

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 809 733**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **00 07113**

⑤1 Int Cl⁷ : C 07 K 14/00, C 07 K 7/08, G 01 N 21/64, C 12 Q 1/37
// (C 12 Q 1/37, C 12 R 1:145)

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 02.06.00.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 07.12.01 Bulletin 01/49.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE
ET DE LA RECHERCHE MEDICALE INSERM Etablis-
sment public à caractère scientifique et technologique*
— FR.

⑦2 Inventeur(s) : ROQUES BERNARD PIERRE et
ANNE CHRISTINE.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : CABINET LAVOIX.

⑤4 **SUBSTRAT PEPTIDIQUE RECONNU PAR LA TOXINE BOTULIQUE DE TYPE BONT/B ET SON UTILISATION
POUR DOSER ET/OU DETECTER LADITE TOXINE OU DES INHIBITEURS CORRESPONDANTS.**

⑤7 La présente invention a pour objet un substrat peptidi-
que reconnu par la toxine botulique de type BoNT/ B, carac-
térisé en ce qu'il incorpore dans sa structure peptidique un
fragment de formule PyA-(Z)- pNF dans laquelle Z repré-
sente un ou plusieurs acides aminés, ledit fragment étant
clivable par ladite toxine.

FR 2 809 733 - A1



La présente invention a pour objet un procédé pour détecter, identifier et/ou caractériser la toxine botulique de type B ou des inhibiteurs et/ou activateurs de ladite toxine.

La neurotoxine botulique de type B (BoNT/B) fait partie d'une
5 famille de sept protéines structurellement apparentées (toxines botuliques A à G) produites par diverses souches du bacille anaérobie «clostridium botulinum». Les deux formes les plus fréquemment rencontrées sont les toxines botuliques de type A et B. Les neurotoxines botuliques sont les toxines les plus puissantes connues avec des doses létales 50 chez la
10 souris de l'ordre de 0,1 à 0,3 ng/kg. Elles agissent au niveau du système nerveux périphérique de l'homme et de diverses espèces animales en induisant le « botulisme » qui est caractérisé par une paralysie flasque des muscles du squelette entraînant la mort.

La forme majeure d'intoxication par ces toxines est due à
15 l'ingestion de nourriture contaminée. Ces protéines peuvent constituer une arme biologique potentielle dans la mesure où elles sont faciles à produire. Enfin, depuis plusieurs années, les toxines botuliques de type A et également de type B sont également utilisées pour des applications thérapeutiques, dans le cadre de dystonies, d'hyperactivité
20 mononeuronale, telle que strabisme, blepharospasme.

Les neurotoxines botuliques sont constituées de deux sous-unités : une chaîne lourde (~ 100 K_DA) associée à une chaîne légère (~ 50 K_DA) par un pont disulfure. La chaîne lourde intervient dans la liaison de la toxine à la terminaison nerveuse, dans l'internalisation puis dans la
25 translocation de la chaîne légère dans le cytosol. La chaîne légère est responsable de la toxicité de la protéine par inhibition de la libération, Ca²⁺ dépendante, de l'acétylcholine. La chaîne légère ne peut manifester sa toxicité que lorsqu'elle est séparée (réduction du pont disulfure) de la chaîne lourde, mais elle n'est pas capable de pénétrer seule à l'intérieur
30 des terminaisons nerveuses (*Montecucco et al. (1994) FEBS Lett. 346, 92-98*).

La toxicité de la chaîne légère de ces toxines est due à son activité peptidasique. En effet, les toxines botuliques appartiennent à la famille des métallopeptidases à zinc et plus particulièrement à la sous-famille des zincines qui contiennent la séquence consensus HExxH (Schiavo et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267(33), 23479-23483). Elles clivent de façon très spécifique les protéines neuronales impliquées dans l'exocytose des neurotransmetteurs. Ainsi, la syntaxine et la SNAP 25 sont dégradées par les toxines botuliques A, C et E, alors que la synaptobrevine (VAMP) est clivée par la toxine tétanique et les toxines botuliques B, D, F et G. Il est important de noter que le site de clivage de ces protéines par les toxines est différent, sauf pour la BoNT/B et la toxine tétanique qui clivent la synaptobrevine au niveau de la liaison Q⁷⁶-F⁷⁷.

L'approche la plus efficace pour combattre les effets néfastes de la BoNT/B, soit au cours d'un botulisme déclaré, soit au cours de contre-indications thérapeutiques, est le développement d'inhibiteurs sélectifs et de haute affinité pour son activité métallopeptidasique, responsable de sa toxicité. Toutefois, l'identification de tels inhibiteurs exige un test simple et robotisable de mise en évidence de l'activité BoNT/B permettant un grand nombre d'essais.

Or, les tests actuellement disponibles ne sont pas totalement satisfaisants. Ils sont soit longs, soit peu sensibles et/ou inappropriés à une mise en œuvre comme méthode de criblage à haut débit.

