

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 10.04.97.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 16.10.98 Bulletin 98/42.

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

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATO-
MIQUE ETABLISSEMENT DE CARACT SCIENT TECH ET
INDUST — FR.

⑦② Inventeur(s) : QUEMENEUR ERIC, MOUTIEZ
MIREILLE et MENEZ ANDRE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET ORES.

⑤④ ENZYMES RECOMBINANTES PURIFIEES A ACTIVITE PROLYLPEPTIDASIQUE, LEUR PROCEDE DE
PREPARATION ET LEURS APPLICATIONS.

⑤⑦ Enzymes recombinantes purifiées à activité prolylpep-
tidasique, leur procédé de préparation et leurs applications,
notamment comme réactif en analyse biochimique et en
cartographie peptidique.

Lesdites enzymes présentent la séquence d'une cyclo-
philine modifiée par substitution d'au moins un résidu d'ami-
noacide du site actif peptidyl-prolyl cis- trans-isomérase,
inclus dans une sphère de 10 Å centrée sur le carbonyle de
la liaison


amide et non impliqué dans l'activité isomérase, par un autre résidu
d'acide aminé et ont à la fois une activité de prolylendo-
peptidase ou de prolylendoprotéinase et une activité de pro-
lylexopeptidase aussi bien en position N- terminale, qu'en
position C-terminale, vis-à-vis des substrats peptidiques et
protéiques.



La présente invention est relative à des enzymes recombinantes purifiées à activité prolylpeptidasique, à leur procédé de préparation et à leurs applications, notamment comme réactif en analyse biochimique et en cartographie peptidique.

La protéolyse représente un moyen performant d'analyse topologique et structurale des protéines. La caractérisation des peptides et protéines passe très souvent par une étape d'hydrolyse enzymatique, préalablement au séquençage ou à la spectrométrie de masse ; des exemple peuvent être trouvés dans les ouvrages généraux suivants : *Proteolytic enzymes: a practical approach* (Beynon R.J. & Bond J.S. Editors) IRL Press, Oxford (1989) ; *Protein sequencing: a practical approach* (Findlay J.B.C. & Geisow M.J. Editors) IRL Press, Oxford (1989).

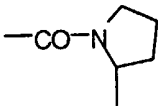
Malheureusement, et en dépit du grand nombre de substances déjà isolées, présentant une activité protéolytique, il n'est toujours pas possible de couper facilement et spécifiquement aussi bien les peptides que les protéines, au niveau de n'importe lequel de leurs aminoacides constitutifs. Parmi ceux-ci, il faut citer la proline qui présente un intérêt particulier, en raison de sa faible abondance (env. 5 %) et de sa présence majoritaire dans les structures en boucle ou coude qui joignent les éléments de structures secondaire ou tertiaire [14] et pour laquelle les méthodes chimiques de coupure [15,16] sont peu utilisées, en raison des nombreuses dégradations non spécifiques qu'elles génèrent.

Des hydrolases coupant spécifiquement au niveau des liaisons amides des prolines ont été déjà été décrites (Yaron A et al., *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1993, 28, 1, 31-81) : EC# 3.4.11.5 (proline iminopeptidase), 3.4.11.9 (aminopeptidase P), 3.4.13.8 (prolinase), 3.4.13.9 (prolidase), 3.4.16.2, 3.4.17.16, 3.4.21.26 [prolylendopeptidase, Demande internationale PCT WO 96/00293] et 3.4.21.72 [17]. Les six premières correspondent à des exopeptidases et seules les deux dernières sont relatives à des endoprotéinases, dont l'une restreinte à la coupure dans les régions charnières des IgA (3.4.21.72).

Majoritairement, elles sont d'origine bactérienne et clivent des liaisons de type Pro-Xaa (coupure au niveau du carboxyle de la proline : liaison amide en α de la proline), les coupures Xaa-Pro n'existant que pour l'aminopeptidase P (3.4.11.9) et la carboxypeptidase C (3.4.16.2) qui, elles, ne clivent pas les substrats polypeptidiques de grande taille ou les protéines.

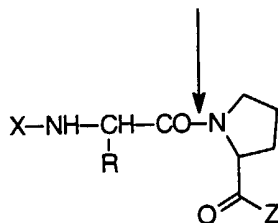
En conséquence, la Demanderesse s'est donné pour but de pourvoir à une enzyme recombinante purifiée à activité prolylpeptidasique, apte à présenter à la fois une activité de prolylendopeptidase ou de prolylendoprotéinase et une activité de prolylexopeptidase aussi bien en position N-terminale, qu'en position C-terminale, tant
 5 vis-à-vis des substrats peptidiques que des protéines, qui réponde ainsi mieux aux besoins de la pratique que les prolylpeptidasés de l'art antérieur.

La présente invention a pour objet une enzyme recombinante purifiée à activité prolylpeptidasique, caractérisée en ce qu'elle présente la séquence d'une cyclophiline modifiée par substitution d'au moins un résidu d'acide aminé du site actif
 10 peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomérase, inclus dans une sphère de 10 Å centrée sur le

carbonyle de la liaison amide  et non-impliqué dans l'activité isomérase, par un autre résidu d'acide aminé et en ce qu'elle présente à la fois une activité de prolylendopeptidase ou de prolylendoprotéinase et une activité de prolylexopeptidase aussi bien en position N-terminale, qu'en position C-terminale, vis-à-vis des substrats
 15 peptidiques et protéiques.

Selon un mode de réalisation de ladite cyclophiline recombinante purifiée à activité prolylpeptidasique, elle présente une activité spécifique supérieure à 10^2 U/mg de furyl-acryloyl-alanyl-proline (fa-AP) et un K_m compris entre 0,1 et 10 mM, une température optimale d'activité de 35-40°C et un pH optimal d'activité
 20 compris entre 6 et 8 ; elle présente, de préférence, un poids moléculaire de 18 kDa (cyclophiline cytosolique).

De telles cyclophilines modifiées sont aptes à hydrolyser les liaisons amides de la proline, de type :



25 dans laquelle
 X représente :

un atome d'hydrogène : activité d'aminopeptidase,

ou un résidu d'acide aminé : activité d'endoprotéinase ou d'endopeptidase

Z représente :

un résidu d'acide aminé : activité d'endoprotéinase ou d'endopeptidase

5 ou un groupe hydroxyle : action de carboxypeptidase et

R représente un élément constitutif d'un acide aminé quelconque.

On entend par résidu d'acide aminé, au sens de la présente invention, n'importe quel résidu d'acide aminé, et notamment : Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp ou Tyr et leurs dérivés natu-
10 rels ou chimiques, tels que hydroxyproline, hydroxylisine, carboxyméthylcystéine, etc.

De nombreuses cyclophilines ont été décrites [1] : on peut citer des cyclophilines de faible poids moléculaire (env. 16 kDa) isolées chez *Bacillus subtilis* et *Synechococcus sp.*, des cyclophilines cytosoliques de poids moléculaire compris entre 17 et 18 kDa, (cyclophiline A) isolées chez la plupart des autres organismes vivants
15 (animaux et végétaux) et des cyclophilines de poids moléculaire plus élevé (19-160 kDa), isolées à partir de fractions membranaires (cyclophiline B ou CyP-B : cyclophiline du réticulum endoplasmique ; cyclophiline C ou CyP-C : cyclophiline mitochondriale ; cyclophiline D ou CyP-D, par exemple).

Les cyclophilines présentent essentiellement trois fonctions :

- 20 . une fonction enzymatique peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomérase (E.C. 5.2. 1.8) [1] associée au repliement des protéines [2],
- . une fonction de récepteur cellulaire de la cyclosporine A [2] et
- . une fonction d'inhibition de la calcineurine [13].

Selon leur origine et leur localisation, elles présentent une ou
25 plusieurs des fonctions précitées.

Aussi bien la structure que les fonctions précitées de ces différentes cyclophilines ont été étudiées ces dernières années ; on peut citer notamment les études portant sur la cyclophiline C [3], la cyclophiline périplasmique d'*Escherichia coli* (ECypP) dont la séquence du gène fut d'abord décrite sous le nom d'ORF190 [4] puis,
30 deux années plus tard, sous le nom de « Cyp a » et la cyclophiline cytoplasmique d'*Escherichia coli* ou « Cyp b » (ECypC) [5].

