

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 28.10.91.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la demande : 30.04.93 Bulletin 93/17.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE Etablissement public — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : *Cohen Paul, De Morais Carvalho Krishnamurti, Joudiou Carine, Boussetta Hamadi et Leseney Anne-Marie.*

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : *Gutmann Ernest - Plasseraud Yves S.A.*

⑤4 **Nouvelle endopeptidase, son activité de clivage et d'inactivation de substrats peptidiques.**

⑤7 L'invention concerne une enzyme de type endopeptidase caractérisée par:

- sa capacité à cliver dans des conditions déterminées la liaison peptidique de doublets d'acides aminés de type Xaa-Phe, Xaa-Ile, Xaa-Leu, dans lesquels Xaa est un acide aminé, de préférence choisi parmi Ser, Phe, Tyr, His, Gly, Ala, lorsque ce doublet est présent à l'intérieur d'un substrat peptidique dont la séquence comprend plus de 5 acides aminés,

- sa sensibilité aux agents chélateurs de cations divalents, tels que l'EDTA, l'EGTA, la o-phenantroline ou le DTT à des concentrations de l'ordre de 1 mM,

- son insensibilité relative aux inhibiteurs de l'endopeptidase neutre (NEP) ou de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) par exemple au phosphoramidon ou au captopril, jusqu'à des concentrations cent à mille fois supérieures aux concentrations de ces inhibiteurs efficaces sur la NEP et/ou sur l'ACE.

FR 2 682 955 - A1



Nouvelle endopeptidase. Son activité de clivage et d'inactivation de substrats peptidiques.

L'invention concerne une nouvelle endopeptidase et son activité de clivage de substrats peptidiques et, le cas échéant, l'inactivation de ces substrats.

Différentes peptidases impliquées (encore appelées protéases) dans l'inactivation notamment, post-sécrétoire, de messagers peptidiques hormonaux ont déjà été isolées et caractérisées. En particulier on connaît une enzyme appelée endopeptidase neutre (abréviation NEP, également appelée enképhalinase et désignée sous la référence EC3.4.24.11) capable de dégrader l'enképhaline, ainsi qu'une enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE, référence EC3.4.15.1) qui convertit l'angiotensine I en angiotensine II. Les références EC3.4.24.11 et EC3.4.15.1 sont celles adoptées par la Commission de Nomenclature de l'I.U.B. (Union Internationale de Biochimie). Ces peptidases agissent par clivage de liaisons peptidiques au sein de substrats déterminés, avec une sélectivité étroite tant au niveau du (ou des) substrats clivés, qu'au niveau des liaisons peptidiques clivées. Elles agissent parfois par clivage de sites multiples au sein d'un même substrat peptidique.

Les auteurs qui se sont intéressés aux enzymes du type enképhalinase (NEP) ou à l'enzyme de conversion de l'angiotensine, ont étudié les sites de clivage de ces enzymes tant au niveau du ou des substrats clivés, qu'au niveau des liaisons peptiques ainsi que leur spécificité vis à vis de leurs substrats, leur comportement vis à vis de différentes substances chimiques; ils ont en particulier recherché les substances inhibitrices de l'activité de ces enzymes.

Ainsi Johnson et al (Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 167 (1), 1990, pages 110-116) ont décrit la caractérisation partielle d'une activité protéolytique dans une culture de cellules bovines de l'endothelium aortique : cette activité se manifeste selon eux par le clivage d'une liaison Ser¹²³-Phe¹²⁴ du Facteur Atrial Natriurétique humain (hANF, abréviation anglaise de Atrial Natriuretic Factor), ce clivage entraînant la formation d'un tripeptide COOH-terminal. Les auteurs de cette publication ont indiqué que la masse moléculaire de l'enzyme susceptible de présenter cette activité protéolytique était de 200000 daltons.

Johnson et al, dans l'article précité, ont conclu qu'il est important de noter que les résultats rapportés dans leur article font intervenir une activité endopeptidase et non une enzyme homogène purifiée. Ils mentionnent qu'il serait nécessaire de purifier une peptidase pour relier ces résultats à une spécificité de substrats ainsi qu'à une structure. Ils établissent également qu'il n'est pas possible en l'état actuel de leurs connaissances de déterminer si l'activité enzymatique mise en évidence résulte de l'action d'une nouvelle enzyme ou d'une enzyme déjà caractérisée.

D'autres auteurs, Bourne et al (Biochem. J., 1990, Vol. 271: 381-385) ont décrit des résultats obtenus par action de l'endopeptidase 24.11 (désignée ci-dessus par les termes enképhalinase ou NEP) sur le peptide atrial natriurétique humain (α -hANP). Les enzymes utilisées (l'endopeptidase 24.11 et la peptidyl-dipeptidase-A) ont été préparées à partir de membranes du rein de porc, plus précisément à partir des membranes des micro-villosités rénales et des membranes du plexus

choroïde. Les auteurs ont montré que ces enzymes porcines hydrolysent différentes liaisons peptidiques sur l' α -hANP ainsi que sur le BNP (Brain Natriuretic peptide). Le BNP est un peptide présent chez le porc et qui a des actions pharmacologiques similaires à celles de l' α -hANP. Bourne et al ont décrit le fait que les préparations membranaires permettent d'obtenir une hydrolyse de la liaison Ser²⁵-Phe²⁶ de l' α -hANP qui libère un fragment COOH-terminal Phe-Arg-Tyr. Ils notent également dans leur article que l'endopeptidase 24.11 agit en même temps que d'autres endopeptidases qui sont selon eux des métalloendopeptidases et des cystéines endopeptidases. L'observation des produits d'hydrolyse de l' α -hANP a montré la présence de plusieurs pics en chromatographie HPLC, dont certains étaient transitoires. Ces pics qui représentent les produits d'hydrolyse sont plus ou moins atténués en présence de substances telles que le phosphoramidon, l'amastatine et le captopril. L'un des pics obtenus par HPLC correspond à un fragment COOH-terminal Phe-Arg-Tyr et ce pic disparaît en présence de phosphoramidon à une concentration de 1 μ M. Les auteurs ont remarqué que les membranes utilisées pouvaient avoir une action de métalloendopeptidase insensible au phosphoramidon mais que l'identité de la ou des enzymes responsables n'était pas claire. Ils établissent encore que l'obtention du tripeptide COOH-terminal Phe-Arg-Tyr serait selon eux due à l'activité de l'endopeptidase 24.11, alors que d'autres auteurs (Deschodt et al, 1988 Neurochem. Int. Vol. 12:367-373) auraient attribué cette activité à une peptidase insensible au phosphoramidon. D'après eux les préparations membranaires pourraient être à l'origine de ces interprétations contradictoires. Deschodt et al n'ont

d'ailleurs relié l'activité enzymatique trouvée qu'à la présence d'un mélange.

On voit donc que les différents résultats obtenus dans l'état antérieur de la technique sur l'existence d'activités endopeptidase nouvelles par rapport notamment à l'activité de la NEP sur différents substrats n'ont pas suffi à caractériser une ou plusieurs enzymes se distinguant de la NEP ou de l'ACE par exemple.

A partir de travaux effectués chez le xénope (Xenopus laevis) les inventeurs de la présente demande ont été en mesure de purifier, d'isoler et de caractériser une famille d'enzymes de type endopeptidase, présente chez le xénope mais également chez des mammifères et en particulier chez l'homme, et de déterminer ses propriétés physicochimiques et fonctionnelles, en particulier sa spécificité de substrat.

L'enzyme de l'invention est une enzyme de type endopeptidase caractérisée par :

- sa capacité à cliver dans des conditions déterminées la liaison peptidique de doublets d'acides aminés de type Xaa-Phe, Xaa-Ile, Xaa-Leu, dans lesquels Xaa est un acide aminé, de préférence choisi parmi Ser, Phe, Tyr, His, Gly, ou Ala, lorsque ce doublet est présent à l'intérieur d'un substrat peptidique dont la séquence comprend plus de 5 acides aminés,
- sa sensibilité aux agents chélateurs de cations divalents, tels que l'EDTA, l'EGTA, l'o-phenantroline ou le DTT à des concentrations de l'ordre de 1 mM,
- son insensibilité relative aux inhibiteurs de l'endopeptidase neutre (NEP) ou de l'enzyme de

conversion de l'angiotensine (ACE) par exemple au phosphoramidon ou au captopril, jusqu'à des concentrations cent à mille fois supérieures aux concentrations de ces inhibiteurs efficaces sur la NEP et/ou sur l'ACE.

Une séquence de plus de 5 acides aminés répondant à la définition précédente susceptible d'être clivée par l'endopeptidase de l'invention est notamment présente dans la partie carboxy-terminale d'hormones telles que l'ANF ou d'hormones de la famille des tachykinines, des kinines, de la bombésine, ou de l'angiotensine.

Les conditions du clivage des doublets d'acides aminés ont été déterminées pour différents substrats dans les exemples proposés dans les pages suivantes. D'une façon générale ces conditions pour déterminer la capacité de clivage d'une enzyme selon l'invention, sont les suivantes : 2 nmoles d'ANF (5-28) sont incubées à pH 7,4 ou 7,5 pendant 2 heures en présence d'une quantité de protéine enzymatique équivalente à 0,1/mole de l'enzyme pure (volume final de 20 μ l). A la fin de l'incubation, on injecte l'ensemble de l'échantillon (20 μ l) sur une colonne d'HPLC (C₁₈). Les fragments d'ANF (5-25) et (26-28) sont identifiés par leur temps de rétention par rapport aux standards et par leur composition en acides aminés.

L'invention concerne également tout fragment de l'enzyme définie ci-dessus, en particulier tout fragment de cette enzyme vérifiant les propriétés énoncées ci-dessus, contenant notamment le site actif de l'enzyme. Dans la suite du texte, les termes "enzyme" et "endopeptidase" s'appliqueront à la fois à l'enzyme et à ses fragments.