Actuellement, la méthode de détection la plus sensible des toxines botuliques repose sur un essai *in vivo* chez la souris (Kautter & Salomon (1976) *J. Assoc. Anal. Chem.* 60, 541-545). Cet essai permet de détecter de 5 à 10 pg de toxine, mais le temps de réponse est beaucoup trop long (3-4 jours), le sérotype de la toxine n'est pas connu et enfin l'expérimentation sur animal est très controversée. Des essais sur lignées cellulaires ont été tentés (DeWaart et al. (1972) *Zentralblatt für Bacteriologie* 222, 96-114), mais leur sensibilité est trop faible. Des dosages immunologiques ont également été proposés mais aucun ne

présente une sensibilité suffisante, même après amplification de la réponse (*Stanley et al. (1985) J. Immunol. Methods 83, 89-95 ; Doellgast et al. (1993) J. Clin. Microbiol. 31, 2402-2409*). Un test colorimétrique relativement sensible a été proposé (*Szilaggi et al. (2000) Toxicon 35 381-389*) pour la BoNT/B, mais il met en jeu une succession d'étapes qui le rend non robotisable.

D'autres essais actuellement développés reposent sur l'utilisation de l'activité endopeptidasique de ces toxines (*Hallis et al. (1996) J. Clin. Microbiol. 34, 1934-1938*). Ceci implique le clivage par la BoNT/B d'un fragment de synaptobrevine immobilisée sur support solide et détection par un anticorps spécifique de l'extrémité N-terminale nouvellement créée par clivage et qui demeure sur la résine. Un dernier protocole consiste à immobiliser la toxine sur une colonne d'affinité. Par passage sur cette colonne, le substrat est clivé et le fragment est reconnu par un anticorps [*Witcome et al. (1999) Applied and environmental microbiology 65 3787-3792*]. Toutefois, ces essais ne sont pas encore optimisés et sont très difficilement robotisables.

La présente invention a précisément pour objet de proposer un nouveau test de détection permettant de s'affranchir des inconvénients évoqués précédemment.

En particulier, la présente invention repose sur la mise en évidence par les inventeurs que l'utilisation de la pyrenylalanine (PyA) associée à l'acide modifié L-paranitrophénylalanine (pNF) est particulièrement intéressante à la fois en terme de diagnostic et de détermination des pouvoirs inhibiteurs de l'activité enzymatique adaptable à des méthodes à haut débit.

La pyrenylalanine est un acide aminé synthétique qui possède une capacité de fluorescence importante. Avantagement, cette fluorescence du reste PyA est quasi totalement éteinte lorsque PyA est placé à proximité du reste pNF. En conséquence, cette fluorescence naturelle du PyA ne peut se manifester qu'à partir du moment où ce reste

n'est plus soumis à l'effet répresseur du reste pNF, par exemple lorsqu'il en est physiquement séparé de ce dernier, notamment par clivage de la séquence les séparant.

5 Ce couple apparaît donc comme un outil particulièrement intéressant lorsqu'il est présent au niveau d'un substrat peptidique reconnu par la BoNT/B sous la forme d'un fragment clivable par cette dernière.

10 Un premier aspect de l'invention concerne donc un substrat peptidique reconnu par la toxine botulique de type BoNT/B, caractérisé en ce qu'il incorpore dans sa structure peptidique un fragment de formule PyA-(Z)-pNF dans laquelle Z représente un ou plusieurs acides aminés, ledit fragment étant clivable par ladite toxine.

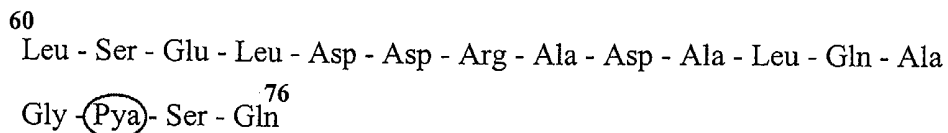
15 La présente invention repose donc sur la détection d'une fluorescence provoquée par la séparation de PyA et pNF, cette séparation étant induite par le clivage d'une des liaisons établies entre eux. Le clivage par la BoNT/B produit une très intense augmentation de fluorescence. La figure 1 illustre ce phénomène.

Z peut ainsi comprendre jusqu'à 4 acides aminés et de préférence représente 2 acides aminés identiques ou différents.

20 Cet ajustement est lié à la nécessité de préserver la spécificité et l'efficacité de BoNT/B pour cliver le substrat incluant PyA-(Z)-pNF. Le choix de Z est par conséquent effectué en prenant en compte ces deux critères.

25 Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le reste peptidyle PyA-Z-pNF est présent, dans la séquence peptidique du substrat cellulaire reconnu par la BoNT/B, au niveau de son site de clivage auquel il se substitue.

30 De préférence, le reste PyA-(Z)-pNF répond à la définition PyA-Ser-Gln-pNF (SEQ ID N°1). Ce fragment est clivable par la toxine BoNT/B au niveau de la liaison Gln-pNF.



(2m)

Les composés revendiqués peuvent être obtenus par les méthodes usuelles de synthèse en phase solide selon la méthode de Merrifield sur un synthétiseur automatique comme par exemple l'appareil
 5 431A de Applied Biosystems. La chimie utilisée correspond à la technologie Fmoc et la protection des chaînes latérales permettant leur clivage par l'acide trifluoroacétique tel que décrit par *E. Atherton et R.C. Sheppard (1989) dans "Solid Phase Peptide Synthesis : a practical approach, IRL Press, Oxford"*.