Des vecteurs permettant l'expression de cyclophilines recombinantes en grande quantité [6,7], ouvrant la voie à un important travail structural sur ces enzymes, ont également été décrits.

A ce jour, plus de 25 fichiers de coordonnées atomiques de cyclophilines, seules ou en complexe avec des peptides ou la cyclosporine, sont déposés à la *Brookhaven Protein Data Bank*. La structure de la protéine ECypP fût résolue par résonance magnétique nucléaire en 1994 [8]. Le mécanisme catalytique de l'enzyme est principalement déduit de l'analyse de la structure cristalline de la cyclophiline A humaine (hCypA) [9,10].

Récemment a été décrite la recherche, parmi les structures déposées à la *Brookhaven Protein Data Bank*, des protéines contenant une triade catalytique de type Ser-His-Asp [11], il a notamment été trouvé que la protéine hCypA s'avère contenir ces trois résidus, en positions S99, H92 et D123, avec une géométrie rappelant celle formée au sein des protéases à sérine. Toutefois, aucune activité protéolytique n'a été décrite à ce jour pour cette protéine et l'examen de sa structure atomique montre que ces résidus ne sont pas situés dans le site actif de l'enzyme. De plus, ils ne sont pas conservés dans des séquences homologues comme ECypP ou ECypC (cf. Figure 1).

De nombreux mutants au niveau du site actif de la cyclophiline ont pu être préparés et étudiés pour l'altération de leurs propriétés enzymatiques et/ou de liaison de la cyclosporine.

Ainsi, il a pu être démontré par mutagenèse en alanine des cystéines 52, 62, 115 et 161 de hCypA que celles-ci ne participent ni à l'activité isomérase, ni à la liaison de la cyclosporine A [6].

Le rôle de W121 de la protéine humaine dans la liaison de la drogue a été clarifié par comparaison des propriétés des mutants W121F et W121A de hCypA et F112W de ECypP [12]. Ces études ont été complétées par l'examen de l'effet des mutations de hCypA suivantes: H54Q, Q111A, F113A, H126Q, F60A, R55A sur l'interaction avec la calcineurine ou la cyclosporine A et sur l'activité peptidylprolyl-isomérase [13].

Toutefois aucun des mutants décrits dans l'art antérieur ne modifient radicalement les propriétés de la peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomérase étudiée ; en parti-

culier, aucune de ces nombreuses études, n'a abouti à l'obtention d'une peptidyl-prolyl cis-trans-isomérase modifiée, présentant les propriétés de prolylpeptidase, telles que précisées ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, lesdites
5 cyclophilines sont de préférence des cyclophilines cytosoliques, d'origine bactérienne ou d'origine animale, et dans ce dernier cas, de préférence issues de mammifères, et notamment des cyclophilines cytosoliques humaines.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ladite cyclophiline est de préférence d'origine bactérienne et issue d'*E. coli*, par exemple
10 (ECypC) ou d'origine humaine (hCypA).

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, ladite enzyme recombinante purifiée à activité prolylpeptidasique est constituée par une cyclophiline modifiée au niveau d'un seul résidu d'acide aminé, situé dans la partie du site actif peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomérase non-impliqué dans l'activité isomérase, qui
15 est remplacé par un acide aminé nucléophile, tel que la sérine ou la cystéine.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, ladite enzyme recombinante purifiée à activité prolylpeptidasique est constituée par une cyclophiline modifiée au niveau de trois résidus d'acides aminés situés dans la partie du site actif peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomérase non-impliqué dans l'activité isomérase, qui
20 sont remplacés par une triade catalytique de type acide aminé basique, acide aminé acide et acide aminé nucléophile, telle que la triade sérine-histidine-acide aspartique.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ladite enzyme recombinante purifiée à activité prolylpeptidasique est constituée par une cyclophiline périplasmique issue d'*E. coli*, modifiée au niveau d'au moins l'un des rési-
25 dus en position 91, en position 104, en position 106 ou en position 122.

Conformément à cette disposition avantageuse, ladite cyclophiline périplasmique d'*Escherichia coli* modifiée comprend la substitution au niveau du résidu en position 91 d'une alanine (Ala ou A) par une sérine (Ser ou S), la substitution au niveau du résidu en position 104, d'une phénylalanine (Phe ou F) par une histidine
30 (His ou H), la substitution au niveau du résidu en position 106, d'une asparagine (Asn ou D) par un acide aspartique (Asp ou D) ; on obtient alors une cyclophiline mutée, dénommée cypIII (A91S-F104H-N106D) (SEQ ID N°4).

Conformément à l'invention, ladite cyclophiline modifiée comprend en outre, en position 122, la substitution d'une tyrosine (Tyr ou Y) par une histidine (His ou H) ; on obtient alors une cyclophiline modifiée, dénommée cypIV (A91S-F104H-N106D-Y122H) (SEQ ID N°6).

5 De manière surprenante, ces cyclophilines modifiées présentent une propriété nouvelle de prolypeptidase de type X-Pro, qui n'existe pas pour les endoprotéinases naturelles.

Bien qu'un très grand nombre d'hydrolases de spécificité variable partagent un motif catalytique commun, dénommé « triade catalytique », constitué de
10 trois résidus d'acides aminés (Serine, Histidine et Aspartate) qui adoptent une géométrie spatiale précise et que la structure tertiaire qui les porte puisse varier largement [18], il n'était pas évident que des cyclophilines ayant une activité peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomérase puissent être modifiées de telles sorte que cette triade se substitue à certains de ses aminoacides et que dans ce contexte, elles puissent effectivement
15 acquérir une fonction de prolypeptidase à fonction polyvalente. Cette triade confère aux dites cyclophilines modifiées, une réactivité chimique élevée, mobilisant le groupe hydroxyle de la sérine dont le caractère nucléophile est exacerbé par l'environnement hydrophobe du site actif et la présence des deux résidus His et Asp en relais.

La présente invention a également pour objet les séquences
20 nucléiques codant pour une enzyme recombinante purifiée à activité prolylpeptidasique, telle que définie ci-dessus.

De manière avantageuse, ladite séquence nucléique est susceptible d'être obtenue par une méthode comprenant :

(a) la mutagenèse dirigée d'une séquence d'ADN codant pour une
25 cyclophiline naturelle issue d'un procaryote ou d'un eucaryote,

(b) la production d'une banque de séquences d'ADN mutées obtenues en (a) et

(c) le criblage de ladite banque et la sélection des séquences codant pour une cyclophiline modifiée présentant à la fois une activité de prolylendopeptidase
30 et de prolylexopeptidase.

Conformément à cette méthode, la séquence selon l'étape (a) est une séquence d'ADN codant pour une cyclophiline naturelle, de préférence la séquence codant pour la cyclophiline périplasmique d'*E. coli* (SEQ ID N°1).

Également conformément à cette méthode, l'étape (a) de mutagenèse
5 dirigée est mise en œuvre en présence des nucléotides de séquences SEQ ID N° 7-12. On obtient notamment les séquences nucléiques SEQ ID N° 3 et SEQ ID N°5.

La présente invention a également pour objet un vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acide nucléique codant pour une enzyme recombinante purifiée à activité prolylpeptidasique constituée par une
10 cyclophiline modifiée selon l'invention.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit vecteur, il inclut un système d'expression comprenant en particulier une origine de réplication dans un microorganisme hôte approprié, notamment une bactérie ou une cellule eucaryote, éventuellement un gène dont l'expression permet la sélection soit des bactéries, soit des
15 cellules eucaryotes, transformées par ledit vecteur, une séquence régulatrice appropriée, notamment un promoteur convenable, un site de fixation aux ribosomes, optionnellement une séquence signal et une séquence nucléique telle que définie ci-dessus, lequel système est inséré dans une structure génétique appropriée, notamment choisie dans le groupe qui comprend des plasmides, des phages, des cosmides ou des chromo-
20 somes appropriés.

Conformément à l'invention, ladite structure génétique est de préférence un plasmide.

Lorsque la séquence nucléique comporte une séquence signal, elle est adaptée à la cellule hôte et est notamment choisie dans le groupe constitué par la
25 séquence signal CypP [7] ou la séquence signal Omp A (Swiss-Prot P02934, acides 1-21).

Lorsque la cellule hôte est une bactérie, telle qu'*E. coli*, la protéine est exprimée dans le cytoplasme, en l'absence de séquence signal ou est exportée dans le périplasme, en présence d'une des séquences signal précitées.

