

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
20 octobre 2005 (20.10.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/098017 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C12P 21/06, G01N 33/50, 33/53

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/000692

(22) Date de dépôt international : 22 mars 2005 (22.03.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
04 02905 22 mars 2004 (22.03.2004) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 rue Michel Ange, F-75016 PARIS (FR). ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN [FR/FR]; 61 avenue du Président Wilson, F-94235 CACHAN Cedex (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : BUCKLE, Malcolm [GB/FR]; 36 rue des Augustins, F-92160 ANTONY (FR).

(74) Mandataires : CORIZZI, Valérie etc.; CABINET ORES, 36 rue de Saint Petersburg, F-75008 PARIS (FR).

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

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

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

(54) Title: METHOD FOR PRODUCTION OF PEPTIDE BANKS

(54) Titre : PROCEDE DE PRODUCTION DE BANQUES DE PEPTIDES

(57) Abstract: The invention relates to a method for production of peptide banks, by the splitting/cleavage of cellular proteins, peptide banks obtained by said method and a method for screening peptides having an affinity for an immobilised target molecule.

(57) Abrégé : Procédé de production de banques de peptides par coupure/clivage de protéines cellulaires. Banques de peptides obtenues par ce procédé. Procédé de criblage de peptides ayant une affinité pour une molécule cible immobilisée.



WO 2005/098017 A1

PROCEDE DE PRODUCTION DE BANQUES DE PEPTIDES

La présente invention est relative à un procédé de production de banques de peptides par coupure/clivage de protéines cellulaires, aux banques de peptides obtenues par ce procédé et à un procédé de criblage de peptides issus de cette banque ayant une affinité pour une molécule cible immobilisée.

La pharmacologie thérapeutique a notamment pour objectif de découvrir de nouvelles molécules qui interviennent dans les processus cellulaires et métaboliques. La plupart de ces processus impliquent des interactions macromoléculaires, comme par exemple, des interactions protéine-protéine et protéine-acide nucléique. Ces interactions elles-mêmes sont fondamentales pour le métabolisme des cellules et sont donc impliquées dans des processus cellulaires normaux ou pathologiques aussi divers que la prolifération, la différenciation, l'oncologie, la croissance, l'immunodéficience et la sénescence.

La recherche de nouveaux principes actifs implique généralement la connaissance d'une ou de plusieurs cibles biologiques et la recherche de molécules susceptibles de se lier à ces cibles. Cette seconde étape nécessite d'avoir recours, soit à la conception de molécules par modélisation moléculaire, soit au criblage du plus grand nombre possible de molécules afin d'optimiser les chances de trouver une molécule ayant l'activité souhaitée. Ensuite, la molécule qui s'est fixée sur la cible est analysée et l'interaction est quantifiée.

L'analyse des partenaires protéiques dans les complexes macromoléculaires est classiquement effectuée par des techniques de protéomique, notamment par l'analyse électrophorétique sur gel 2D, et l'identification de ces protéines est réalisée ultérieurement par spectrométrie de masse.

Les technologies émergentes comme la spectrométrie de masse de type SELDI (« *surface enhanced laser desorption/ionisation* ») et les puces à protéines (ProteinChipTM) peuvent remplacer l'analyse sur gel 2D pour l'étude des protéines ; elles présentent l'avantage de mettre en évidence la fonctionnalité des interactions dans les complexes macromoléculaires.

Or, ces techniques en protéomique, qui ont pour but la caractérisation du protéome (contenu total en protéines d'une cellule) à un instant donné, ne possèdent ni la résolution, ni la sensibilité requises pour identifier une protéine dans un mélange à une concentration d'environ quelques femtomoles dans une centaine de microlitres d'extraits cellulaires (concentration finale inférieure à la

pico mole). En effet, les gels 2D permettent au mieux de visualiser 10.000 protéines - soit les protéines les plus nombreuses dans une cellule – c'est-à-dire un nombre restreint de protéines présentes. Par conséquent, les protéines existant en faible quantité ne seront pas détectées. Ce problème est accentué par le fait que les techniques d'isolement et de préparation des complexes multi-protéiques utilisés
5 préalablement à l'analyse souvent endommagent ou même détruisent ceux-ci.

Dans le domaine de la recherche de nouvelles molécules à potentiel thérapeutique, il existe un besoin réel de définir les peptides qui sont impliqués dans des interactions biologiques. La fixation des peptides sur les cibles protéiques est
10 déterminée couramment par les techniques physico-chimiques classiques (pontage, fluorescence, SPR, ELISA, RIA). Les effets inhibiteurs des peptides sont caractérisés par des essais *in vitro* basés sur une éventuelle mise en évidence d'un effet non compétitif (souhaitable) ou compétitif (moins souhaitable) de ces peptides par rapport à la protéine cible. Les peptides présentant une forte affinité et/ou un effet inhibiteur
15 sont alors sélectionnés pour être testés au cours de la phase d'essais cliniques.

Les techniques énumérées ci-dessus présentent comme inconvénients d'être laborieuses, surtout si un nombre important de peptides doit être analysé ; elles engendrent des artefacts comme des faux-positifs ou des faux-négatifs ; elles sont non-quantitatives. De plus, elles nécessitent souvent de marquer les
20 molécules par radioactivité ou fluorescence et sont souvent d'une sensibilité inadéquate (ELISA, Biacore ®, RIA). Il en résulte que la proportion de peptides identifiés comme inhibiteurs qui sont ultérieurement soumis aux essais cliniques reste très faible, en grande partie parce que ces peptides présentent souvent des effets inhibiteurs non souhaités. En outre, la synthèse puis le marquage de peptides sont des
25 opérations longues et coûteuses.

Des études antérieures ont montré qu'il était possible d'isoler et d'identifier des protéines spécifiques en faible quantité dans des échantillons biologiques grâce à l'utilisation de la technique dite de résonance des plasmons de surface (SPR) couplée à la spectrométrie de masse (MS) (A. Zhukov *et al.*,
30 PharmaGenomics, March/April 2002). Les Auteurs de cet article précisent que l'association en tandem des techniques SPR et MS permet de fournir sur les protéines cibles des informations aussi bien fonctionnelles que structurales. Cette démarche a permis d'isoler la calmoduline à partir d'extraits de cerveau bovin et de caractériser l'affinité de la calmoduline pour un fragment de myosine. Les auteurs de cet article
35 indiquent que la technique SPR permet de déterminer en temps réel la spécificité de liaison, la concentration des molécules biologiquement actives dans un échantillon,

ainsi que les cinétiques de liaison et d'affinité protéine/peptide. Le couplage SPR/MS a pour avantage de permettre de s'affranchir de tout marquage des molécules de l'analyte par un élément fluorescent ou radioactif. De cette manière, il est possible de réduire les risques d'altération de la structure et de l'activité des molécules à analyser, et de ne pas s'exposer aux problèmes inhérents aux techniques de fluorescence et de spectrométrie. Toutefois dans le procédé décrit dans cet article, le problème posé était l'isolement d'une molécule à partir d'un échantillon biologique brut.