10 La L-pyrenylalanine est obtenue selon un procédé de synthèse asymétrique décrit dans la publication *Soleilhac, J.M. et al. Anal. Biochem. (1996) 241, 120-127*. La pureté des peptides finaux est estimée supérieure à 99% par HPLC en phase inverse et l'identification de ceux-ci est effectuée par spectrométrie de masse electrospray.

15 Les couplages sont effectués selon des techniques conventionnelles à l'aide d'agent de couplage comme HATU, PyBrop et de préférence en utilisant dicyclohexylcarbodiimide / hydroxybenzotriazole.

20 Un substrat conforme à la présente invention est intéressant à plusieurs titres.

Il peut permettre de détecter rapidement au sein d'une substance la présence éventuelle de la toxine botulique de type B. Les substrats 1s et 2s présentent en particulier une très haute sélectivité vis à vis des autres toxines botuliques car seule la BoNT/B clive la synaptobrevine au
 25 niveau de la liaison Q⁷⁶-F⁷⁷. Il est également très sélectif vis à vis de la toxine tétanique (*Soleilhac et al. (1996) Anal. Biochem. 241, 120-127*).

Il rend également possible le criblage à haut débit d'inhibiteurs potentiels de la toxine botulique de type B.

En conséquence, la présente invention concerne l'utilisation d'un substrat tel que défini précédemment pour détecter, identifier et/ou doser la BoNT/B ou un composé capable d'inhiber ou d'activer la BoNT/B.

Selon une variante préférée de l'invention, le composé à doser est
5 un composé capable d'inhiber la BoNT/B.

La présente invention a également pour objet un procédé pour détecter, identifier et/ou doser un composé capable d'inhiber la BoNT/B, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en présence en solution d'un substrat conforme à
10 l'invention avec ladite BoNT/B, et au moins un composé susceptible d'inhiber la BoNT/B,

- la mesure de la fluorescence émise en présence, et/ou en absence, du composé à détecter, identifier et/ou doser, avec l'absence ou une diminution de fluorescence indiquant la présence d'un composé inhibiteur
15 de la BoNT/B.

Un composé auquel on applique le test défini ci-dessus pour déterminer son activité inhibitrice de la BoNT/B peut être de nature diverse, sans limitation, et par exemple, peut être choisi parmi des inhibiteurs récemment publiés [L. Martin (1999) J. Med. Chem. 42 515-
20 525].

Le composé à tester peut se présenter sous une forme isolée, être connu ou non et/ou être présent dans une banque de composés, un extrait biologique.

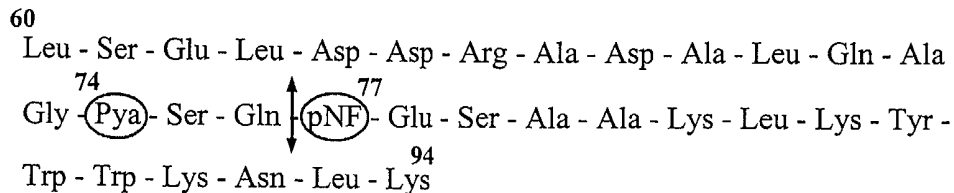
Selon une variante préférée, le substrat est :

25 60
Leu-Ser-Glu-Leu-Asp-Asp-Arg-Ala-Asp-Ala-Leu-Gln-Ala-
74
Gly-Pya-(Z)—pNF-Glu-Ser-Ala-Ala-Lys-Leu-Lys-Tyr-

Trp-Trp-Lys-Asn-Leu-Lys

(1s)

et plus préférentiellement



(2s)

5

L'addition de doses croissantes d'un composé capable d'inhiber l'activité enzymatique de la BoNT/B vis-à-vis d'un substrat conforme à la présente invention, se traduira par une diminution de l'intensité de la fluorescence due à la diminution de la quantité de métabolite, formé par la BoNT/B. La mesure de cette intensité rapportée à une courbe étalon établie par mélanges du substrat et du métabolite fluorescent formé permet donc soit d'évaluer le pouvoir inhibiteur en pourcentage d'inhibition à une concentration donnée fixe du produit P, soit de déterminer précisément son IC₅₀ puis son K_i à l'aide du K_m du substrat et de plusieurs concentrations du produit P.

L'extrême sensibilité du dosage permet d'opérer dans des volumes très faibles (50 ou 100 µl) avec des concentrations de l'ordre de 20 µM du substrat 2s. Le test est donc très facilement utilisable en plaques à 96 puits ou plus, permettant sa robotisation avec détermination automatique des K_i lorsque le fluorimètre de lecture est relié à un ordinateur possédant un logiciel commercial approprié.

La présente invention propose donc un test d'identification d'inhibiteurs de la BoNT/B ainsi que la détermination de leur pouvoirs inhibiteurs par un essai fluorimétrique, très rapide, reproductible et permettant des tests robotisables et très nombreux pouvant donc s'adapter à une sélection à haut débit de molécules inhibitrices.