Les doublets d'acides aminés susceptibles d'être clivés par l'enzyme de l'invention ont été donnés ci-dessus à titre d'exemple. D'autres doublets peuvent être clivés par l'endopeptidase, dès lors que l'acide aminé désigné par Xaa présente une parenté structurale avec l'un des acides aminés du groupe Ser, Phe, Tyr, Lys ou Gly, au sein de la liaison avec un acide aminé choisi parmi, Phe, Ile, ou Leu. De même il est possible que l'acide aminé Phe, Ile ou Leu soit substitué par un autre acide aminé dès lors que le doublet formé, susceptible d'être clivé conserve les propriétés structurales et conformationnelles de l'un des doublets donnés ci-dessus.

On rappelle que les abréviations ci-dessus pour désigner les acides aminés correspondent aux codes à trois lettres et à une lettre suivants :

Acides aminés	Codes à trois lettres	à une lettre
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Acide Aspartique	Asp	D
Asparagine ou acide Aspartique	Asx	B
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Acide Glutamique	Glu	E
Glutamine ou acide Glutamique	Glx	Z
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K

Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

Les doublets d'acides aminés susceptibles de donner lieu à un clivage par l'action de l'endopeptidase de l'invention sont présents à l'intérieur d'un substrat peptidique, c'est à dire qu'ils ne forment ni le doublet de l'extrémité carboxy-terminale (COOH-terminale) ni le doublet de l'extrémité amino-terminale (NH₂-terminale) du substrat peptidique. De plus le clivage potentiel n'a lieu par l'action de l'enzyme de l'invention, que lorsque le substrat comporte plus de cinq acides aminés.

De façon préférée, le doublet susceptible d'être clivé est présent dans la moitié (partie) carboxy-terminale du substrat.

Selon la définition donnée précédemment, l'enzyme endopeptidase de l'invention présente une insensibilité relative aux inhibiteurs de la NEP ou de l'ACE tels que le phosphoramidon ou le captopril. On entend par insensibilité relative, le fait que l'activité de clivage de l'endopeptidase de l'invention n'est pas inhibée à plus de 50% par des concentrations de l'ordre de 1 mM ou 1 μ M de ces inhibiteurs habituellement actives sur l'activité de clivage de la NEP ou l'ACE respectivement sur l'enképhalinase et sur l'angiotensine. A titre d'exemple le phosphoramidon ou le captopril n'inhibe partiellement l'endopeptidase de l'invention qu'à des concentrations 100 à 1000 fois

supérieures à celles qui permettent d'obtenir l'inhibition de l'activité de clivage de la NEP ou de l'ACE.

L'endopeptidase de l'invention peut cliver un substrat donné au niveau de plusieurs doublets d'acides aminés ; dans ce cas, l'un des clivages effectués reste cependant majoritaire en proportion de produit de clivage obtenu. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le clivage peut être réalisé en un site unique du substrat.

Ce clivage peut également être sélectif et par conséquent ne concerner qu'un doublet d'acides aminés particulier et ce même si d'autres doublets susceptibles d'être clivés selon la définition précédente, sont présents dans le substrat.

D'autres substrats peptidiques capables d'être clivés par l'endopeptidase sont la substance P, la bradykinine, la somatostatine, les neuromédines B et C, la litorine, l'angiotensine II, ou des substrats apparentés du point de vue de leur séquence en acides aminés. L'endopeptidase de l'invention est aussi caractérisée en ce qu'elle ne clive pas la minigastrine I, l'enképhaline et son dérivé carboxamidé, l'ocytocine, la vasopressine.

Le clivage par l'enzyme peut également, en respectant les conditions précédemment données, entraîner un clivage de polypeptides ou de peptides contenus dans les substrats peptidiques décrits ci-dessus.

En particulier l'enzyme répondant aux définitions précédentes est capable de cliver par un clivage unique et sélectif la liaison Ser²⁵-Phe²⁶ de l'ANF humain et en particulier du peptide comprenant les acides aminés 1 à 28 de l'ANF (ANF(1-28)) ou du peptide comprenant les

acides aminés 5 à 28 de l'ANF (ANF(5-28)). Ce clivage est de façon avantageuse un clivage inactivant de l'ANF, abolissant ses fonctions hormonales, dans la régulation de la pression artérielle et le métabolisme hydrosodé : en particulier grâce à sa capacité à augmenter le flux des ions et de l'eau dans les tubules rénaux (diurèse et natriurèse) par intervention de récepteurs de surface dont la reconnaissance par l'ANF aboutit à un effet hypotenseur. De plus, l'ANF diminue la sécrétion de 2 hormones (l'aldostérone et la vasopressine) et de la rénine.

Par conséquent et contrairement à ce qui a pu être observé dans le cas d'enzymes telles que l'enképhalinase également active sur l'ANF, l'endopeptidase de l'invention conduit à une inactivation tout à fait contrôlable par le fait de ce clivage unique et sélectif, au niveau de l'ANF.

Entre également dans le cadre de la famille des enzymes dont la définition a été donnée précédemment, une enzyme capable de cliver la liaison Gly³³-Leu³⁴ du peptide β 1-40 de la protéine β -amyloïde.

Ce clivage peut être accompagné d'un second clivage au niveau de la liaison Lys¹⁶-Leu¹⁷ du peptide β 1-40.

La protéine β -amyloïde a par exemple été décrite dans une publication de Yankner et al (Science Vol. 250: 279-282, 12 Octobre 1990). La séquence du peptide β 1-40 est la suivante, selon le code à une lettre des acides aminés :

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV

On sait que la protéine β -amyloïde possède des effets neurotrophiques et neurotoxiques sur les neurones, en fonction du stade de maturation de ces neurones et de la concentration en protéine β -amyloïde.

Ces effets de la protéine β -amyloïde ont été associés à certaines observations relatives à la dégénérescence neuronale apparaissant chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer et en particulier à la formation de plaques dites plaques séniles.

En conséquence l'endopeptidase selon l'invention pourrait être utilisée pour favoriser ou au contraire atténuer les effets de la protéine β -amyloïde en fonction du stade de maturation des neurones.

Une endopeptidase de l'invention peut également être définie par les caractéristiques suivantes : elle présente un seul pic en chromatographie HPLC, sur une colonne de C4-silice 300 Å équilibrée avec un tampon de phosphate de sodium 10mM et de chlorure de sodium 1,5 M à pH 7,5 et à température ambiante, avec un débit de 0,5 ml/min, et elle est éluée avec un gradient linéaire constitué par un tampon de chlorure de sodium 10 mM à pH 7,5 jusqu'à un tampon de phosphate de sodium 10 mM à pH 7,5 en 10 minutes et d'un gradient de 0 à 30% de méthanol dans un tampon de phosphate de sodium 10 mM à pH 7,5 en 60 minutes, l'enzyme étant éluée entre 10 et 30% de méthanol.

Des enzymes de l'invention sont également caractérisées en ce que leur constante d'affinité (K_m) pour un substrat choisi parmi l'ANF(5-28), la substance P, l'angiotensine II, la bradikynine, la somatostatine-14, la neuromédine C, la neuromédine B ou la litorine, se situe entre 18 et 63 μ M.

En outre l'activité de l'enzyme dans les conditions expérimentales décrites ci-après est optimale à pH 7,4 ou 7,5.

De façon particulièrement avantageuse, les enzymes de l'invention sont sous forme pure ; en d'autres termes elles sont homogènes du point de vue de leur

activité de clivage de substrats déterminés et dépourvues de contaminants.

Un groupe particulier d'endopeptidases de l'invention est représenté par l'enzyme de Xenopus laevis qui répond aux définitions précédemment données et qui présente une masse moléculaire apparente de 100 kDa.

Un autre groupe d'enzymes selon l'invention comprend les enzymes humaines. A cet égard les inventeurs ont isolé et caractérisé une enzyme apparentée à celle du xénope, présente en particulier au niveau du système nerveux. Cette enzyme a été retrouvée et caractérisée dans des cellules du clone U-373 MG de glioblastome, astrocytome humain. Ce clone est identifié par sa référence dans une banque de cellules. L'enzyme humaine est indiscernable de l'enzyme de X.laevis par sa sélectivité au regard des substrats et son profil d'inhibition par les agents décrits au Tableau II.

Selon une autre définition, une endopeptidase de l'invention peut être obtenue par la mise en oeuvre des étapes suivantes :

- filtration moléculaire d'un échantillon biologique susceptible de contenir l'enzyme recherchée, et récupération du filtrat contenant la fraction active, enrichie en enzyme;
- chromatographie sur échangeur d'ions du filtrat et récupération des fractions actives;
- chromatographie hydrophobe d'absorption et récupération de la fraction ayant une activité endopeptidase;
- concentration de cette fraction par ultrafiltration;

- chromatographie HPLC et élution au moyen d'un tampon, puis d'un gradient linéaire;
- analyse des fractions éluées, par absorption d'UV à 220 nm et récupération de l'enzyme.

Pour tester l'activité des fractions obtenues, puis de l'enzyme récupérée, on pourra avoir recours au test décrit dans les exemples, qui permet de déterminer l'activité de clivage sur un ou plusieurs substrats donnés. On pourra également mettre en oeuvre le test décrit dans les pages précédentes.

De façon préférée, cette enzyme est caractérisée en ce que la filtration moléculaire a lieu sur Sephadex G50, la chromatographie sur échangeur d'ions a lieu sur DEAE Sephadex, la chromatographie hydrophobe d'absorption a lieu sur aminoethylagarose.