Le problème que la présente invention cherche à résoudre est celui de la préparation d'une banque de peptides à caractère aléatoire en vue de réaliser un criblage sur des cibles d'intérêt biologique.

Les banques de peptides produites jusqu'à ce jour étaient généralement préparées par synthèse chimique ou par la technique dite de « présentation des phages », qui sont des techniques extrêmement coûteuses. Si ces voies permettent de préparer des peptides de séquence aléatoire, elles présentent un coût trop élevé pour permettre l'utilisation des banques de peptides en résultant de façon systématique. Lorsqu'une cible biologique est identifiée et isolée, on a plus généralement recours à des expériences de modélisation moléculaire de façon à définir le profil général des molécules susceptibles d'avoir une affinité pour cette cible, puis à la synthèse de molécules correspondant à ce profil général et enfin à des tests biologiques sur la cible. Cette démarche n'a pas le caractère systématique du criblage de banques de molécules engendrées de façon aléatoire. On a donc cherché à mettre au point un procédé de préparation d'une banque de peptides qui permette d'accéder à un mélange de peptides variés, à caractère aléatoire, et qui soit suffisamment économique pour permettre son utilisation dans les expériences de routine.

Une cellule humaine possède un génome qui contient un nombre limité de gènes (environ 40.000), mais elle est capable de générer plus d'un million de protéines différentes grâce au système d'épissage alternatif, aux modifications post-traductionnelles et à la variabilité de repliement des protéines. L'invention se propose donc d'utiliser la grande richesse protéique de la cellule pour construire des banques de peptides.

La présente invention a pour objet un procédé de production d'une banque de peptides, caractérisé en ce que :

- (i) le produit de départ est une ou plusieurs cellules ;
- (ii) les constituants protéiques de la cellule sont isolés pour former une composition de protéines ;

- (iii) la composition de protéines obtenue à l'étape (ii) est soumise à un traitement de clivage.

L'isolement du matériau protéique contenu dans les cellules à partir des cellules est fait, de façon connue, par un traitement physique, chimique ou biologique approprié. On peut, par exemple, réaliser une lyse (disruption) des cellules permettant de favoriser la libération des protéines. Cette lyse est généralement effectuée grâce à un homogénéisateur. D'autres méthodes peuvent être utilisées, comme par exemple la provocation d'un choc osmotique (avec éventuellement l'ajout de détergents comme le NP-40 ou Triton X-100), la sonication, l'utilisation d'une bombe à disruption ou de billes de verre, l'application d'une pression élevée à la cellule (technique dite de « french press »). Lorsque les cellules sont rompues, on isole la fraction protéique qui peut être plus ou moins pure, en utilisant une ou plusieurs des techniques connues dont la précipitation par le sulfate d'ammonium, la centrifugation, la chromatographie (chromatographie par échange d'ion, chromatographie d'exclusion de taille, chromatographie d'affinité de type hydrophile/hydrophobe). Ce traitement permet d'éliminer les autres constituants de la cellule tels que les sucres, les acides nucléiques, les lipides... A partir d'un échantillon biologique qui peut provenir d'un prélèvement ou d'une culture, on a donc obtenu une ou plusieurs cellules et à partir de ces cellules on a isolé le matériau protéique les constituant.

La composition de protéines peut être soit constituée d'un seul type de protéines, ou alors d'un mélange de protéines différentes. Les protéines peuvent être phosphorylées, glycosylées, mistrylées ou être porteuses de tout substituant d'origine naturel ou synthétique.

Conformément au procédé de l'invention, la composition de protéines est alors soumise à un traitement de clivage. Le clivage des protéines peut être fait par un traitement physico-chimique, biologique ou par une combinaison de traitements. Parmi les traitements utilisables dans le cadre de la présente invention, on peut citer le traitement par des radicaux hydroxyles qui consiste à administrer à la composition de protéines un produit qui génère des radicaux hydroxyles (HO^\bullet) dans la solution aqueuse dans laquelle se trouvent les protéines. Un tel traitement peut consister en une administration de H_2O_2 . Le traitement par les radicaux hydroxyles provoque une coupure des liaisons peptidiques qui se fait de manière aléatoire sur n'importe quelle liaison peptidique de n'importe quelle protéine. La concentration en radicaux hydroxyles détermine l'importance du nombre de clivages opérés et donc la longueur plus ou moins importante des fragments peptidiques issus de ce traitement.

D'autres traitements chimiques peuvent être également utilisés comme par exemple le traitement par le bromure de cyanogène (CNBr) qui scinde spécifiquement les liaisons peptidiques au niveau du groupe carboxylique des résidus méthionyl. Il est également possible de réaliser un clivage acide partiel au niveau des résidus aspartyl par chauffage à 100°C d'une solution de protéines dans de l'acide trifluoroacétique.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, la coupure des protéines est effectuée par un procédé qui comporte au moins une étape de traitement enzymatique.

L'avantage que présente ce traitement par rapport au traitement physico-chimique réside dans le fait qu'il préserve davantage la structure des protéines, et qu'il est plus facile à contrôler. Par « traitement enzymatique », on entend l'action simple ou combinée d'une ou de plusieurs enzymes dans des conditions de réaction appropriées. Les enzymes effectuant la protéolyse, appelées protéases, coupent les protéines à des endroits spécifiques. Chaque protéase reconnaît généralement une séquence d'acides aminés au sein desquels elle effectue toujours la même coupure. Certaines protéases reconnaissent un seul acide aminé ou une séquence de deux acides aminés entre lesquels elles opèrent un clivage, d'autres protéases ne reconnaissent que des séquences plus longues. Ces protéases peuvent être des endoprotéases ou des exoprotéases. Parmi les protéases connues, on trouve :

- les enzymes spécifiques comme la trypsine qui scinde la liaison peptidique au niveau du groupe carboxylique des résidus Arg et Lys, l'endolysine qui clive la liaison peptidique du groupe -CO des lysines, la chymotrypsine qui hydrolyse la liaison peptidique au niveau du groupe carboxylique des résidus aromatiques (Phe, Tyr et Trp), la pepsine qui coupe au niveau du groupe NH₂ des résidus aromatiques (Phe, Tyr et Trp), la protéase V8 de la souche V8 de *Staphylococcus aureus* qui clive la liaison peptidique au niveau du groupe carboxylique du résidu Glu ;

- les enzymes non-spécifiques comme la thermolysine provenant de la bactérie *Bacillus thermoproteolyticus* qui hydrolyse la liaison peptidique du groupe NH₂ des acides aminés hydrophobes (Xaa-Leu, Xaa-Ile, Xaa-Phe), la subtilisine et la pronase qui sont des protéases bactériennes qui hydrolysent pratiquement toutes les liaisons et peuvent transformer les protéines en oligopeptides dans des conditions de réaction contrôlées (concentration en enzyme et durée de réaction).