25

La présente invention propose également la production de produits industriels nouveaux, éventuellement utilisables sous forme de kits comprenant des plaques de 96, 192 et 384 puits prêts à l'emploi et contenant soit la BoNT/B lyophilisée, soit un substrat tel que défini selon l'invention et illustré dans le cas de 1s et 2s, auxquels on ajoute, éventuellement par utilisation d'un robot, les réactifs nécessaires à la détermination des pouvoirs inhibiteurs de séries de molécules.

Un autre aspect de l'invention concerne une méthode de diagnostic de la présence de BoNT/B en particulier dans des aliments éventuellement contaminés, caractérisée en ce qu'elle met en œuvre un substrat conforme à l'invention et de préférence de type 1s ou plus préférentiellement 2s.

Les figures et exemples ci-après sont présentés à titre illustratif et non limitatif de la présente invention.

Figures :

Figure 1 : Fluorescence des métabolites et substrat en émission (excitation à 343 nm).

Figure 2 : Mesure des constantes cinétiques du substrat.

Figure 3 : Fluorescence en fonction de la quantité d'enzyme.

Figure 4 : Détermination du K_i du composé 2s dans L. Martin et al. (1999) J. Med. Chem. 42, 515-525) sur la BoNT/B.
 $K_i(\text{BoNT/B})=5.6 \cdot 10^{-6}\text{M}$

25

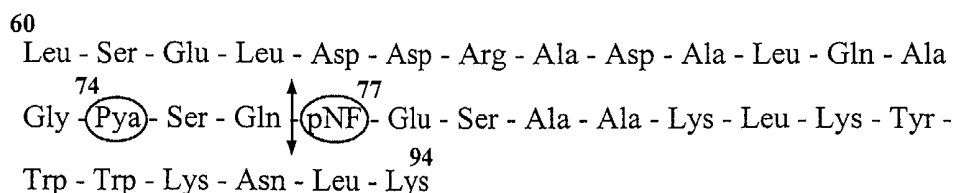
EXEMPLES

EXEMPLE 1

PREPARATION DES PEPTIDES.

Le peptide 2s et son métabolite 2m sont préparés en phase solide par la méthode de Merrifield sur un synthétiseur automatique en utilisant la stratégie Fmoc et la protection des chaînes latérales sous forme de groupements t.butyl, trityl ou Boc comme décrit dans "Solid Phase Peptide
 5 *Synthesis : a practical approach, IRL Press, Oxford (1989)*". La L-pyrénylalanine est obtenu selon un procédé de synthèse asymétrique précédemment mis au point (*Soleilhac et al. (1996) Anal. Biochem. 241, 120-127*). Les couplages sont effectués principalement par utilisation de dicyclohexylcarbodiimide/hydroxy-benzotriazole dans le N-méthyl-
 10 pyrrolidone. On peut avantageusement utiliser le HATU en présence de diisopropyléthylamine pour l'introduction de la pyrénylalanine dans la séquence peptidique. Le peptide final est obtenu après clivage de la résine et déprotection des chaînes latérales par l'acide trifluoroacétique. La solution est évaporée sous vide et le peptide est précipité dans l'éther à
 15 -20°C et purifié par HPLC sur une colonne nucléosyl C₈. Les peptides sont analysés par spectromètre de masse et RMN 1H (600 MHz).

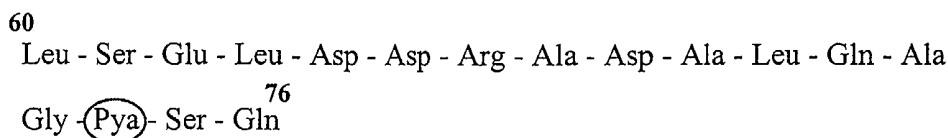
Composé 2s :



$$MH^+_{(exp)} 4269.04 \quad MH^+_{(theo)} 4269.20$$

20

Composé 2m :



$$MH^+_{(exp)} 1959.83 \quad MH^+_{(theo)} 1958.06$$

La toxine botulique de type B utilisée pour des tests à haut débit correspond à la chaîne légère de la BoNT/B, accessible commercialement (Sigma, France Biochem). Elle peut également être isolée par clivage de la protéine entière (chaînes légères et lourdes) produite par des souches
5 de clostridium botulinum de type B.

EXEMPLE 2

ESSAI FLUORIMETRIQUE.

On incube le substrat 2s (18 μ m) pendant 30 minutes avec 0.35
10 ng de chaîne légère de BoNT/B à 37°C dans 100 μ l de tampon HEPES 20 mM, pH 7.4 et 0.1 mM de DTT. On arrête l'hydrolyse enzymatique par addition de 100 μ l HCl 0.2 N, et on lie directement la fluorescence émise sur un fluorimètre (λ_{ex} 343 nm, λ_{em} 377 nm). Dans ces conditions, on obtient moins de 10% de clivage de substrat. (figure 2)

15 Identification du site de clivage par HPLC.

Les solutions du substrat 2s avant et après incubation avec l'enzyme dans les conditions standard décrites ci-dessus, sont analysées par HPLC sur une colonne nucléosyl C₈ 7 μ m/300 Å (4.6 x 70 mm) avec comme éluant un gradient 10-90% de solvant B en 30 minutes (solvant A, 0.05%
20 d'acide trifluoacétique dans l'eau ; solvant B 0.038% d'acide trifluoroacétique dans CH₃CN/H₂O 90/10). Détection UV ou fluorimétrique, temps de rétention du substrat S : 15.90 mn ; métabolite M : 12.76 mn.