De façon particulièrement avantageuse, cette enzyme est encore caractérisée en ce que l'élution est réalisée pendant 10 minutes avec un tampon de phosphate de sodium 10 mM, chlorure de sodium 1,5 M à pH 7,5 avec un débit de 0,5 ml/min. puis avec un gradient linéaire par un tampon de phosphate de sodium 10 mM et chlorure de sodium 1,5 M à pH 7,5 jusqu'à un tampon de phosphate de sodium 10 mM, dépourvu de chlorure de sodium à pH 7,5.

L'invention vise également des anticorps polyclonaux ou monoclonaux caractérisés en ce qu'ils reconnaissent l'endopeptidase décrite précédemment ou toute partie de cette endopeptidase et en particulier tout site impliqué dans les propriétés fonctionnelles de clivage de l'enzyme données précédemment.

Les anticorps peuvent être obtenus par les méthodes classiques et notamment à partir d'hybridomes résultant de la fusion de cellules spléniques d'un

animal préalablement immunisé avec l'enzyme, avec des cellules de myélome.

On peut également préparer in vitro des anticorps monoclonaux humains dirigés contre cette enzyme, par exemple selon la technique suivante :

On réalise la fusion de lymphocytes B immortalisés par exemple par le virus d'Epstein Barr, avec des lymphocytes B humains préalablement stimulés in vitro avec l'endopeptidase selon l'invention contre laquelle on cherche à former des anticorps monoclonaux, dans des conditions de culture permettant la stimulation des lymphocytes.

On se reportera avantageusement à la technique décrite par Desgranges C. et al (1987, J of Virological Methods, vol 16, p281-292), pour la préparation des anticorps monoclonaux humains de l'invention.

De préférence les anticorps de l'invention reconnaissent sélectivement une enzyme répondant aux critères donnés précédemment et en d'autres termes sont dépourvus de réaction à l'égard d'autres endopeptidases telles que la NEP ou l'ACE.

L'invention vise par ailleurs l'utilisation de l'endopeptidase pour le criblage de molécules connues ou pour la mise au point de nouvelles molécules susceptibles d'agir en tant qu'inhibiteur ou modulateur sélectif de cette endopeptidase.

Par modulateur sélectif on entend toute molécule capable soit d'inhiber soit d'activer l'enzyme, en fonction des conditions de concentration respectivement de l'enzyme et du modulateur et en fonction des conditions relatives au milieu de réaction.

L'invention se rapporte également à un procédé pour détecter la capacité d'une molécule à se comporter

comme substrat de l'enzyme de l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- mise en contact de la molécule testée avec l'endopeptidase selon l'invention et incubation pendant un temps suffisant pour permettre à l'activité de clivage de l'enzyme de se manifester au niveau de la molécule testée, cette incubation étant de préférence réalisée dans un tampon de phosphate de sodium 100 mM à pH 7,5,
- récupération des produits résultant de la réaction et élution de ces produits par chromatographie HPLC,
- suivi des produits obtenus par absorption UV à 220 nm.

Les fragments éventuellement obtenus par clivage de la molécule testée peuvent être identifiés par leur composition en acides aminés, par exemple en utilisant le kit Pico Tag Station de Waters. Le cas échéant la partie amino-terminale de ces produits de clivage éventuels est séquencée.

L'invention vise aussi un procédé pour la détection ou le criblage de molécules susceptibles de se comporter comme inhibiteur, activateur ou modulateur de l'enzyme de l'invention, caractérisé par les étapes suivantes :

- mise en contact de la molécule testée avec un substrat peptidique comportant des liaisons peptidiques susceptibles d'être clivées, conformément aux définitions ci-dessus données, en présence de l'endopeptidase de l'invention,
- incubation dans un tampon de préférence à pH 7,5 et récupération des produits formés à l'issue de la réaction,

- détection de la présence d'éventuels produits de clivage du substrat peptidique utilisé afin de déterminer l'action de la molécule testée,
- le cas échéant comparaison de l'activité endopeptidase de l'enzyme avec l'activité de référence de cette enzyme obtenue dans les mêmes conditions sur le même substrat en l'absence de la molécule testée et détermination qualitative et/ou quantitative de l'effet de la molécule testée.

L'invention se rapporte aussi à un médicament caractérisé en ce qu'il contient à titre de principe actif une enzyme de type endopeptidase répondant aux définitions données dans les pages précédentes, ou un fragment de cette enzyme, en particulier un fragment ayant conservé la capacité de clivage de cette enzyme.

Un autre médicament selon l'invention contient, à titre de principe actif, un activateur, un inhibiteur ou un modulateur des fonctions enzymatiques de l'endopeptidase de l'invention.

En particulier l'invention vise la préparation d'un médicament actif en tant qu'hypotenseur, susceptible d'agir sur un substrat tel que l'ANF.

On appelle modulateur, une substance capable d'intervenir sur l'intensité de l'activité de l'endopeptidase soit par activation soit par inhibition.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans les figures et dans les exemples qui suivent.

F I G U R E S

**Figure 1 Purification et analyse de l'endopeptidase
d'inactivation de peptides hormonaux (PHIE)
de Xenopus Laevis**

A) : L'enzyme récupérée à partir de l'étape d'absorption sur aminoéthylagarose a été soumise à une chromatographie HPLC en phase inverse sur une colonne C4-silice 300 Å, équilibrée avec un tampon de phosphate de sodium 10 mM et de chlorure de sodium 1,5 M, à pH 7,4 à température ambiante, avec un débit de 0,5 ml/min. L'élution avec ce tampon a été poursuivie pendant 10 min et suivie de l'application sur un gradient linéaire avec du chlorure de sodium 1,5 M dans un tampon de phosphate de sodium 10 mM à pH 7,4 jusqu'à un tampon de phosphate de sodium 10 mM (sans chlorure de sodium) à pH 7,4 en 10 min. Ensuite un gradient de méthanol de 0 à 30% dans un tampon de phosphate de sodium 10 mM à pH 7,4 et en 60 min a été utilisé pour l'élution de l'enzyme. L'absorption de l'effluent de la colonne a été suivie à 220 nm. Des fractions de 1 ml ont été collectées et une partie aliquote de 20 µl a été testée pour déterminer son activité enzymatique.

Trois substrats différents ont été utilisés : DABTC [α R⁸]-Kermit ($\text{---}\text{---}$), (5-28)-ANF ($\text{---}\bullet\text{---}$) ou la substance P ($\text{---}\circ\text{---}$) et les résultats exprimés ont été décrits dans la partie Matériels et Méthodes. Les flèches indiquent les fractions contenant l'activité de l'endoprotéase RXVRG qui ont été éluées avec du méthanol à 12% et un tampon de phosphate de sodium à pH 7,4.

B) : L'électrophorèse a été réalisée sur un gel de polyacrylamide suivant un gradient de 8 à 25% en

utilisant le système Phast-gel (Pharmacia, Uppsala, Suède). Des parties aliquotes de l'enzyme obtenue après l'étape finale de purification, contenant 0,5 μg de protéine (approximativement) ont été chargées séparément sur deux lignes parallèles. Après migration, une ligne a été colorée avec de l'argent et l'autre a été coupée en bandes de 1 mm. Chaque bande a été incubée avec 50 μl d'un tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4, contenant 50 pmol du peptide DABTC [I^8]-Kermit pendant 2 heures à 37°C. L'activité enzymatique a été exprimée en quantité (en nmol) de substrat peptidique clivé au niveau de la liaison Ser¹²-Phe¹³ par heure.

C) : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS/ β -mercaptoéthanol de l'endopeptidase de Xenopus Laevis récupérée après l'étape finale de purification. Une partie aliquote des fractions actives récupérées à l'issue de l'étape d'HPLC sur colonne C4-silice avec 25% de méthanol, a été soumise à une analyse sur un gradient de gel de polyacrylamide de 8 à 25% en présence de SDS/ β -mercaptoethanol, en utilisant un système Phast-gel. La visualisation des protéines a été réalisée par coloration à l'argent.

Ligne gauche :

Marqueurs de masse moléculaire; à partir du haut vers le bas : phosphorylase b (94 kDa); sérum albumine bovine (67 kDa); ovalbumine (43 kDa); anhydrase carbonique (30 kDa); inhibiteur de trypsine (20,1 kDa) et α -lactalbumine (14,4 kDa).

Ligne droite :

0,5 μg de l'enzyme récupérée à partir de l'étape de purification HPLC sur colonne C4-silice (figure 1A).

Figure 2 Profil d'éluion de fragments de différents substrats peptidiques hormonaux résultant de l'action de l'endopeptidase de Xenopus Laevis

Après incubation de chacun des substrats peptidiques testés (1-2 nmol) en présence de l'enzyme pure (10ng) dans des conditions suivantes : 2 nmoles d'ANF (5-28) sont incubées à pH 7,5 pendant 2 heures en présence d'une quantité de protéine enzymatique équivalente à 0,1/mole de l'enzyme pure (volume final de 20 μ l). A la fin de l'incubation, on injecte l'ensemble de l'échantillon (20 μ l) sur une colonne d'HPLC (C₁₈). La réaction a été stoppée en chauffant pendant 10 min à 100°C et l'échantillon complet a été injecté sur une colonne HPLC (Nucleosil™ 5 μ , C18, 146x4,5 mm), puis élué avec un gradient de 0-45% d'acétonitrile en 25 min. L'absorption a été suivie à 200 nm. Les fragments ont été identifiés par leur composition en acides aminés, par référence à un standard et par le séquençage de la partie NH₂-terminale.

A) : ANF : les fragments (5-25) et (26-28) d'ANF ont été identifiés tous les deux par référence à des standards et par leur composition en acides aminés;

B) : Substance P : les fragments générés (a,b,c et d) ont été identifiés par leur composition en acides aminés.

C) : Angiotensine II : les deux produits de la réaction (a et b) ont été identifiés par leur composition en acides aminés.