D'autres protéases sont décrites avec leur mode de fonctionnement notamment dans <http://cgat.ukm.my/protease/bacterial.html>.

Plusieurs protéases peuvent être utilisées de façon simultanée, si leurs modes d'action sont compatibles, ou elles peuvent être utilisées de façon successive.

5 Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, les cellules sont obtenues à partir d'un échantillon biologique.

Par « échantillon biologique », on entend un produit résultant d'une extraction ou d'un prélèvement à partir d'un organisme humain, animal ou végétal.

Un échantillon biologique utilisable dans le procédé de la présente invention est constitué d'une ou de plusieurs cellules.

10 L'échantillon biologique utilisable dans le procédé de l'invention peut être également un tissu biologique comme par exemple un tissu prélevé lors d'une biopsie ; il peut être un fluide corporel ou végétal comme du sang, de l'urine, de la sève.

15 Les cellules peuvent également être issues d'une lignée cellulaire en culture.

De préférence, l'échantillon est soumis à un premier traitement visant à isoler les cellules contenues dans cet échantillon puis ces cellules sont elles-mêmes soumises à un traitement destiné à isoler le matériau protéique contenu dans ces cellules. Bien entendu il est possible d'utiliser des cultures de cellules comme un
20 échantillon biologique de départ et dans ce cas l'isolement des cellules n'est pas nécessaire.

Lorsque le produit de départ est un tissu biologique, celui-ci est soumis à un premier traitement visant à rompre les parois cellulaires. Le traitement peut être de nature physique, chimique ou biologique tel qu'exposé ci-dessus puis la
25 fraction protéique est récupérée en utilisant des techniques telles que la centrifugation.

La grande variété du protéome contenu dans une seule cellule fait que le traitement de ce protéome par une seule protéase permet d'obtenir des peptides de séquences et de longueur extrêmement variées. S'il est impossible d'obtenir par ce procédé l'infinie variété des séquences résultant de combinaisons systématiques
30 d'acides aminés naturels, néanmoins, le procédé de l'invention permet d'obtenir un ensemble de peptides contenant un nombre important de peptides et d'une grande variété tant en terme de longueur qu'en terme de séquences. L'utilisation de plusieurs cellules différentes et/ou de plusieurs méthodes de clivage différentes permet

d'accroître encore la variété des ensembles de peptides obtenus. La combinaison systématique d'acides aminés naturels en vue de produire toutes les séquences possibles pour un peptide d'une taille donnée ne pourrait être faite que par voie de synthèse et représenterait un travail faramineux, irréalisable du point de vue économique. Si l'on veut en plus obtenir une banque de peptides de tailles variées, la difficulté est encore plus grande. Le procédé de l'invention permet de préparer des banques de peptides qui n'ont pas un caractère exhaustif, ce qui serait impossible à obtenir, quelle que soit la méthode envisagée. En revanche, ces banques de peptides présentent une variété de peptides en terme de taille et de séquence, qui sont suffisantes pour qu'elles puissent être considérées comme un échantillon prélevé aléatoirement dans la totalité des peptides existants. Elles peuvent être considérées comme un échantillon représentatif de l'infinie variété des peptides naturels. La variété et la richesse des banques de peptides obtenues par le procédé de l'invention est supérieure à ce qui peut être obtenu par voie de synthèse dans des conditions économiques acceptables.

Si l'on souhaite limiter la taille des peptides constituant la banque de peptides, il est possible, après l'étape de protéolyse, de sélectionner les peptides en fonction de leur taille. Ceci peut être réalisé par exemple par chromatographie sur colonne d'exclusion de taille. On peut également trier les banques de peptides en fonction de la charge ou de l'hydrophilie/hydrophobie de leurs constituants.

La présente invention a également pour objet des banques de peptides susceptibles d'être obtenues par le procédé de l'invention. Les banques de peptides de l'invention se caractérisent par le grand nombre de peptides différents qu'elles comprennent. Une cellule humaine comprenant plus de 20000 protéines différentes, les banques de peptides de l'invention peut contenir plus de 20000 peptides distincts, préférentiellement plus de 40000 peptides distincts, encore plus préférentiellement plus de 10^6 peptides distincts, avantageusement encore plus de 10^7 peptides distincts.

Le caractère aléatoire des banques de peptides obtenues par le procédé de l'invention associé au coût réduit pour leur obtention permet alors de les utiliser dans des tests de routine lors du criblage de molécules.

La présente invention se rapporte également à l'utilisation d'une banque de peptides obtenue par le procédé de l'invention, pour le criblage de molécules ayant une affinité pour une molécule cible donnée.

Au sens de la présente invention, on définit par « molécule cible » ou « cible » toute molécule ou tout fragment de molécule généralement d'origine biologique, dont on cherche à étudier le comportement et les affinités. Il s'agit le plus souvent d'une macromolécule (protéine, molécule d'ADN, glucide ou lipide) ou même une cellule entière. Il peut également s'agir d'un peptide, d'un co-facteur comme l'acétyl coA ou l'AMP cyclique, d'un groupe d'hèmes ou d'un composé chimique tel qu'un stéroïde, un acide aminé modifié....

Le criblage des banques de peptides de l'invention est utile en pharmacologie, notamment pour rechercher de nouveaux peptides à potentiel thérapeutique qui peuvent avoir un rôle modulateur (activateur ou inhibiteur) sur des molécules déjà connues. En outre, les peptides obtenus après criblage peuvent être utilisés lors du diagnostic d'états pathologiques, ou comme marqueurs (cellulaires ou autres).

