

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :

2 932 190

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

②① N° d'enregistrement national :

08 53850

⑤① Int Cl⁸ : **C 12 Q 1/37** (2006.01), C 07 K 7/64, 11/002, 1/10,
G 01 N 33/52, 33/58

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 10.06.08.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 11.12.09 Bulletin 09/50.

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 public à caractère industriel et
commercial — FR.

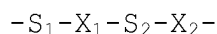
⑦② Inventeur(s) : BERTHELOT THOMAS et DELERIS
GERARD.

⑦③ Titulaire(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMI-
QUE Etablissement public à caractère industriel et com-
mercial.

⑦④ Mandataire(s) : BREVALEX.

⑤④ PEPTIDES CYCLIQUES FLUORESCENTS, PROCEDES DE PREPARATION DE CEUX-CI ET UTILISATION DE
CES PEPTIDES POUR MESURER L'ACTIVITE ENZYMATIQUE D'UNE ENZYME PROTEASE.

⑤⑦ L'invention a trait à un peptide cyclique comprenant la
séquence suivante:



dans laquelle S₁ est une première séquence peptidique
cible d'une enzyme protéase E, S₂ est une seconde sé-
quence peptidique cible de ladite enzyme protéase E, S₁ et
S₂ pouvant être identiques ou différents, X₁ est une sonde
porteur d'un groupe donneur fluorescent et X₂ est une son-
de porteur d'un groupe accepteur fluorescent ou non fluo-
rescent, le groupe donneur et le groupe accepteur étant
choisis de sorte à ce que le spectre d'émission de fluores-
cence du groupe donneur recouvre, au moins en partie, le
spectre d'absorption du groupe accepteur.

Application de ces peptides à la détermination de l'acti-
vité d'enzymes protéases.

FR 2 932 190 - A1



PEPTIDES CYCLIQUES FLUORESCENTS, PROCEDES DE
PREPARATION DE CEUX-CI ET UTILISATION DE CES PEPTIDES
POUR MESURER L'ACTIVITE ENZYMATIQUE D'UNE ENZYME
PROTEASE

DESCRIPTION

DOMAINE TECHNIQUE

La présente invention a trait à de nouveaux
5 peptides cycliques fluorescents destinés à permettre la
mesure de l'activité enzymatique d'une enzyme protéase,
notamment par la technique dite de FRET (acronyme
correspondant à la terminologie anglaise « Fluorescence
Resonance Energy Transfer » ou encore « Förster's
10 Resonance Energy Transfer »).

L'invention trouve, notamment, son
application dans le domaine du diagnostic de maladies
découlant d'un dérèglement enzymatique.

ÉTAT DE LA TECHNIQUE ANTÉRIEURE

15 Les enzymes présentent des mécanismes
d'action complexes faisant intervenir notamment des
phénomènes de régulations, qui, lorsqu'ils sont
déréglés, peuvent être à l'origine de l'apparition de
20 troubles pathologiques.

C'est le cas notamment des
métalloprotéinases (connues sous l'abréviation MMP),
qui sont capables de cliver tous les éléments de la
matrice extracellulaire, certains facteurs de
25 croissance ainsi que des molécules d'adhésion. Ces
enzymes sont naturellement régulées par des inhibiteurs

comme les TIMP (acronyme correspondant à la terminologie anglaise « Tissue inhibitor of metalloproteinases »). Lorsque la balance MMP/TIMP est dérégulée, des processus pathologiques peuvent apparaître tels que la croissance tumorale, les métastases, les arthrites rhumatoïdes, les maladies cardiaques.

Eu égard aux implications des enzymes dans de nombreuses pathologies, il s'est révélé très vite primordial de mettre en place des outils permettant de mesurer l'activité de ces enzymes, en vue d'établir éventuellement une corrélation avec la pathologie détectée. A l'heure actuelle, les outils disponibles consistent en des substrats de l'enzyme, dont on veut mesurer l'activité, ces substrats présentant des groupes fluorescents, l'activité pouvant ainsi être quantifiée par des mesures de fluorescence. En particulier, la technique de fluorescence la plus utilisée est le FRET (acronyme correspondant à la terminologie anglaise « Fluorescence Resonance Energy Transfer »). Toutefois, cette technique n'est pas basée en tant que telle sur la mesure du transfert de fluorescence mais sur la mesure de transfert d'une énergie électronique. Il faut ainsi faire la distinction entre le transfert radiatif et le transfert non radiatif (ou résonant). Le transfert radiatif ne donne pas accès à des informations comme la distance entre groupes, leurs orientations, qui peuvent être des données essentielles pour comprendre ou caractériser les systèmes étudiés.

Le transfert radiatif est un processus se déroulant en deux étapes. Dans un premier temps, un photon est émis par un groupe donneur et dans un deuxième temps, ce photon est absorbé par un groupe
5 accepteur du photons identique ou différent du groupe donneur. Ce transfert ne requiert aucune interaction entre les groupes mais dépend du recouvrement spectral des espèces et de la concentration.

Le transfert non radiatif de l'énergie
10 d'excitation nécessite une interaction entre un groupe donneur et un groupe accepteur. Ce transfert ne peut se produire, que si le spectre d'émission du groupe donneur recouvre partiellement le spectre d'absorption du groupe accepteur, afin qu'il existe une
15 correspondance en énergie entre des transitions vibroniques du groupe donneur et des transitions vibroniques du groupe accepteur. De telles transitions sont dites couplées, ou « en résonance ».

Le phénomène de transfert non radiatif
20 d'énergie a été étudié par Förster. Il a pu mettre en évidence, que ce phénomène physique se déroule sur de très courtes distances, de l'ordre de 10 à 100 Å. Lorsque la distance entre le groupe donneur et le groupe accepteur augmente, ceci se traduit pas une
25 variation du transfert de l'énergie. Ce phénomène peut ainsi être utilisé pour évaluer l'activité enzymatique d'une enzyme protéase. En effet, en mettant en contact un substrat comprenant à la fois un groupe donneur et un groupe accepteur disposés respectivement à chacun de
30 ses extrémités avec une enzyme protéase spécifique, il s'ensuit un clivage du substrat et ainsi, une

augmentation de la distance entre le groupe donneur et le groupe accepteur et, par voie de conséquence, une variation du transfert de l'énergie d'excitation (ou énergie de résonance). A partir de cette variation, on
5 peut ainsi remonter à une estimation de l'activité de l'enzyme.

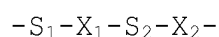
Les substrats actuellement utilisés sont pour la plupart des substrats de structure linéaire,
10 qui se révèlent être peu stables en milieu biologique, car ils sont notamment susceptibles d'être dégradés par des exoprotéases et des protéases non spécifiques.

Il existe donc un véritable besoin pour des peptides utilisables comme outils pour la
15 quantification de l'activité enzymatique d'une enzyme protéase prédéterminée, qui soient stables et qui permettent notamment de suivre l'activité enzymatique de ladite enzyme par la technique FRET.

EXPOSÉ DE L'INVENTION

20 Les Inventeurs ont ainsi mis au point de nouveaux peptides répondant au besoin susmentionné.

Ainsi, l'invention a trait, selon un premier objet, à un peptide cyclique (désigné également
25 par cyclopeptide) comprenant la séquence suivante :



dans laquelle S_1 est une première séquence peptidique
30 cible d'une enzyme protéase E_1 , S_2 est une seconde séquence peptidique cible d'une enzyme protéase E_2 , S_1

et S_2 pouvant être identiques ou différents, E_1 et E_2 pouvant correspondre à la même enzyme protéase ou à deux enzymes protéases distinctes, X_1 est une sonde porteuse d'un groupe donneur fluorescent et X_2 est une sonde porteuse d'un groupe accepteur fluorescent ou non fluorescent.

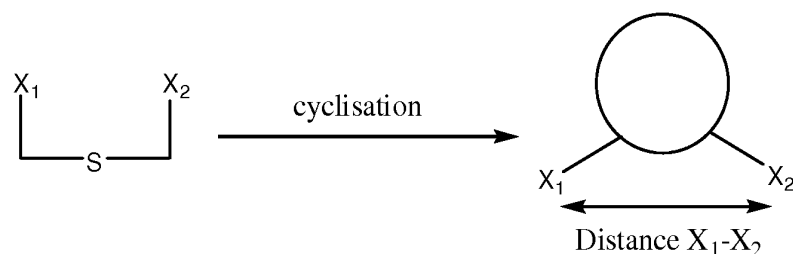
De préférence, le groupe donneur et le groupe accepteur sont choisis de sorte à ce que le spectre d'émission de fluorescence du groupe donneur recouvre, au moins en partie, le spectre d'absorption du groupe accepteur.

Ainsi, en présence d'une enzyme protéase E (si E_1 et E_2 ne constituent qu'une seule et même enzyme et S_1 et S_2 sont des séquences peptidiques cibles de la même enzyme protéase) ou à la fois d'une enzyme protéase E_1 et d'une enzyme protéase E_2 (lorsqu'elles sont distinctes et que S_1 est une séquence peptidique cible de l'enzyme protéase E_1 et S_2 est une séquence peptidique cible de l'enzyme protéase E_2), les peptides cycliques de l'invention vont se cliver à la fois au niveau de la première séquence peptidique S_1 et au niveau de la seconde séquence peptidique S_2 , ce qui va générer un éloignement dans l'espace des sondes X_1 et X_2 , du fait de la disposition des sondes X_1 et X_2 . S'ensuit un éloignement des groupes donneur et accepteur et, par voie de conséquence, une variation du transfert de l'énergie de résonance entre ces deux groupes. A partir de la variation d'énergie de résonance, il est ainsi possible de remonter à l'activité enzymatique de l'enzyme protéase E ou des enzymes protéases E_1 et E_2 .

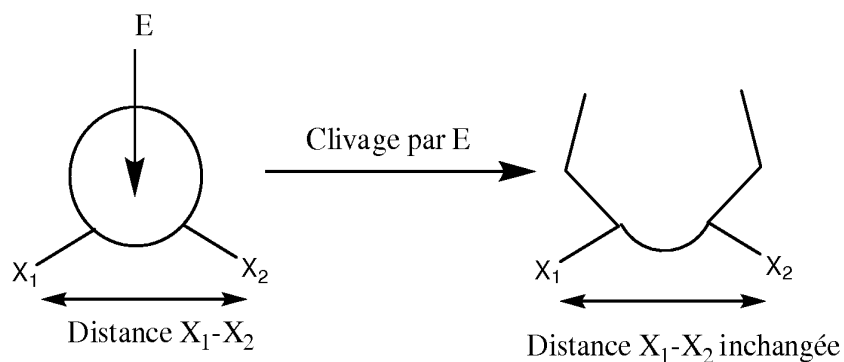
Qui plus est, le fait que les peptides de l'invention soient cycliques permet de surmonter les inconvénients des peptides linéaires classiquement utilisés dans l'art antérieur, notamment les problèmes de stabilité rencontrés avec les peptides linéaires de l'art antérieur.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, E_1 et E_2 correspondent à la même enzyme protéase.

Pour étudier l'activité enzymatique d'une enzyme protéase E , dans le cas où $E_1=E_2$, les inventeurs auraient pu imaginer tout simplement de cycliser une seule séquence peptidique linéaire cible de l'enzyme protéase E à étudier, comprenant à ses extrémités une sonde X_1 et une sonde X_2 selon le schéma suivant :



En présence de l'enzyme protéase E à étudier, le peptide cyclique se cliverait selon le schéma suivant :



Après clivage, la distance entre les groupes X_1 et X_2 est inchangée. Il s'ensuit aucune variation du transfert de résonance, et donc une impossibilité de quantifier l'activité de l'enzyme
5 protéase E.

Avant d'entrer plus en détail dans la description, nous proposons les définitions suivantes.

Par groupe donneur fluorescent, on entend classiquement un groupe apte à absorber de l'énergie lumineuse (dite lumière d'excitation, dont la longueur
10 d'onde appartient généralement au domaine de l'ultraviolet) et de la restituer sous deux formes possibles en fonction de son environnement :

a) sous forme d'un transfert d'énergie d'excitation par résonance avec un groupe accepteur, à
15 condition que ce dernier se trouve à une distance compatible avec le phénomène de FRET décrit précédemment et préférentiellement, à une distance allant de 10 à 100 Å ; ou

b) sous forme d'une lumière fluorescente (dite lumière d'émission du donneur), dont la longueur
20 d'onde appartient, généralement, au domaine du visible.

Par groupe accepteur, on entend classiquement, au sens de l'invention, un groupe apte à
25 absorber l'énergie d'excitation du groupe donneur par énergie de résonance. Cette énergie d'excitation pourra être restituée selon deux grands modes :

a) par émission radiative (émission de photons), auquel cas on parlera de groupe accepteur
30 fluorescent ; ou

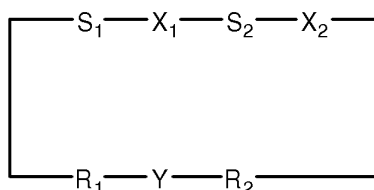
b) par émission non radiative (à savoir tout autre mode de désactivation autre que l'émission de photons), auquel cas on parlera de groupe accepteur non fluorescent.

