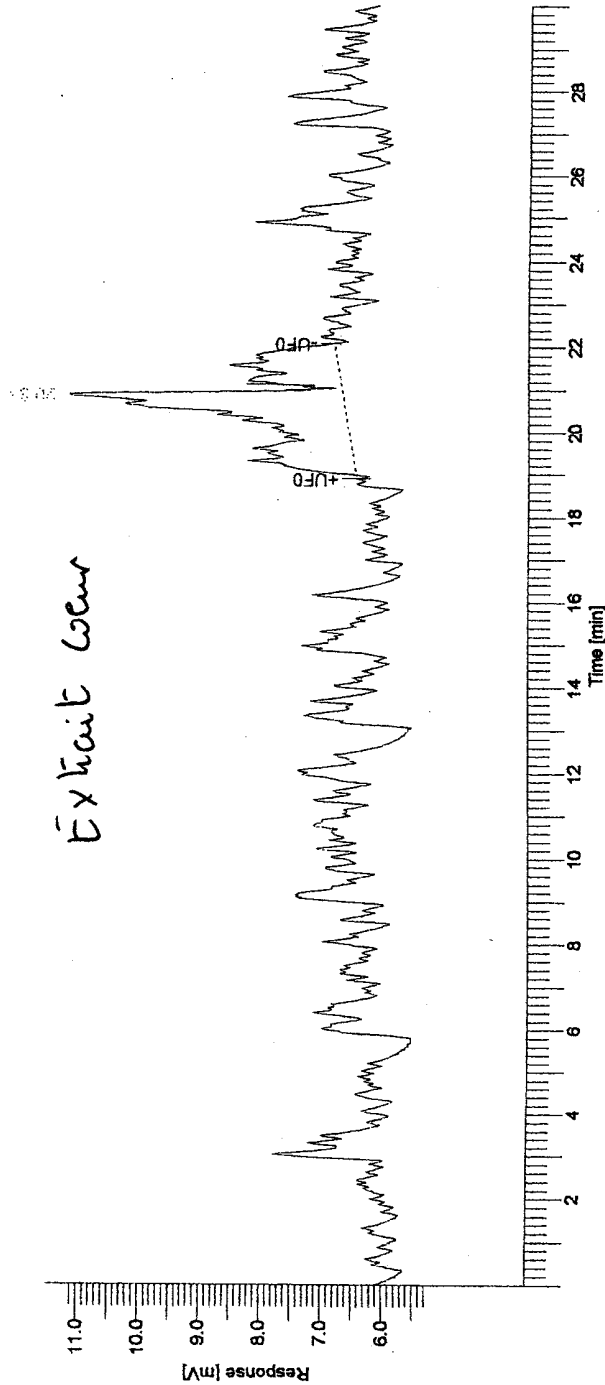
FIGURE 15

16/25

Software Version : 6.2.0.0.0.B27  
 Sample Name : coeur C17  
 Instrument Name : nci900  
 Rack/Vial : 0/0  
 Sample Amount : 1.000000  
 Cycle : 7

Date : 2/14/02 2:01:20 PM  
 Data Acquisition Time : 1/28/02 4:37:43 PM  
 Channel : A  
 Operator : cea  
 Dilution Factor : 1.000000

Result File : D:\resultats\argb011.rst  
 Sequence File : D:\sequences\PrArg\_organes\_radio.seq



## Radio

Peak #	Temps [min]	Composé	Surface [μV*sec]	Area [%]	Hauteur [μV]
1	20.859		277496.62	100.00	4461.82
			277496.62	100.00	4461.82

Missing Component Report  
 Component Expected Retention (Calibration File)

All components were found

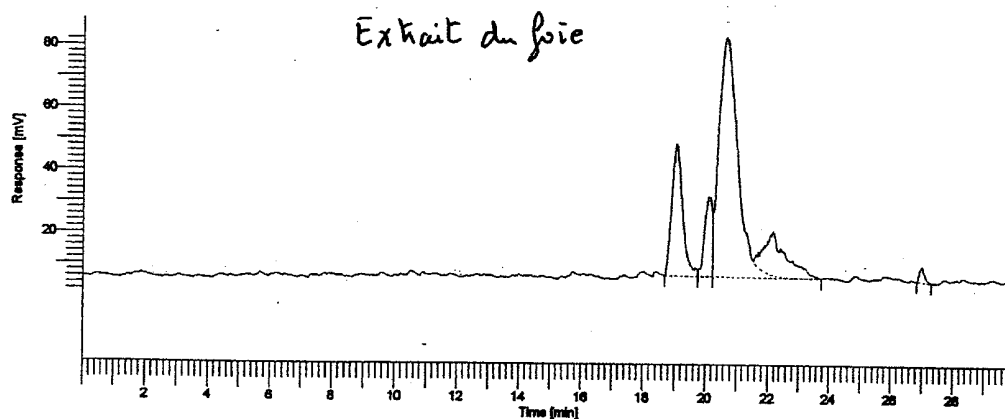
FIGURE 16

17/25

Software Version : 6.2.0.0.0-B27  
Sample Name : foie F16  
Instrument Name : nc900  
Rack/Vial : 0/0  
Sample Amount : 1.000000  
Cycle : 15