Le criblage de banques de peptides est également utile pour l'étude des mécanismes d'action de composés thérapeutiques connus : on peut rechercher avec quelles séquences peptidiques ces composés thérapeutiques ont une affinité et ainsi retrouver leurs cibles biologiques. Une telle étude permet par exemple de prévoir plus facilement les effets secondaires d'un tel composé.

L'invention a également pour objet un kit de criblage en vue de rechercher des molécules ayant une affinité pour une cible choisie, ce kit de criblage comprenant une banque de peptides telle que décrite ci-dessus.

L'invention a également pour objet un procédé de criblage de peptides ayant une affinité pour une molécule cible, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

- (i) production d'une banque de peptides par le procédé de l'invention tel que décrit ci-dessus ;
- (ii) mise en contact de la banque de peptides avec la ou les molécule(s) cible(s) fixée(s) sur un support ;
- (iii) élimination des peptides n'ayant pas d'affinité pour la ou les molécule(s) cible(s) ;
- (iv) isolement et caractérisation des peptides ayant une affinité pour la ou les molécule(s) cible(s).

On définit par le terme « criblage » toute méthode permettant la recherche, l'identification et le tri de peptide(s) parmi la ou les banque(s) de peptides.

On entend par « affinité » la formation d'une liaison covalente ou non covalente entre un peptide et une molécule cible.

5 Selon un mode de réalisation avantageux, la molécule cible est une protéine.

Généralement, la molécule cible est fixée sur un support solide tel qu'un polymère (résine de chromatographie, filtre par exemple), des billes magnétiques, une plaque de verre ou de silicium... La mise en contact de la banque de peptides avec la cible se fait par imprégnation de la banque de peptide sur le support
10 lorsque ce dernier est une plaque, une colonne de chromatographie ou un filtre ou par mélange de la banque de peptides avec des particules solides sur lesquelles sont fixées les cibles. L'élimination des peptides n'ayant pas d'affinité pour la molécule cible se fait de façon connue par élution, filtration et/ou lavage. Les peptides ayant une affinité
15 pour la molécule cible sont ensuite isolés de façon connue du support auquel est fixée la molécule cible et analysés par tout moyen connu de l'homme du métier, notamment par résonance magnétique nucléaire ou par spectrométrie de masse.

De façon préférentielle dans la présente invention, le criblage de la banque de peptides est réalisé en utilisant une technique qui permet de quantifier
20 l'interaction des peptides avec la cible couplée à une technique permettant l'identification des peptides ayant interagi avec la ou les molécules cibles. De préférence, on choisit une technique de mesure de l'interaction qui permet de fournir une quantification de l'interaction en temps réel. Parmi ces techniques, on peut citer la technique dite « résonance de plasmons de surface » (SPR pour « *surface plasmons resonance* »).
25

Le phénomène de résonance des plasmons de surface a lieu à la surface d'une mince couche de métal sur laquelle une source lumineuse polarisée arrive à la surface avec un angle défini ; on enregistre continuellement l'intensité de la lumière réfléchie. Par cette technique, il est possible d'enregistrer des changements
30 très faibles dans la résonance optique lorsque des molécules se fixent ou se dissocient d'une autre molécule biologique ayant été préalablement fixée de façon covalente à une surface métallique (comme par exemple une biopuce recouverte d'une pellicule d'or).

Selon un mode de réalisation préféré, on procède au criblage des peptides interagissant avec une ou plusieurs molécules cibles de la façon suivante :

a) production d'une banque de peptides par le procédé de l'invention tel que décrit ci-dessus ;

5 b) immobilisation d'une ou de plusieurs molécule(s) cible(s) sur un support convenable ;

c) mise en contact (incubation) de la banque de peptides avec la ou les molécule(s) cible(s) ;

10 d) analyse de l'affinité de fixation des peptides sur les molécules cibles au moyen de la technique SPR ;

e) élimination des peptides n'ayant pas d'affinité pour la ou les molécule(s) cible(s) ;

f) élution des peptides fixés sur les molécules cibles ;

g) identification de ces peptides par spectrométrie de masse ;

15 Les étapes d) et e) peuvent être mises en œuvre dans l'ordre inverse.

Ce procédé a pour but de déterminer de façon quantitative les interactions spécifiques entre un ou plusieurs peptide(s) et une ou plusieurs molécules cible(s) immobilisée(s), puis d'identifier les peptides qui possèdent une affinité déterminée pour la ou les molécules cible(s) immobilisée(s).

20 Le support convenant à l'immobilisation d'une ou plusieurs molécules cibles selon l'invention est une surface qui permet une analyse de fixation sensible et en temps réel en utilisant des techniques telles que la SPR et de façon éventuelle qui permette aussi de pratiquer la spectrométrie de masse.

25 Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, on utilise une biopuce comme support d'immobilisation de la ou des molécules cibles. Une biopuce est en général une surface de verre recouverte par une fine pellicule d'or. Parmi les biopuces particulièrement adaptées à l'invention, on peut citer celles de type Biacore® (commercialisées par la société Biacore), il en existe de différents types selon le type de molécules cibles à immobiliser sur le support.

30 Les molécules cibles peuvent être immobilisées sur une surface préalablement à l'utilisation de la technique SPR selon une variété de protocoles ; le choix du protocole étant dicté par la nature même de l'appareil SPR et/ou par la nature de la molécule cible.

Dans le cas où la molécule cible est un acide nucléique, alors une immobilisation courante et appropriée implique l'utilisation d'acides nucléiques biotinylés sur des surfaces recouvertes par la streptavidine. Alternativement, les acides nucléiques peuvent être fixés grâce à des adducts de streptavidine situés à l'extrémité 5' ou 3' de la chaîne d'acide nucléique, sur une surface recouverte par la biotine. Les protéines cibles peuvent être soit directement immobilisées par voie chimique par l'intermédiaire de résidus chargés (lysines) sur des surfaces ayant des groupes carboxyliques ou époxy dans un appareil SPR, soit indirectement grâce à des étiquettes (« tags ») appropriées comme les extensions à base d'hexahistidine N ou C terminale ou de glutathion. Les protéines cibles peuvent être capturées sur des surfaces de chélation ou recouvertes par la glutathion S transférase. Il existe un nombre croissant de techniques permettant la dérivation et la production de surfaces de biopuces. En l'absence d'une étiquette convenable, les surfaces méthylées par des groupes carboxyliques peuvent être activées par un traitement par la carbodiimide et/ou l'hydroxysuccinimide pour générer des groupes carboxyliques activés capables de former des liaisons covalentes avec des amines non-protonées (généralement des résidus à chaîne latérale à base de lysine) d'une protéine. Le protocole d'immobilisation des molécules cibles sur un support selon la configuration BIAcore® est particulièrement adapté à l'invention (on peut se reporter à <http://www.biacore.com/home.lasso>).