5 Par sonde, on entend classiquement, au sens de l'invention, un reste d'acide aminé porteur d'un groupe donneur (dans le cas de la sonde X_1) ou porteur d'un groupe accepteur (dans le cas de la sonde X_2).

Par reste d'acide aminé, on entend,
10 classiquement, le reste d'acide aminé résultant de la réaction d'une fonction $-NH_2$ d'un acide aminé ou $-CO_2H$ et analogues avec une fonction d'un autre composé, de sorte à former une liaison covalente.
Par séquence peptidique cible, on entend classiquement,
15 au sens de l'invention, une séquence peptidique apte à être reconnue et clivée par une enzyme protéase.

L'utilisation d'un peptide cyclique comprenant deux séquences peptidiques cibles de l'enzyme protéase E_1 et de l'enzyme protéase E_2 (E_1 et
20 E_2 pouvant être identiques ou différents) entre lesquelles sont disposées respectivement une sonde X_1 et une sonde X_2 conforme à l'invention permet, comme explicité ci-dessus, de fournir de bons outils pour la quantification de l'activité desdites enzymes
25 protéases.

Les peptides cycliques de l'invention peuvent répondre à la formule suivante :



dans laquelle :

- S_1 , X_1 , S_2 et X_2 répondent à la même définition que celle donnée ci-dessus ;
- 5 - R_1 et R_2 correspondent indépendamment à une liaison simple, un reste d'acide aminé ou une séquence peptidique ;
- Y correspond à un groupe $-\text{CONH}-$ ou $-\text{NHCO}-$.

S_1 et S_2 peuvent être identiques, lorsque le peptide est destiné à quantifier l'activité d'une seule enzyme protéase (E_1 et E_2 étant alors identiques) ou différents, notamment lorsque le peptide est destiné à différencier la présence d'isoformes de la même enzyme protéase ou la présence de deux enzymes protéases distinctes E_1 et E_2 .

Lorsque S_1 et S_2 sont identiques, elles peuvent être disposées dans le même sens ou en sens inverse. Par exemple, lorsque S_1 correspond à la séquence $-\text{Gly-Pro-Gln-Gly-Leu-Leu-Gly-Ala}-$, la séquence S_2 peut correspondre à la même séquence disposée en sens inverse, à savoir la séquence suivante $-\text{Ala-Gly-Leu-Leu-Gly-Gln-Pro-Gly}-$.

Les peptides cycliques de l'invention sont particulièrement adaptés pour la mesure de l'activité enzymatique d'enzymes protéases du type MMP (connues également sous le nom de « métalloprotéases de matrice extracellulaire »).

Dans ce cas, l'enzyme protéase E_1 et l'enzyme protéase E_2 sont des enzymes du type MMP, auquel cas la première séquence peptidique S_1 est cible

d'une enzyme protéase MMP et la seconde séquence peptidique S₂ est cible d'une enzyme protéase MMP.

Les MMP sont une famille d'endopeptidases, au nombre de 28, contenant un atome de zinc au niveau
5 de leur site actif. Elles peuvent être classées en deux sous-familles, selon qu'elles sont sécrétées ou associées à une membrane. Les MMP sécrétées comprennent les collagénases (telles que MMP-1, 8, 13 et 18), les gélatinases (telles que MMP-2 et 9), les matrilysines
10 (telles que MMP-7 et 26), les stromélysines (telles que MMP-3, 10 et 11), l'épilysine (MMP-28), l'énamélysine (MMP-20). Les MMP associées à une membrane comprennent les MMP transmembranaires telles que MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-23, MMP-24 et MMP-25.

15 Les MMP sont capables de cliver tous les éléments de la matrice extracellulaire ainsi que certains facteurs de croissance, ou encore des molécules d'adhésion. Les MMP sont régulées par des inhibiteurs naturels tels que les TIMP et jouent un
20 rôle important dans les processus physiologiques (tels que la croissance embryonnaire, l'angiogénèse, le remodelage du tissu osseux). Lorsque la balance MMP/TIMP est dérégulée, des processus pathologiques apparaissent tels que la croissance tumorale, les
25 métastases, les arthrites rhumatoïdes, les maladies cardiaques.

Le rôle des MMP dans la progression tumorale est multiple, notamment du fait de la capacité des MMP à dégrader la matrice extracellulaire,
30 favorisant ainsi l'invasion tumorale. Il a été démontré que les MMP ont également une activité protéolytique

contre des protéines non matricielles, ce qui leur confère un rôle complexe dans plusieurs autres étapes de la progression tumorale, la perte d'adhérence, l'invasion, la prolifération, l'angiogénèse, l'intravasion, l'extravasion et la croissance métastatique.

Les peptides cycliques se révèlent donc être d'excellents outils pour le suivi de l'activité enzymatique d'enzymes protéases du type MMP, afin, notamment, d'établir des liens entre l'activité enzymatique et les pathologies détectées.

Plus précisément, lorsque les peptides cycliques sont destinés au suivi de l'activité des MMP, les séquences peptidiques cibles S_1 et S_2 seront cibles d'une enzyme MMP (si $S_1=S_2$ ou si S_1 et S_2 sont des séquences cibles différentes destinées à distinguer deux isomorphes d'une même enzyme) ou de deux enzymes MMP (si S_1 et S_2 sont distinctes et sont cibles respectivement de deux enzymes protéases distinctes), ces séquences correspondant aux séquences des substrats de la (des) MMP reconnues par la(les) MMP dont on veut suivre l'activité.

En particulier, les séquences peptidiques cibles S_1 et S_2 peuvent être cibles d'une enzyme MMP choisie parmi la MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-5, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-19, MMP-23, MMP-25 et MMP-26 et les mélanges de celles-ci.

Les séquences peptidiques S_1 et S_2 ont généralement une longueur inférieure à 1000 acides aminés, de préférence de 4 à 14 acides aminés. S_1 et S_2

seront avantageusement choisies de sorte à ce que la distance entre leurs extrémités N et C terminales soit comprise entre 10 et 100 Å, une telle distance étant compatible avec la distance effective pour réaliser du FRET entre un groupe donneur et un groupe accepteur tel que défini précédemment. L'utilisation d'un logiciel de modélisation moléculaire permet de prédire avec fiabilité une telle distance.

Les séquences peptidiques S_1 et S_2 peuvent être issues de séquences peptidiques naturelles rencontrées dans les substrats naturels des MMP ou bien être issues de séquences synthétiques reconnues comme étant des substrats synthétiques des MMP.

Dans certains cas, il est possible qu'un substrat naturel ou synthétique soit reconnu et clivé par plusieurs MMP. Afin de déterminer quelle MMP est responsable du clivage, il faudra alors utiliser et comparer les données de cinétique enzymatique des différentes MMP pour ce substrat.

Ces données de cinétique enzymatique qui permettent la discrimination entre plusieurs MMP, sont généralement la constante de Mickaelis (K_m) qui est l'indicateur d'affinité d'un enzyme pour son substrat et le rapport de la constante catalytique (K_{cat} , nombre de moles de produits formées par seconde et par mole d'enzyme) sur la constante de Mickaelis qui est l'indicateur de l'efficacité catalytique de l'enzyme. Généralement, il existe donc un couple de valeurs (K_m et k_{cat}/K_m) spécifique pour un couple MMP/substrat. Il sera donc possible, à titre d'exemple, pour 2 MMP

reconnaissant le même substrat de déterminer laquelle est responsable de l'activité visualisée.

Les séquences synthétiques peuvent comprendre, par exemple les acides aminés ou groupes
5 suivants :

Nva (Nor-valine) ; Cha (3-cyclohexylalanine) ; Dpa (N-3(2,4-dinitrophényl)-L-2,3-diaminopropionyle) ; Abu : acide α -aminobutyrique ; Cys(Me) correspondant à la S-méthylcystéine, ce qui
10 signifie que le groupe -SH est remplacé par le groupe -S-CH₃, D-Arg correspondant à la D-Arginine.

Dans la suite de cet exposé, on précise que les abréviations listées ci-dessous ont les significations suivantes :

15 Gly : glycine ; Pro : proline ; Leu : leucine ; Ala : alanine ; Gln : glutamine ; Ile : isoleucine ; Arg : arginine ; Val : valine ; Tyr : tyrosine ; Glu : glutamate ; Met : méthionine ; Phe : phénylalanine ; Asn : Asparagine ; Thr : thréonine ;
20 Trp : tryptophane ; Ser : sérine ; His : histidine, ces abréviations correspondant à la nomenclature officielle à 3 lettres des acides aminés.

Lorsque la première séquence S₁ et/ou la seconde séquence S₂ sont destinées à être cibles de
25 l'enzyme MMP-1, elles peuvent ainsi correspondre à l'une au moins des séquences suivantes :

-Gly-Pro-Gln-Gly-Leu-Leu-Gly-Ala-

SEQ. 1

30 -Ala-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln-

SEQ. 2

- Gly-Pro-Gln-Gly-Leu-Ala-Gly-Gln-
SEQ.3
- Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Ile-
SEQ.4
- 5 -Gly-Pro-Glu-Gly-Leu-Arg-Val-Gly-
SEQ.5
- Tyr-Glu-Ala-Gly-Leu-Gly-Val-Val-
SEQ.6
- Ala-Gly-Leu-Gly-Val-Val-Glu-Arg-
10 SEQ.7
- Ala-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Ser-Thr-
SEQ.8
- Gly-Ala-Met-Phe-Leu-Glu-Ala-Ile-
SEQ.9
- 15 -Ile-Pro-Glu-Asn-Phe-Phe-Gly-Val-
SEQ.10
- Thr-Glu-Gly-Glu-Ala-Arg-Gly-Ser-
SEQ.11
- Arg-Ala-Ile-His-Ile-Gln-Ala-Glu-
20 SEQ.12
- Leu-Arg-Ala-Tyr-Leu-Leu-Pro-Ala-
SEQ.13
- Gly-Pro-Leu-Gly-Met-Arg-Gly-Leu-
SEQ.14
- 25 *Deng, S.J., et al. 2000. J. Biol. Chem. 275, 31422*
- Pro-Gln-Gly-Leu-Glu-Ala-Lys-
SEQ.15
- 30 *Beekman, B., et al. 1996. FEBS Lett 390, 221*
- Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-D-Arg-
35 SEQ. 16

- Bickett, D.M., et al. 1993. *Anal. Biochem.* 212, 58
 Knight, C.G., et al. 1992. *FEBS Lett.* 296, 263
 Darlak, K., et al. 1990. *J. Biol. Chem.* 265, 5199
 Stack, M.S., and Gray, R.D. 1989. *J. Biol. Chem.* 264, 4277
 5
 -Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Ala-Arg-
 SEQ. 17
 10
 Netzel-Arnett, S., et al. 1991. *Anal. Biochem.* 195, 86
 -Pro-Cha-Abu-Cys(Me)-His-Ala-
 SEQ.18
 15
 McGeehan, G.M., et al. 1994. *J. Biol. Chem.* 269, 32814
 -Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-
 20
 SEQ. 19
 Bickett, D.M., et al. 1993. *Anal. Biochem.* 212, 58
 25
 -Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-
 SEQ. 20
 30
 Mohan, M.J. et al. 2002. *Biochemistry* 41, 9462
 Hanessian, S. et al. 2001. *J. Med. Chem.* 44, 3066
 Ambrose, W.P. et al. 1998. *Anal. Biochem.* 263, 150
 -Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-
 35
 SEQ.21
 Knäuper, V. et al. 1996. *J. Biol. Chem.* 271, 1544
 -Pro-Leu-Gly-[2-mercapto-4-methyl-pentanoyl]-Leu-Gly-
 40
 SEQ. 22
 Weingarten, H.; Feder, J. 1985. *Anal. Biochem.* 147, 437
 Weingarten, H. et al. 1985. *Biochemistry.* 24, 6730
 45
 -Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Ala-Arg-
 SEQ. 17
 50
 A. Santala, A. et al. 1999. *FEBS Lett.* 461, 153-156
 Nagase, H. et al. 1994 *J.Biol.Chem.* 269, 20952-20957

-Pro-Leu-Gly-Cys (Me) -His-Ala-D-Arg-

SEQ. 23

5 J. Berman et al. 1992. J.Biol.Chem. 267, 1434-1437

-Arg-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Arg-

SEQ. 24

10

Kraft, P.J. et al. 2001. Connect.Tissue Res. 42, 149-163
Itoh, M. et al. 1997. J.Pharm.Biomed.Anal. 15, 1417-1426
Welch, A.R. et al. 1995. Arch.Biochem.Biophys. 324, 59-64