D) : Bradykinine : les quatre fragments générés (a,b,c et d) ont été identifiés par leur composition en acides aminés.

E) : Somatostatine-14 : l'unique produit de réaction généré par le clivage au niveau de la liaison Phe⁶-Phe⁷ a été identifié par la composition en acides aminés et par le séquençage NH₂-terminal.

F) : Neuromédine C : les quatre produits de la réaction (a,b,c et d) ont été déterminés par leur composition en acides aminés.

Figure 3 Séquences d'acides aminés des hormones peptidiques utilisées à titre de substrat pour l'endopeptidase d'inactivation d'hormone peptidique de Xenopus Laevis

Les flèches pleines indiquent le site du clivage principal observé. Les flèches en pointillés correspondent aux sites de clivage mineur. Lorsqu'aucune flèche n'est indiquée aucun clivage n'a été obtenu. Les séquences ont été alignées de façon à mettre en évidence les liaisons Xaa-Phe, Xaa-Leu et Xaa-Ile. Tous les fragments correspondants ont été identifiés de façon non ambiguë par leur composition en acides aminés. Dans certains cas le séquençage de la partie amino-terminale a également été réalisé (Chang et al (1983) Methods Enzymol. 91: 455-466). Les valeurs de Km ont été mesurées en utilisant cinq concentrations différentes de substrat dans des conditions dans lesquelles un maximum de 5% de clivage était mesuré.

Figure 4 Profils de pH et d'inhibition par le phosphoramidon, de l'activité endopeptidase

A) : L'activité a été mesurée pour chaque valeur de pH sur un test standard (2 nmol de substrat, par exemple [α R⁸]-Kermit ou (5-28)-ANF en présence de 10 ng

d'enzyme pure dans un tampon de phosphate 0,1 M, dans un volume final de 20 μ l pendant 1 heure à 37°C). Le tampon a été ajusté pour couvrir un intervalle de pH de 5,8 à 8,0.

B) : L'activité a été mesurée avec 2 nmol de substrat (soit [14 C]-Kermit, soit ANF-(5-28) en présence de 10 ng d'enzyme pure dans un tampon phosphate 0,1 M, dans un volume final de 20 μ l pendant 1 heure à 37°C en présence de phosphoramidon dans un intervalle de 10^{-4} à 10^{-9} M.

E X E M P L E S

MATERIEL ET METHODESProcédé de purification

La purification de l'endopeptidase a été réalisée selon une technique essentiellement analogue à celle utilisée dans la publication de Kuks et al (J. Biol. Chem. 264: 14609-14612, 1989) pour isoler l'endopeptidase RXVRG. Des exsudats ont été obtenus à partir de trois X. laevis, soumis à une filtration moléculaire sur Sephadex G50, suivie d'une chromatographie par échange d'ions sur DEAE Sephadex. Les fractions actives ont ensuite été soumises à une chromatographie d'absorption hydrophobe sur de l' aminoéthylagarose, selon la description donnée dans la référence Kuks et al précédente. Les fractions présentant une activité de type endopeptidase, récupérées après l'étape d'absorption sur aminoéthylagarose (au total 60 ml) dans 10 mM de tampon phosphate à pH 7,4, NP-40 0,1%, ont été concentrées par ultrafiltration (cartouches Unisep™ à membrane Ultracent-30, Bio-Rad) pour obtenir un volume final approximatif de 0,6 ml. Cet échantillon a ensuite été placé sur une colonne d'HPLC (SFCC, France) (Nucleosil™ C4 300Å (8x75mm)), et élué avec un tampon contenant du phosphate de sodium 10 mM et du chlorure de sodium 1,5 M à pH 7,4, avec un débit de 0,5 ml/min. L'élution a été poursuivie pendant 10 min et un gradient linéaire de tampon phosphate de sodium 10 mM avec du chlorure de sodium 1,5 M, à pH 7,4 jusqu'à un tampon phosphate de sodium 10 mM (dépourvu de chlorure de sodium) a été appliqué en 10 min. Ensuite un

gradient de 0 à 30% de méthanol a été appliqué en 60 min pour éluer l'enzyme récupérée à 25% de méthanol.

L'enzyme purifiée résistait à 30% de méthanol et au chlorure de sodium 1,5 M (90% de l'activité d'origine est conservée).

Les fractions éluées ont été analysées par absorption d'UV à 220 nm et l'activité enzymatique a été suivie sur chaque fraction de 1 ml. Cette dernière étape de purification a permis d'obtenir une séparation complète de l'endopeptidase de l'endoprotéase RXVRG copurifiée qui a été élue avec 12% de méthanol dans du tampon de phosphate de sodium 10 mM. Les fractions actives ont été regroupées, et concentrées à un volume final de 30 μ l. Cet échantillon contenant l'activité endopeptidase a été analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans des conditions non dénaturantes ou dans des conditions dénaturantes en utilisant le système "Phast-System" (Pharmacia, Uppsala, Suède, Kuks et al, J. Biol. Chem. 264: 14609-14612, 1989). Le contenu en protéines a été évalué par la méthode de Bradford selon la description donnée dans Anal. Biochem 72: 248-254 (1976).

Tests enzymatiques

L'activité endopeptidase a été suivie en routine en utilisant la technique décrite dans la publication de Kuks et al précitée et, à titre de substrat le peptide désigné par [α R⁸]-Kermit, dérivé du peptide désigné par Kermit (DVDERDVRGFASFL_{NH2}) qui a subi un clivage au niveau de la liaison S¹²-F¹³ mais n'a pas été clivé par l'endoprotéase RXVRG au site α R⁸-G⁹.

Lorsque l'ANF (Atrial Natriuretic Factor), la substance P, la somatostatine, la bradykinine, l'angiotensine II, les neuromédines B et C et la litorine ont été utilisées en tant que substrat, les conditions étaient les suivantes : 1-2 nmol de peptide ont été incubés pendant 1 à 5 heures dans un tampon de phosphate 100 mM à pH 7,4 en présence de 10 ng de l'enzyme pure pour un volume final de 20 μ l. La réaction a été arrêtée en chauffant 10 min à 100°C et les produits résultant ont été directement placés sur une colonne HPLC (Nucléosil™ 5 μ C18, 146x4,5 mm), et élués conformément aux conditions décrites à la figure 2. Le substrat restant et les produits obtenus ont été suivis directement par absorption d'UV à 220 nm. Tous les fragments produits par le clivage endopeptidolytique ont été identifiés de façon certaine par leur composition en acides aminés en utilisant l'appareil PicoTag (Waters). Dans certains cas l'identification a été également vérifiée par le séquençage de la partie amino-terminale selon la description donnée par Chang (Methods Enzymol. 91: 455- 466, 1983).

Des inhibiteurs ont été testés à différentes concentrations (voir tableau II) en utilisant les conditions de routine du test de l'endopeptidase, précédemment décrites et en utilisant soit le peptide ANF-(5-28) soit le peptide [α R⁸]-Kermit à titre de substrat. Le peptide ANF-(5-28) comprend les acides aminés 5 à 28 de l'ANF. Les inhibitions ont été exprimées en pourcentage de l'activité de référence mesurée en l'absence de réactifs chimiques, dans les mêmes conditions expérimentales.

Le profil de pH de l'activité endoprotéase a été obtenu en utilisant soit [α R⁸]-Kermit soit ANF-(5-28) en tant

que substrat (2 nmol par essai) incubé pendant 1 heure avec 10 ng d'enzyme pure dans un tampon phosphate 0,1 M ajusté pour répondre à un intervalle de pH de 5,8 à 8,0 (figure 4).

Peptides et réactifs

Les peptides [$^{14}R^8$]-Kermit, ANF (24-28), [Ala²⁵] ANF (24-28), [His²⁵]ANF (24-28) ont été préparés par synthèse en phase solide selon les techniques décrites par Tam et al et Merrifield respectivement dans les publications (J. Am. Chem. Soc. 105: 6442-6455 (1983) et J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154 (1963)), sur un multisynthétiseur NPS 4000 (Neosystem, Strasbourg, France) et purifiés par HPLC. Ils ont été contrôlés par un ensemble de méthodes analytiques selon la description détaillée donnée par Plevrakis et al et Nicolas et al respectivement les publications (Biochemistry 28: 2705-2710 (1989) et Biochem. Biophys. Res. Commun. 140: 565-573 (1986)). Tous les réactifs ont été obtenus auprès de Sigma (Saint-Louis, Mo, USA) et les autres substrats peptidiques ou fragments ont été obtenus chez Neosystem ou Sigma.

RESULTATS

Purification de l'endopeptidase de *Xenopus laevis*

A partir d'un exsudat de peau de trois *X. laevis*, une purification complète de l'endopeptidase a été réalisée en utilisant les quatre étapes successives résumées dans le tableau I et décrites en détail dans la partie précédente. La chromatographie HPLC sur colonne C4-silice a permis d'aboutir à un facteur final

d'enrichissement de 2029 (tableau I). Ce facteur est probablement sous-estimé car à l'étape initiale de purification, l'activité de clivage de la liaison Ser-Phe est masquée par les protéases contaminantes. De plus un taux de récupération relativement élevé a été obtenu (tableau I) ; ceci peut être attribué soit à la présence d'inhibiteur (s) endogène (s) (Kuks et al précité) ou à de multiples activités protéolytiques présentes au niveau de l'exsudat ou les deux. Si cette dernière hypothèse est exacte, on peut penser que la présence d'activités protéolytiques contaminantes multiples lors de la première étape de purification pourrait dégrader le substrat ou les produits résultant de l'activité de l'endopeptidase, conduisant ainsi à sous-estimer l'activité spécifique de départ. L'activité endopeptidase élue à partir de la colonne était enzymatiquement homogène par rapport au clivage Ser-Phe produit au niveau des peptides [1R⁸]-Kermit et ANF-(5-28) ou du clivage de la liaison Gly⁹-Leu¹⁰ de la substance P. Les profils présentés à la figure 1A indiquent que l'activité peptidolytique, suivie en utilisant les trois substrats a co-élué parfaitement et a coïncidé avec un pic précis de la protéine. Ceci suggère un enrichissement significatif de l'endopeptidase (tableau I). La pureté de l'enzyme récupérée à partir du pic d'activité de l'étape de chromatographie HPLC sur colonne C4-silice a été démontrée par électrophorèse sur gel dans des conditions à la fois non dénaturantes et dénaturantes. En l'absence de SDS, l'activité a coïncidé avec une bande unique de protéine (figure 1B). En présence de l'agent dénaturant, la protéine a migré sous forme d'une bande unique indiquant une masse moléculaire apparente de 100 kDa (figure 1C).