Date : 1/29/02 11:27:21 AM  
Data Acquisition Time : 1/28/02 10:07:07 PM  
Channel : A  
Operator : csa  
Dilution Factor : 1.000000

Result File : D:\resultats\argh019.rst  
Sequence File : D:\sequences\PrArg\_organes\_radio.seq



## Radio

Peak #	Temps [min]	Composé	Surface [mV*sec]	Area [%]	Hauteur [mV]
1	19.021		997769.59	18.26	42462.91
2	20.084		461967.48	8.44	25610.94
3	20.825		3219996.30	58.83	76393.89
4	22.308		732396.41	13.40	8268.91
5	27.018		96232.67	1.07	4647.20
			5468634.46	100.00	157373.86

Missing Component Report  
Component Expected Retention (Calibration File)

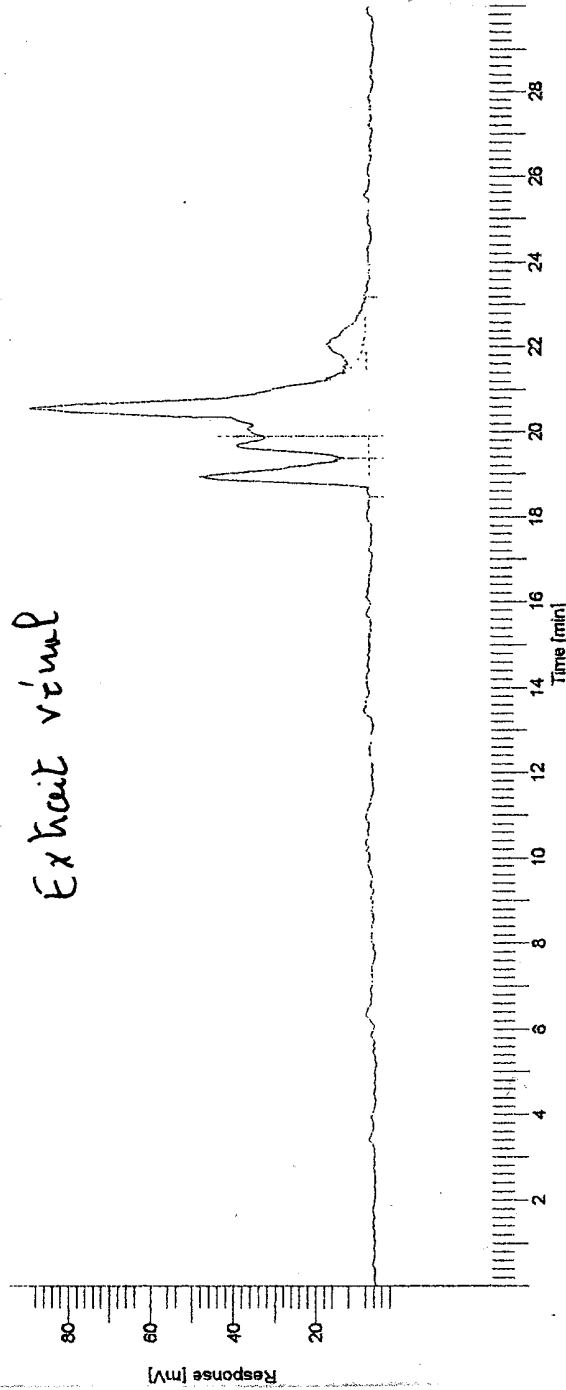
All components were found

FIGURE 17

18/25

Software Version : 6.2.0.0.B27  
Sample Name : rein R16  
Instrument Name : nci900  
Rack/Vial : 0/0  
Sample Amount : 1.000000  
Cycle : 9  
Date : 1/28/02 6:50:08 PM  
Data Acquisition Time : 1/28/02 6:00:06 PM  
Channel : A  
Operator : cea  
Dilution Factor : 1.000000

Result File : D:\resultats\argb013.rst  
Sequence File : D:\sequences\PrArg\_organes\_radio.seq



## Radio

Peak #	Temps [min]	Composé	Surface [uV*sec]	Area [%]	Hauteur [uV]
1	18.996		892155.42	17.05	36375.99
2	19.651		712153.13	13.61	31906.88
3	20.570		3222670.24	61.59	81876.53
4	22.132		405114.62	7.74	8061.85
			5232093.41	100.00	158221.25

Missing Component Report  
Component Expected Retention (Calibration File)