Mesure des constantes cinétiques du substrat.

Dans 100 μ l de tampon HEPES 20 mM pH 7.4 et 0.1 mM DTT, on
25 incube pendant 30 minutes à 37°C, 0.23 ng de chaîne légère de BoNT/B et des concentrations variables (de 3.9 à 500 μ M) de substrat S. La réaction est arrêtée comme décrit ci-dessus. Pour chaque concentration de substrat, une courbe de calibration représentant 5, 10, 15 et 20% de clivage est établie par mélange du substrat S et de son métabolite
30 fluorescent M (Figure 2).

Le pourcentage de clivage doit toujours être inférieur à 10%.

A partir de ces courbes de calibration, les quantités de métabolites formées pour chaque essai sont déterminées et les valeurs de K_m calculées à partir du programme Enzfitter (Biosoft) $K_m = 47 \mu\text{M}$; $k_{cat} = 45$
5 s^{-1} .

EXEMPLE 3

DOSAGE DES QUANTITES MINIMALES DE BoNT/B DANS UN ECHANTILLON.

10 On incube pendant 4 h à 37°C dans le tampon HEPES 20 mM pH 7.4 et 0.1 mM DTT le substrat 2s (18 μM) et des quantités croissantes (3.5 pg, 10 pg et 35 pg) de chaîne légère de BoNT/B. L'analyse de la fluorescence, due à la dégradation du substrat en présence de 3.5 pg de toxine, est reproductible et significativement différente ($p = 0.01$) de celle
15 du témoin contenant uniquement le substrat 2s (Figure 3).

EXEMPLE 4

DETERMINATION DU K_i D'INHIBITEURS DE LA BoNT/B.

Cet essai peut être robotisé sur plaque de 96 puits. On préincube
20 dans 100 μl final de tampon HEPES 20 mM et 0.1 mM DTT, des quantités croissantes d'inhibiteurs choisis dans L. Martin et al. (1999) J. Med. Chem. 42 515-525 et 0.35 ng de chaîne légère de BoNT/B pendant 30 minutes. On ajoute alors 18 μM de substrat 2s et l'incubation est poursuivie pendant 30 minutes à 37°C. La réaction est stoppée par addition de HCl
25 0.2 M et la lecture de la plaque se fait directement sur un fluorimètre.

La quantité de métabolite formé dans chaque essai est déterminée à partir des courbes étalon.

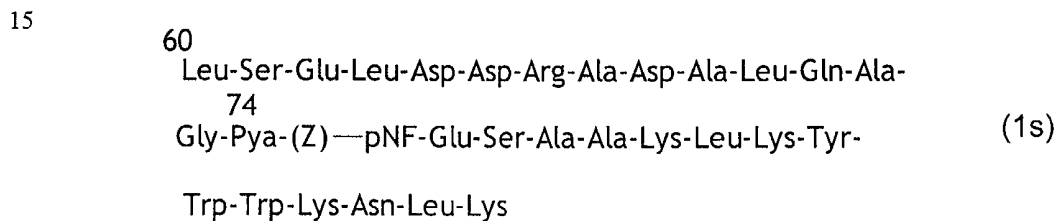
Le K_i de l'inhibiteur est déterminé à partir de la relation de Cheug Prussoff : $K_i = IC_{50}/(1 + [S]/K_M)$ (Figure 4).

REVENDICATIONS

1. Substrat peptidique reconnu par la toxine botulique de type
 5 BoNT/B, caractérisé en ce qu'il incorpore dans sa structure peptidique un
 fragment de formule PyA-(Z)-pNF dans laquelle Z représente un ou
 plusieurs acides aminés, ledit reste étant clivable par ladite toxine.

2. Substrat selon la revendication 1, caractérisé en ce que Z
 10 comprend jusqu'à 3 acides aminés, et de préférence 1 ou 2 acides
 aminés, identiques ou différents.

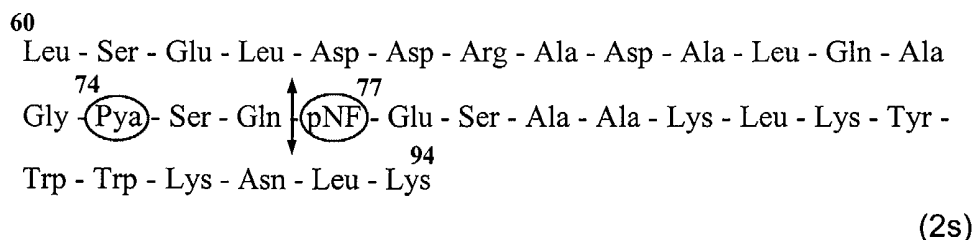
3. Substrat selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le
 substrat répond à la formule 1s :



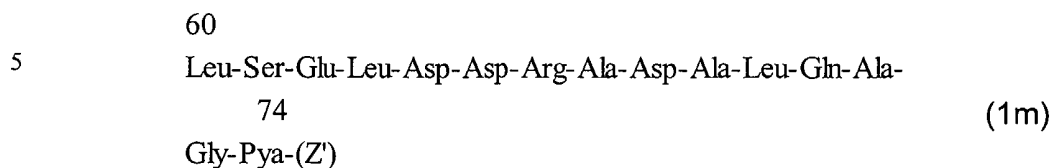
20 avec Z étant tel que défini en revendication 1 ou 2.