L'activité enzymatique offrait une grande stabilité pendant des périodes de 24 heures et plus dans les conditions d'incubation de routine du test enzymatique.

Sélectivité du substrat

La sélectivité du substrat de l'enzyme isolée a été vérifiée sur une variété de peptides (figure 2). L'endopeptidase de X. laevis a donné lieu dans la plupart des cas à un clivage unique ou à un clivage majoritaire au niveau des liaisons Ser-Phe, Gly-Phe, Phe-Phe, His-Phe, Gly-Leu, His-Leu ou Tyr-Ile des peptides testés. L'hydrolyse de la liaison Ser²⁵-Phe²⁶ du peptide ANF-(5-28) a conduit à la séparation d'une terminaison tripeptidique Phe²⁶-Arg-Tyr²⁸ et à la production de quantités stoechiométriques à la fois du fragment (5-25)NH₂-terminal et du tripeptide (26-28) COOH-terminal (figure 2A). Dans le cas de la substance P, l'hydrolyse principale a été réalisée au niveau de la liaison Gly⁹-Leu¹⁰ (fragments a et c de la figure 2B) et un clivage mineur a été obtenu au niveau du doublet Phe⁷-Phe⁸ (fragments b et d au niveau de la figure 2B). Dans le cas de l'angiotensine II, un unique clivage a été produit au niveau de la liaison Tyr⁴-Ile⁵ (fragments a et b figure 2C). De même, la bradykinine a été clivée au niveau de la liaison Gly⁴-Phe⁵ (fragments a et d figure 2D) avec un clivage minoritaire au niveau de la liaison Pro⁷-Phe⁸ (fragments b et c figure 2D). La somatostatine-14 a subi un clivage unique au niveau de la liaison Phe⁶-Phe⁷ située dans la boucle liée par un pont disulfure du tétradécapeptide. Ceci a conduit à l'obtention d'un unique produit comme le montre la figure 3E (le fragment a a été identifié par séquençage de la partie amino-terminale). Au niveau de la

neuromédine C, une hydrolyse majeure a été observée au niveau de la liaison His⁸-Leu⁹ (fragments a et d figure 2F) alors que le clivage mineur était également réalisé au niveau de la liaison Gly⁷-His⁸ (fragments b et c figure 2F). Des résultats analogues ont été obtenus pour la neuromédine B et la litorine avec un clivage majeur de la liaison His⁸-Phe⁹ et un clivage mineur de la liaison Gly⁷-His⁸.

L'enzyme pure présentait une forte affinité pour tous les substrats clivés. La Km était de l'ordre de 18 à 63 μ M, mesurée à l'égard du peptide ANF-(5-28) de la substance P, de la somatostatine-14, de la bradykinine, de la neuromédine C et de l'angiotensine II (figure 3).

Au contraire, d'autres peptides contenant un motif Xaa-Phe, Xaa-Leu, ou Xaa-Ile incluant l'ocytocine, la vasopressine, la minigastrine I et la [Leu⁵]enképhaline n'ont pas été clivés par l'endopeptidase de X. laevis (figure 3). Comme les pentapeptides [Leu⁵]enképhaline et son dérivé amidé n'ont pas été clivés par l'enzyme endopeptidase pure les pentapeptides reproduisant ou mimant la séquence COOH-terminale (acides aminés 24-28) de l'ANF ont été utilisés à titre de substrat (figure 3). Alors qu'ils n'étaient pas clivés dans tous les cas au niveau de la liaison Xaa-Phe dans des conditions d'incubation de routine, ils sont apparus comme étant des inhibiteurs du clivage de l'ANF par l'endopeptidase. De façon intéressante la [Leu⁵]enképhaline se comportait aussi comme un inhibiteur efficace de l'hydrolyse de la liaison ANF Ser²⁵-Phe²⁶ (IC₅₀ = 54 μ M).

En résumé l'endopeptidase des sécrétions de X. laevis clive de façon préférée l'extrémité NH₂-terminale des

acides aminés Phe, Leu ou Ile lorsqu'ils sont inclus dans un doublet de type Xaa-Phe, Xaa-Leu ou Xaa-Ile. De plus l'activité endopeptidase est régulée par d'autres paramètres structuraux tels que la taille du substrat et probablement sa conformation. A ce sujet, on peut noter que lorsque le motif Xaa-Phe, Xaa-Leu ou Xaa-Ile forme l'extrémité carboxy-terminale du peptide, il n'est pas clivé. Ceci a été démontré dans le cas de la minigastrine I et de l'angiotensine II (figure 3). En outre lorsque les motifs Xaa-Phe, Xaa-Ile ou Xaa-Leu étaient présents aux positions +2 (160-169) -prépro-thyrolibérine telles que décrites dans la publication de Bulant et al (J. Biol. Chem. 263: 17189-17196, 1988) ou à la position +3 du fragment ANF (24-28) et de ses dérivés, dans l'ocytocine, la vasopressine, la neuromédine B ou à la position +4 de la [Leu⁵]enképhaline et de la [Leu⁵]enképhalinamide, et de pentapeptides dérivés de l'ANF, ces positions étant déterminées à partir de l'extrémité amino-terminale des peptides (figure 3, échantillon bas de la page) aucun clivage par l'endopeptidase n'a été observé.

Les résultats présentés ici indiquent que la position topographique du motif conservé (Xaa-Phe, Xaa-Leu ou Xaa-Ile) dans le substrat peptidique hormonal est un facteur important et limitant de l'hydrolyse du substrat par l'endopeptidase de X. laevis. Ainsi un peptide contenant Phe ou Leu ou Ile avec 4 acides aminés à la partie amino-terminale et 1 acide aminé à la partie carboxy-terminale, semble être la condition minimum pour l'hydrolyse par l'endopeptidase de X. laevis.

pH optimal et profil d'inhibition

Le pH optimal était de 7,5 (figure 4B). Le caractère de métalloendopeptidase de l'enzyme a été suggéré par l'étude de différents inhibiteurs (tableau II). L'EDTA, l'EGTA, l'o-phénanthroline, ou le DTT à une concentration millimolaire, ont inhibé de façon significative l'activité lorsqu'elle était mesurée par rapport au clivage Ser-Phe de l'ANF ou de [α R⁸]-Kermit. Au contraire les inhibiteurs classiques de l'endopeptidase neutre (NEP) (Poszgay et al (1985) Biochem soc Trans 13:44-50, EC 3.4.24.11) ou de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) (EC 3.4.15.1) étaient soit faiblement efficaces soit inefficaces jusqu'à des concentrations micromolaires ou millimolaires respectivement, c'est à dire à des concentrations très supérieures à celles qui sont pleinement efficaces pour inhiber ces endopeptidases. Le phosphoramidon a conduit à une inhibition partielle de l'enzyme avec des concentrations supérieures à 0,1 μ M avec une IC₅₀ de 50 μ M. De façon intéressante l'inhibition totale de l'enzyme n'a pas été atteinte à des concentrations aussi fortes que 100 μ M (figure 4A) de Tiorphan et des inhibiteurs de la NEP ont exercé un effet relatif uniquement à des concentrations supérieures à 1 μ M (tableau II). Les inhibiteurs classiques pour les cystéinyl-, sérine-, et carboxyl-protéases n'avaient pas d'effet lorsqu'ils ont été testés à des concentrations de l'ordre de 0,1 à 1 mM (tableau II).

DISCUSSION

La transformation de messagers peptidiques hormonaux par inactivation protéolytique est un mécanisme général. Ce procédé peut être associé à des récepteurs et dans le cas de l'ANF, des récepteurs de transformation structurellement apparentés à ceux qui sont activés par l'hormone ont été caractérisés et sont susceptibles d'être associés avec l'endocytose de l'ANF préalablement à sa dégradation lysosomale (Roques et al, Trends Pharmacol. Sci. 11: 245-249, 1990). En plus de ces mécanismes, des études ont montré que la dégradation enzymatique peut souvent avoir lieu dans les organes cibles et être responsable de la demi-vie courte de certaines espèces hormonales (Roques et al, Trends Pharmacol. Sci. 11: 245-249, 1990 et Schwartz et al, Life Sci. 47: 1279-1297, 1990).

L'enzyme décrite ici présente un intérêt particulier au niveau de son mode d'action puisqu'on a pu montrer de façon claire qu'elle produit un clivage sélectif principal au niveau de liaisons peptidiques de doublets Xaa-Phe, Xaa-Ile ou Xaa-Leu dans un nombre important de messagers peptidiques qui ont en commun la présence de ces doublets dans leur séquence. En conséquence la capacité de cette enzyme à cliver la liaison Xaa-Phe de l'ANF, de la somatostatine et de la substance P par exemple, clivages qui sont reconnus dans tous les cas comme responsables d'inactivation, montre que cette enzyme est un prototype de la classe des enzymes d'inactivation distinctes de la NEP et de l'ACE. En effet cette hypothèse est confortée par un certain nombre d'observations.