15

-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-

SEQ. 25

20 Lauer-Fields, J.L. and Fields, G.B. 2002 Biol.Chem. 383, 1095-1105
Lauer-Fields, J.L. et al. 2001. Biochemistry 40, 5795-5803

-Arg-Pro-Lys-Pro-Tyr-Ala-Nva-Trp-Met-

SEQ. 26

25

Bremer, C. et al. 2002. Acad.Radiol. 9 Suppl 2, S314-S315
Nagase, H. et al. 1994. J.Biol.Chem. 269, 20952-20957

30 Lorsque la première séquence S₁ et/ou la
seconde séquence S₂ sont destinées à être cibles de
l'enzyme MMP-2, elles peuvent ainsi correspondre à
l'une au moins des séquences suivantes :

-Ile-Pro-Glu-Asn-Phe-Phe-Gly-Val-

35

SEQ.10

-Pro-Pro-Gly-Ala-Tyr-His-Gly-Ala-

SEQ.27

-Arg-Ala-Ile-His-Ile-Gln-Ala-Glu-

SEQ.12

40

-Gly-Pro-His-Leu-Leu-Val-Glu-Ala-

SEQ.28

-Leu-Arg-Ala-Tyr-Leu-Leu-Pro-Ala-

SEQ.13

-Pro-Gln-Gly-Leu-Glu-Ala-Lys-

5

SEQ.29

Beekman, B., et al. 1996. *FEBS Lett* 390, 221

-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-D-Arg-

10

SEQ. 16

Bickett, D.M., et al. 1993. *Anal. Biochem.* 212, 58

Knight, C.G., et al. 1992. *FEBS Lett.* 296, 263

15

Darlak, K., et al. 1990. *J. Biol. Chem.* 265, 5199

Stack, M.S., and Gray, R.D. 1989. *J. Biol. Chem.* 264, 4277

-Pro-Leu-Ala-Nva-Dpa-Ala-Arg-

20

SEQ.30

Murphy, G., et al. 1994. *J. Biol. Chem.* 269, 6632

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

25

SEQ.21

Knight, C.G., et al. 1992. *FEBS Lett.* 296, 263

-Pro-Leu-Gly-Met-Trp-Ser-Arg-

30

SEQ. 31

Netzel-Arnett, S., et al. 1991. *Anal. Biochem.* 195, 86

35

-Pro-Leu-Gly-SCH[CH₂CH(CH₃)₂]-CO-Leu-Gly-

SEQ. 32

Weingarten, H., et al. 1985. *Anal. Biochem.* 147, 437

40

Weingarten, H., et al. 1985. *Biochemistry* 24, 6730

-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Ala-Phe-

45

SEQ. 33

G.D. Johnson and K. Ahn 2000. *Anal. Biochem.* 286, 112

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

SEQ.21

5 Knight, C.G. et al. 1992. FEBS Lett. 296, 263

-Pro-Leu-Gly-[2-mercapto-4-methyl-pentanoyl]-Leu-Gly-

SEQ.22

10

Weingarten, H.; Feder, J. 1985. Anal. Biochem. 147, 437

Weingarten, H. et al. 1985. Biochemistry. 24, 6730

Xia, T. et al. 1996. Biochim. Biophys. Acta 1293, 259

15

-Pro-Leu-Gly-Cys (Me) -His-Ala-D-Arg-

SEQ.23

20

J. Berman et al., 1992. J.Biol.Chem. 267, 1434-1437

-Arg-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Arg-

SEQ.24

25

Kraft, P.J. et al. 2001. Connect.Tissue Res. 42, 149-163

Itoh, M. et al. 1997. J.Pharm.Biomed.Anal. 15, 1417-1426

Welch, A.R. et al. 1995. Arch.Biochem.Biophys. 324, 59-64

30

-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-

SEQ. 25

Lauer-Fields, J.L. and Fields, G.B. 2002 Biol.Chem. 383, 1095-1105

Lauer-Fields, J.L. et al. 2001. Biochemistry 40, 5795-5803

35

-Arg-Pro-Lys-Pro-Tyr-Ala-Nva-Trp-Met-

SEQ. 26

40

Bremer, C. et al. 2002. Acad.Radiol. 9 Suppl 2, S314-S315

Nagase, H. et al. 1994. J.Biol.Chem. 269, 20952-20957

45 Lorsque la première séquence S₁ et/ou la
seconde séquence S₂ sont destinées à être cibles de
l'enzyme MMP-3, elles peuvent ainsi correspondre à
l'une au moins des séquences suivantes :

-Gly-Pro-Glu-Gly-Leu-Arg-Val-Gly-

SEQ.5

-Arg-Val-Gly-Phe-Tyr-Glu-Ser-Asp-

5

SEQ.34

-Leu-Leu-Ser-Ala-Leu-Val-Glu-Thr-

10

SEQ.35

-Glu-Ala-Ile-Pro-Met-Ser-Ile-Pro-

15

SEQ.36

-Ile-Ala-Gly-Arg-Ser-Leu-Asn-Pro-

20

SEQ.37

-Ile-Pro-Glu-Asn-Phe-Phe-Gly-Val-

SEQ.10

25

-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-

SEQ.38

-Asp-Val-Ala-Gln-Phe-Val-Leu-Thr-

30

SEQ.39

-Asp-Thr-Leu-Glu-Val-Met-Arg-Lys-

35

SEQ.40

-Asp-Val-Gly-His-Phe-Arg-Thr-Phe-

40

SEQ.41

-Asp-Ser-Gly-Gly-Phe-Met-Leu-Thr-

45

SEQ.42

-Arg-Val-Ala-Glu-Met-Arg-Gly-Glu-
SEQ.43

5 -Asp-Leu-Gly-Arg-Phe-Gln-Thr-Phe-
SEQ.44

10 -Pro-Phe-Ser-Pro-Leu-Val-Ala-Thr-
SEQ.45

-Leu-Arg-Ala-Tyr-Leu-Leu-Pro-Ala-
SEQ.13

-Ala-Pro-Gly-Asn-Ala-Ser-Glu-Ser-
SEQ.46

20 -Phe-Ser-Ser-Glu-Ser-Lys-Arg-Glu-
SEQ.47

25 -Arg-Ala-Ile-His-Ile-Gln-Ala-Glu-
SEQ.12

30 -Gly-Pro-His-Leu-Leu-Val-Glu-Ala-
SEQ.28

35 -Pro-Pro-Glu-Glu-Leu-Lys-Phe-Gln-
SEQ.48

-Gly-Pro-Leu-Gly-Met-Arg-Gly-Leu-
SEQ. 49

Deng, S.J., et al. 2000. *J. Biol. Chem.* 275, 31422

45 -Pro-Gln-Gly-Leu-Glu-Ala-Lys-
SEQ. 15

Beekman, B., et al. 1996. *FEBS Lett* 390, 221

-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Glu-Ala-Lys-

5 SEQ. 50

Beekman, B., et al. 1997. *FEBS Lett* 418, 305

-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-D-Arg-

10 SEQ. 16

Bickett, D.M., et al. 1993. *Anal. Biochem.* 212, 58

Knight, C.G., et al. 1992. *FEBS Lett.* 296, 263

15 Darlak, K., et al. 1990. *J. Biol. Chem.* 265, 5199

Stack, M.S., and Gray, R.D. 1989. *J. Biol. Chem.* 264, 4277

-Pro-Tyr-Ala-Tyr-Trp-Met-Arg-

20 SEQ. 51

Netzel-Arnett, S., et al. 1991. *Anal. Biochem.* 195, 86

-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-Trp-

25 SEQ. 52

Bickett, D.M., et al. 1994. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 732, 351

30 -Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-

SEQ. 20

35 Mohan, M.J. et al. 2002. *Biochemistry* 41, 9462

Hanessian, S. et al. 2001. *J. Med. Chem.* 44, 3066

Ambrose, W.P. et al. 1998. *Anal. Biochem.* 263, 150

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

40 SEQ. 21

Knight, C.G. et al. 1992. *FEBS Lett.* 296, 263

45 -Pro-Leu-Gly-[2-mercapto-4-methyl-pentanoyl]-Leu-Gly-

SEQ. 22

Weingarten, H.; Feder, J. 1985. *Anal. Biochem.* 147, 437

50 Weingarten, H. et al. 1985. *Biochemistry.* 24, 6730

-Arg-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Arg-Ser-

SEQ. 24

5

Welch, A.R., et al. 1996. *Biochemistry* 35, 10103
Welch, A.R., et al. 1995. *Arch. Biochem. Biophys.* 324, 59

10

-Pro-Cha-Gly-Cys (Me)-His-Ala-

SEQ. 20

15

Mohan, M.J. et al. 2002. *Biochemistry* 41, 9462
Hanessian, S. et al. 2001. *J. Med. Chem.* 44, 3066
Ambrose, W.P. et al. 1998. *Anal. Biochem.* 263, 150

20

-Pro-Leu-Gly-[2-mercapto-4-methyl-pentanoyl]-Leu-Gly-

SEQ. 22

25

Weingarten, H.; Feder, J. 1985. *Anal. Biochem.* 147, 437
Weingarten, H. et al. 1985. *Biochemistry.* 24, 6730

-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Ala-Arg-

SEQ. 17

30

A. Santala, A. et al. 1999. *FEBS Lett.* 461, 153-156
Shabani, F. et al. 1998. *Free Radic. Res.* 28, 115-123
Nagase, H. et al. 1994 *J. Biol. Chem.* 269, 20952-20957

-Pro-Tyr-Ala-Tyr-Trp-Met-Arg-

35

SEQ. 51

40

Finch-Arietta, M. et al., 1993. *Agents Actions* 39 SpecNo, C189-C191
Netzel-Arnett, S. et al. 1991 *Anal. Biochem.* 195, 86-92

-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-Trp-

SEQ. 52

45

Finch-Arietta, M. et al., 1993. *Agents Actions* 39 SpecNo, C189-C191
Bickett, D.M. et al., 1994. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 732, 351-355

Lorsque la première séquence S₁ et/ou la
50 seconde séquence S₂ sont destinées à être cibles de

l'enzyme MMP-8, elles peuvent ainsi correspondre à l'une au moins des séquences suivantes :

- 5 -*Pro-Leu-Ala-Tyr-Trp-Ala-Arg-*
 SEQ. 53
 Netzel-Arnett, S., et al. 1991. Anal. Biochem. 195, 86
- 10 -*Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-D-Arg-*
 SEQ. 16
 Grams, F. et al. 2001. Biol. Chem. 382, 1277
- 15 -*Pro-Cha-Gly-Cys (Me)-His-Ala-*
 SEQ. 20
 Mohan, M.J. et al. 2002. Biochemistry 41, 9462
 Hanessian, S. et al. 2001. J. Med. Chem. 44, 3066
 Ambrose, W.P. et al. 1998. Anal. Biochem. 263, 150
- 20 -*Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-*
 SEQ. 21
 Knäuper, V. et al. 1996. J. Biol. Chem. 271,1544
- 25 -*Pro-Leu-Gly-[2-mercapto-4-methyl-pentanoyl]-Leu-Gly-*
 SEQ. 22
 Weingarten, H.; Feder, J. 1985. Anal. Biochem. 147, 437
 Weingarten, H. et al. 1985. Biochemistry. 24, 6730
- 30 -*Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Ala-Arg-*
 SEQ. 17
 A. Santala, A. et al. 1999. FEBS Lett. 461, 153-156
 Shabani, F. et al.1998. Free Radic.Res. 28, 115-123
 Nagase, H. et al. 1994 J.Biol.Chem. 269, 20952-20957
- 35 -*Pro-Leu-Gly-Cys (Me)-His-Ala-D-Arg-*
 SEQ. 23
 J. Berman et al., 1992. J.Biol.Chem. 267, 1434-1437
- 40 -*Pro-Leu-Gly-Cys (Me)-His-Ala-D-Arg-*
 SEQ. 23
 J. Berman et al., 1992. J.Biol.Chem. 267, 1434-1437
- 45 -*Pro-Leu-Gly-Cys (Me)-His-Ala-D-Arg-*
 SEQ. 23
 J. Berman et al., 1992. J.Biol.Chem. 267, 1434-1437
- 50 -*Pro-Leu-Gly-Cys (Me)-His-Ala-D-Arg-*
 SEQ. 23
 J. Berman et al., 1992. J.Biol.Chem. 267, 1434-1437

-Arg-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Arg-

SEQ. 24

5 Kraft, P.J. et al. 2001. *Connect.Tissue Res.* 42, 149-163
 Itoh, M. et al. 1997. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 15, 1417-1426
 Welch, A.R. et al. 1995. *Arch.Biochem.Biophys.* 324, 59-64

-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-

10

SEQ. 25

Lauer-Fields, J.L. and Fields, G.B. 2002 *Biol.Chem.* 383, 1095-1105
 Lauer-Fields, J.L. et al. 2001. *Biochemistry* 40, 5795-5803