4. Substrat selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce
 que le fragment PyA-(Z)- pNF répond à la définition PyA-Ser-Gln-pNF.

25 5. Substrat selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce
 qu'il s'agit du substrat 2s, de formule :



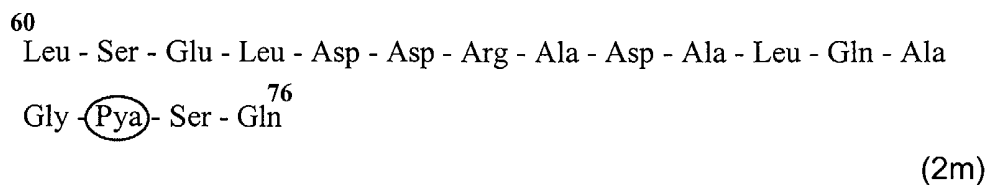
6. Composé caractérisé en ce qu'il répond à la formule 1m :



avec Z' représentant un ou plusieurs acides aminés présent(s) dans Z tel que défini en revendications 1 à 4.

10

7. Composé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il répond à la formule 2m :



15

8. Utilisation d'un substrat selon l'une des revendications 1 à 5, pour détecter, identifier et/ou doser la BoNT/B ou un composé capable d'inhiber la BoNT/B.

20

9. Procédé pour détecter, identifier et/ou doser un composé capable d'inhiber la BoNT/B, caractérisé en ce qu'il comprend :

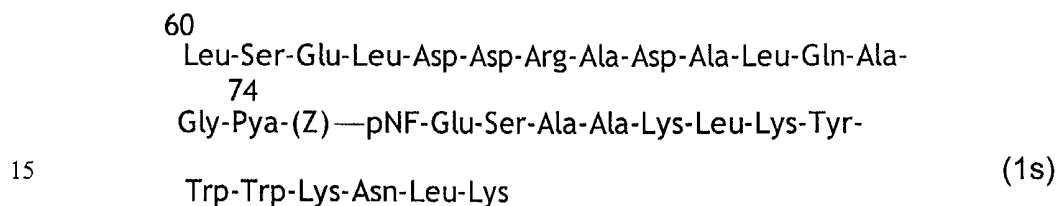
– la mise en présence en solution d'un substrat selon l'une des revendications 1 à 5, avec la BoNT/B et au moins un composé susceptible d'inhiber ou d'activer la BoNT/B ;

– la mesure de la fluorescence émise en présence et/ou en absence du composé à détecter, identifier et/ou doser avec l'absence ou une diminution de fluorescence indiquant la présence d'un composé inhibiteur de la BoNT/B.

5

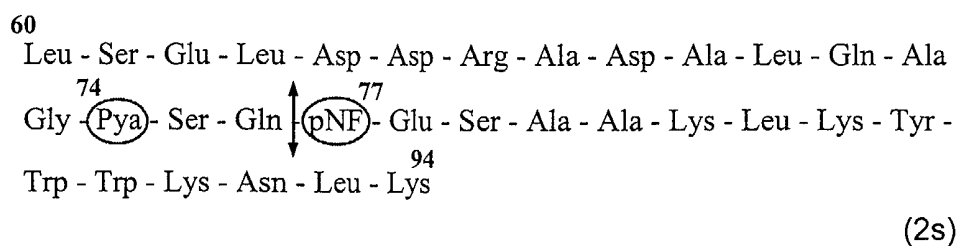
10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que le composé à tester est connu ou non et/ou est présent dans une banque de composés ou un extrait biologique.

10 11. Procédé selon la revendication 9 ou 10, caractérisé en ce que le substrat est le substrat 1s :