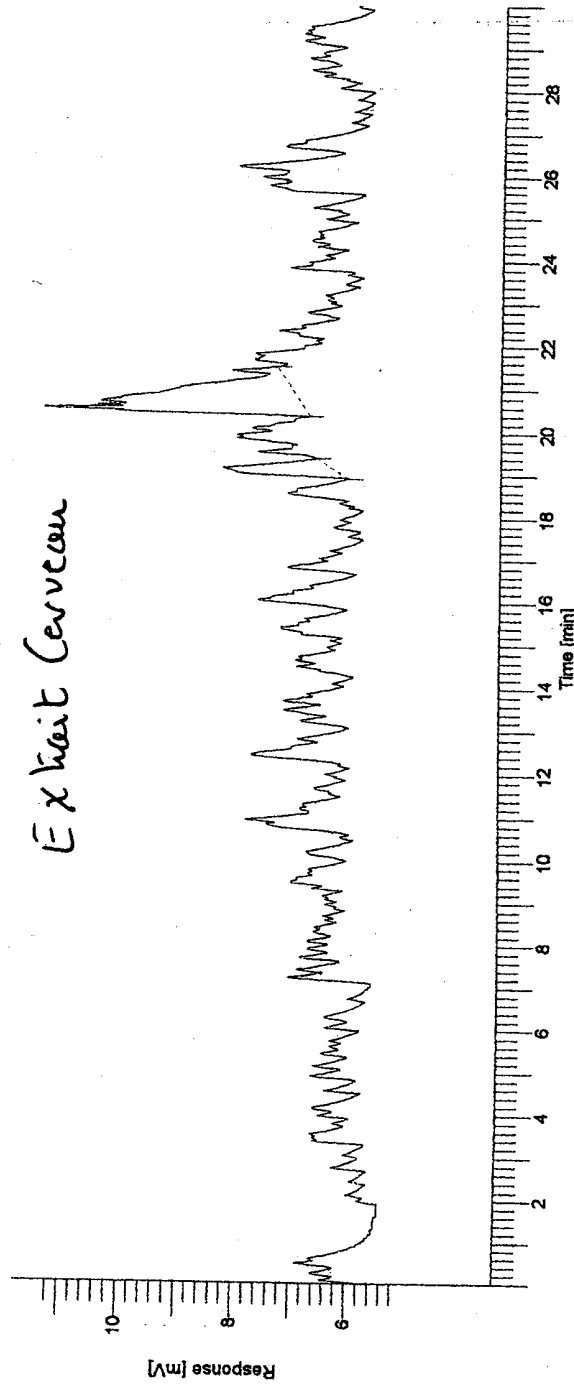
All components were found

FIGURE 18

19/25

Software Version : 6.2.0.0.827  
 Sample Name : cerveau Cs17  
 Instrument Name : nci900  
 Rack/Vial : 0/0  
 Sample Amount : 1.000000  
 Cycle : 14  
 Date : 1/29/02 11:26:58 AM  
 Data Acquisition Time : 1/28/02 9:25:55 PM  
 Channel : A  
 Operator : cea  
 Dilution Factor : 1.000000

Result File : D:\resultats\argb018.rst  
 Sequence File : D:\sequences\PrArg\_organes\_radio.seq



## Radio

Peak #	Temps [min]	Composé	Surface [uV*sec]	Area [%]	Hauteur [uV]
1	19.141		32004.47	19.66	1893.62
2	20.791		130803.01	80.34	3064.03
			162807.48	100.00	4957.86

Missing Component Report  
 Component Expected Retention (Calibration File)