30 La présente invention a également pour objet une cellule hôte, transformée par un plasmide selon l'invention, notamment une bactérie telle qu'*E. coli*.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation desdites enzymes recombinantes dans une cellule hôte, caractérisé en ce qu'il comprend :

- (a) la transformation d'une cellule hôte appropriée par un vecteur d'expression, tel que défini ci-dessus,
- (b) l'expression d'une enzyme recombinante purifiée à activité prolylpeptidasique constituée par une cyclophiline modifiée selon l'invention et
- (c) la purification de l'enzyme recombinante obtenue.

La présente invention a également pour objet un réactif biologique, caractérisé en ce qu'il est constitué d'une prolylpeptidase selon l'invention.

La présente invention a également pour objet une méthode de caractérisation d'une protéine, caractérisée en ce qu'elle comprend la dégradation de la protéine à analyser à l'aide d'une prolylpeptidase selon l'invention, seule ou en combinaison avec d'autres réactifs de coupure des protéines et l'analyse des produits de dégradation par des techniques d'analyse telles que l'électrophorèse ou la chromatographie.

La présente invention a, en outre, pour objet l'application d'une cellule hôte transformée, telle que définie ci-dessus, à la bioconversion de produits agro-alimentaires.

Certains peptides utiles dans le domaine agro-alimentaire sont amers et leurs propriétés organoleptiques peuvent avantageusement être modifiées par action d'une prolylpeptidase selon l'invention.

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 oeuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 représente l'alignement structural des séquences de cyclophilines de structures tridimensionnelles connues ;
- la figure 2 illustre la localisation des mutations dans le gène de structure de la cyclophiline périplasmique d'*Escherichia coli*. A cette figure la séquence nucléotidique dans la région de la phase codante pour la cyclophiline est décrite ainsi que sa traduction (en majuscules). // désigne le site de coupure post-

traductionnel déduit du séquençage N-terminal de la protéine mature. Les modifications introduites par la mutagenèse sont indiquées en gras ainsi que les acides aminés correspondants ;

- la figure 3 illustre la détermination de l'efficacité catalytique de CypIII pour fa-AP. Cette figure montre la conversion de fa-AP en fa-A+P suivie par spectrophotométrie de différence sur une solution 1 mM fa-AP avec ou sans enzyme. Les spectres obtenus à 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75, 90 et 120 minutes de réaction sont présentés. La concentration initiale en fa-AP (S_0) est déterminée à 300 nm ($\epsilon=13500 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). La concentration en enzyme (E_t) est 13,6 ng/ml, soit 76.10^{-11} M . La pente de $\ln S=f(t)$ est de $0,49.10^6 \text{ s}^{-1}.\text{M}^{-1}$;

- la figure 4 illustre l'efficacité catalytique de CypIII sur la neurotoxine α du venin de serpent *Naja nigricollis*.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Exemple 1 : Préparation de séquences nucléiques codant pour des cyclophilines modifiées et expression des protéines modifiées.

La figure 1 présente l'alignement structural de trois séquences homologues : cyclophiline périplasmique (ECypP) et cytoplasmique (ECypC) d'*E. coli* et cyclophiline A humaine (hCypA). Les résidus du site actif de la hCypA et de l'ECypC sont définis comme étant ceux inclus dans une sphère de 10 Å centrée sur le carbonyle de la liaison amide X-Pro. Les aminoacides alignés avec ceux-ci dans ECypP sont considérés comme faisant partie du site actif.

Les éléments de structure secondaire conservés sont encadrés et les résidus homologues ombrés. En gras, sont indiqués les aminoacides situés dans le site actif et en négatif, les acides aminés soumis aux mutations.

- Production de séquences codant pour une cyclophiline d'*E. coli* périplasmique modifiée

Le plasmide pJLEC-2B [7] contenant le gène de structure codant pour ECypP a été utilisé pour une expérience de mutagenèse par cycles thermiques (18 cycles : 94°C, 30 secondes ; 45°C, 1 minute ; 68°C, 10 minutes) en présence de Pfu

DNA polymérase (méthode QuickChange®, Stratagene. USA). Les oligonucléotides utilisés sont les suivants :

A) SEQ ID N°7 : 5'P-AGC GGT ACG TGA CAT TGC GAT GGT GCC-3'OH

B) SEQ ID N°8 : 5'P-GGC ACC ATC GCA ATG TCA CGT ACC GCT-3'OH

5 C) SEQ ID N°9 : 5'P-GTT ATC GGC AAC GTC GAT GTG GAA CTG GCT GGT-3'OH

D) SEQ ID N°10 : 5'P-ACC AGC CAG TTC CAC ATC GAC GTT GCC GAT AAC-3'OH

E) SEQ ID N°11 : 5'P-ACC AAA TAC CGC GTG ACC GAA ATC ACG CTG-3'OH

10 et

F) SEQ ID N°12 : 5'P-CAG CGT GAT TTC GGT CAC GCG GTA TTT GGT-3'OH.

Après mutagenèse *in vitro* et transformation par choc thermique (30 minutes à 4°C, 45 secondes à 42°C et 30 minutes à 37°C) (Sambrook et al., Molecular Cloning, a laboratory manuel, 2nd Ed., CSH, 1989, pages 1.82-1.84) dans *E. coli* XL1-Blue, plusieurs clones résistants à l'ampicilline ont été isolés et les 573 pb du gène
15 séquencées. Deux clones, cIII et cIV, contenant respectivement les plasmides pECIII (contenant la séquence ID N°3) et pECIV (contenant la séquence ID N°5) ont été retenus sur la base de l'hydrolyse du fa-AP dans le milieu de culture et de la présence des mutations définies plus haut dans leur séquence. Les changements introduits dans
20 leurs séquences protéiques par les mutations nucléotidiques sont décrites dans la figure 2. Elles se résument de la façon suivante :

cypIII: A91S-F104H-N106D (SEQ ID N°4)

cypIV: A91S-F104H-N106D-Y122H (SEQ ID N°6)

- Construction des vecteurs exprimant CypIII et CypIV

25 Le vecteur de production de CypIII et de CypIV dérive directement de pJLEC-2B [Liu et al., 1990] en raison de la stratégie de mutagenèse utilisée qui ne requiert pas de changement de vecteur. Notamment, l'absence de séquence signal à l'extrémité N-terminale de ECypP se traduit par une accumulation cytoplasmique de la protéine recombinante. Le protocole de purification est décrit pour une culture d'un
30 litre.

La culture de cellules d'*Escherichia coli* MC1061, transformées par l'un ou l'autre des plasmides précédemment décrits (pECIII, pECIV), est conduite dans

le milieu LB à 37°C, 220 rpm en présence d'ampicilline à 100 mg/l jusqu'à une densité optique de 0,8. A ce stade, l'IPTG inducteur est ajouté à une concentration finale de 0,1 mM et la culture poursuivie pendant 6 à 8 heures. Les cellules sont alors collectées par centrifugation à 6000 g, 15 min., 4°C. Le culot est récupéré avec 20 ml d'un
5 tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,80 (tampon A). Les cellules sont ensuite lysées par 4 cycles de congélation-décongélation, dans l'azote liquide et au bain-marie à 37°C alternativement.

Si nécessaire, une étape à la presse d'Eaton peut être combinée tout en sachant que celle-ci utilisée seule ne donne pas lieu à une récupération quantitative
10 de l'enzyme, comme illustré au Tableau I ci-après.

L'essentiel des débris cellulaires est éliminé par une première précipitation au sulfate d'ammonium à 30 % de saturation. Après centrifugation à 12 000 g pendant 30 min., le surnageant est récupéré puis l'enzyme est précipitée par addition de sulfate d'ammonium jusqu'à 60 % de saturation. Une nouvelle centrifugation à 12 000 g
15 pendant 30 min. permet d'obtenir un culot enrichi en enzyme.

Celui-ci est repris dans 2 ml de tampon A et dialysé contre 3 X 1 litre du même tampon. La solution d'enzyme est ensuite déposée sur une colonne DEAE-Sephadex CL-6B (Pharmacia) équilibrée dans le tampon A. La protéine d'intérêt est contenue dans la fraction non retenue qui est collectée tandis que les contaminants
20 majeurs restent sur la résine. La solution d'enzyme est pure à environ 95% à cette étape, mais diluée (généralement 0.5-2 mg/ml). La concentration peut s'effectuer par lyophilisation ou centrifugation sur Centricon 10. Une purification ultime peut être effectuée par une étape chromatographique additionnelle de filtration sur un gel de type Sephadex G-50 ou Superose 12 (Pharmacia) ou par échange de cations sur gel -CM à
25 pH 7,50.