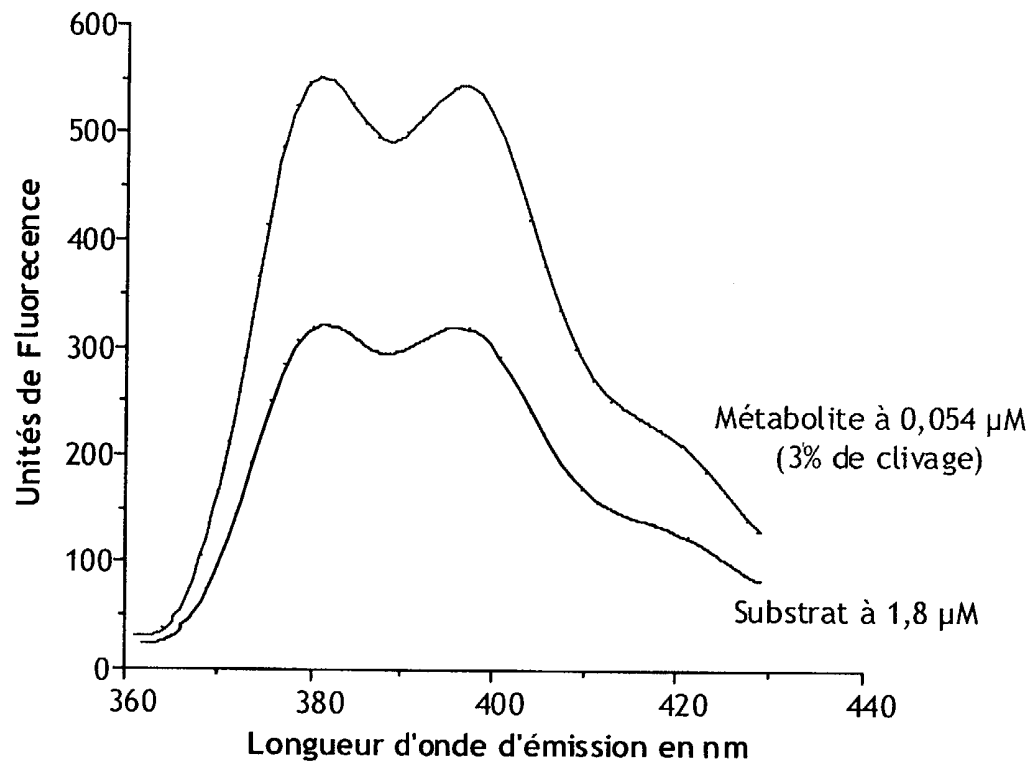
avec Z tel que défini en revendication 1.

20 12. Procédé selon la revendication 9 ou 10, caractérisé en ce que le substrat est le substrat 2s :

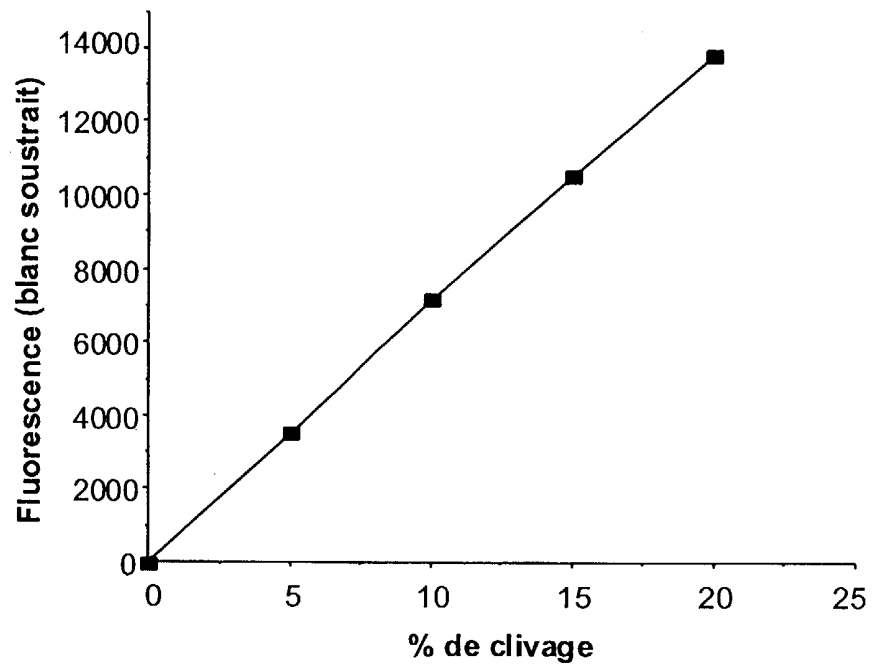


25 13. Méthode de diagnostic de la présence de BoNT/B, caractérisée en ce qu'elle met en œuvre un substrat selon l'une des revendications 1 à 5.