All components were found

FIGURE 19

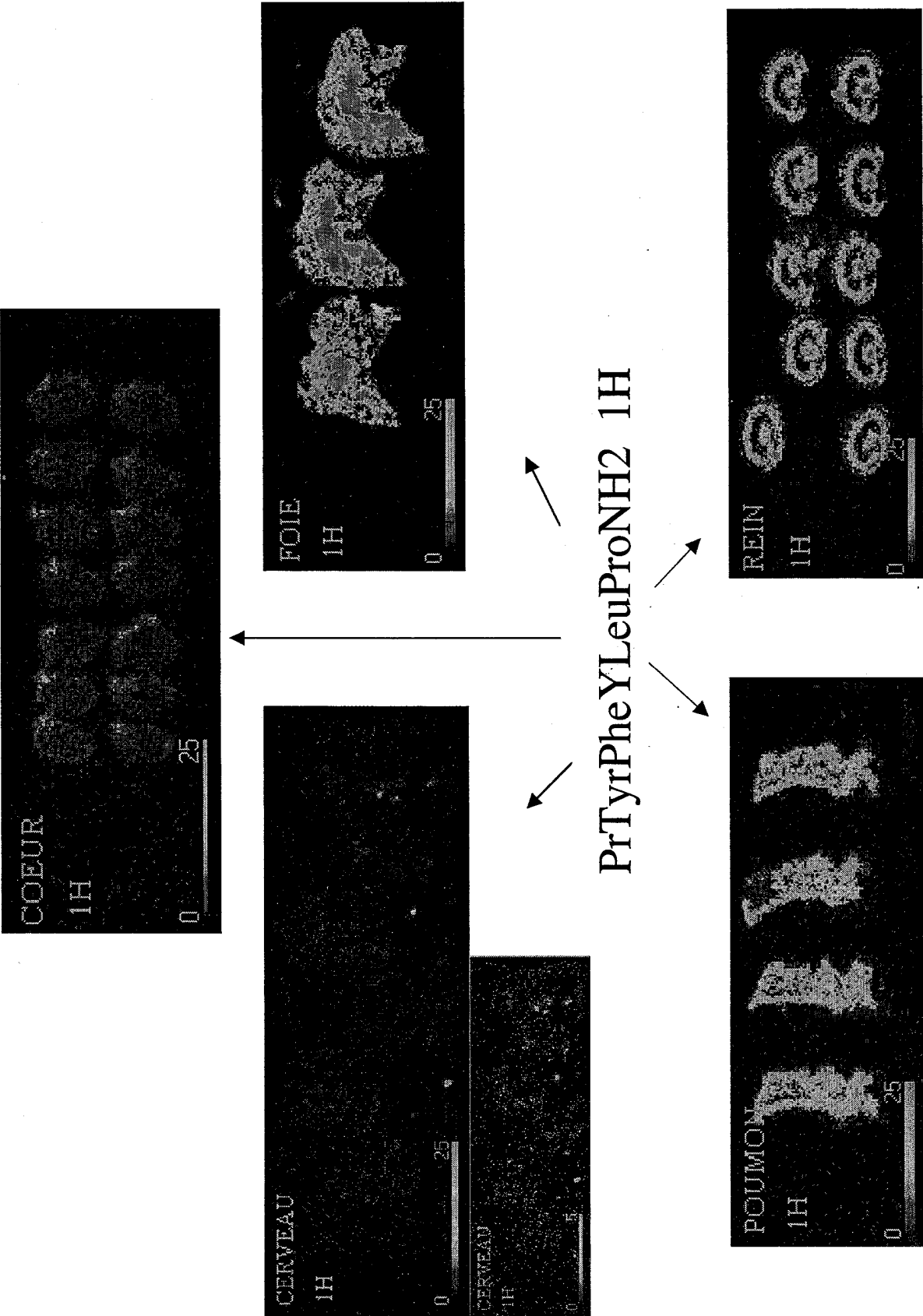
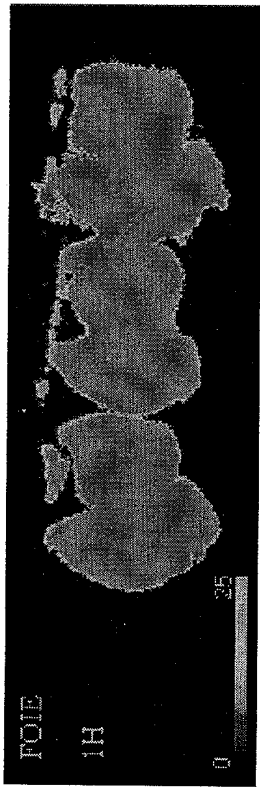
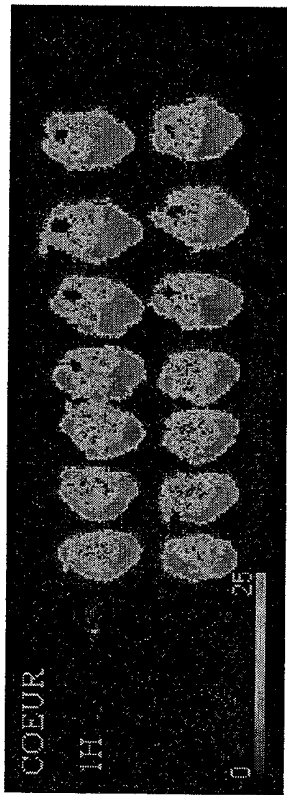