Lors de l'utilisation de la technique dite SPR, un mélange de peptides ou une fraction pré-sélectionnée d'un mélange est mise en contact avec les molécules cibles immobilisées pour mesurer l'interaction par les changements dans la résonance des plasmons de surface.

Le cas échéant, le fractionnement peut être réalisé sur la base de quelques propriétés physico-chimiques du peptide telles que sa taille, sa charge ou son index d'hydrophobicité. Après un lavage de la surface de façon à éliminer les molécules n'ayant pas été fixées, les peptides qui ont été physiquement retenus par la molécule cible sont élués ou rendus volatiles (désorbés) en vue de leur caractérisation. On utilise comme témoins négatifs des surfaces qui n'ont pas été traitées par des molécules cibles ; on soumet alors ces témoins négatifs au même traitement que précédemment. Cette technique permet de caractériser l'interaction entre les peptides et les molécules cibles par des paramètres physico-chimiques tels la constante de dissociation à l'équilibre (K_D). Il est alors possible de déterminer les caractéristiques comme :

- a) la spécificité de la liaison entre le peptide et la molécule cible ;

- b) la concentration en peptide ;
- c) la cinétique d'association ou de dissociation ;
- d) l'affinité de la liaison.

L'utilisation de cette technique permet ainsi d'accélérer la recherche
5 initiale notamment de molécules à potentiel médicamenteux qui peuvent entrer dans
des essais en phase clinique.

Dans le cas où des systèmes complètement automatiques sont
utilisés, comme par exemple la technologie SPR Biacore®, il est possible d'analyser
un grand nombre d'échantillons en un laps de temps très réduit. Cette méthode
10 constitue alors un outil de choix pour un criblage dans des délais raccourcis par
rapport à l'emploi d'autres techniques.

La mise en œuvre de la technique SPR est réalisée de façon connue
comme illustré dans les exemples ci-dessous ou comme décrit dans : A. Zhukov *et al.*,
PharmaGenomics, March/April 2002 ; Fägerstam, L. (1991) in Techniques in Protein
15 Chemistry II, ed. Villafranca J. J. (Academic Press inc., New York), pp. 65-71 ;
Malmquist, M. (1993) Nature 361, 186-187 ; Bondeson, K. & Frostell-Karlsson, A.
(1993) Analytical Biochemistry 214, 245-251 ; Nice, E. & Lackmann, M. (1994) J.
Chromatography A. 660, 169-185 ; Buckle M, 'Surface Plasmon Resonance applied to
DNA-protein complexes' in DNA-Protein interactions principles and protocols 2nd
20 edition (Tom Moss ed) (2001) vol 148 535-546 ; Persson, B., Buckle, M & Stockley,
P.G. 'Kinetics of DNA interactions studied by surface plasmon resonance' in Protein-
DNA Interactions: A Practical Approach (M. Buckle & A. Travers, eds.), Oxford
University Press, Oxford, U.K. (2000). 257-279.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, on procède à la
25 résolution de mélanges complexes de peptides qui sont élués de la surface
d'immobilisation après analyse par SPR à l'aide de tous moyens appropriés. Parmi les
moyens convenant à l'invention, on peut citer notamment la chromatographie liquide
à haute performance (CLHP), la chromatographie de rétention sur surface (qui peut
être directement couplée avec la spectrométrie de masse SELDI ®), l'électrophorèse
30 sur gel.

On peut également envisager de désorber et ioniser directement le
complexe peptide-cible à partir du support de SPR en vue de son analyse par
spectrométrie de masse.

Selon une variante préférée du procédé de l'invention, les peptides élués ou directement désorbés à partir du support SPR sont alors identifiés par leur masse et par leur structure grâce à la spectrométrie de masse (MS).

5 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, on procède au séquençage partiel ou total des peptides élués.

L'utilisation de la spectrométrie de masse permet alors, entre autres, de :

- 10 - mesurer la masse moléculaire des peptides élués de la surface, et ainsi de caractériser les protéines par cartographie des masses des peptides élués ;
- identifier des peptides à des concentrations très faibles ;
- séquencer partiellement ou totalement les peptides élués.

La caractérisation des peptides par spectrométrie de masse est réalisée par couplage d'un moyen de désorption/ionisation avec un moyen de mesure
15 de la masse. Parmi les moyens de désorption/ionisation, on peut citer la désorption et ionisation au laser assisté par la présence d'une matrice (MALDI), la désorption et ionisation améliorées par une surface active (SELDI), la spectrométrie de masse à ions secondaires (SIMS), la spectrométrie de masse secondaires (SNMS), l'ionisation par nébulisation (ESI), le bombardement d'atomes rapides (FAB) et l'ionisation chimique
20 à pression atmosphérique (APCI). Parmi les moyens de mesure de la masse, on peut citer le temps de vol (TOF), la spectrométrie de masse en tandem, spectrométrie de masse multidimensionnelle (MS/MS), quadrupole ou trappe à ion, la spectrométrie de masse à transformée de Fourier (FT-MS ou FT-ICR).

Grâce au procédé de criblage de la présente invention, il est possible
25 d'isoler et d'identifier des peptides à potentiel thérapeutique, ayant un rôle d'activateur ou d'inhibiteur sur des molécules déjà connues. Ces peptides peuvent être :

- des ligands présentant une affinité quantifiée pour une macromolécule immobilisée ;
- 30 - des candidats très intéressants en tant qu'inhibiteurs de la macromolécule immobilisée ;
- des partenaires dans des complexes protéiques.

En outre, ledit procédé peut fournir des réactifs susceptibles d'être utilisés lors d'essais diagnostiques, ainsi que de générer des nouveaux marqueurs d'affinité.

5 Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre de la présente invention ainsi qu'au dessin annexé, dans lequel :

10 - la figure 1 présente tous les peptides obtenus après digestion de l'albumine sérique bovine (BSA) par la trypsine, la protéase V8 provenant de *Staphylococcus aureus* et la chymotrypsine.

Exemple 1 : Production d'une banque de peptides par digestion enzymatique

1.1 Lyse cellulaire

15 Un litre de culture de cellules est centrifugé et les cellules humides sont récoltées, mises en suspension dans un tampon de lyse (Tris HCl 50 mM pH 8,3 ; glycérol 5% ; NaCl 300 mM ; 0,05% désoxycholate) et soumises à une lyse en utilisant une presse de type Aminco-French. L'homogénat est alors centrifugé à 11 000 g pendant 60 minutes à 4°C.