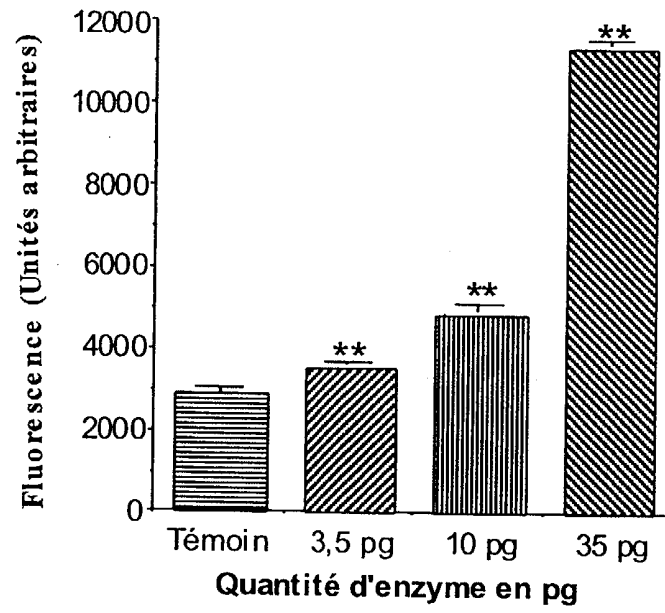
1/4

**FIG.1**

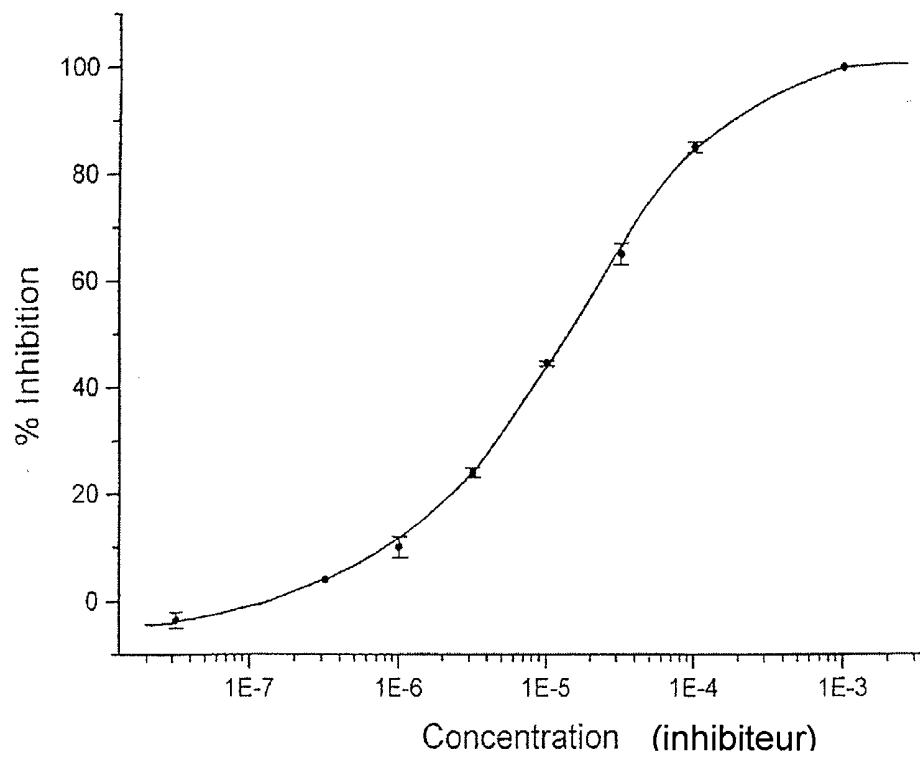
2/4

**FIG.2**

3/4

**FIG.3**

4/4

**FIG.4**

LISTE DE SEQUENCES

<110> INSERM

<120> Substrat peptidique reconnu par la toxine botulique
BoNT/B et son utilisation pour doser et/ou détecter
ladite toxine ou des inhibiteurs correspondants.

<130> BFF00/300

<140> FR 00/07113

<141> 2000-06-02

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:substrat
peptidique, Xaa en position 1 = PyA ; Xaa en position 4 = pNF.

<400> 1

Xaa Ser Gln Xaa

1

<210> 2

<211> 31

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:substrat
peptidique, Xaa en position 15 = PyA ; Xaa en position 16 = Z ; Xaa en
position 17 = pNF.

<400> 2

Leu Ser Glu Leu Asp Asp Arg Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Xaa Xaa

1

5

10

15

Xaa Glu Ser Ala Ala Lys Leu Lys Tyr Trp Trp Lys Asn Leu Lys

20

25

30

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:substrat
peptidique, Xaa en position 15 = PyA ; Xaa en position 16 = Z'.

<400> 3

Leu Ser Glu Leu Asp Asp Arg Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Xaa Xaa
1 5 10 15

<210> 4

<211> 32

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:substrat
peptidique, Xaa en position 15 = PyA ; Xaa en position 18 = pNF.

<400> 4

Leu Ser Glu Leu Asp Asp Arg Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Xaa Ser
1 5 10 15

Gln Xaa Glu Ser Ala Ala Lys Leu Lys Tyr Trp Trp Lys Asn Leu Lys
20 25 30

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:substrat
peptidique, Xaa en position 15 = PyA.

<400> 5

Leu Ser Glu Leu Asp Asp Arg Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Xaa Ser
1 5 10 15

Gln

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
D,Y	SOLEILHAC ET AL.: "A sensitive and rapid fluorescence-based assay for determination of tetanus toxin peptidase activity" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 241, 1996, pages 120-127, XP002160418 * abrégé; figure 1 *	1-13	C07K14/00 C07K7/08 G01N21/64 C12Q1/37
Y	FITZGERALD ET AL.: "A continuous fluorometric assay for the feline immunodeficiency virus protease" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 54, 15 décembre 1997 (1997-12-15), pages 226-230, XP002160419 * abrégé *	1-13	
A	WO 95 33850 A (MICROBIOLOGICAL RES AUTHORITY ;SHONE CLIFFORD CHARLES (GB); HALLIS) 14 décembre 1995 (1995-12-14) * abrégé; revendications; figure 1 * * page 11, ligne 1 - ligne 2 * * Seq Id No 9 *	1-13	
A	PERANTEAU ET AL.: "Increase in fluorescence upon the hydrolysis of tyrosine peptides: Application to proteinase assays" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 227, no. 1, 1995, pages 242-245, XP000982301 * abrégé * * page 244, colonne de gauche, dernière ligne - page 244, colonne de droite, ligne 3 *	1,2	C07K C12Q G01N
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
27 février 2001		Ceder, 0	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		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	

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