15

Lorsque la première séquence S₁ et/ou la
 seconde séquence S₂ sont destinées à être cibles de
 l'enzyme MMP-9, elles peuvent ainsi correspondre à
 l'une au moins des séquences suivantes :

20

-Gly-Pro-Pro-Gly-Val-Val-Gly-Pro-

SEQ.54

25

-Gly-Pro-Pro-Gly-Leu-Arg-Gly-Glu-

SEQ.55

30

-Gly-Pro-Gly-Gly-Val-Val-Gly-Pro-

SEQ.56

35

-Ile-Pro-Gln-Asn-Phe-Phe-Gly-Val-

SEQ.57

40

-Pro-Pro-Gly-Ala-Tyr-His-Gly-Ala-

SEQ.58

-Arg-Ala-Ile-His-Ile-Gln-Ala-Glu-

SEQ.12

45

-Gly-Pro-Leu-Gly-Met-Arg-Gly-Leu-

SEQ. 14

5 Deng, S.J., et al. 2000. *J. Biol. Chem.* 275, 31422

-Pro-Gln-Gly-Leu-Glu-Ala-Lys-

SEQ. 15

10

Beekman, B., et al. 1996. *FEBS Lett* 390, 221

-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Glu-Ala-Lys-

15

SEQ. 50

Beekman, B., et al. 1997. *FEBS Lett* 418, 305

-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-D-Arg-

20

SEQ. 16

Bickett, D.M., et al. 1993. *Anal. Biochem.* 212, 58

Knight, C.G., et al. 1992. *FEBS Lett.* 296, 263

25

Darlak, K., et al. 1990. *J. Biol. Chem.* 265, 5199

Stack, M.S., and Gray, R.D. 1989. *J. Biol. Chem.* 264, 4277

-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-

30

SEQ. 19

Bickett, D.M., et al. 1993. *Anal. Biochem.* 212, 58

-Pro-Leu-Gly-SCH[CH₂CH(CH₃)₂]-CO-Leu-Gly-

35

SEQ. 32

Weingarten, H., et al. 1985. *Anal. Biochem.* 147, 437

Weingarten, H., et al. 1985. *Biochemistry* 24, 6730

40

-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Ala-Phe-

SEQ. 33

45

G.D. Johnson and K. Ahn 2000. *Anal. Biochem.* 286, 112

-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-

50

SEQ. 20

Mohan, M.J. et al. 2002. *Biochemistry* 41, 9462
 Hanessian, S. et al. 2001. *J. Med. Chem.* 44, 3066
 Ambrose, W.P. et al. 1998. *Anal. Biochem.* 263, 150

5

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

SEQ. 21

10

Roy, N. et al. 1999. *Prot. Expr. Purif.* 16, 324

-Pro-Leu-Gly-[2-mercapto-4-methyl-pentanoyl]-Leu-Gly-

SEQ. 22

15

Weingarten, H.; Feder, J. 1985. *Anal. Biochem.* 147, 437
 Weingarten, H. et al. 1985. *Biochemistry.* 24, 6730
 Xia, T. et al. 1996. *Biochim. Biophys. Acta* 1293, 259

20

-Pro-Leu-Gly-Cys(Me)-His-Ala-D-Arg-

SEQ. 23

25

J. Berman et al., 1992. *J.Biol.Chem.* 267, 1434-1437

Lorsque la première séquence S₁ et/ou la
 seconde séquence S₂ sont destinées à être cibles de
 l'enzyme MMP-10, elles peuvent ainsi correspondre à
 l'une au moins des séquences suivantes :

30

-Arg-Ala-Ile-His-Ile-Gln-Ala-Glu-

SEQ.12

35

-Gly-Pro-His-Leu-Leu-Val-Glu-Ala-

SEQ.28

40

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

SEQ. 21

45

Kannan, R. et al. 1999. *Prot. Expr. Purif.* 16, 76

Lorsque la première séquence S₁ et/ou la
 seconde séquence S₂ sont destinées à être cibles de

l'enzyme MMP-11, elles peuvent ainsi correspondre à l'une au moins des séquences suivantes :

-Pro-Cha-Gly-Cys (Me)-His-Ala-

5

SEQ. 20

Mohan, M.J. et al. 2002. *Biochemistry* 41, 9462
 Hanessian, S. et al. 2001. *J. Med. Chem.* 44, 3066
 Ambrose, W.P. et al. 1998. *Anal. Biochem.* 263, 150

10

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

SEQ. 21

15

Kannan, R. et al. 1999. *Prot. Expr. Purif.* 16, 76

Lorsque la première séquence S₁ et/ou la seconde séquence S₂ sont destinées à être cibles de l'enzyme MMP-12, elles peuvent ainsi correspondre à l'une au moins des séquences suivantes :

20

-Pro-Cha-Gly-Cys (Me)-His-Ala-

25

SEQ. 20

Mohan, M.J. et al. 2002. *Biochemistry* 41, 9462
 Hanessian, S. et al. 2001. *J. Med. Chem.* 44, 3066
 Ambrose, W.P. et al. 1998. *Anal. Biochem.* 263, 150

30

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

SEQ. 21

35

Park, H.I. et al. 2000. *J. Biol. Chem.* 275, 20540

-Pro-Leu-Gly-[2-mercapto-4-methyl-pentanoyl]-Leu-Gly-

40

SEQ. 22

Weingarten, H.; Feder, J. 1985. *Anal. Biochem.* 147, 437
 Weingarten, H. et al. 1985. *Biochemistry.* 24, 6730

45

-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Ala-Arg-

SEQ. 17

A. Santala, A. et al. 1999. *FEBS Lett.* 461, 153-156
 Shabani, F. et al. 1998. *Free Radic. Res.* 28, 115-123
 Nagase, H. et al. 1994 *J. Biol. Chem.* 269, 20952-20957

5 -Pro-Leu-Gly-Cys (Me) -His-Ala-D-Arg-

SEQ. 23

Berman, J. et al., 1992. *J. Biol. Chem.* 267, 1434-1437

10

-Pro-Tyr-Ala-Tyr-Trp-Met-Arg-

SEQ. 51

15 Finch-Arietta, M. et al., 1993. *Agents Actions* 39 SpecNo, C189-C191
 Netzel-Arnett, S. et al. 1991 *Anal. Biochem.* 195, 86-92

-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-Trp-

20

SEQ. 52

Finch-Arietta, M. et al., 1993. *Agents Actions* 39 SpecNo, C189-C191
 Bickett, D.M. et al., 1994. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 732, 351-355

25

-Arg-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Arg-

SEQ. 24

30 Kraft, P.J. et al. 2001. *Connect. Tissue Res.* 42, 149-163
 Itoh, M. et al. 1997. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15, 1417-1426
 Welch, A.R. et al. 1995. *Arch. Biochem. Biophys.* 324, 59-64

-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-

35

SEQ. 25

Lauer-Fields, J.L. and Fields, G.B. 2002 *Biol. Chem.* 383, 1095-1105
 Lauer-Fields, J.L. et al. 2001. *Biochemistry* 40, 5795-5803

40

-Arg-Pro-Lys-Pro-Tyr-Ala-Nva-Trp-Met-

SEQ. 26

45 Bremer, C. et al. 2002. *Acad. Radiol.* 9 Suppl 2, S314-S315
 Nagase, H. et al. 1994. *J. Biol. Chem.* 269, 20952-20957

-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-

SEQ. 50

50 Bremer, C. et al. 2002. *Acad. Radiol.* 9 Suppl 2, S314-S315
 Nagase, H. et al. 1994. *J. Biol. Chem.* 269, 20952-20957

-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Trp-

SEQ. 59

5

Bickett, D.M. et al. 1994. Ann.N.Y.Acad.Sci. 732, 351-355

Lorsque la première séquence S₁ et/ou la
 10 seconde séquence S₂ sont destinées à être cibles de
 l'enzyme MMP-13, elles peuvent ainsi correspondre à
 l'une au moins des séquences suivantes :

-Gly-Pro-Leu-Gly-Met-Arg-Gly-Leu-

15

SEQ. 49

Deng, S.J., et al. 2000. J. Biol. Chem. 275, 31422

20

-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Glu-Ala-Lys-

SEQ. 50

Beekman, B., et al. 1997. FEBS Lett 418, 305

25

-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-Dpa-

SEQ. 25

Knauper, V., et al. 1996. J. Biol. Chem. 271, 1544

30

-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-

SEQ. 20

35

Mohan, M.J. et al. 2002. Biochemistry 41, 9462
Hanessian, S. et al. 2001. J. Med. Chem. 44, 3066
Ambrose, W.P. et al. 1998. Anal. Biochem. 263, 150

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

40

SEQ. 21

Knäuper, V. et al. 1996. J. Biol. Chem. 271, 1544

45

-Pro-Leu-Gly-[2-mercapto-4-methyl-pentanoyl]-Leu-Gly-

SEQ.22

Weingarten, H.; Feder, J. 1985. Anal. Biochem. 147, 437

Weingarten, H. et al. 1985. *Biochemistry*. 24, 6730

-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-D-Arg-

5 SEQ. 16

Netzel-Arnett, S. et al. 1991. *Anal.Biochem.*195, 86-92

Santala, A. et al. 1999. *FEBS Lett.* 461, 153-156

10 Bickett, D.M. et al., 1993. *Anal.Biochem.* 212, 58-64

-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Ala-Arg-

SEQ. 17

15 A. Santala, A. et al. 1999. *FEBS Lett.* 461, 153-156

Shabani, F. et al.1998. *Free Radic.Res.* 28, 115-123

Nagase, H. et al. 1994 *J.Biol.Chem.* 269, 20952-20957

-Pro-Leu-Gly-Cys (Me) -His-Ala-D-Arg-

20

SEQ. 23

J. Berman et al., 1992. *J.Biol.Chem.* 267, 1434-1437

25 -Pro-Leu-Gly-Met-Trp-Ser-Arg-

SEQ. 31

Netzel-Arnett, S. et al.1991. *Anal.Biochem.*195, 86-92

30 d'Ortho, M.P. et al., 1997. *Eur.J.Biochem.* 250, 751-757

-Pro-Tyr-Ala-Tyr-Trp-Met-Arg-

SEQ. 51

35

Finch-Arietta, M. et al., 1993. *Agents Actions* 39 SpecNo,C189-C191

Netzel-Arnett, S. et al. 1991 *Anal.Biochem.*195, 86-92

-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-Trp-

40

SEQ. 52

Finch-Arietta, M. et al., 1993. *Agents Actions* 39 SpecNo,C189-C191

Bickett, D.M. et al., 1994. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 732, 351-355

45

-Arg-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Arg-

SEQ. 24

50

Kraft, P.J. et al. 2001. *Connect.Tissue Res.* 42, 149-163

Itoh, M. et al. 1997. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 15, 1417-1426

Welch, A.R. et al. 1995. *Arch.Biochem.Biophys.* 324, 59-64

-Pro-Leu-Ala-Tyr-Trp-Ala-Arg-

5 SEQ. 53

Aschi, M. et al. 2002. *J.Comput.Aided Mol.Des* 16, 213-225
Netzel-Arnett, S. et al. 1991. *Anal.Biochem.*195, 86-92

10 -Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-

SEQ. 25

15 Lauer-Fields, J.L. and Fields, G.B. 2002 *Biol.Chem.* 383, 1095-1105
Lauer-Fields, J.L. et al. 2001. *Biochemistry* 40, 5795-5803

-Arg-Pro-Lys-Pro-Tyr-Ala-Nva-Trp-Met-

SEQ. 26

20

Bremer, C. et al.2002. *Acad.Radiol.* 9 Suppl 2, S314-S315
Nagase, H. et al. 1994. *J.Biol.Chem.* 269, 20952-20957

-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Trp-

25

SEQ. 59

Bickett, D.M. et al. 1994. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 732, 351-355

30

Lorsque la première séquence S₁ et/ou la
seconde séquence S₂ sont destinées à être cibles de
l'enzyme MMP-14, elles peuvent ainsi correspondre à
l'une au moins des séquences suivantes :

35

-Pro-Leu-Ala-Cys(p-OMeBz)-Trp-Ala-Arg-

SEQ. 60

40

Mucha, A., et al. 1998. *J. Biol. Chem.* 273, 2763
Holtz, B., et al. 1999. *Biochemistry* 38, 12174

-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-

45

SEQ. 20

Mohan, M.J. et al. 2002. *Biochemistry* 41, 9462
Hanessian, S. et al. 2001. *J. Med. Chem.* 44, 3066

Ambrose, W.P. et al. 1998. Anal. Biochem. 263, 150

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

5 *SEQ. 21*

Roderfeld, M. et al. 2000 . Prot. Expr. Purif. 19, 369

Kannan, R. et al. 1999. Prot. Expr. Purif. 16, 76

10 *-Pro-Leu-Gly-[2-mercapto-4-methyl-pentanoyl]-Leu-Gly-*

SEQ. 22

Weingarten, H.; Feder, J. 1985. Anal. Biochem. 147, 437

15 *Weingarten, H. et al. 1985. Biochemistry. 24, 6730*

Lorsque la première séquence S₁ et/ou la
seconde séquence S₂ sont destinées à être cibles de
20 l'enzyme MMP-15, elles peuvent ainsi correspondre à
l'une au moins des séquences suivantes :