1.2 Précipitation des protéines

20 Les protéines du surnageant provenant de la lyse cellulaire sont précipitées par addition de sulfate d'ammonium à une concentration finale de 40% (poids/volume) et la solution est agitée à 4°C pendant 30 minutes, puis les protéines sont récupérées dans le culot après centrifugation à 19 600 g pendant 30 minutes à 25 4°C.

1.3 Digestion des protéines

30 On procède à la digestion par la trypsine dans des conditions dénaturantes. La trypsine clive après des résidus lysine (K) ou arginine (R) dans une séquence de protéine. Le culot de protéines est mis en suspension dans 0,5 ml de tampon de dénaturation (0,375 g KCl, 0,09 g d'EDTA, 1,15 g de NH₄H₂PO₄, 50 g de guanidine-HCl et complété par de l'eau jusqu'à 100 ml). Le pH est ajusté à 8,5. On ajoute 20 µl de dithiothréitol 0,8 M et on laisse la suspension cellulaire à température ambiante pendant 10 minutes, puis on ajoute 25 µl d'une solution aqueuse d'acide

iodoacétique 0,5M et on laisse à nouveau la suspension cellulaire à température ambiante pendant 10 minutes. On élue l'échantillon sur une colonne Nap-5 (par exemple, Sephadex G-25) pour éliminer les sels grâce à 0,8 ml de tampon contenant 40 mM de NH_4HCO_3 . On procède à deux reprises à la dissolution d'une quantité de 25
5 μg de trypsine (Boehringer, de qualité convenant au séquençage) dans 25 μl d'eau, et on ajoute cette solution enzymatique à la solution de protéines. On laisse la réaction à température ambiante pendant 18 heures. La réaction est arrêtée par ajout de TFA à une concentration finale de 0,1% (ou par tout acide convenable pour abaisser le pH). Le mélange obtenu peut être ensuite purifié davantage par élution sur une colonne
10 d'exclusion de taille permettant de récupérer des protéines et des peptides de poids moléculaire inférieur à environ 7000 Da en utilisant par exemple, des colonnes à peptides de type Superdex (Amersham Bioscience) sur un appareil CLHP.

Exemple 2 : Peptides obtenus par digestion de la BSA par diverses protéases

15 A titre illustratif, on a effectué une série de digestions enzymatiques à partir d'albumine sérique bovine (BSA) pour montrer en particulier le caractère varié de la banque de peptides produite tant en termes de longueur de séquence que de variété d'acides aminés.

20 La figure 1 montre les peptides générés par le traitement par la trypsine, la protéase V8 de la bactérie *Staphylococcus aureus* et par la chymotrypsine. La digestion par la trypsine permet de générer une série de 38 peptides ayant entre 7 et 21 acides aminés ; toute la protéine BSA est représentée puisque la longueur totale des peptides est de 447 acides aminés. On obtient des banques de peptides différentes après digestion par d'autres protéases, comme la chymotrypsine (séquences à
25 caractère complémentaire).

Dans cet exemple, une seule protéine de petite taille a été soumise à une digestion par une ou plusieurs protéase(s). Cet exemple permet alors d'entrevoir les possibilités du procédé de la présente invention de générer un nombre très important de peptides différents lorsque le traitement enzymatique est effectué non
30 plus sur un seul type de protéine (comme c'est le cas dans cet exemple), mais sur l'ensemble du protéome d'une cellule.

Exemple 3 : Protocole d'évaluation de l'interaction avec une molécule cible fixée sur une surface de type Biacore®

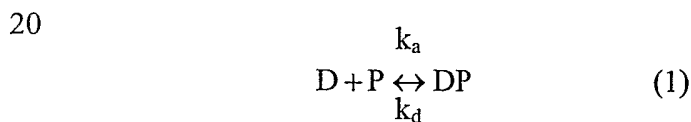
35 2.1 Immobilisation des molécules cibles sur une surface convenant à l'utilisation de la technique SPR

Concernant ce protocole, on peut se reporter à Buckle M, 'Surface Plasmon Resonance applied to DNA-protein complexes' in DNA-Protein interactions principles and protocols 2nd edition (Tom Moss ed) (2001) vol 148 535-546 ; Persson, B., Buckle, M & Stockley, P.G. 'Kinetics of DNA interactions studied by surface plasmon resonance' in Protein-DNA Interactions: A Practical Approach (M. Buckle & A. Travers, eds.), Oxford University Press, Oxford, U.K. (2000). 257-279.

On injecte un aliquot de 100 μ l de 0,05M NHS(N hydroxyl succinimide)/0,2M EDC (N-éthyl-N'-(diméthylaminopropyl)carbodiimide) sur une surface capteur de type CM5 à un débit de 20 μ l/minute dans 10 mM de tampon Hépès (pH 8) contenant 150 mM de NaCl et 1 mM d'EDTA, puis on injecte la fraction protéique à immobiliser à une concentration finale de 1 μ M. On arrête d'injecter lorsque la fraction protéique liée est estimée être en excès, c'est à dire normalement autour de la valeur de 50 RU (Unités de Résonance), ce qui correspond à environ 0,05 ng de protéines globulaires. Les groupes carboxyliques n'ayant pas réagi à la surface sont bloqués par traitement avec 50 μ l de 1M éthanolamine-HCl.

2.2 Mesure de l'affinité de l'interaction :

Pour une macromolécule (D), l'interaction avec un peptide (P) peut être exprimé ainsi:



La fraction des sites (θ_D) occupés par les peptides sur la cible immobilisée est:

$$\theta_D = \frac{DP}{D_T} \quad (2)$$

Donc la constante d'association K_a est calculée en utilisant :

$$\theta_D = \frac{K_a \cdot P}{1 + K_a P} \quad (4)$$

Dans une expérience SPR sur un appareil comme le Biacore, à un état stationnaire obtenu à une concentration de peptide donné, la quantité de peptide

fixé peut être calculée à partir de l'asymptote de la courbe de changement d'indice de réfraction en fonction du temps. Si on effectue le rapport (θ_D) sur $[P]_T$ on peut estimer K_a et puis $K_d = 1/K_a$

5 D'une façon parallèle on peut mesurer à la fois le signal à l'équilibre (R_{eq}) pour une concentration donnée de peptide sur la surface SPR et le signal de résonance R en fonction du temps t après l'injection à temps $t = 0$ (quand $R = R_0$) pendant la phase d'association des peptides avec la molécule immobilisée sur la surface. On peut donc calculer une constante d'association apparente (k_{obs}) en utilisant l'équation :

$$10 \quad R_t = R_0 - (R_{eq} - R_0) \cdot (1 - e^{-k_{obs} \cdot t}) \quad (5)$$

On peut également calculer la constante de dissociation k_d en mesurant la diminution du signal pendant la dissociation du peptide de la surface en fonction du temps et appliquant l'équation :

$$R_t = R_0 + (R_{eq} - R_0) \cdot (e^{-k_{off} \cdot t}) \quad (6)$$

15 Puisque $k_{obs} = k_{on}[P] + k_{off}$ (7) on peut obtenir k_{on} et donc puisque $k_{off} = k_{on}K_d$ (8) on peut calculer la constante d'équilibre (K_d).