FIGURE 20



PrArgPheYLeuAlaNH<sub>2</sub> 1H

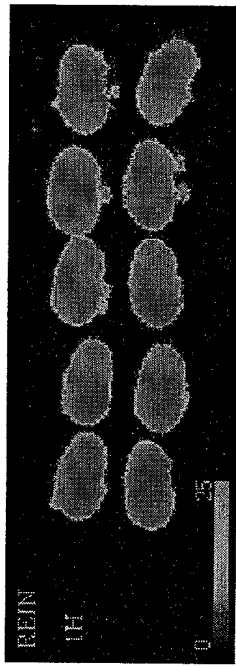
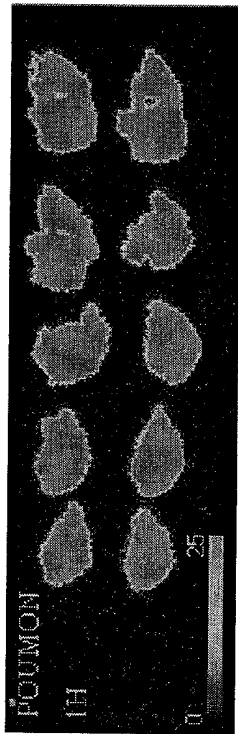


FIGURE 21

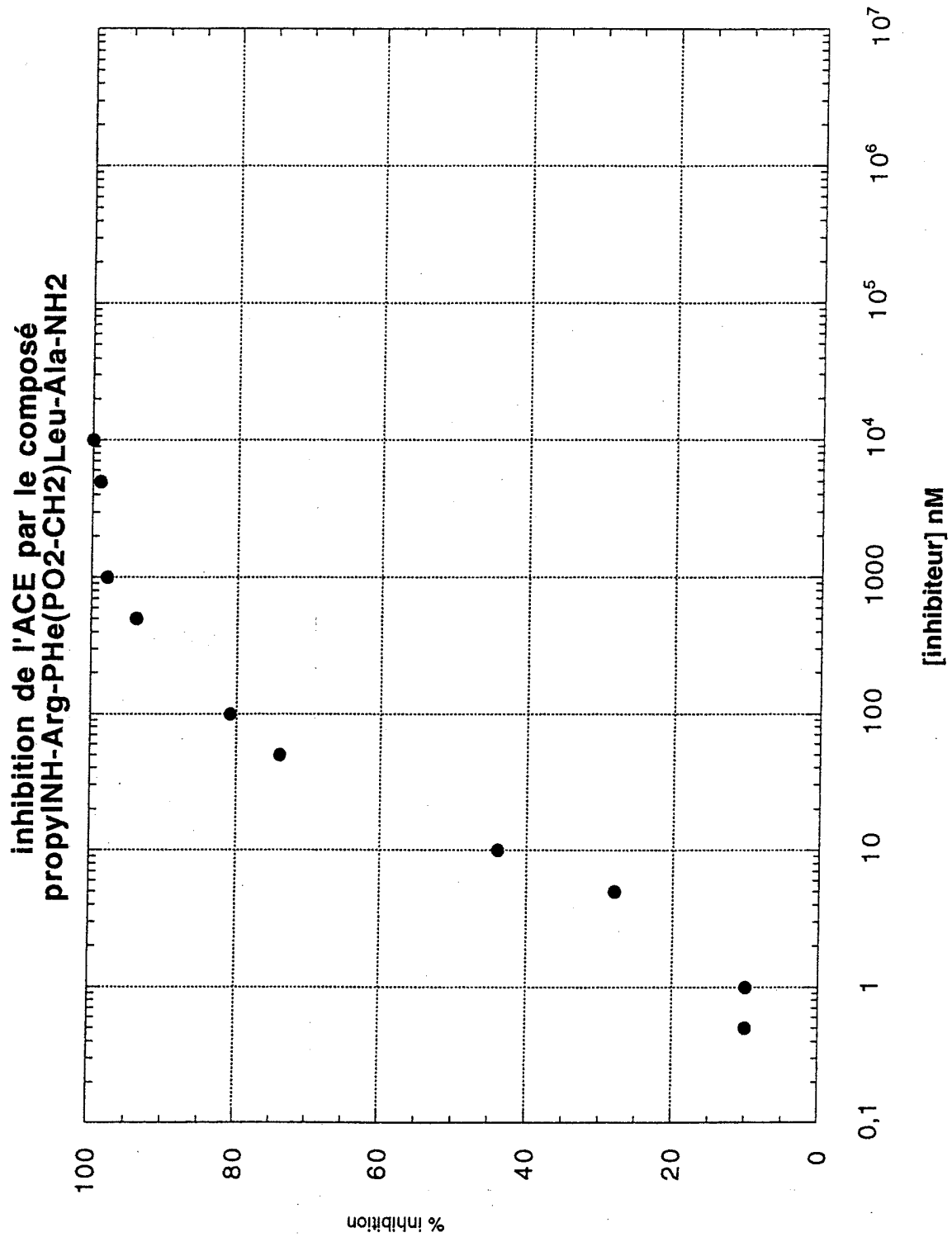


FIGURE 22



23/25

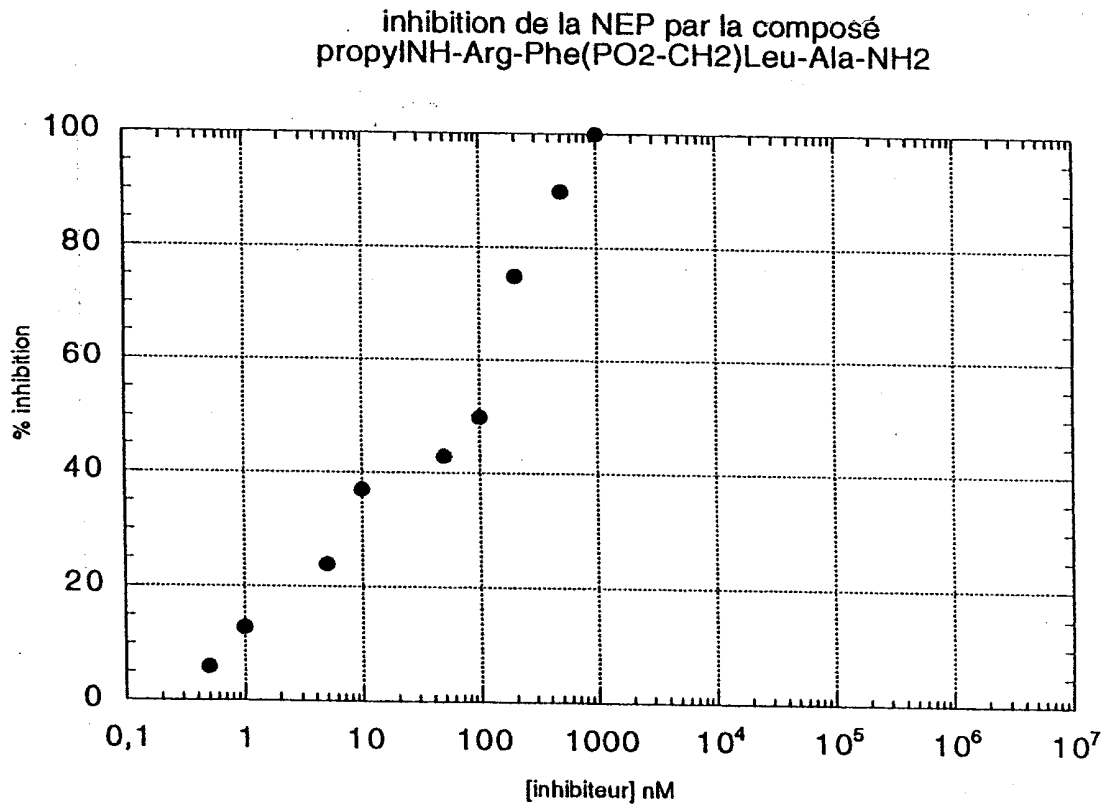
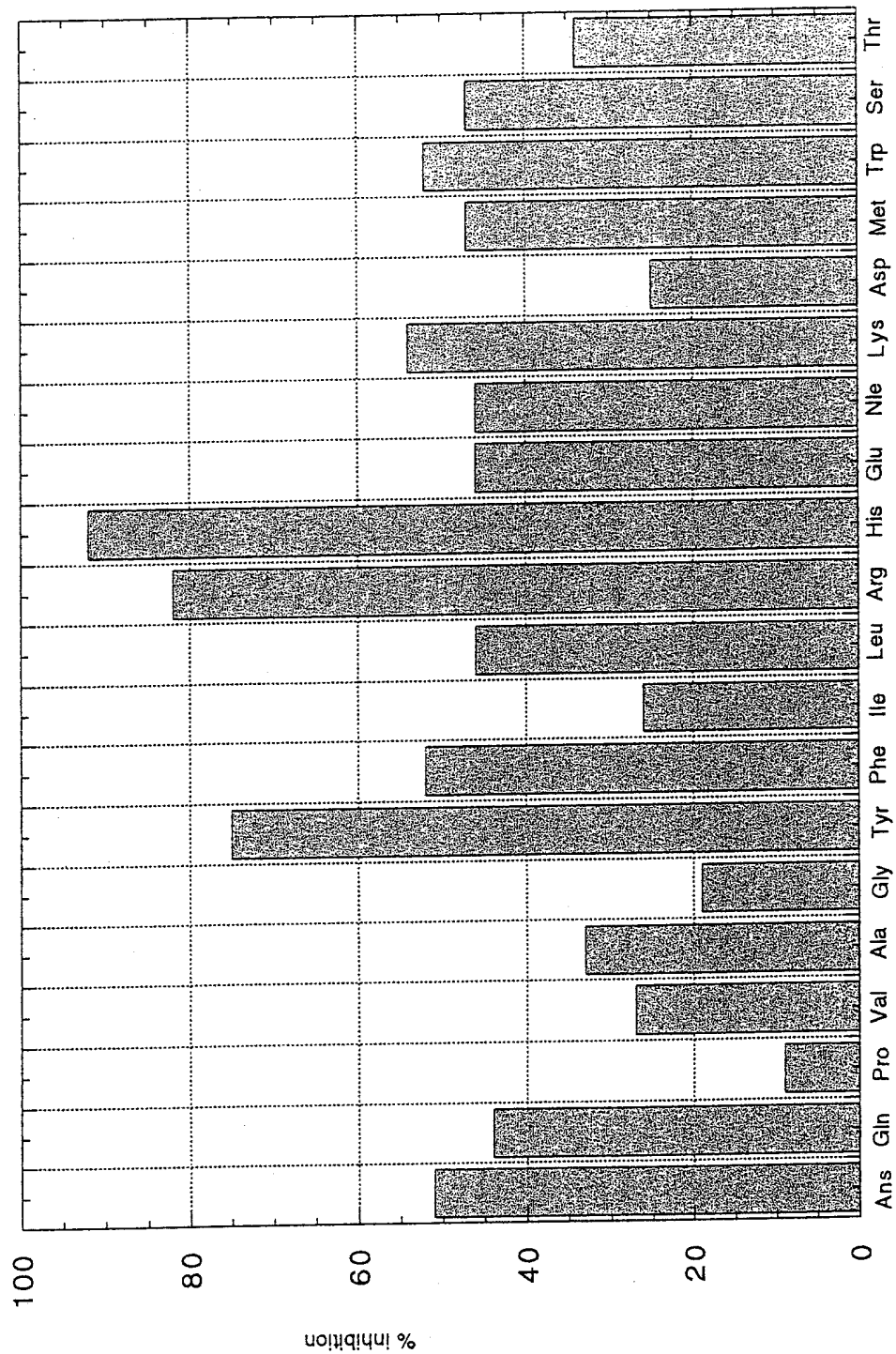