Exemple 2 : Propriétés enzymatiques de cypIII et cypIV

- Hydrolyse du dipeptide modifié chimiquement : furyl-actyloyl-Ala-Pro ou fa-AP

Le Tableau I illustre l'enrichissement réalisé à chaque étape du fractionnement et de la purification de CypIII et de Cyp IV, tels que mis en oeuvre à
30 l'exemple 1 (la méthode de mesure de l'activité est explicitée ci-après).

TABLEAU I

Etape de purification (pour un litre de culture bactérienne)	Cyp III		Cyp IV	
	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg)
extrait cytoplasmique (cngl./décgl.)	2262	0,75	1520	0,4
extrait cytoplasmique (cngl./décgl. +E press)	3741	1,2	3478	0,9
Précipitation sulfate d'ammonium 40-60%	1914	18	2068	23
DEAE-Sephacel (volume mort)	1827	61.10^3	1786	69.10^3
Lyophilisation	1690	-	1320	-
Superose 12	1131	87.10^3	983	94.10^3

- La réaction d'hydrolyse du substrat est suivie en continu au spectrophotomètre grâce au spectre différentiel entre fa-AP et le produit formé, le furyl-acryloyl-alanine. Une unité d'activité enzymatique (1 U) est définie comme le nombre de μ moles hydrolysées en 1 minute. En pratique, l'échantillon à tester est incubé pendant une heure à 37°C dans le mélange réactionnel suivant : 20 mM Hepes. 1 mM EDTA, 1 mM fa-AP, pH 7,80. A l'issue de cette incubation, l'échantillon est dilué 20 fois et dosé au spectrophotomètre double faisceau contre une solution 50 μ M fa-AP.
- La quantité de produit formé est estimée en utilisant une valeur de $\Delta\epsilon_{324}$ de $-2110 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ [21]. Une unité d'enzyme produit une différence d'absorbance de -0,127 en une heure.

- Il est apparu que la proline formée en cours de réaction se comporte comme un inhibiteur de la réaction. De plus, le K_m pour le substrat fa-AP apparaît élevé (de l'ordre de 1 à 5 mM suivant les milieux utilisées). Ces limitations n'autorisent pas la mesure individuelle des paramètres cinétiques V_m et K_m . Un traitement mathématique particulier des données doit être effectué pour accéder à l'efficacité enzymatique k_{cat}/K_m . Les mesures d'activité sont réalisées dans des conditions où la concentration en substrat est très inférieure au K_m , ce qui permet d'effectuer un traitement du

premier ordre. Dans ces conditions ($S \ll K_m$), l'équation de Michaelis et Menten peut se réduire à $v = (V_m \cdot S) / K_m$. Par intégration de $v = -dS/dt = k_{obs} \cdot t$, on obtient $\ln S = -k_{obs} \cdot t + \ln S_0$, et on peut donc tracer la droite $\ln S = f(t)$ dont la pente est égale à k_{obs} . On accède ensuite à k_{cat}/K_m puisque $k_{obs} = V_m/K_m = (k_{cat} \cdot E_t)/K_m$. La figure 3 présente les données brutes de conversion de fa-AP en fonction du temps ainsi que le graphe $\ln S = f(t)$. Les valeurs obtenues dans ces conditions pour CypIII et CypIV sont, respectivement, de 0,49 et 0,52. $106 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$.

Exemple 3 : Protéolyse et cartographie peptidique

Afin d'illustrer le champ d'applications possibles de cette protéase de spécificité nouvelle, une digestion enzymatique par CypIII d'une protéine de 61 résidus et de structure connue, la neurotoxine α du venin du serpent *Naja nigricollis*, a été réalisée. Sa séquence est la suivante :

LECHNQSSQPPTTKTCPGETNCKYKKVWRDHRGTIIERGCGCPTVKPGIKLNC
CTTDKCNN (SEQ ID N°13)

Elle contient 5 prolines (en gras) et quatre ponts disulfure (3-24, 17-41, 43-54, 55-60).

Les conditions opératoires sont les suivantes : 1 mg de toxine préalablement réduite et alkylée au N éthylmaléimide est incubée dans 5 ml de tampon Hepes 20 mM, pH 7,80, en présence de 10 μg de CypIII (0,11 μM finale) pendant 2 heures à 37°C. La solution est alors lyophilisée, puis reprise dans 100 μl d'acide acétique 10 %. Après centrifugation à 6000 g pendant 15 min., le surnageant est séparé par chromatographie liquide haute performance sur une colonne de phase inverse C 18 Bondapak (3 μ) équilibrée dans une solution eau/0,1 % TFA à un débit de 1 ml/min. L'élution est réalisée par un gradient de 0-100% du mélange eau/60 % acéto-
nitrile/0,1 % TFA en 60 minutes. Cinq pics majeurs, visibles à 220 nm (figure 4), ont été collectés et analysés (Tableau II).

TABLEAU II

pic n°	TR** HPLC (min.)	masse	Séq. N-terminale	fragment
1	22	1298	LECHNQSSQ	1-10*
2	24	2001	PGIKLNXXTD...	47-61*
3	27	3254	PGETNXKKVX...	18-42*
4	29	5661	PGETNXKKVX...	18-61*
5	33	3679	PGETNXKK...	18-47*

* positions dans la séquence

** TR = temps de rétention.

5 Le séquençage N-terminal par la méthode d'Edman ainsi que les mesures de masse de ces peptides confirment la spécificité de coupure X-Pro. Le site majeur de coupure au niveau de P18 est remarquable (3 produits sur 5). Ce résidu est situé dans le coude T2, à proximité des quatre ponts disulfure, et est relativement accessible au solvant dans la protéine native [22].

10 Néanmoins, il n'est pas attaqué par CypIII ou CypIV dans cette conformation native et la réduction est requise pour l'obtention d'une coupure à ce niveau. Il convient également de noter que dans le cas de l'enchaînement P11-P12, la coupure par CypIII se produit en amont de P11 (fragment 1-10). De nombreux autres fragments de faible abondance doivent également résulter de la protéolyse, comme en
15 témoignent les nombreux pics mineurs visibles sur le chromatogramme.

Il n'a toutefois pas été possible de procéder à leur caractérisation.

La possibilité d'effectuer, à l'aide des mutants de cyclophiline à activité protéinase, des digestions spécifiques en vue d'analyses biochimiques sur des protéines (cartographie de modifications post-traductionnelles, analyse topologique)
20 est ainsi démontrée.

Références

- [1] Galat A. et Metcalfe S., Prog. Biophys. Mol. Biol., 1995, **63**, 69-119.
[2] Schmid F.X., Mayr L.M., Mücke M. et Schönbrunner E.R., Adv- Prot. Chem.,
25 1993, **44**, 25-66.
[3] Friedman J.S. et Weissman I.L., Brevet US n° 5,447,852 (1993).
[4] Kawamukai M., Matsuda H., Fuji W., Utsumi R. et Komano T., J. Bacteriol., 1989,
171, 4525-4529.