Méthodologie : 100 μ l d'une solution contenant des peptides dissous dans un tampon compatible avec le Biacore à une concentration entre mM et nM sont injectés en flux continu à 20 μ l/min sur la surface à une température fixe, généralement 25° C. A la fin de la période d'injection le tampon seul est envoyé sur la surface. Les constantes d'association et de dissociation sont calculées comme indiquée ci-dessus.

2.1.3 Détermination de la masse des peptides élués

Nous utilisons deux techniques complémentaires :

25 Spectrométrie de masse électrospray. L'échantillon contenant les peptides est re-suspendu dans un tampon de 70 % acétonitrile / 0.1% acide acétique / H₂O distillée (tampon filtrée a travers une filtre de 0.22 μ m). L'ensemble est injecté à 20 μ l/min dans le port d'injection d'un spectromètre de masse électrospray. L'analyse du spectre de masse permet de déterminer la masse du peptide. Dans le cas où il y a

plusieurs peptides une séparation auparavant par colonne hydrophobe permet de mieux attribuer une masse à chaque peptide.

REVENDICATIONS

1. Procédé de production d'une banque de peptides, caractérisé en ce que :

(i) le produit de départ est une ou plusieurs cellules ;

5 (ii) les constituants protéiques de la cellule sont isolés pour former une composition de protéines ;

(iii) la composition de protéines obtenue à l'étape (ii) est soumise à un traitement de clivage.

10 2. Procédé de production d'une banque de peptides selon la revendication 1, caractérisé en ce que les cellules sont obtenues à partir d'un échantillon biologique.

3. Procédé de production d'une banque de peptides selon la revendication 1, caractérisé en ce que les cellules sont issues d'une lignée cellulaire en culture.

15 4. Procédé de production d'une banque de peptides selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est choisi parmi un tissu biologique, un fluide corporel ou végétal.

20 5. Procédé de production d'une banque de peptides selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le traitement de clivage comporte au moins une étape de traitement enzymatique.

6. Procédé de production d'une banque de peptides selon la revendication 5, caractérisé en ce que le traitement enzymatique comprend l'action d'au moins une enzyme choisie parmi : la trypsine, l'endolysine, la pepsine, la chymotrypsine, la protéase V8, la thermolysine, la subtiline et la pronase.

25 7. Procédé de production d'une banque de peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le traitement de clivage comporte au moins une étape de traitement par des radicaux hydroxyles.

30 8. Procédé de production d'une banque de peptides selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape de séparation des peptides en fonction de leur taille et/ou de leur charge et/ou de leur hydrophilie/hydrophobie.

9. Banque de peptides comportant au moins 20 000 peptides susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une des revendications précédentes.

10. Utilisation d'une banque de peptides selon la revendication précédente pour le criblage de molécules ayant une affinité pour une molécule cible donnée.

11. Kit de criblage caractérisé en ce qu'il comporte une banque de peptides selon la revendication 9.

12. Procédé de criblage de peptides ayant une affinité pour une molécule cible, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

10 (i) production d'une banque de peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 ;

(ii) mise en contact de la banque de peptides avec la ou les molécule(s) cible(s) fixé(e)s sur un support ;

15 (iii) élimination des peptides n'ayant pas d'affinité pour la ou les molécule(s) cible(s) ;

(iv) isolement et caractérisation des peptides ayant une affinité pour la ou les molécule(s) cible(s).

20 13. Procédé de criblage de peptides selon la revendication précédente, caractérisé en ce que la molécule cible est choisie parmi une protéine, un peptide, une molécule d'ADN, un co-facteur, un groupe d'hèmes, un composé chimique, un glucide, un lipide, ou une cellule entière.

14. Procédé de criblage de peptides ayant une affinité pour une molécule cible, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

25 (a) production d'une banque de peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 ;

(b) immobilisation d'une ou de plusieurs molécule(s) cible(s) sur un support convenable ;

(c) mise en contact de la banque de peptide avec la ou les molécule(s) cible(s) ;

30 (d) analyse de l'affinité de fixation des peptides sur molécules cibles au moyen de la technique SPR ;

(e) élimination des peptides n'ayant pas d'affinité pour la ou les molécule(s) cible(s) ;

(f) élution des peptides fixés sur les molécules cibles ;

(g) identification des peptides élués par spectrométrie de masse ;

5 les étapes (d) et (e) pouvant être mises en œuvre dans l'ordre inverse.

15. Procédé de criblage de peptides selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisé en ce le support est une biopuce.

10 16. Procédé de criblage de peptides selon l'une des revendications 12 à 15, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape de séparation des peptides après leur élution du support et avant leur identification.