FIGURE 23

Inhibition de l'ACE par les sous banques de formule générale  
propyl-NHAAA-Phe(PO2-CH2)Leu-Yaa-NH2, concentration de chaque banque 500 nM



Aaa

FIGURE 24

inhibition de la NEP par les sous banques de formule générale  
propyl-NH<sub>2</sub>Aaa-Phe(PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)Leu-Yaa-NH<sub>2</sub>,  
concentration de chaque banque 250 nM

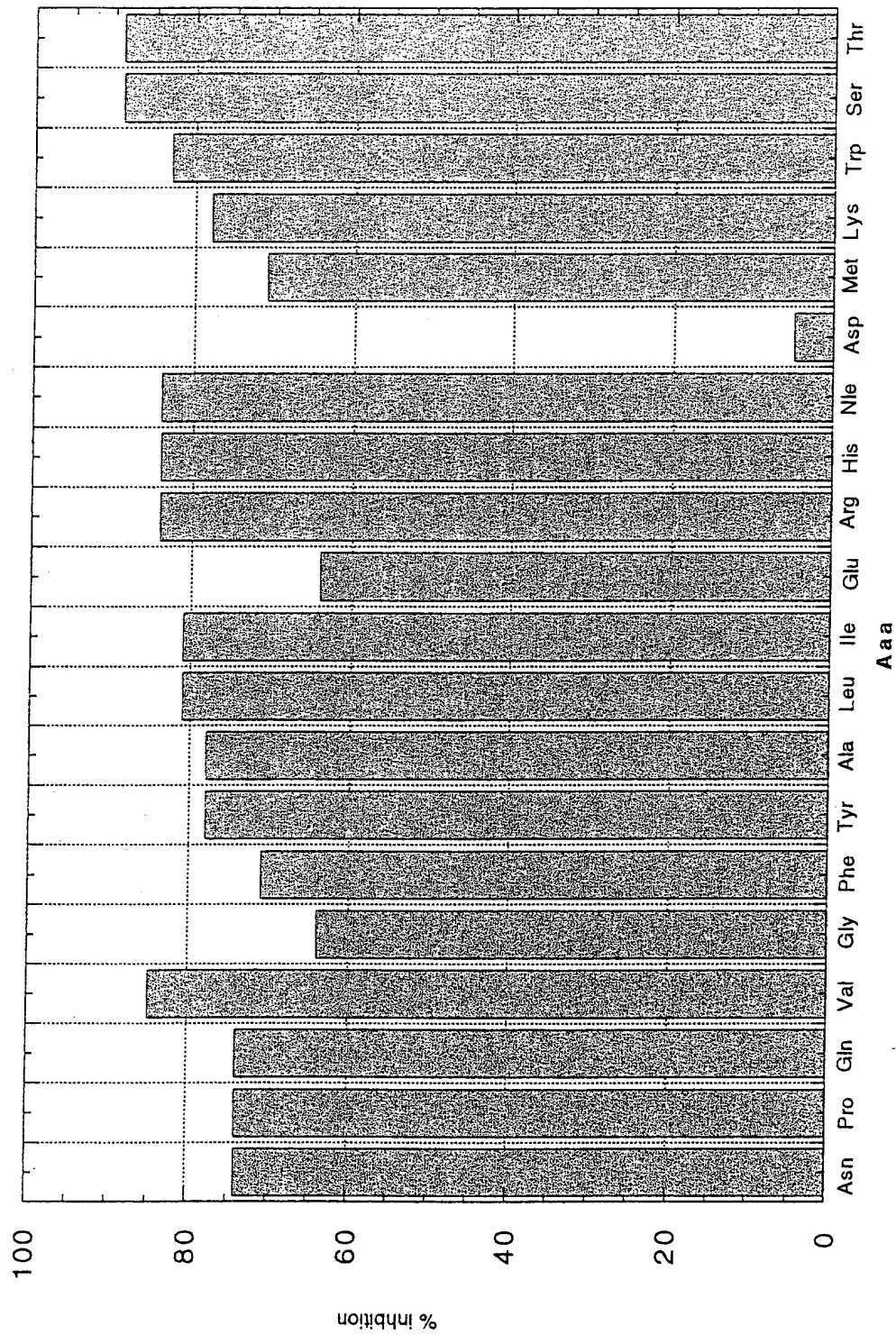


FIGURE 25

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	DIVE V ET AL: "Phosphinic peptide inhibitors as tools in the study of the function of zinc metallopeptidases." BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, vol. 28, no. 4, 2000, pages 455-460, XP002242579 ISSN: 0300-5127 * page 459 *	1,2,5-15	G01N33/567 G01N33/60
X	US 6 306 365 B1 (PASQUALINI RENATA ET AL) 23 octobre 2001 (2001-10-23) * colonne 5, ligne 64,65 *	1,2,5-15	
Y	* colonne 12, alinéa 5; revendication 2 * * colonne 12, alinéa 5; revendication 2 * * colonne 5, ligne 64,65 *	1,2,5-15	
X	WO 01 20331 A (CHERNOV ROGAN TANIA ;GALLOP MARK (US); CUNDY KENNETH C (US); DOWER) 22 mars 2001 (2001-03-22) * revendications 59,64,107 *	1,2,5-15	
Y	* revendications 59,64,107 *	1,2,5-15	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
Y,D	WO 99 56789 A (COCKBAIN JULIAN ;DUGSTAD HARALD (NO); KLAVENESS JO (NO); NYCOMED I) 11 novembre 1999 (1999-11-11) * revendications 1-4,20 *	1,2,5-15	G01N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
27 mai 2003		Cuendet, P	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES			
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

**RECHERCHE INCOMPLÈTE  
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE C**

Numéro de la demande

FA 626227  
FR 0206698

Certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche ou ont fait l'objet d'une recherche incomplète, à savoir:

Revendications n'ayant pas fait  