- [5] Hayano T., Takahashi N., Kato S., Maki N. et Suzuki M., *Biochemistry*, 1991, **30**, 3041-3048.
- [6] Liu J., Albers M.W., Chen C.-M., Schreiber S.L. et Walsh C.T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, **87**, 2304-2308.
- 5 [7] Liu J. et Walsh C.T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, **87**, 4028-4032.
- [8] Clubb R.T., Ferguson S.B., Walsh C.T. et Wagner G., *Biochemistry*, 1994, **33**, 2761-2772.
- [9] Zhao Y. et Ke H., *Biochemistry*, 1996, **35**, 7356-7361.
- [10] Zhao Y. et Ke H., *Biochemistry*, 1996, **35**, 7362-7368.
- 10 [11] Wallace A.C., Laskowski R.A. et Thornton J.M., *Prot. Sci.*, 1996, **5**, 1001-1013.
- [12] Liu J., Chen C.-M. et Walsh C.T., *Biochemistry*, 1991, **30**, 2306-2310.
- [13] Zydowsky L.D., Etzkorn F.A., Chang H.Y., Ferguson S.B., Stolz L.A., Ho S.I. et Walsh C.T., *Prot. Sci.*, 1992, **1**, 1092-1099.
- [14] Creighton T.E., *Proteins: structures and molecular properties* (2nd ed.) Freeman
15 and Co., New York, 1993.
- [15] Kauffmana T. et Sobel J., *Justins Liebig's Ann.Chem.*, 1966, **698**, 235.
- [16] Ruttenberg M.A., King T.P. et Craig L.C., *Biochemistry*, 1965, **4**, 11.
- [17] Bairoch A., *Nucl. Acids Res.*, 1996, **24**, 221-222.
- [18] Ollis D.L., Cheah E., Cygler M., Dijkstra B., Frolow F., Franken S.M., Harel M.,
20 Remington S.J., Silman I., Schrag J., Sussman J.L., Verschueren K.H.G et Goldman
A., *Prot. Eng.*, 1992, **5**, 197-211.
- [19] Ke H., Mayrose D. et Cao W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**, 3324-3328.
- [20] Konno M., Ito M., Hayano T. et Takahashi N., *J. Mol. Biol.*, 1996, **256**, 897-908.
- [21] Plummer, T.H. et Kimmel, M.T., *Anal. Biochem.*, 1980, **108**, 348-353.
- 25 [22] Zinn-Justin S., Roumestand C., Gilquin B., Bontems F., Menez A. et Toma F.,
Biochemistry, 1992, **31**, 11335-11347.

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

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
- (B) RUE: 31-33 RUE DE LA FEDERATION
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75015

(ii) TITRE DE L'INVENTION: CYCLOPHILINES MODIFIEES, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET LEURS APPLICATIONS.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 12

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D'EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1: Séquence codant pour l'ECypP

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 657 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLACEMENT: 157..656

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

```
CGCAAACCGC CTCTCCCCGC GCGTTGGCCG ATTCATTAAT GCAGATTCTG AAATGAGCTG 60
TTGACAATTA ATCATCGGCT CGTATAATGT GTGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTTTACA 120
CAGGAAACAG AATTCTAGGA GGAATACTTA ATGGCA GCG AAA GGG GAC CCG CAC 174
                                   Ala Lys Gly Asp Pro His
                                   1 5
GTA TTG TTG ACA ACC TCA GCT GGT AAC ATC GAA CTG GAG CTG GAT AAA 222
Val Leu Leu Thr Thr Ser Ala Gly Asn Ile Glu Leu Glu Leu Asp Lys
              10 15 20
CAA AAA GCG CCA GTG TCT GTG CAA AAC TTT GTC GAT TAT GTG AAC AGC 270
Gln Lys Ala Pro Val Ser Val Gln Asn Phe Val Asp Tyr Val Asn Ser
              25 30 35
GGT TTT TAT AAC AAC ACT ACC TTT CAC CGC GTC ATT CCT GGC TTT ATG 318
Gly Phe Tyr Asn Asn Thr Thr Phe His Arg Val Ile Pro Gly Phe Met
              40 45 50
```

```

ATT CAG GGC GGC GGT TTC ACC GAG CAG ATG CAG CAG AAA AAA CCA AAC 366
Ile Gln Gly Gly Gly Phe Thr Glu Gln Met Gln Gln Lys Lys Pro Asn
55 60 65 70

CCG CCA ATC AAA AAT GAA GCC GAT AAC GGC CTG CGC AAC ACG CGT GGC 414
Pro Pro Ile Lys Asn Glu Ala Asp Asn Gly Leu Arg Asn Thr Arg Gly
75 80 85

ACC ATC GCG ATG GCA CGT ACC GCT GAC AAA GAC AGC GCC ACC AGC CAG 462
Thr Ile Ala Met Ala Arg Thr Ala Asp Lys Asp Ser Ala Thr Ser Gln
90 95 100

TTC TTT ATC AAC GTT GCC GAT AAC GCC TTC CTT GAC CAT GGT CAG CGT 510
Phe Phe Ile Asn Val Ala Asp Asn Ala Phe Leu Asp His Gly Gln Arg
105 110 115

GAT TTC GGT TAC GCG GTA TTT GGT AAA GTG GTG AAA GGC ATG GAC GTT 558
Asp Phe Gly Tyr Ala Val Phe Gly Lys Val Val Lys Gly Met Asp Val
120 125 130

GCC GAT AAG ATT TCC CAG GTG CCG ACT CAT GAC GTT GGT CCG TAC CAG 606
Ala Asp Lys Ile Ser Gln Val Pro Thr His Asp Val Gly Pro Tyr Gln
135 140 145 150

AAT GTG CCG TCA AAA CCG GTA GTT ATC CTT TCC GCT AAA GTC CTG CCG TAA 657
Asn Val Pro Ser Lys Pro Val Val Ile Leu Ser Ala Lys Val Leu Pro
155 160 165

```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2: ECypP

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 166 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

```

Ala Lys Gly Asp Pro His Val Leu Leu Thr Thr Ser Ala Gly Asn Ile
1 5 10 15

Glu Leu Glu Leu Asp Lys Gln Lys Ala Pro Val Ser Val Gln Asn Phe
20 25 30

Val Asp Tyr Val Asn Ser Gly Phe Tyr Asn Asn Thr Thr Phe His Arg
35 40 45

Val Ile Pro Gly Phe Met Ile Gln Gly Gly Gly Phe Thr Glu Gln Met
50 55 60

Gln Gln Lys Lys Pro Asn Pro Pro Ile Lys Asn Glu Ala Asp Asn Gly
65 70 75 80

Leu Arg Asn Thr Arg Gly Thr Ile Ala Met Ala Arg Thr Ala Asp Lys
85 90 95

Asp Ser Ala Thr Ser Gln Phe Phe Ile Asn Val Ala Asp Asn Ala Phe
100 105 110

```

Leu Asp His Gly Gln Arg Asp Phe Gly Tyr Ala Val Phe Gly Lys Val
 115 120 125

Val Lys Gly Met Asp Val Ala Asp Lys Ile Ser Gln Val Pro Thr His
 130 135 140

Asp Val Gly Pro Tyr Gln Asn Val Pro Ser Lys Pro Val Val Ile Leu
 145 150 155 160

Ser Ala Lys Val Leu Pro
 165

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3: Séquence codant pour cypIII

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 657 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLEMENT: 157..656

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

CGCAAACCGC CTCTCCCCGC GCGTTGGCCG ATTCATTAAT GCAGATTCTG AAATGAGCTG	60
TTGACAATTA ATCATCGGCT CGTATAATGT GTGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTTTACA	120
CAGGAAACAG AATTCTAGGA GGAATACTTA ATGGCA GCG AAA GGG GAC CCG CAC	174
Ala Lys Gly Asp Pro His	5
GTA TTG TTG ACA ACC TCA GCT GGT AAC ATC GAA CTG GAG CTG GAT AAA	222
Val Leu Leu Thr Thr Ser Ala Gly Asn Ile Glu Leu Glu Leu Asp Lys	10 15 20
CAA AAA GCG CCA GTG TCT GTG CAA AAC TTT GTC GAT TAT GTG AAC AGC	270
Gln Lys Ala Pro Val Ser Val Gln Asn Phe Val Asp Tyr Val Asn Ser	25 30 35
GGT TTT TAT AAC AAC ACT ACC TTT CAC CGC GTC ATT CCT GGC TTT ATG	318
Gly Phe Tyr Asn Asn Thr Thr Phe His Arg Val Ile Pro Gly Phe Met	40 45 50
ATT CAG GGC GGC GGT TTC ACC GAG CAG ATG CAG CAG AAA AAA CCA AAC	366
Ile Gln Gly Gly Gly Phe Thr Glu Gln Met Gln Gln Lys Lys Pro Asn	55 60 65 70
CCG CCA ATC AAA AAT GAA GCC GAT AAC GGC CTG CGC AAC ACG CGT GGC	414
Pro Pro Ile Lys Asn Glu Ala Asp Asn Gly Leu Arg Asn Thr Arg Gly	75 80 85
ACC ATC GCA ATG TCA CGT ACC GCT GAC AAA GAC AGC GCC ACC AGC CAG	462
Thr Ile Ala Met Ser Arg Thr Ala Asp Lys Asp Ser Ala Thr Ser Gln	90 95 100

```

TTC CAC ATC GAC GTT GCC GAT AAC GCC TTC CTT GAC CAT GGT CAG CGT      510
Phe His Ile Asp Val Ala Asp Asn Ala Phe Leu Asp His Gly Gln Arg
      105                      110                      115

GAT TTC GGT TAC GCG GTA TTT GGT AAA GTG GTG AAA GGC ATG GAC GTT      558
Asp Phe Gly Tyr Ala Val Phe Gly Lys Val Val Lys Gly Met Asp Val
      120                      125                      130

GCC GAT AAG ATT TCC CAG GTG CCG ACT CAT GAC GTT GGT CCG TAC CAG      606
Ala Asp Lys Ile Ser Gln Val Pro Thr His Asp Val Gly Pro Tyr Gln
      135                      140                      145                      150

AAT GTG CCG TCA AAA CCG GTA GTT ATC CTT TCC GCT AAA GTC CTG CCG TAA 657
Asn Val Pro Ser Lys Pro Val Val Ile Leu Ser Ala Lys Val Leu Pro
      155                      160                      165