Digestion par la trypsine	Digestion par la protéase V8	Digestion par la chymotrypsine
ATEEQLK	FKADE	LGSF
LCVLHEK	KQEPE	NGVF
DDSPDLPK	ACFAVE	STVF
AEFVEVTK	KTPVSE	ANKY
YLYEIAR	ICTLPD	VPKAF
DLGEEHFK	RMPCTE	DEKLF
NECFLSHK	VTKLVTD	APELLY
LVVSTQTALA	KSHCIAE	LQQCPF
QNCDQFEK	NFVAFVD	EKLGEY
SHCIAEVEK	LAKYICD	QEAKDAF
QTALVELLK	HVKLVNE	KGLVLIAF
CCTESLVNR	NLPPLTAD	KADEKKF
EACFAVEGPK	CFLSHKD	GERALKAW
CCTKPESER	QLKTVME	SRRHPEY
LVNELTEFAK	LTKVHKE	KDLGEEHF
ECCDKP LLEK	VCKNYQE	QNALIVRY
HPEYAVSVLLR	IAHRFKD	SALTPDETY
HLVDEPQNLK	TISSKLKE	EIARRHPY
TCVADESHAGCEK	KVTKCCTE	AEDKDVCCKNY
SLHTLFGDELCK	YSRRHPE	DTHKSEIAHRF
ETYGDMADCCEK	KLFTFHAD	AVSVLLRLAKEY
YICDNQDTISSK	FAKTCVADE	VDKCCAADDKEACF
EYEATLECCAK	LCKVASLRE	DEHVKLVNELTEF
TVMENFVAFVVDK	AFLGSFLYE	GDELCKVASLRETY
LGEYGFQNALIVR	TYVPKAFDE	AVEGPKLVVSTQTALA
DDPHACYSTVFDK	KGACLLPKIE	SVARLSQKFPKAEF
VPQVSTPTLVEVSR	KSLHTLFGDE	EATLECCAKDDPHACY
LKPDNTLCDEFK	DPHACYSTVFD	GDMADCCEKQEPERNECF
DAFLGSFLYEYSR	GPKLVVSTQTALA	AKTCVADESHAGCEKSLHTL F
ECCHGDLLECADDR	KQIKKQTALVE	DKLKHVLVDEPQNLKQNCDDQ F
YNGVFQECCQAEDK	LLKHKPKATEE	LSHKDDSPDLPKLKPDPNTLC DEF
MPCTEDYLSLILNR	KKFWGKYLYE	VEVTKLVTDLTKVHKECCHG DLLECADDRADLAKY
RPCFSALTPDETYVPK	YAVSVLLRLAKE	LSLILNRLCVLHEKTPVSEKV TKCCTESLVNRRPCF
LFTFHADICTLPDTEK	IARRHPYFYAPE	TRKVPQVSTPTLVEVSRSLGK VGTRCCTKPESERMPCTEDY
HPYFYAPPELLYYANK	LPKLPDPNTLCDE	QECCQAEDKGACLLPKIETM REKVLASSARQLRCASIQKF
DAIPENLPLTADFAEDK	YLSLILNRLCVLHE	HADICTLPDTEKQIKKQTALV ELLKHKPKATEEQLKTVMEN F
GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK	LLYYANKYNGVFQE	ICDNQDTISSKLKECCDKPLL EKSHCIAEVEKDAIPENLPL TADF

Figure 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/000692

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12P21/06 G01N33/50 G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P G01N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PARK PYO-JAM ET AL: "Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk" JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, vol. 78, no. 6, June 2001 (2001-06), pages 651-656, XP001206986 ISSN: 0003-021X	1,2,4,5, 8,9,11
Y	page 651 - page 653 ----- -/--	3,7,10, 12-16



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- '&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 August 2005

Date of mailing of the international search report

30/08/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Espen, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/000692

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>YEE J J ET AL: "ANTI OXIDANT EFFECTS OF SOY PROTEIN HYDROLYSATES ON COPPER CATALYZED METHYL LINOLEATE OXIDATION" JOURNAL OF FOOD SCIENCE, vol. 45, no. 4, 1980, pages 1082-1083, XP009051083 ISSN: 0022-1147 page 1082</p>	1,2,4-6
Y	<p>SWANN P G ET AL: "NONSPECIFIC PROTEASE-CATALYZED HYDROLYSIS/SYNTHESIS OF A MIXTURE OF PEPTIDES: PRODUCT DIVERSITY AND LIGAND AMPLIFICATION BY A MOLECULAR TRAP" BIOPOLYMERS, NEW YORK, NY, US, vol. 40, no. 6, 1996, pages 617-625, XP009015590 ISSN: 0006-3525 the whole document</p>	3,7,10, 12-16
Y	<p>YANO KAZUYOSHI ET AL: "Preparation of a whole genome phage library using fragmented Escherichia coli genome and its characterization of protein binding properties by surface plasmon resonance." BIOSENSORS & BIOELECTRONICS. SEP 2003, vol. 18, no. 10, September 2003 (2003-09), pages 1201-1207, XP002339959 ISSN: 0956-5663 the whole document</p>	3,7,10, 12-16
Y	<p>AMIN A ET AL: "Identification of constrained peptides that bind to and preferentially inhibit the activity of the hepatitis C viral RNA-dependent RNA polymerase" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, vol. 313, no. 1, 15 August 2003 (2003-08-15), pages 158-169, XP004452399 ISSN: 0042-6822 the whole document</p>	3,7,10, 12-16

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR2005/000692

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12P21/06 G01N33/50 G01N33/53

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12P G01N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	PARK PYO-JAM ET AL: "Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk" JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, vol. 78, no. 6, juin 2001 (2001-06), pages 651-656, XP001206986 ISSN: 0003-021X	1,2,4,5, 8,9,11
Y	page 651 - page 653 ----- -/--	3,7,10, 12-16



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

10 août 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30/08/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Espen, J

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>YEE J J ET AL: "ANTI OXIDANT EFFECTS OF SOY PROTEIN HYDROLYSATES ON COPPER CATALYZED METHYL LINOLEATE OXIDATION" JOURNAL OF FOOD SCIENCE, vol. 45, no. 4, 1980, pages 1082-1083, XP009051083 ISSN: 0022-1147 page 1082</p>	1,2,4-6
Y	<p>SWANN P G ET AL: "NONSPECIFIC PROTEASE-CATALYZED HYDROLYSIS/SYNTHESIS OF A MIXTURE OF PEPTIDES: PRODUCT DIVERSITY AND LIGAND AMPLIFICATION BY A MOLECULAR TRAP" BIOPOLYMERS, NEW YORK, NY, US, vol. 40, no. 6, 1996, pages 617-625, XP009015590 ISSN: 0006-3525 le document en entier</p>	3,7,10, 12-16
Y	<p>YANO KAZUYOSHI ET AL: "Preparation of a whole genome phage library using fragmented Escherichia coli genome and its characterization of protein binding properties by surface plasmon resonance." BIOSENSORS & BIOELECTRONICS. SEP 2003, vol. 18, no. 10, septembre 2003 (2003-09), pages 1201-1207, XP002339959 ISSN: 0956-5663 le document en entier</p>	3,7,10, 12-16
Y	<p>AMIN A ET AL: "Identification of constrained peptides that bind to and preferentially inhibit the activity of the hepatitis C viral RNA-dependent RNA polymerase" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, vol. 313, no. 1, 15 août 2003 (2003-08-15), pages 158-169, XP004452399 ISSN: 0042-6822 le document en entier</p>	3,7,10, 12-16