Tout d'abord il est clair d'après ce qui a été décrit plus haut que le doublet d'acides aminés correspond à un site de clivage sélectif et inactivant dans des systèmes cellulaires contenant un récepteur. L'ANF subit une élimination sélective du tripeptide (Phe²⁶-Tyr²⁸) par un clivage de la liaison Ser-Phe dans différents tissus incluant les cellules endothéliales du muscle vasculaire lisse (Johnson et al, J. Biol. Chem. 264: 11637-11642, 1989 et Biochem. Biophys. Res. Commun. 167: 110-116, 1990), ainsi que dans les cellules du neuroblastome NB-OK-1 (Delporte et al, Eur. J. Pharm. 207: 81-88, 1991) et dans le cortex rénal bovin (Toll et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 175: 886-893, 1991).

Par ailleurs il apparaît à l'issue d'une comparaison précise des propriétés de l'enzyme de X. laevis avec des endopeptidases d'inactivation suffisamment caractérisées jusqu'à présent, que l'enzyme isolée à partir de X. laevis est différente de l'enzyme appelée enképhalinase (EC 3.4.24.11), de l'endoprotéase de conversion de l'angiotensine (EC 3.4.15.1), de l'enzyme de dégradation de la substance P (EC 3.4.24) et d'autres activités comparables Lee et al Eur. J. Biochem 114: 315-327; Oblin et al Life Sci. 44: 1467-1474; Stephenson et al Biochem. J. 255: 45-51. Dans ce contexte il est connu que l'ANF peut être dégradée in vitro par l'enképhalinase qui réalise des clivages, essentiellement et de façon limitée au niveau de la liaison Cys⁷-Phe⁸ (Roques et al, Trends Pharmacol. Sci. 11: 245-249, 1990 et Bourne et al Biochem. J. 271: 381-385, 1990) alors qu'uniquement une réaction secondaire et plus faible a été observée au niveau de la liaison Ser²⁵-Phe²⁶. De plus l'enzyme de sécrétion de la peau, qui ne clive pas l'enképhaline,

était uniquement sensible au phosphoramidon et autres inhibiteurs classiques de l'EC 24.11, à des concentrations cent à mille plus fortes que celles agissant sur l'endopeptidase neutre (Almenoff et al J. Neurochem 42 (1), 151-157, 1984). Les études réalisées in vivo sur le rein permettent de démontrer que la dégradation de l'ANF endogène n'a pu être évitée en utilisant les inhibiteurs de l'EC 24.11, ce qui suggère l'intervention d'une autre enzyme résistant au phosphoramidon jusqu'à des concentrations micromolaires (Roques et al, Schwartz et al précité). Enfin la peptidase de X. laevis était insensible au captopril jusqu'à des concentrations millimolaires, indiquant clairement qu'il s'agissait d'une enzyme différente de l'ACE. De plus cette dernière, comme la NEP, agissait sur des substrats peptidiques plus courts que ceux de l'enzyme de sécrétion de la peau (Pozsgay et al, Biochem. soc. Trans. 13: 44-50, 1985). Par comparaison avec l'endopeptidase du cerveau dégradant la substance P, il est clair que l'enzyme de X. laevis entraîne des clivages différents de ceux produits par l'enzyme de rat (hydrolyse Pro-Gln; Gln-Gln et Gln-Phe) ou par les espèces humaines dont les clivages principaux sont les suivants (Gln-Phe; Phe-Phe et Phe-Gly) respectivement (Endo et al, J. Biochem. 104: 999-1006, 1988 et Lee et al, Euro. J. Biochem. 114: 315-327, 1981).

On en conclut que l'enzyme de X. laevis est une nouvelle métalloendopeptidase qui hydrolyse une liaison peptidique par reconnaissance sélective d'un doublet d'acides aminés contenant un résidu carboxy-terminal Phe ou Leu ou Ile, ayant ainsi une activité thermolysine-like (Almenoff et al J. Neurochem 42 (1), 151-157, 1984 et Pozsgay et al, Biochem. soc. Trans. 13: 44-50, 1985). De plus l'enzyme de X. laevis

d'inactivation d'hormones peptidiques (PHIE) clive efficacement uniquement ce type de doublets, lorsqu'il est inclu dans un peptide contenant plus de cinq résidus d'acides aminés, ceci constituant une différence supplémentaire et notable avec la structure classique correspondant à l'activité de type NEP (Pozsgay et al).

Les observations faites jusqu'à présent permettent de penser que la fonction biologique de la peptidase dans la peau de X. laevis est apparentée à une inactivation post-sécrétionnelle de nombreux peptides des familles de l'angiotensine, de la bombésine et de la tachykinine, qui sont présentes dans les sécrétions de la peau.

TABLEAU I :

Etape	Protéine totale (mg)	Activité totale (nmol/h)	Activité spécifique (nmol/h/mg)	Purification (nbr de fois)	Rendement (%)
Exsudat de peau	285	1549	5.4	1	100
Sephadex G50	194	1394	7.2	1.3	90
DEAE-Sephadex	57	1043	18.3	3.4	67
Aminoethylagarose	1,8	660	367	68	43
C4-Silice HPLC	0,023	252	10956	2029	16

TABLEAU II:

CLASSE DE PEPTIDASE	INHIBITEUR	CONCENTRATION (mM)	INHIBITION (%)
Metallo	o-Phenantroline	1	98
		0.1	5
	EDTA	10	67
		1	59
	EGTA	10	63
		1	51
	DTT	10	66
		1	49
Cysteinyll-	PCMPS	1	0
	Iodacetamide	1	1
	NEM	1	0
Serine-	PMSF	1	0
	STI	1	0
	Aprotinine	1	0
	TPCK	1	2
Carboxyl-	Pepstatine	1	0
	GEMSA	0.1	1
NEP	Phosphoramidon	0.001	41
		0.005	52
	Acetorphan	0.001	15
		0.005	26
	Kelatorphan	0.001	12
		0.005	20
	Retrotiorphan	0.001	1
	Tiorphan	0.001	0
ACE	Captopril	1	0
Aspecific	Benzamidine	0.1	0
	Tame	1	0

R E V E N D I C A T I O N S

1. Enzyme de type endopeptidase caractérisée par :
 - sa capacité à cliver dans des conditions déterminées la liaison peptidique de doublets d'acides aminés de type Xaa-Phe, Xaa-Ile, Xaa-Leu, dans lesquels Xaa est un acide aminé, de préférence choisi parmi Ser, Phe, Tyr, His, Gly, ou Ala lorsque ce doublet est présent à l'intérieur d'un substrat peptidique dont la séquence comprend plus de 5 acides aminés,
 - sa sensibilité aux agents chélateurs de cations divalents, tels que l'EDTA, l'EGTA, l'o-phenantroline ou le DTT à des concentrations de l'ordre de 1 mM,
 - son insensibilité relative aux inhibiteurs de l'endopeptidase neutre (NEP) ou de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) par exemple au phosphoramidon ou au captopril, jusqu'à des concentrations cent à mille fois supérieures aux concentrations de ces inhibiteurs efficaces sur la NEP et/ou sur l'ACE,
 - ou tout fragment de cette enzyme.
2. Enzyme de type endopeptidase selon la revendication 1, telle qu'obtenue par la mise en oeuvre des étapes suivantes :
 - filtration moléculaire d'un échantillon biologique susceptible de contenir l'enzyme recherchée, et récupération du filtrat contenant la fraction active, enrichie en enzyme;
 - chromatographie sur échangeur d'ions du filtrat et récupération des fractions actives;
 - chromatographie hydrophobe d'absorption et récupération de la fraction ayant une activité endopeptidase;

concentration de cette fraction par ultrafiltration;

chromatographie HPLC et élution au moyen d'un tampon, puis d'un gradient linéaire;

analyse des fractions éluées, par absorption d'UV à 220 nm et récupération de l'enzyme.

3. Enzyme de type endopeptidase selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle présente un seul pic en chromatographie HPLC, sur une colonne de C4-silice 300 Å équilibrée avec un tampon de phosphate de sodium 10mM et de chlorure de sodium 1,5 M à pH 7,5 et à température ambiante, avec un débit de 0,5 ml/min, suivie d'une élution avec un gradient linéaire constitué par un tampon de chlorure de sodium 10 mM à pH 7,5 jusqu'à un tampon de phosphate de sodium 10 mM à pH 7,5 en 10 minutes et d'un gradient de 0 à 30% de méthanol dans un tampon de phosphate de sodium 10 mM à pH 7,5 en 60 minutes, l'enzyme étant éluee entre 10-30% de méthanol.

4. Enzyme selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle est en outre capable de cliver les substrats peptidiques tels que l'ANF, des hormones de la famille des tachykinines, des kinines, de la bombésine, ou de l'angiotensine, la substance P, la bradykinine, la somatostatine, les neuromédines B et C, la litorine, l'angiotensine II, et en ce qu'elle ne clive pas la minigastrine I, l'enképhaline et son dérivé carboxamidé, l'ocytocine, la vasopressine.

5. Enzyme selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle est capable d'inactiver l'ANF par clivage unique et sélectif de la liaison Ser²⁵-Phe²⁶ de l'ANF (1-28) ou de l'ANF (5-28).