```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4: cypIII

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 166 acides aminé

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

```

Ala Lys Gly Asp Pro His Val Leu Leu Thr Thr Ser Ala Gly Asn Ile
 1              5              10              15

Glu Leu Glu Leu Asp Lys Gln Lys Ala Pro Val Ser Val Gln Asn Phe
      20              25              30

Val Asp Tyr Val Asn Ser Gly Phe Tyr Asn Asn Thr Thr Phe His Arg
      35              40              45

Val Ile Pro Gly Phe Met Ile Gln Gly Gly Gly Phe Thr Glu Gln Met
      50              55              60

Gln Gln Lys Lys Pro Asn Pro Pro Ile Lys Asn Glu Ala Asp Asn Gly
      65              70              75              80

Leu Arg Asn Thr Arg Gly Thr Ile Ala Met Ser Arg Thr Ala Asp Lys
      85              90              95

Asp Ser Ala Thr Ser Gln Phe His Ile Asp Val Ala Asp Asn Ala Phe
      100              105              110

Leu Asp His Gly Gln Arg Asp Phe Gly Tyr Ala Val Phe Gly Lys Val
      115              120              125

Val Lys Gly Met Asp Val Ala Asp Lys Ile Ser Gln Val Pro Thr His
      130              135              140

Asp Val Gly Pro Tyr Gln Asn Val Pro Ser Lys Pro Val Val Ile Leu
      145              150              155              160

Ser Ala Lys Val Leu Pro
      165

```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5: séquence codant pour cypIV

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 657 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLACEMENT: 157..656

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CGCAAACCGC CTCTCCCCGC GCGTTGGCCG ATTCATTAAT GCAGATTCTG AAATGAGCTG	60
TTGACAATTA ATCATCGGCT CGTATAATGT GTGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTTACACA	120
CAGGAAACAG AATTCTAGGA GGAATACTTA ATGGCA GCG AAA GGG GAC CCG CAC	174
Ala Lys Gly Asp Pro His	5
1	
GTA TTG TTG ACA ACC TCA GCT GGT AAC ATC GAA CTG GAG CTG GAT AAA	222
Val Leu Leu Thr Thr Ser Ala Gly Asn Ile Glu Leu Glu Leu Asp Lys	20
10	15
CAA AAA GCG CCA GTG TCT GTG CAA AAC TTT GTC GAT TAT GTG AAC AGC	270
Gln Lys Ala Pro Val Ser Val Gln Asn Phe Val Asp Tyr Val Asn Ser	35
25	30
GGT TTT TAT AAC AAC ACT ACC TTT CAC CGC GTC ATT CCT GGC TTT ATG	318
Gly Phe Tyr Asn Asn Thr Thr Phe His Arg Val Ile Pro Gly Phe Met	50
40	45
ATT CAG GGC GGC GGT TTC ACC GAG CAG ATG CAG CAG AAA AAA CCA AAC	366
Ile Gln Gly Gly Gly Phe Thr Glu Gln Met Gln Gln Lys Lys Pro Asn	70
55	60
CCG CCA ATC AAA AAT GAA GCC GAT AAC GGC CTG CGC AAC ACG CGT GGC	414
Pro Pro Ile Lys Asn Glu Ala Asp Asn Gly Leu Arg Asn Thr Arg Gly	85
75	80
ACC ATC GCA ATG TCA CGT ACC GCT GAC AAA GAC AGC GCC ACC AGC CAG	462
Thr Ile Ala Met Ser Arg Thr Ala Asp Lys Asp Ser Ala Thr Ser Gln	100
90	95
TTC CAC ATC GAC GTT GCC GAT AAC GCC TTC CTT GAC CAT GGT CAG CGT	510
Phe His Ile Asp Val Ala Asp Asn Ala Phe Leu Asp His Gly Gln Arg	115
105	110
GAT TTC GGT CAC GCG GTA TTT GGT AAA GTG GTG AAA GGC ATG GAC GTT	558
Asp Phe Gly His Ala Val Phe Gly Lys Val Val Lys Gly Met Asp Val	130
120	125
GCC GAT AAG ATT TCC CAG GTG CCG ACT CAT GAC GTT GGT CCG TAC CAG	606
Ala Asp Lys Ile Ser Gln Val Pro Thr His Asp Val Gly Pro Tyr Gln	150
135	140
	145

AAT GTG CCG TCA AAA CCG GTA GTT ATC CTT TCC GCT AAA GTC CTG CCG TAA 657
 Asn Val Pro Ser Lys Pro Val Val Ile Leu Ser Ala Lys Val Leu Pro
 155 160 165

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6: cypIV

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 166 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

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

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 27 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

22

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

AGCGGTACGT GACATTGCGA TGGTGCC

27

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 27 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GGCACCATCG CAATGTCACG TACCGCT

27

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

GTTATCGGCA ACGTCGATGT GGAACGGCT GGT

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

ACCAGCCAGT TCCACATCGA CGTTGCCGAT AAC

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

ACCAAATACC GCGTGACCGA AATCAGCTG

30

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

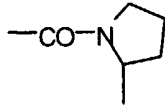
(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

CAGCGTGATT TCGGTCACGC GGTATTTGGT

30

REVENDEICATIONS

1°) Enzyme recombinante purifiée à activité prolylpeptidasique, caractérisée en ce qu'elle présente la séquence d'une cyclophiline modifiée par substitution d'au moins un résidu d'acide aminé du site actif peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomérase, inclus dans une sphère de 10 Å centrée sur le carbonyle de la liaison amide



et non impliqué dans l'activité isomérase, par un autre résidu d'acide aminé et en ce qu'elle présente à la fois une activité de prolylendopeptidase ou de prolylendoprotéinase et une activité de prolylexopeptidase aussi bien en position N-terminale, qu'en position C-terminale, vis-à-vis des substrats peptidiques et protéiques.

2°) Enzyme recombinante purifiée à activité prolylpeptidasique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle présente une activité spécifique supérieure à 10^2 U/mg de furyl-acryloyl-alanyl-proline (fa-AP) et un K_m compris entre 0,1 et 10 mM, une température optimale d'activité de 35-40°C et un pH optimal d'activité compris entre 6 et 8.

3°) Enzyme recombinante purifiée à activité prolylpeptidasique selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une cyclophiline modifiée cytosolique, d'origine bactérienne ou animale.

4°) Enzyme recombinante purifiée à activité prolylpeptidasique selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une cyclophiline modifiée d'origine bactérienne, issue d'*E. coli* ou d'origine humaine.

5°) Enzyme recombinante purifiée à activité prolylpeptidasique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une cyclophiline modifiée au niveau d'un seul résidu d'acide aminé, situé dans la partie du site actif peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomérase, non-impliqué dans l'activité isomérase, qui est remplacé par un acide aminé nucléophile, tel que la sérine ou la cystéine.

6°) Enzyme recombinante purifiée à activité prolylpeptidasique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une cyclophiline modifiée au niveau de trois résidus d'acides aminés situés dans la partie du site actif peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomérase, non-impliqué dans l'activité isomérase,

qui sont remplacés par une triade catalytique de type aminoacide basique, aminoacide acide et aminoacide nucléophile telle que la triade sérine-histidine-acide aspartique.

7°) Enzyme recombinante purifiée à activité prolylpeptidasique selon la revendication 5 ou la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une cyclophiline périplasmique d'*E. coli*, modifiée au niveau d'au moins l'un des résidus en position 91, en position 104, en position 106 ou en position 122.