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

25 *SEQ. 21*

Xue, C.-B. et al. 2001. J. Med. Chem. 44, 2636

30 Lorsque la première séquence S₁ et/ou la
seconde séquence S₂ sont destinées à être cibles de
l'enzyme MMP-16, elles peuvent ainsi correspondre à
l'une au moins des séquences suivantes :

35 *-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-*

SEQ. 21

40 *Shimada, T. et al. 1999. Eur. J. Biochem. 262, 907*

Xue, C.-B. et al. 2001. J. Med. Chem. 44, 2636

Lorsque la première séquence S₁ et/ou la
45 seconde séquence S₂ sont destinées à être cibles de

l'enzyme MMP-17, elles peuvent ainsi correspondre à l'une au moins des séquences suivantes :

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

5

SEQ. 21

English, W.R. et al. 2001. *FEBS Lett.* 491, 137

10 -Pro-Leu-Gly-[2-mercapto-4-methyl-pentanoyl]-Leu-Gly-

SEQ. 22

Lorsque la première séquence S_1 et/ou la
15 seconde séquence S_2 sont destinées à être cibles de
l'enzyme MMP-19, elles peuvent ainsi correspondre à
l'une au moins des séquences suivantes :

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

20

SEQ. 21

Pendás, A.M. et al. 1997. *J. Biol. Chem.* 272, 4281

25 Lorsque la première séquence S_1 et/ou la
seconde séquence S_2 sont destinées à être cibles de
l'enzyme MMP-23, elles peuvent ainsi correspondre à
l'une au moins des séquences suivantes :

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

30

SEQ. 21

Velasco, G. et al. 1999. *J. Biol. Chem.* 274, 4570

35

Lorsque la première séquence S_1 et/ou la seconde séquence S_2 sont destinées à être cibles de l'enzyme MMP-25, elles peuvent ainsi correspondre à l'une au moins des séquences suivantes :

40

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

SEQ. 21

English, W.R. et al. 2001. FEBS Lett. 491, 137

5 Lorsque la première séquence S_1 et/ou la
seconde séquence S_2 sont destinées à être cibles de
l'enzyme MMP-26, elles peuvent ainsi correspondre à
l'une au moins des séquences suivantes :

10 -*Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-D-Arg*-

SEQ. 16

Park, H.I. et al. 2002. J. Biol. Chem. 277, 35168

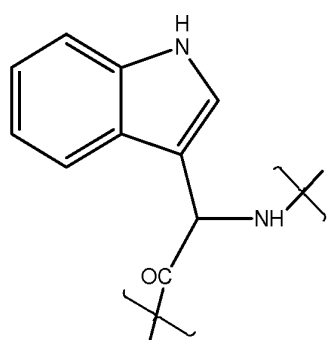
15 Comme il ressort de ce qui précède, une MMP
donnée est susceptible de reconnaître plusieurs
séquences, ces séquences appartenant à l'origine à des
protéines distinctes, qui interviennent selon des
20 mécanismes précis dans certaines pathologies.

 Comme mentionné ci-dessus, les peptides
cycliques de l'invention comprennent au moins une sonde
 X_1 porteuse d'un groupe donneur fluorescent et au moins
une sonde X_2 porteur d'un groupe accepteur fluorescent
25 ou non fluorescent. Ceux-ci sont généralement choisis
de sorte à ce que le spectre d'émission de fluorescence
du groupe donneur recouvre, au moins en partie, le
spectre d'absorption du groupe accepteur, ce qui se
traduit par un phénomène de transfert non radiatif de
30 l'énergie d'excitation du groupe donneur vers le groupe
accepteur (ou transfert d'énergie de résonance).

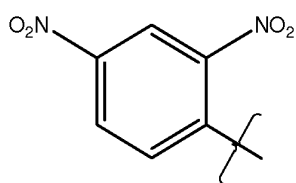
 De tels groupes comprennent classiquement
un noyau aromatique, tel qu'un noyau benzénique,
anthracénique ou coumarine.

On peut citer, par exemple, les couples suivants (le premier membre du couple étant le groupe donneur, tandis que le second membre du couple étant le groupe accepteur) :

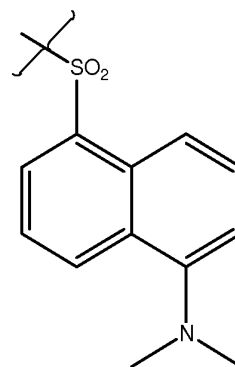
- 5 *Tryptophane/2,4-dinitrophényle (symbolisé par l'abréviation W/Dnp) ;
- *Acide o-aminobenzoïque/2,4-dinitrophényle (symbolisé par l'abréviation Abz/Dnp) ;
- * (7-méthoxycoumarin-4-yl)-acétyle/2,4-dinitrophényle
- 10 (symbolisé par l'abréviation Mca/Dnp) ;
- * (7-méthoxycoumarin-4-yl)-acétyle/N-3-(2,4-dinitrophényl)-L-2,3-diaminopropyle (symbolisé par l'abréviation Mca/Dpa) ;
- *Tryptophane/Dansyle (symbolisé par l'abréviation
- 15 W/Dns) ;
- *N-méthylanthranoyl/2,4-dinitrophényle (symbolisé par l'abréviation Nma/Dnp) ;
- *6,7-diméthoxycoumarin-4-yl-acétyle/acide 6-N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)aminohexanoïque
- 20 (symbolisé par l'abréviation DMC/Nbd) ;
- *Acide 5-(2'-aminométhyl)naphtalène sulfonique/acide 4-(4'-diméthylaminophénylaza)benzoïque (symbolisé par l'abréviation EDANS/Dabcyl) ;
- * acide 7-méthoxycoumarin-3-carboxylique/acide 7-
- 25 diéthylaminocoumarin-3-carboxylique/ (symbolisé par l'abréviation MC/DAC), lesdits groupes répondant aux formules suivantes :



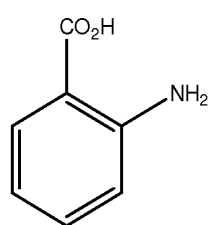
Tryptophane



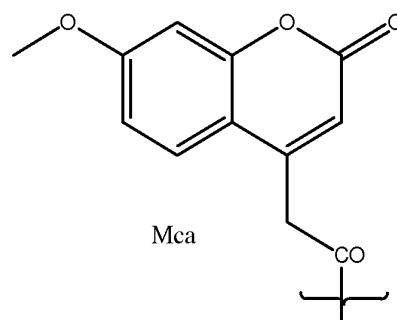
Dnp



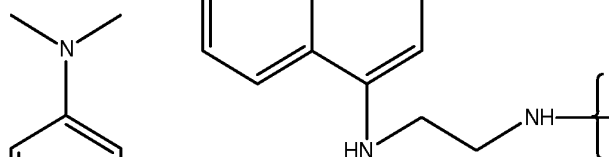
Dansyle



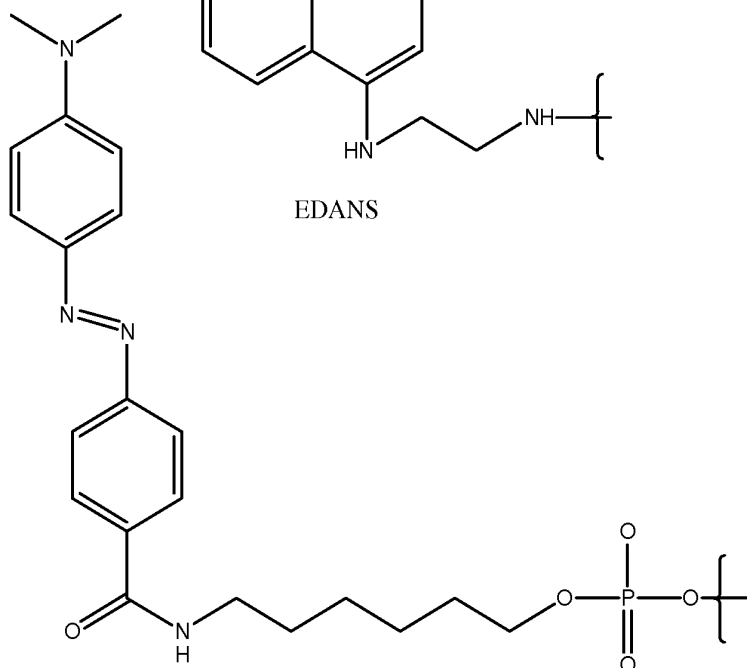
Abz



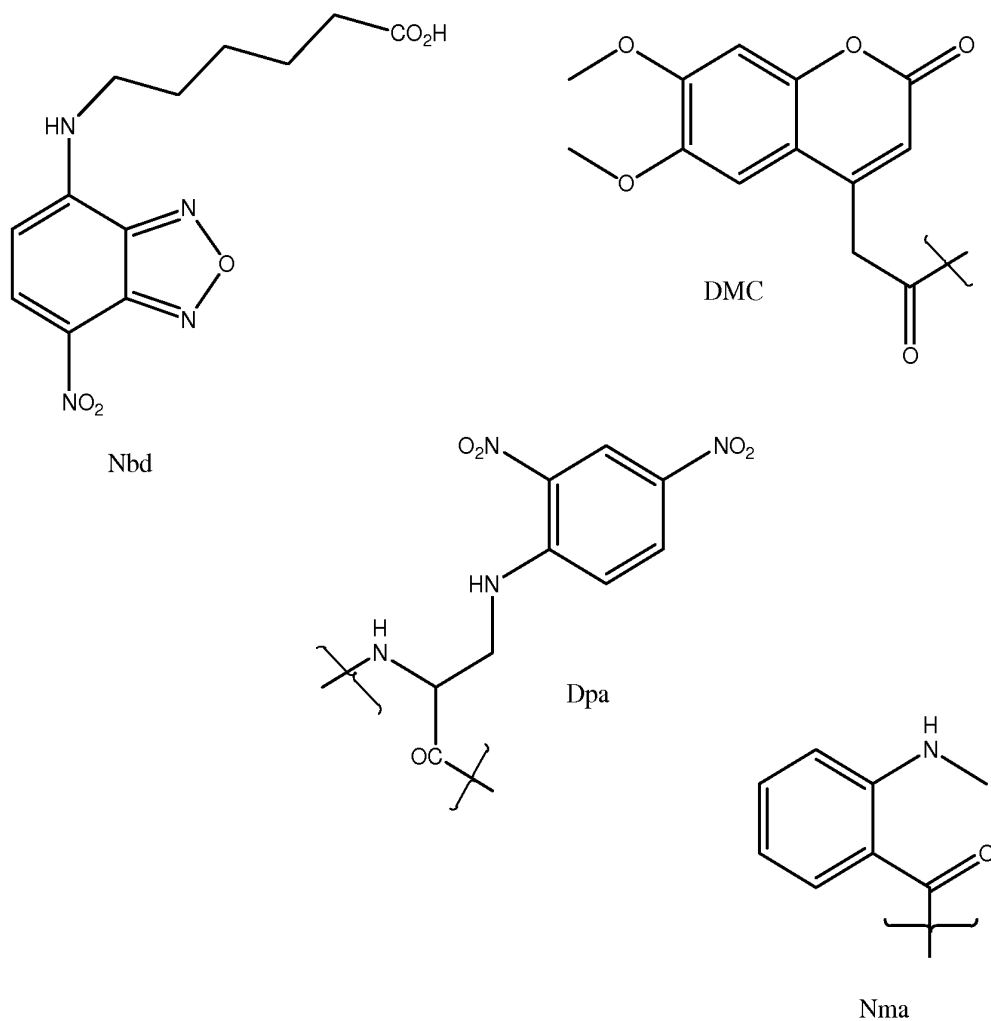
Mca



EDANS



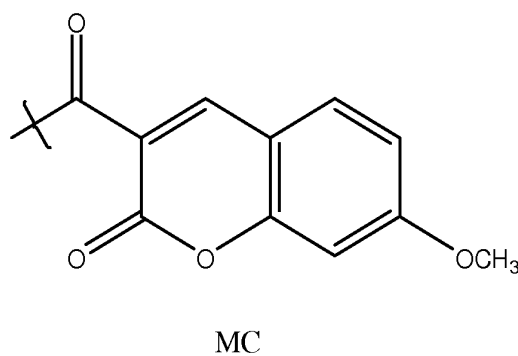
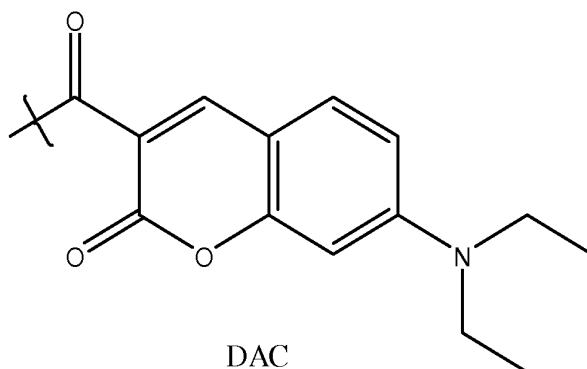
DABCYL



Avantageusement, le groupe donneur et le groupe accepteur sont des groupes comprenant un noyau coumarine.