6. Enzyme selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle clive la liaison Gly³³-Leu³⁴ du peptide β 1-40 de la protéine β amyloïde.
7. Enzyme selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle clive la liaison Lys¹⁶-Leu¹⁷ du peptide β 1-40 de la protéine β amyloïde.
8. Enzyme selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que sa constante d'affinité (Km) pour un substrat choisi parmi l'ANF (5-28), la substance P, l'angiotensine II, la bradykinine, la somatostatine-14, la neuromédine C, la litorine ou la neuromédine B, se situe entre 18 et 63 μ M.
9. Enzyme selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que son activité est optimale à pH 7,5.
10. Enzyme selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'elle est pure.
11. Enzyme selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'il s'agit de l'endopeptidase de Xenopus Laevis et en ce qu'elle a une masse moléculaire apparente de 100 kDa.
12. Enzyme selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une enzyme humaine, notamment d'une endopeptidase caractéristique du système nerveux.
13. Enzyme selon l'une quelconque des revendications 2 à 12, caractérisée en ce que la filtration moléculaire a lieu sur Sephadex G50, la chromatographie sur échangeur d'ions a lieu sur DEAE Sephadex, la chromatographie hydrophobe d'absorption a lieu sur aminoethylagarose.
14. Enzyme selon l'une quelconque des revendications 2 à 13, caractérisée en ce que l'élution est réalisée pendant 10 minutes avec un tampon de phosphate de

sodium 10 mM, chlorure de sodium 1,5 M à pH 7,5 avec un débit de 0,5 ml/min puis avec un gradient linéaire par un tampon de phosphate de sodium 10 mM et chlorure de sodium 1,5 M à pH 7,5 jusqu'à un tampon de phosphate de sodium 10 mM, dépourvu de chlorure de sodium à pH 7,5.

15. Anticorps polyclonal ou monoclonal, caractérisé en ce qu'il reconnaît une enzyme selon l'une quelconque des revendications 1 à 14.

16. Anticorps selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il reconnaît sélectivement une enzyme selon l'une quelconque des revendications 1 à 14.

17. Médicament caractérisé en ce qu'il contient à titre de principe actif, une enzyme selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, un fragment de cette enzyme, un activateur, un inhibiteur ou un modulateur de cette enzyme.

18. Utilisation de l'enzyme selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, pour la fabrication d'un inhibiteur, d'un activateur ou d'un modulateur sélectif de cette enzyme.

19. Procédé pour la détection ou le criblage de molécules susceptibles de se comporter comme inhibiteur, activateur ou modulateur de l'enzyme de l'invention, caractérisé par les étapes suivantes :

- mise en contact de la molécule testée avec un substrat peptidique comportant des liaisons peptidiques susceptibles d'être clivées, conformément aux définitions ci-dessus données, en présence de l'endopeptidase de l'invention,
- incubation dans un tampon de préférence à pH 7,5 et récupération des produits formés à l'issue de la réaction,

- détection de la présence d'éventuels produits de clivage du substrat peptidique utilisé afin de déterminer l'action de la molécule testée,
- le cas échéant comparaison de l'activité endopeptidase de l'enzyme avec l'activité de référence de cette enzyme obtenue dans les mêmes conditions sur le même substrat en l'absence de la molécule testée et détermination qualitative et/ou quantitative de l'effet de la molécule testée.

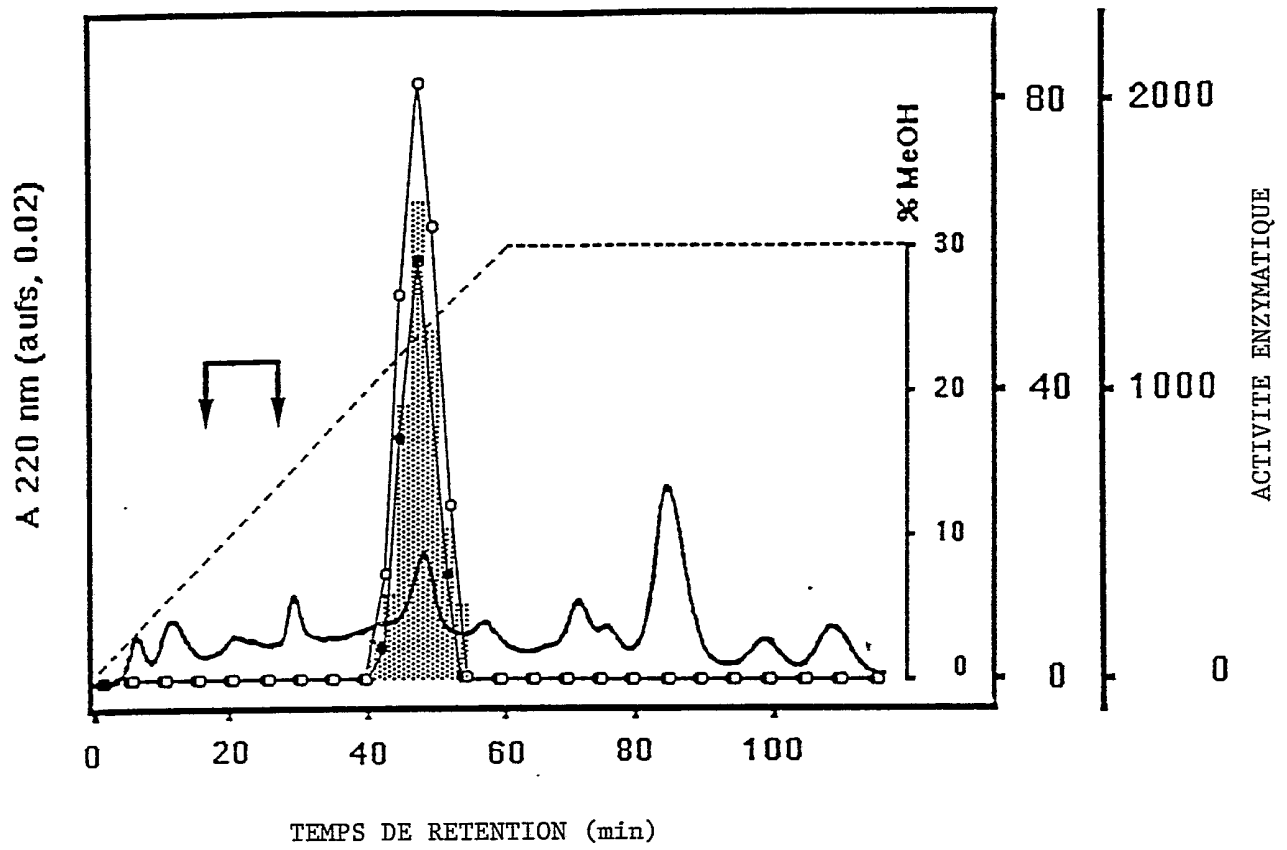


FIGURE 1 A

2/6

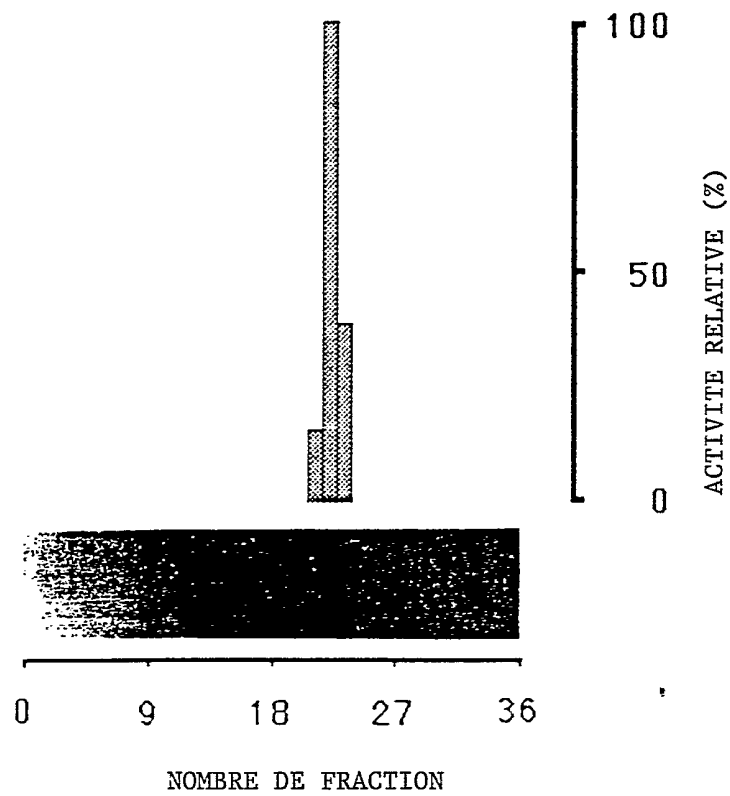


FIGURE 1 B

3/6

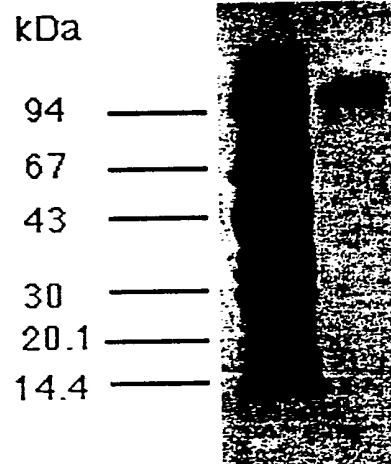


FIGURE 1C

		Km (10 ⁻⁵ M)	IC ₅₀ (10 ⁻⁵ M)
(5-28) ANF	SSCFGGHMDRIGAQSGLCN S [↓] F R Y	5	-
Substance P	R P K P Q N F [↓] G [↓] L M(NH ₂)	2	-
AngiotensinII	D R V Y [↓] I H P F	6,3	-
Bradykinine	R P P G [↓] F S P [↓] F R	4,1	-
Somatostatine14	A G C K N F [↓] F W K T F T S C	1,8	-
NeuromedineC	G N H W A V G [↓] H [↓] L M(NH ₂)	2,2	-
Litorine	PE Q W A V G [↓] H [↓] F M(NH ₂)	2,4	-
NeuromedineB	G N L W A T G [↓] H [↓] F M(NH ₂)	2,1	-
MinigastrineI	L E E E E A Y G W M D F(NH ₂)	-	-
AngiotensinII	D R V Y I H P F	-	-
(160-169)Preprothyliberine	S F P W M E S D V T	-	-
(24-28) ANF	N S F R Y	-	20
[Ala ²⁵] (24-28) ANF	N A F R Y	-	-
[His ²⁵] (24-28) ANF	N H F R Y	-	-
Vasopressine	C Y F Q N C [↓] P [↓] R G(NH ₂)	-	-
Oxytocine	C Y I Q N C [↓] P [↓] L G(NH ₂)	-	-
NeuromedineB	G N L W A T G [↓] H [↓] F M(NH ₂)	-	-
[Leu ⁵] Enkephaline	Y G G F L	-	5,4
[Leu ⁵] Enkephalinamide	Y G G F L(NH ₂)	-	3,5