8°) Enzyme recombinante purifiée à activité prolylpeptidasique selon la revendication 7, caractérisée en ce que ladite cyclophiline périplasmique d'*Escherichia coli* modifiée comprend la substitution au niveau du résidu en position 91 d'une alanine (Ala ou A) par une sérine (Ser ou S), la substitution au niveau du résidu en position 104, d'une phénylalanine (Phe ou F) par une histidine (His ou H), la substitution au niveau du résidu en position 106, d'une asparagine (Asn ou D) par un acide aspartique (Asp ou D) (SEQ ID N°4).

9°) Enzyme recombinante purifiée à activité prolylpeptidasique selon la revendication 8, caractérisée en ce que ladite cyclophiline périplasmique d'*Escherichia coli* modifiée comprend en outre, en position 122, la substitution d'une tyrosine (Tyr ou Y) par une histidine (His ou H) (SEQ ID N°6).

10°) Séquence nucléique codant pour une enzyme recombinante purifiée à activité prolylpeptidasique constituée par une cyclophiline modifiée selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

11°) Séquence nucléique selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par une méthode comprenant :

(a) la mutagenèse dirigée d'une séquence d'ADN codant pour une cyclophiline naturelle issue d'un procaryote ou d'un eucaryote,

(b) la production d'une banque de séquences d'ADN mutées obtenues en (a) et

(c) le criblage de ladite banque et la sélection des séquences codant pour cyclophiline modifiée présentant à la fois une activité de prolylendopeptidase et de prolylexopeptidase.

12°) Séquence nucléique selon la revendication 11, caractérisée en ce que la séquence selon l'étape (a) est une séquence d'ADN codant pour une cyclo-

philine naturelle, de préférence la séquence codant pour la cyclophiline périplasmique d'*E. coli* (SEQ ID N°1).

13°) Séquence nucléique selon la revendication 11 ou la revendication 12, caractérisée en ce que l'étape (a) de mutagenèse dirigée est mise en œuvre en présence des nucléotides de séquences SEQ ID N° 7-12.

14°) Séquence nucléique selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, caractérisée en ce qu'elle est constituée par la séquence nucléique SEQ ID N° 3 ou la séquence nucléique SEQ ID N°5.

15°) Vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acide nucléique codant pour une enzyme recombinante purifiée à activité prolylpeptidasique constituée par une cyclophiline modifiée selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

16°) Vecteur d'expression selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il inclut un système d'expression comprenant en particulier une origine de répllication dans un microorganisme hôte approprié, notamment une bactérie ou une cellule eucaryote, éventuellement un gène dont l'expression permet la sélection soit des bactéries, soit des cellules eucaryotes, transformées par ledit vecteur, une séquence régulatrice appropriée, notamment un promoteur convenable, un site de fixation aux ribosomes, optionnellement une séquence signal et une séquence nucléique selon l'une quelconque des revendications 10 à 14, lequel système est inséré dans une structure génétique appropriée, notamment choisie dans le groupe qui comprend des plasmides, des phages, des cosmides ou des chromosomes appropriés.

17°) Cellule hôte, transformée par un vecteur selon la revendication 15 ou la revendication 16, notamment une bactérie telle qu'*E. coli*.

18°) Procédé de préparation d'une enzyme recombinante purifiée à activité prolylpeptidasique dans une cellule hôte, caractérisé en ce qu'il comprend :

(a) la transformation d'une cellule hôte appropriée par un vecteur d'expression, selon la revendication 15 ou la revendication 16,

(b) l'expression de l'enzyme recombinante purifiée à activité prolylpeptidasique constituée par une cyclophiline modifiée selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 et

(c) la purification de l'enzyme recombinante à activité prolylpeptidasique obtenue.

19°) Réactif biologique, caractérisé en ce qu'il est constitué par une enzyme recombinante purifiée à activité prolylpeptidasique selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

20°) Méthode de caractérisation d'une protéine, caractérisée en ce qu'elle comprend la dégradation de la protéine à analyser à l'aide d'une enzyme recombinante purifiée à activité prolylpeptidasique selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, seule ou en combinaison avec d'autres réactifs de coupure des protéines et l'analyse des produits de dégradation obtenus par des techniques d'analyse appropriées, telles que l'électrophorèse ou la chromatographie.

21°) Application d'une cellule hôte selon la revendication 17 à la bio-conversion de produits agro-alimentaires.

1/4

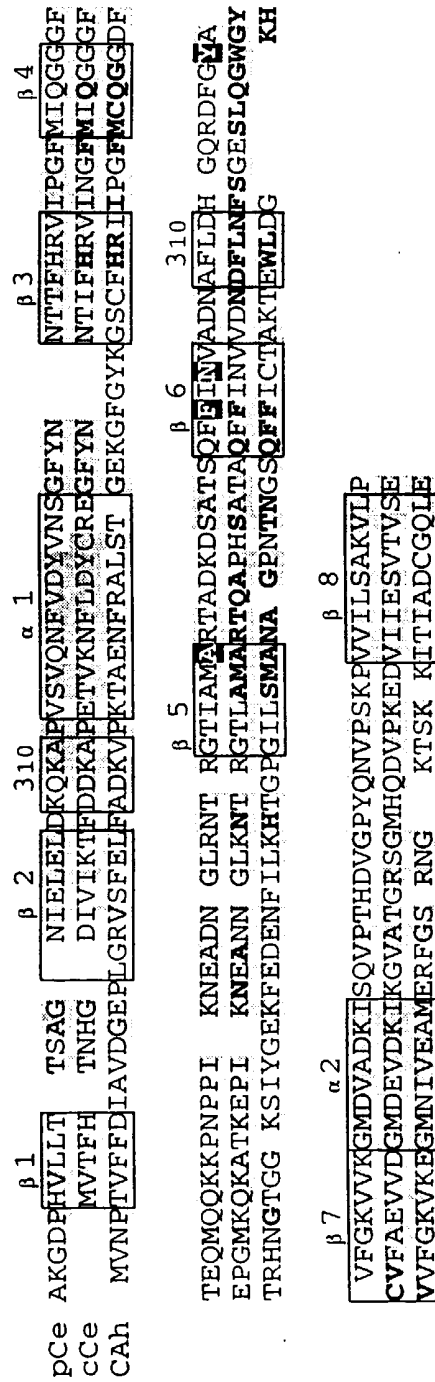


FIGURE 1

2/4

2013 (-35) tac promoter
cgcaaaccgcctctccccgcggttggccgattcattaatgcagattctgaaatgagctgttgacaattaatcatcggc

TATAbox(-10) +1(mRNA) RBS
tcgtataatgtgtgggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagaattctaggaggaaatactta ATG GCA
M A //

2169/1 2228/20
GCG AAA GGG GAC CCG CAC GTA TTG TTG ACA ACC TCA GCT GGT AAC ATC GAA CTG GAG CTG
A K G D P H V L L T T S A G N I E L E L

2229/21 2288/40
GAT AAA CAA AAA GCG CCA GTG TCT GTG CAA AAC TTT GTC GAT TAT GTG AAC AGC GGT TTT
D K Q K A P V S V Q N F V D Y V N S G F

2289/41 2348/60
TAT AAC AAC ACT ACC TTT CAC CGC GTC ATT CCT GGC TTT ATG ATT CAG GGC GGC GGT TTC
Y N N T T F H R V I P G F M I Q G G G F

2349/61 2408/80
ACC GAG CAG ATG CAG CAG AAA AAA CCA AAC CCG CCA ATC AAA AAT GAA GCC GAT AAC GGC
T E Q M Q Q K K P N P P I K N E A D N G

2409/81 2468/100
CTG CGC AAC ACG CGT GGC ACC ATC GCG ATG GCA CGT ACC GCT GAC AAA GAC AGC GCC ACC
L R N T R G T I A M A R T A D K D S A T
GCA TCA
A S₉₁