l'objet de recherches:  
3,4

Raison:

Les revendications 3 et 4 présentes ont trait à une utilisation d'un produit en faisant référence à une caractéristique souhaitable, à savoir: "la mise en contact de la ou des biomolécules caractérisées". Ces revendications couvrent l'utilisation de toutes les "biomolécules", alors que la demande ne fournit un fondement au sens de l'Article L.612-6 CPI et/ou un exposé au sens de l'Article L.612-5 CPI que pour un nombre très limité de tels produits. Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d'exposé à un point tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par ces revendications est impossible. Indépendamment des raisons évoquées ci-dessus, les revendications manquent aussi de clarté. En effet, on a cherché à définir le produit ("biomolécules") au moyen du résultat à atteindre. Ce manque de clarté est, dans le cas présent, de nouveau tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. En conséquence, la recherche n'a pas pu être effectuée que pour les revendications 3 et 4.

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0206698 FA 626227**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **27-05-2003**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 6306365 B1	23-10-2001	US 6068829 A	30-05-2000
		US 5622699 A	22-04-1997
		US 6296832 B1	02-10-2001
		AT 195181 T	15-08-2000
		AU 6374098 A	18-06-1998
		AU 693723 B2	02-07-1998
		AU 6973996 A	01-04-1997
		CA 2204535 A1	20-03-1997
		DE 69609585 D1	07-09-2000
		DE 69609585 T2	05-04-2001
		DE 773441 T1	04-03-1999
		EP 0773441 A1	14-05-1997
		EP 0876611 A1	11-11-1998
		EP 0987275 A2	22-03-2000
		JP 10502674 T	10-03-1998
		WO 9710507 A1	20-03-1997
WO 0120331 A	22-03-2001	AU 7703400 A	17-04-2001
		EP 1212619 A1	12-06-2002
		WO 0120331 A1	22-03-2001
WO 9956789 A	11-11-1999	AU 3837899 A	23-11-1999
		WO 9956789 A1	11-11-1999