FIGURE 2

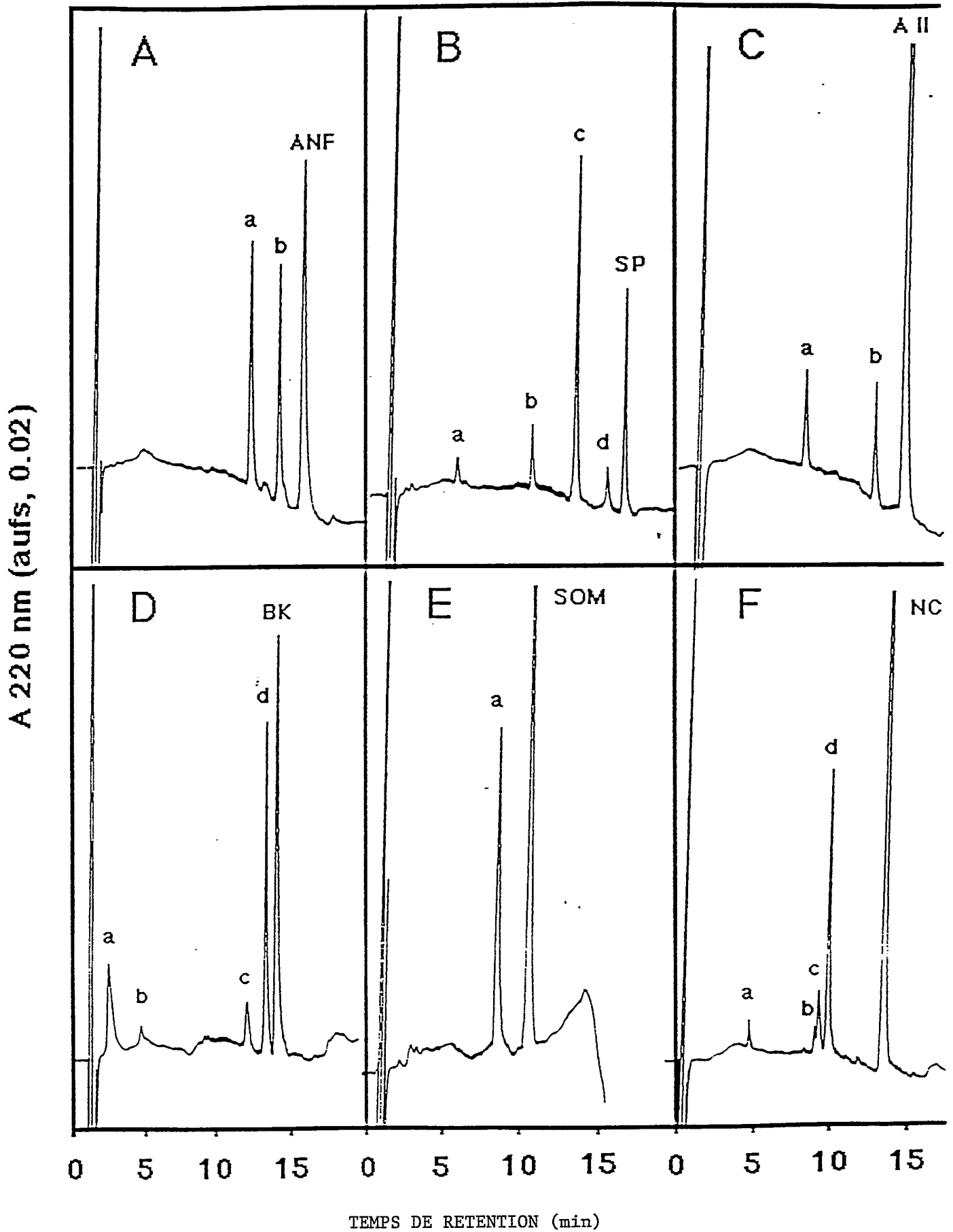


FIGURE 3

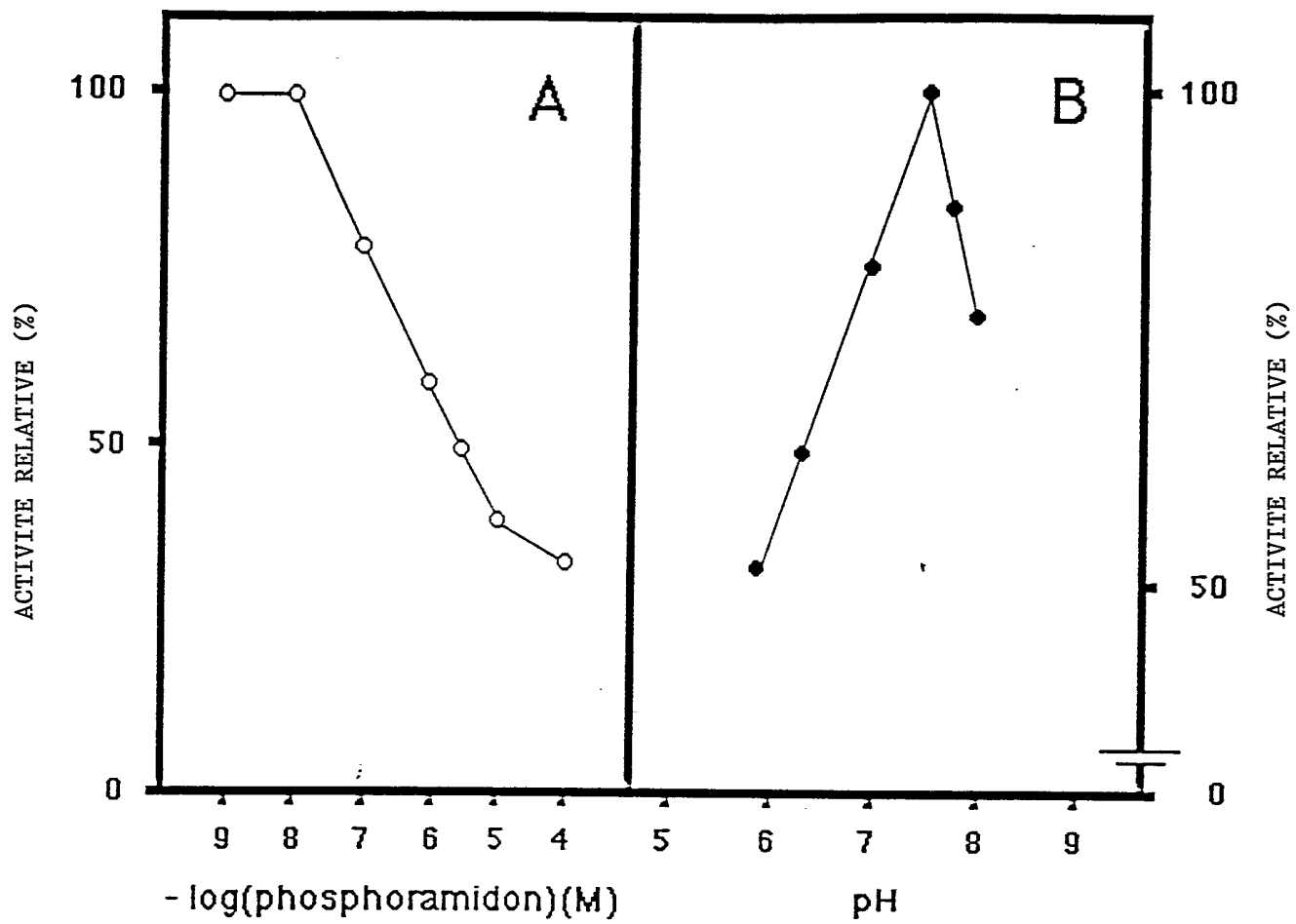


FIGURE 4

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9113279
FA 467541

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. vol. 175, no. 3, 29 Mars 1991, DULUTH, MINNESOTA US pages 886 - 893; L. TOLL ET AL.: 'Isolation and characterization of a new atrial peptide-degrading enzyme from bovine kidney' * le document en entier *	1-5, 8-10, 13-16, 18, 19
D, X	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. vol. 167, no. 1, 28 Février 1990, DULUTH, MINNESOTA US pages 110 - 116; G. JOHNSON AND C. FOSTER: 'Partial characterization of a metalloendopeptidase activity produced by cultured endothelial cells that removes the COOH-terminal tripeptide from 125I-atrial natriuretic factor' * le document en entier *	1-5, 13, 14, 18, 19
X	BIOCHEMICAL JOURNAL vol. 209, 1983, pages 741 - 752; W. GALLOWAY ET AL: 'Purification and characterization of a rabbit bone metalloproteinase that degrades proteoglycan and other connective-tissue components' * abrégé *	1-3, 9, 10, 13-16, 18, 19
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C12N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
26 MAI 1992		VAN DER SCHAAL C. A.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire 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 & : membre de la même famille, document correspondant		