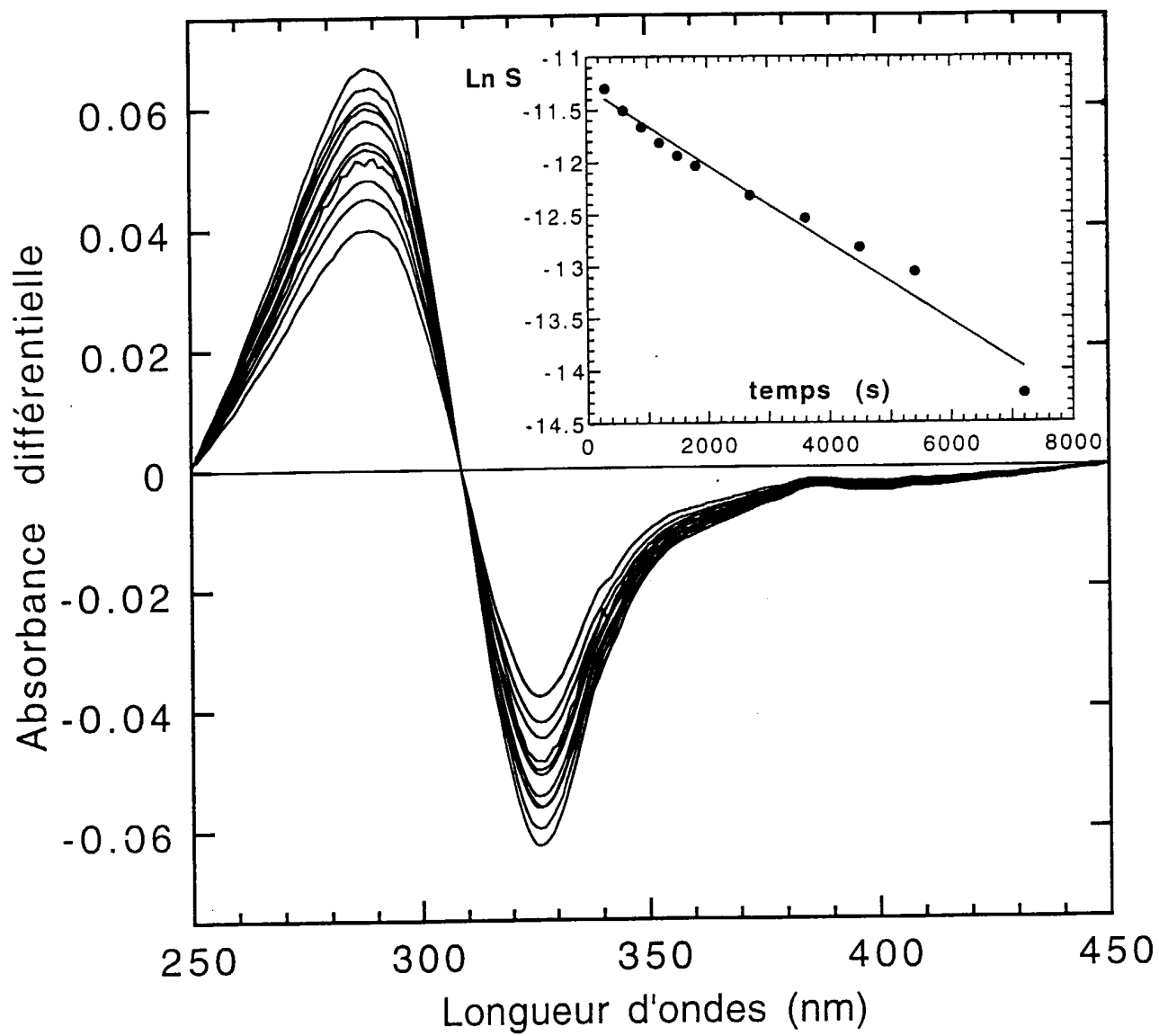
2469/101 2528/120
AGC CAG TTC TTT ATC AAC GTT GCC GAT AAC GCC TTC CTT GAC CAT GGT CAG CGT GAT TTC
S Q F F I N V A D N A F L D H G Q R D F
CAC GAC
H₁₀₄ D₁₀₆

2529/121 2588/140
GGT TAC GCG GTA TTT GGT AAA GTG GTG AAA GGC ATG GAC GTT GCC GAT AAG ATT TCC CAG
G Y A V F G K V V K G M D V A D K I S Q
CAC
H₁₂₂

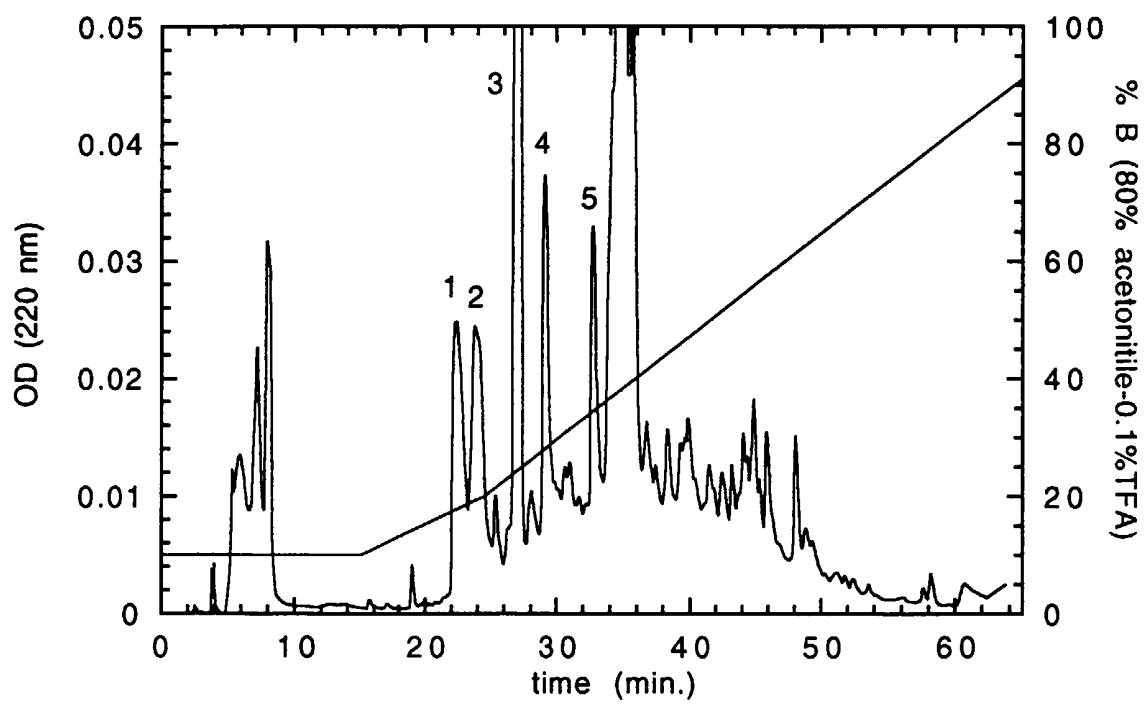
2589/141 2648/160
GTG CCG ACT CAT GAC GTT GGT CCG TAC CAG AAT GTG CCG TCA AAA CCG GTA GTT ATC CTT
V P T H D V G P Y Q N V P S K P V V I L

2649/161 2666/166
TCC GCT AAA GTC CTG CCG taa
S A K V L P stop

FIGURE 2

FIGURE 3

4/4

FIGURE 4

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement
nationalFA 542288
FR 9704391

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	GOETHEL, SVEN F. ET AL: "Peptidyl-Prolyl Cis-trans Isomerase of Bacillus subtilis: Identification of Residues Involved in Cyclosporin A Affinity and Catalytic Efficiency" BIOCHEMISTRY (1996), 35(11), 3636-40 CODEN: BICHAW;ISSN: 0006-2960, 1996, XP002052301 * figure 1 *	8,9
A	EP 0 413 440 A (TONEN CORP) * revendications 6-15 *	4,12
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 118, no. 17, 26 avril 1993 Columbus, Ohio, US; abstract no. 164109, ZYDOWSKY, LYNNE D. ET AL: "Active site mutants of human cyclophilin A separate peptidyl-prolyl isomerase activity from cyclosporin A binding and calcineurin inhibition" XP002052303 * abrégé *	
D	& PROTEIN SCI. (1992), 1(9), 1092-9 CODEN: PRCIEI, 1992,	
D,A	J. LIU ET AL: "Human and Escherichia coli cyclophilins: Sensitivity to inhibition by the immunosuppressant cyclosporin A correlates with a specific tryptophan residue" BIOCHEMISTRY, vol. 30, 1991, pages 2306-2310, XP002052302	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C12N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
16 janvier 1998		Van der Schaal, C
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		