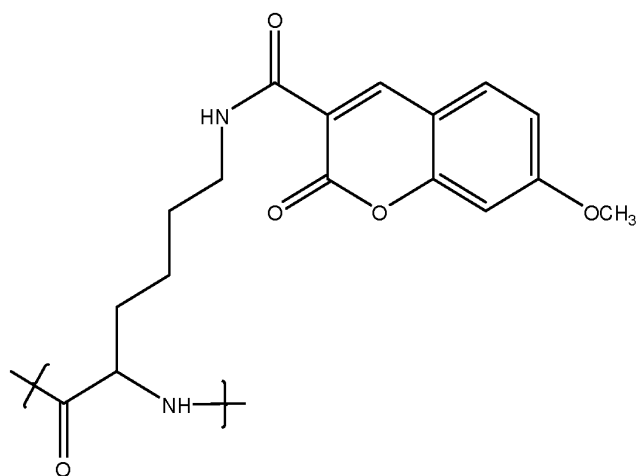
5 Du fait que ces groupes présentent un motif aromatique commun du type coumarine, cela permet la formation d'un complexe de nature hydrophobe ou du type π -stacking, qui participe à la stabilité des peptides cycliques de l'invention.

10 En particulier, le couple préféré peut être le couple MC/DAC, ayant pour formules respectives, une fois liés à la sonde, les formules suivantes :

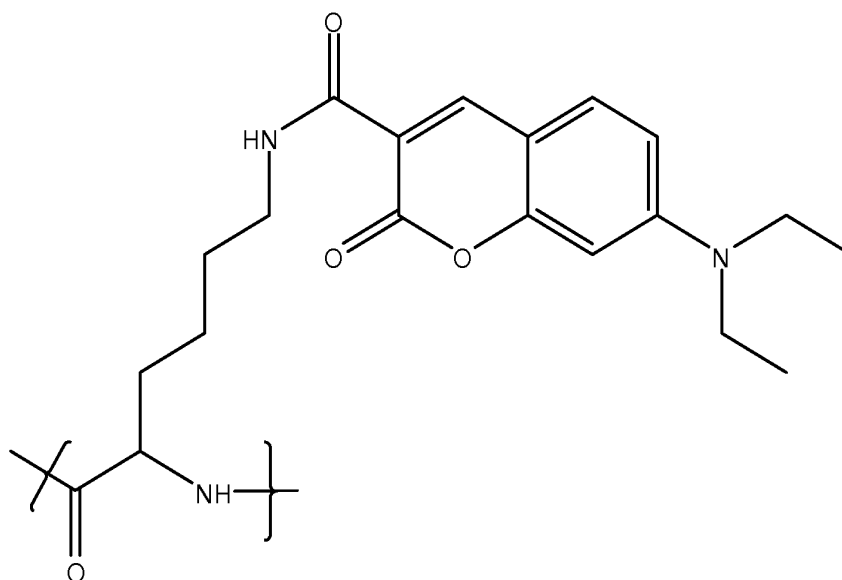


Les sondes S_1 et S_2 peuvent être des restes d'acide aminé.

5 Un exemple de sonde S_1 peut être ainsi la sonde -Lys(MC)- de formule suivante :



tandis qu'un exemple de sonde S_2 peut être la sonde -Lys(DAC)- de formule suivante :



5

S_1 et S_2 peuvent correspondre à une séquence cible d'une MMP telle que définie ci-dessus, en particulier à la séquence suivante :

-Gly-Pro-Gln-Gly-Leu-Leu-Gly-Ala-

10

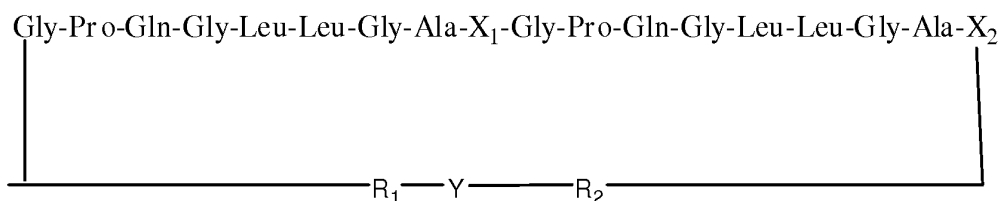
ou

-Gly-Pro-Gly-Gly-Val-Val-Gly-Pro

ces séquences correspondant respectivement à des séquences reconnues par l'enzyme MMP-1 et l'enzyme MMP-9.

Un peptide cyclique conforme à l'invention peut être un peptide cyclique de formule suivante :

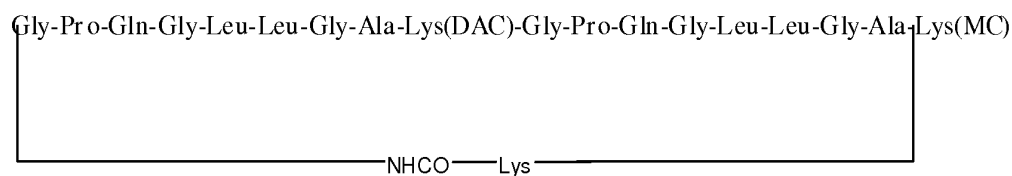
20



X_1 , X_2 , R_1 , Y et R_2 répondant à la même définition que celle donnée ci-dessus.

5

Un peptide cyclique précis conforme à l'invention répond à la formule suivante :



10 les groupes -Lys(DAC)- et -Lys(MC)- répondant à la même définition que celle donnée ci-dessus.

Les séquences en gras seront clivées en présence de l'enzyme MMP1, contribuant ainsi à éloigner l'une de l'autre les sondes Lys(Dac) et Lys(MC).
 15 S'ensuit une variation du transfert de résonance, permettant ainsi de quantifier l'activité de l'enzyme MMP1.

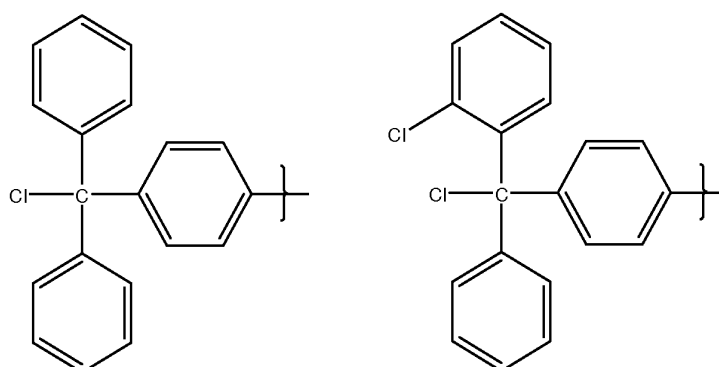
Les peptides cycliques de l'invention peuvent être amenés, par le biais de fonctions
 20 pendantes (telles que des fonctions amines issues d'un reste de lysine ou d'acide aspartique), à être fixés sur un support, tel que des particules.

Les peptides cycliques de l'invention peuvent être préparés par des procédés mettant en jeu
 25 une étape de synthèse automatique sur une phase solide

par un procédé classique, suivie d'un couplage des extrémités du peptide linéaire, soit après avoir libéré le peptide de la phase solide, soit en le libérant ensuite de la phase solide.

5 La phase solide est classiquement une résine porteuse de groupes aptes à réagir avec une fonction -NH_2 ou -COOH de façon à former une liaison covalente, cette liaison étant destinée à être clivée ultérieurement, de façon à libérer le peptide une fois
10 synthétisé.

De telles résines peuvent être des résines trityl, 2-chloro chloro trityle porteuses respectivement de groupes de formules suivantes :



15 les accolades indiquant l'endroit par lequel les groupes susmentionnés sont fixés à la résine.

Selon un premier mode de réalisation, le procédé de l'invention comprend :

- 20 a) une étape de préparation d'un peptide linéaire par synthèse chimique sur une phase solide ;
b) une étape de libération du peptide linéaire de la phase solide ; et

c) une étape de couplage des extrémités du peptide linéaire pour former le peptide cyclique.

Selon un second mode de réalisation, le procédé de l'invention comprend :

- 5 a) une étape de préparation du peptide linéaire par synthèse chimique sur une phase solide ;
- b) une étape de couplage de l'extrémité libre du peptide linéaire avec une fonction terminale d'un résidu linéaire du peptide linéaire ; et
- 10 c) une étape de libération du peptide cyclique de la phase solide, les étapes b) et c) pouvant être réalisées de façon concomitante.

Que ce soit pour le premier mode ou le second mode de réalisation, dans le cadre de la réalisation de l'étape a), la première phase consiste à

15 ancrer un premier acide aminé sur la phase solide.

Cet ancrage peut se réaliser de différentes façons :

- l'ancrage sur la phase solide par une
- 20 extrémité C-terminale du premier acide aminé ;
- l'ancrage sur la phase solide par la chaîne latérale du premier acide aminé ;
- l'ancrage sur la phase solide par la chaîne principale du premier acide aminé.

25 Pour le premier type d'ancrage, une fois le peptide synthétisé, la fonction N- terminale déprotégée du peptide réagit, selon un mécanisme d'addition nucléophile, sur la fonction carboxyle libérée ou ancrée encore sur la résine. Dans le cas où la fonction

30 carboxyle est encore ancrée sur la résine, la réaction d'addition nucléophile (étant une addition

intramoléculaire) réalise conjointement la cyclisation et la libération du peptide de la résine.

Le deuxième type d'ancrage se faisant par la chaîne latérale d'un acide aminé est généralement
5 dévolu aux acides aminés suivants : asparagine, acide aspartique, glutamine, glutamate, lysine, histidine, serine, thréonine, arginine et tyrosine, qui ont la particularité de présenter une chaîne latérale porteuse d'une fonction, telle que $\text{-CO}_2\text{H}$, OH , NH_2 ou NH_2CO , apte
10 à réagir avec un groupe réactif porté par la résine.

Pour la troisième approche fondée sur l'ancrage de la chaîne principale sur la résine, le peptide synthétisé est lié à la résine par un des atomes d'azote d'une liaison amide de la chaîne
15 principale.

Il est entendu, que l'homme du métier utilisera, pour synthétiser la séquence voulue, usera de groupements protecteurs appropriés.

Comme mentionné ci-dessus, les peptides
20 cycliques de l'invention sont destinés à être utilisés pour suivre l'activité d'une enzyme protéase E.

Plus précisément, l'utilisation des peptides cycliques de l'invention peut être envisagée de plusieurs façons :

25 - ils peuvent permettre d'établir des corrélations entre l'activité d'une enzyme et une pathologie détectée ;

- ils peuvent être utilisés pour effectuer un diagnostic d'une pathologie, en effectuant un dosage
30 d'une enzyme présent dans un échantillon biologique, si

la corrélation entre l'activité de l'enzyme et la pathologie à détecter est connue.

Ils pourront être utilisés notamment pour effectuer l'analyse *in vitro* de fluides comprenant
5 l'enzyme dont on veut estimer l'activité.

Ils pourront être utilisés également *in vivo*, notamment lorsque le couple X_1/X_2 émet dans le rouge.

Ainsi, l'invention a trait à un réactif
10 prêt à l'emploi comprenant au moins un peptide cyclique conforme à l'invention ainsi qu'à un kit comprenant :

- un premier compartiment comprenant au moins un peptide cyclique conforme à l'invention ; et
- un second compartiment comprenant une
15 solution tampon.

Ce kit est destiné à la préparation de solutions mères, lesquelles seront mises en contact avec l'enzyme protéase, dont on veut mesurer l'activité. L'enzyme protéase peut être contenue dans
20 un fluide biologique.

Comme son nom l'indique, la solution tampon est destinée à fixer le pH d'une solution, de façon à ce que ce pH ne soit ni acide, ni basique, ce qui influencerait sur les mesures d'activité enzymatique
25 ultérieures.

Enfin, l'invention a trait à l'utilisation d'au moins un peptide cyclique conforme à l'invention pour déterminer *in vitro* l'activité d'une enzyme protéase.

30

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, donnés à titre illustratif et non limitatif.

BRÈVE DESCRIPTION DES DESSINS

5 La figure 1 est un graphique représentant la variation d'intensité de fluorescence Δ_{IF} donneur (en a.u) du peptide cyclique préparé conformément à l'exemple, en fonction du temps t (en min), ce peptide cyclique étant mis en présence, à raison d'une
10 concentration de 90 μM avec une solution de MMP-1 (1nM).

 La figure 2 est un graphique en double inverse présentant l'inverse des vitesses initiales ($1/v_i$) (en $\text{a.u}^{-1}.\text{s}$) d'hydrolyse du peptide cyclique
15 préparé en fonction de l'inverse de sa concentration ($1/[S]$) (en μM^{-1}).

EXPOSÉ DÉTAILLÉ DE MODES DE RÉALISATION PARTICULIERS

 L'exemple suivant illustre la préparation d'un peptide cyclique conforme à l'invention comprenant
20 deux séquences peptidiques S_1 et S_2 correspondant chacune à une séquence cible de la MMP1, cette séquence étant la suivante : -Gly-Pro-Gln-Gly-Leu-Leu-Gly-Ala-.

 La préparation de ce peptide cyclique comprend les étapes suivantes :

25 a) la synthèse d'un acide aminé de départ destiné à être greffé sur une résine par sa chaîne latérale : le Fmoc-Lys-OAllyl ;

 b) le greffage dudit acide aminé de départ sur une résine ;

c) la synthèse des deux séquences peptidiques sur la résine greffée ;

d) la cyclisation.

Les détails de ces étapes sont exposés ci-dessous.

Dans les protocoles ci-dessous, les abréviations suivantes ont été utilisées :

ACN : Acétonitrile ; Boc : t-butyloxycarbonyl ; DAC : acide 7-diéthylaminocoumarin-3-carboxylique ; DCM : dichlorométhane ; DIEA : N,N'-diisopropyldiéthylamine ; DMF : N,N-diméthylformamide ; ESMS : electrospray mass spectrometry ; Et₂O : diisopropyléther ; Fmoc : 9-fluorénylméthoxycarbonyle ; HBTU : N-[1H-benzotriazol-1-yl)diméthylamino)méthylène]-N-méthylméthanaminium hexafluorophosphate N-oxyde ; HOBT : N-hydroxybenzotriazole ; MC : acide 7-méthoxycoumarin-3-carboxylique ; AMPA : 4-aminophénylmercurique acétate ; PyBOP : benzotriazol-1-yl-oxy-*tris*-pyrrolidonophosphonium ; TA : température ambiante ; TFA : acide trifluoroacétique ; THF : tétrahydrofurane ; TIS : triisopropylsilane ; TRIS : tris(hydroxyméthyl)aminométhane.

Tous les produits chimiques et les solvants sont de qualité analytique et ont été achetés chez Sigma. La résine 2-chloro chlorotrityle, le PyBOP et tous les acides aminés (protégés en N α par Fmoc) ont été achetés chez Advanced Chemtech.

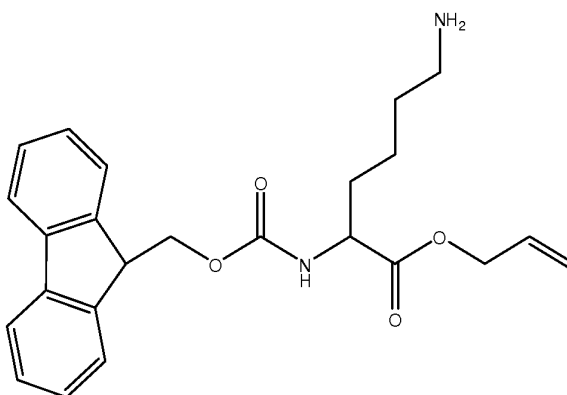
Toutes les réactions chimiques ont été réalisées sous N₂ avec des solvants anhydres. Le DMF

est desséché sur CaH_2 au reflux pendant une nuit et distillé. Le DCM a été distillé avant utilisation.

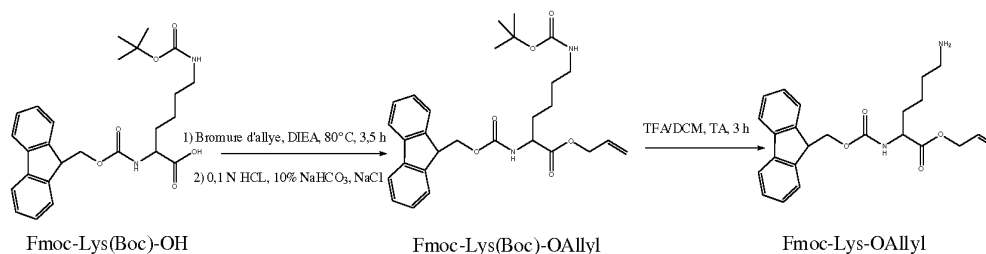
Les spectres UV/visible ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Hitachi modèle U-2010. Les spectres de fluorescence ont été réalisés sur un spectrofluorimètre PTI et un Jobin-Yvon JY3 avec une cuve thermostatée à 37°C . La synthèse peptidique en phase solide a été effectuée sur un synthétiseur Applied Biosystem 433A. Les purifications ont été réalisées sur une HPLC Shimadzu en phase inverse (contrôleur SLC-10 AVP, pompes LC8A, détecteur UV/Visible SPD-10 AVP (longueurs d'onde 214, 267 et 254 nm) et colonne C18 Satisfaction RP18AB $5\ \mu\text{m}$ $250 \times 4,6$ mm). Le système de solvants utilisé pour l'élution est (A) une solution aqueuse de TFA à 0,1% et (B) une solution aqueuse d'ACN à 70%.

a) Synthèse de la Fmoc-Lys-OAllyl

La Fmoc-Lys-OAllyl répond à la formule suivante :



Elle est préparée selon le schéma réactionnel suivant :



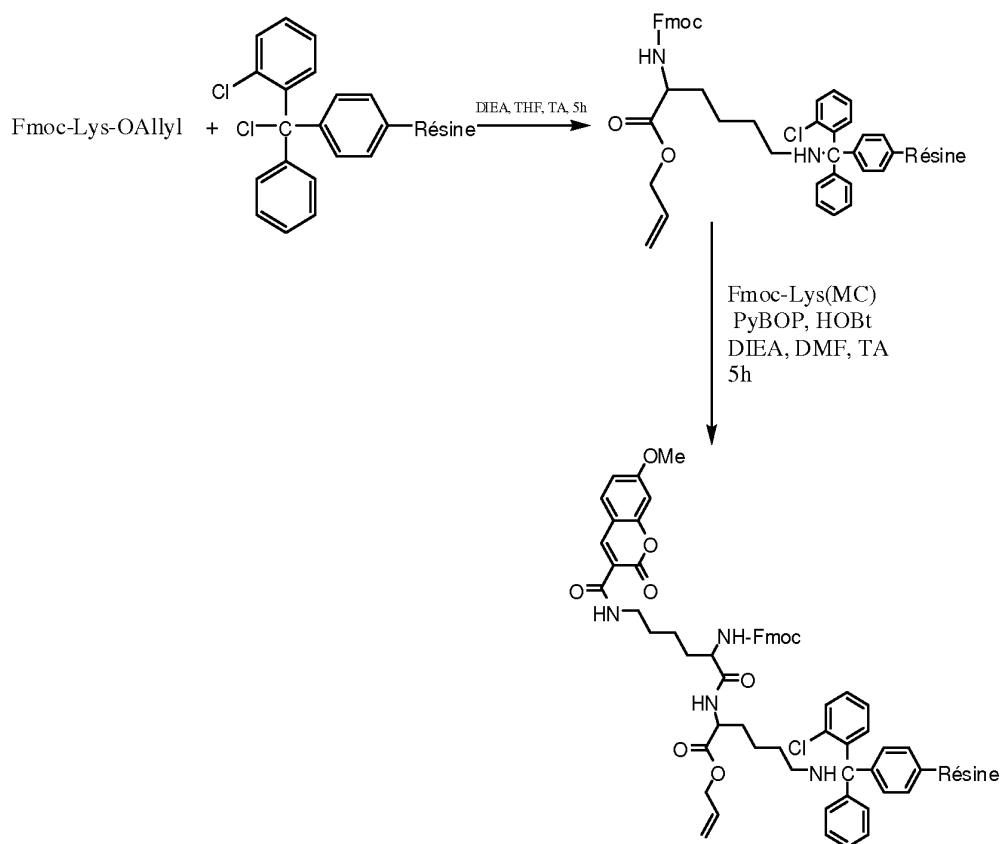
5

A une solution de Fmoc-Lys(Boc)-OH (2g, 4,3 mmol) et de bromure d'allyle (10 mL, 118,2 mmol) est ajouté 1,45 mL de DIEA (8,5 mmol). Après agitation à 80°C pendant 3,5 heures, la solution est diluée avec 200 mL d'acétate d'éthyle puis lavée avec 0,1 N de HCl (3*100 mL), 10% de NaHCO₃ (3*100 mL) et une solution saturée en NaCl (3*100 mL) puis séchée sur MgSO₄. Après évaporation sous pression réduite, 1,9 g de Fmoc-Lys(Boc)-OAllyl (3,87 mmol, 90%) sont obtenus sous forme d'une poudre blanche.

La Fmoc-Lys(Boc)-OAllyl (1,9 g, 3,87 mmol) est dissoute dans un mélange TFA/DCM (70 mL, 1/1). La solution est agitée à température ambiante pendant 3 heures. Après concentration de la solution, des lavages avec de l'éther et des évaporations successives, 1,45 g de Fmoc-Lys-OAllyl (3,56 mmol, 92%) sont récupérés sous forme d'une poudre blanche.

b) Greffage de la Fmoc-Lys(Boc)-OAllyl sur une résine et d'une sonde Lys(MC)

Le schéma réactionnel est le suivant :

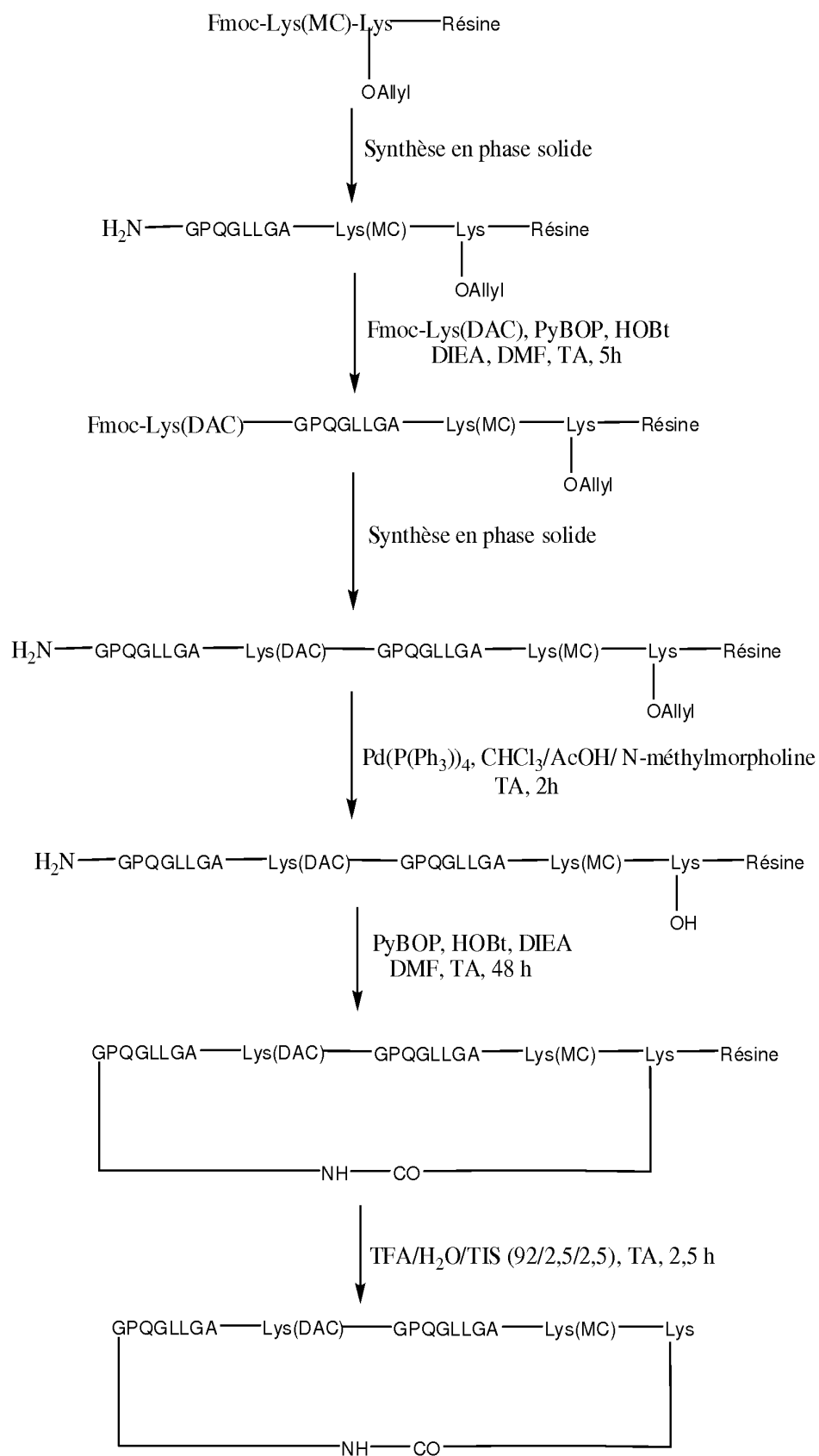


La Fmoc-Lys(Boc)-OAllyl (1,81 g, 4,43 mmol) est dissoute dans du THF anhydre (2 mL) et de la DIEA (734 μL , 4,23 mmol) est ajouté. Après 10 minutes d'agitation à température ambiante, 570 mg de résine 2-chlorotrityle est introduite. Le mélange est agité pendant 5 heures à température ambiante. La résine est, par la suite, filtrée et lavée avec du DMF (20 mL), un mélange DCM/méthanol/DIEA (17/2/1) (2*20 mL), du DMF (10 mL) et du DCM (20 mL). Le taux de substitution de cette nouvelle résine a été déterminé à 0,4 mmol/g par mesure UV du complexe dibenzofulvène après traitement à la pipéridine. Dans un premier temps, la résine Fmoc-Lys-OAllyl-chlorotrityle (300 mg, 0,4 mmol/g) a été déprotégée, par libération du groupe Fmoc, en mettant

en contact ladite résine avec un mélange de 20% de
pipéridine dans du DMF à température ambiante pendant 3
heures. La présence d'amine primaire libre a été
vérifiée par le test de Kaiser. Cette résine est mis à
5 réagir avec de la Fmoc-Lys(MC)-OH (228 mg, 0,4 mmol) en
présence de PyBOP (173 mg, 0,392 mmol), de HOBt (54 mg,
0,4 mmol) et de DIEA (100 μ L, 0,8 mmol) dans le DMF (5
mL) pendant 6 heures à température ambiante. La résine
est ensuite filtrée et lavée avec du DMF, du DCM et du
10 méthanol. 270 mg de résine Fmoc-Lys(MC)-Lys-OAllyl-
chlorotrityle sont récupérés. Le taux de substitution
de cette nouvelle résine a été déterminé à 0,38 mmol/g
par mesure UV du complexe dibenzofulvène après
traitement à la pipéridine. Les fonctions amines, qui
15 n'ont pas réagies, ont été acétylées en présence
d'ester succinimide d'acétate (25,12 mg, 0,16 mmol),
de pipéridine (12 mg, 0,16 mmol) dans du DMF (5 mL)
pendant 40 minutes à température ambiante.

20 c) Synthèse peptidique

Le schéma réactionnel est le suivant :



les codes G, P, Q, L et A correspondant respectivement aux acides aminés glycine, proline, glutamine, leucine, alanine.

La résine Fmoc-Lys(MC)-Lys-OAllyl-chlorotrityle est introduite dans le réacteur du synthétiseur. Les acides aminés (Gly, Pro, Gln(Trt), Leu et Ala) protégés en N α par un groupement Fmoc sont introduits en excès (10 fois). Les étapes de couplage sont réalisées en présence de HBTU, HOBt et DIEA, à l'issue desquelles l'on obtient le peptide suivant GPQGLLGA-, A étant lié à Lys(MC). Après 18 heures, 370 mg de peptide lié à la résine sont récupérés.

La Fmoc-Lys(DAC)-OH (190 mg, 0,3 mmol) est couplée, en dehors du réacteur du synthétiseur, au peptide sur résine en présence de PyBOP (153 mg, 0,3 mmol), de HOBt (40,53 mg, 0,3 mmol) et de DIEA (99,1 μ L, 0,6 mmol) dans du DMF (5 mL) pendant 5 heures à température ambiante. Ensuite, la résine est filtrée et lavée comme précédemment. 401 mg sont récupérés. Le taux de substitution est évalué à 0,25 mmol/g. Les fonctions amines n'ayant pas réagi sont acétylées par la même procédure que celle décrite ci-dessus.

Le peptide sur résine est, de nouveau, introduit dans le réacteur du synthétiseur automatique de peptide et la même séquence d'acides aminés que précédemment est synthétisée à la suite de la première. 530 mg sont récupérés.

d) Cyclisation

La résine est séchée sous un vide poussé pendant 4 heures puis est mise sous argon. Du Pd(P(Ph₃))₄ (346,6, mg, 0,3 mmol) est dissous dans un mélange chloroforme/acide acétique/N-méthylmorpholine (37/2/1, 8 mL) sous flux d'argon. Cette solution est alors mise en contact avec la résine et le mélange résultant est agité occasionnellement à température ambiante pendant 2 heures. La résine est alors filtrée, lavée avec une solution de 0,5% de DIEA dans le DMF (2*10 mL) puis avec une solution de diéthylthiocarbamate de sodium (0,5% m/m) dans du DMF, afin d'éliminer le catalyseur.

Après le clivage du Fmoc, la résine est lavée avec du HOBt (1M) dans le DMF. Afin de réaliser la cyclisation entre les extrémités N et C terminales, 260 mg de PyBOP (0,5 mmol), 69 mg de HOBt (0,51 mmol) et 180 µL de DIEA (1 mmol) sont introduits dans 10 mL de N-méthylpyrrolidone. La solution est agitée pendant 48 heures à température ambiante puis la résine est lavée avec 30 mL de DMF, de DCM et de méthanol.

La résine est alors mise en suspension dans une solution de TFA/H₂O/TIS (95/2,5/2,5). Après 3 heures à température ambiante, la résine est filtrée, lavée avec du TFA (2*1 mL) et du DCM (10 mL). Le filtrat est évaporé partiellement sous pression réduite puis noyé dans de l'éther froid.

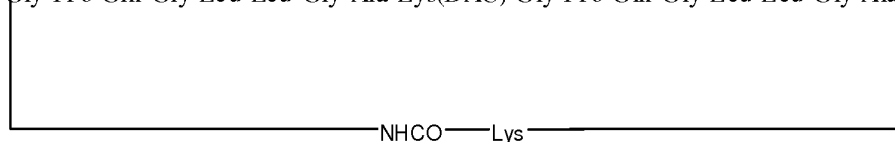
Après 12 heures à -20°C, le précipité est filtré et lavé pour obtenir 170 mg de produit brut. Après purification par HPLC semi-préparative, 92,1 mg

du peptide sont obtenus. La structure du peptide a été vérifiée par ESMS.

Le peptide cyclique obtenu dans cet exemple répond à la formule suivante :

Gly-Pro-Gln-Gly-Leu-Leu-Gly-Ala-Lys(DAC)-Gly-Pro-Gln-Gly-Leu-Leu-Gly-Ala-Lys(MC)

5



Des essais enzymatiques ont été réalisés dans une solution tampon contenant 0,1 M de TRIS, 0,1 M de NaCl et 10 mM de CaCl₂ à un pH de 7,6.

10 25 μ L de MMP-9 commerciale (90% de forme zymogène) sont activés avec une solution de AMPA (1mM) dans la solution tampon à 37°C pendant 4 heures. La MMP-1 commerciale est déjà sous forme activée. Une solution mère du peptide cyclique préparé conformément au
15 protocole exposé ci-dessus est préparée avec une solution tampon telle que définie ci-dessus à une concentration finale de 90 μ M. La solution de concentration finale de 90 μ M a servi de solution de départ pour réaliser différentes dilutions afin
20 d'obtenir 4 solutions de peptide cyclique/tampon ayant chacune une concentration de 10, 5, 1 et 0,5 μ M.

Tous les essais sont réalisés dans un volume réactionnel final de 2 mL avec 1 nM de MMP-1 active ou 2 nM de MMP-9 activée par de l'AMPA.

25 Après ajout de l'enzyme, le taux d'hydrolyse initial est déterminé par la variation dans le temps de l'intensité de fluorescence à 403 nm (à une longueur d'excitation de 340 nm). Pour chaque concentration de peptide cyclique testée, une courbe a

été tracée représentant la variation d'intensité de fluorescence du groupe donneur ΔI_F (en a.u) en fonction du temps t (en min), comme cela est représenté sur la figure 1 (pour une concentration de peptide cyclique de 10, 5, 1 et 0,5 μM).

A partir de l'équation suivante :

$$\text{Fluorescence}(t) = \text{fluorescence}_{\max}(1 - \exp(-k_{\text{obs}}t))$$

la constante de premier ordre k_{obs} a pu être déterminée. Le calcul de la constante de second ordre (dite constante de spécificité) k_{cat}/K_M est obtenu grâce à la concentration d'enzyme active utilisée E_0 suivant la relation $k_{\text{cat}}/K_M = k_{\text{obs}}/[E_0]$. Le k_{cat}/K_M du peptide est évalué à $319120 \text{ s}^{-1} \cdot M^{-1}$, valeur très élevée par rapport aux meilleurs substrats de la MMP-1 décrits dans la littérature, ce qui atteste de la très grande spécificité du peptide cyclique préparé selon l'invention pour la MMP-1.

En utilisant les vitesses initiales des différents tests, le graphique en double inverse $(1/V_i) = f(1/[\text{peptide cyclique}])$ représenté à la figure 2 a permis de déterminer le K_M du peptide cyclique, qui s'élève à 3,8 μM . Cette valeur est plus faible que celle obtenue pour les meilleurs substrats de la MMP-1 décrits dans la littérature, ce qui atteste d'une excellente affinité du peptide cyclique préparé selon l'invention pour la MMP-1.

Le peptide cyclique de l'invention a également été testé en présence de 2 nM de MMP-9 active. Aucune variation de l'intensité de fluorescence du groupe donneur n'a pu être mesurée au cours du temps. Ce peptide cyclique n'est donc pas substrat de

la MMP-9, ce qui montre la sélectivité de ce peptide cyclique. Ce peptide cyclique présente également une très grande sélectivité et une grande affinité pour la MMP-1.

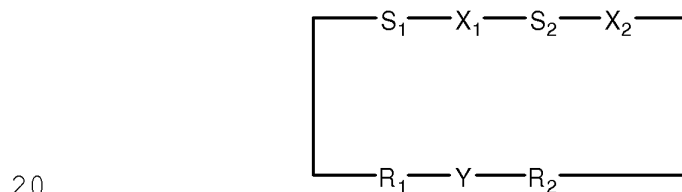
REVENDICATIONS

1. Peptide cyclique comprenant la séquence suivante :

5 $-S_1-X_1-S_2-X_2-$

dans laquelle S_1 est une première séquence peptidique cible d'une enzyme protéase E_1 , S_2 est une seconde séquence peptidique cible d'une enzyme protéase E_2 , S_1 et S_2 pouvant être identiques ou différents et E_1 et E_2 pouvant correspondre à la même enzyme protéase ou à deux enzymes protéases distinctes, X_1 est une sonde porteuse d'un groupe donneur fluorescent et X_2 est une sonde porteuse d'un groupe accepteur fluorescent ou non fluorescent.

2. Peptide cyclique selon la revendication 1, répondant à la formule suivante :



dans laquelle :

- S_1 , X_1 , S_2 et X_2 répondent à la même définition que celle donnée à la revendication 1;
- 25 - R_1 et R_2 correspondent indépendamment à une liaison simple, un reste d'acide aminé ou une séquence peptidique ;
- Y correspond à un groupe $-\text{CONH}-$ ou $-\text{NHCO}-$.

3. Peptide cyclique selon la revendication
1 ou 2, dans lequel l'enzyme protéase E_1 et l'enzyme
protéase E_2 sont des enzymes du type MMP, auquel cas la
première séquence peptidique S_1 est cible d'une enzyme
5 MMP et la seconde séquence peptidique est cible d'une
enzyme MMP.

4. Peptide cyclique selon la revendication
3, dans lequel l'enzyme protéase MMP est choisie parmi
10 la MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-5, MMP-7, MMP-8, MMP-9,
MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16,
MMP-17, MMP-19, MMP-23, MMP-25 et MMP-26 et les
mélanges de celles-ci.

15 5. Peptide cyclique selon la revendication
4, dans lequel :

- lorsqu'elles sont cibles de l'enzyme MMP-
1, la première séquence S_1 et/ou la seconde séquence S_2 ,
répondent à l'une au moins des séquences suivantes :

20

-Gly-Pro-Gln-Gly-Leu-Leu-Gly-Ala-

SEQ. 1

-Ala-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln-

SEQ. 2

25

-Gly-Pro-Gln-Gly-Leu-Ala-Gly-Gln-

SEQ.3

-Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Ile-

SEQ.4

-Gly-Pro-Glu-Gly-Leu-Arg-Val-Gly-

30

SEQ.5

-Tyr-Glu-Ala-Gly-Leu-Gly-Val-Val-
SEQ.6

-Ala-Gly-Leu-Gly-Val-Val-Glu-Arg-
SEQ.7

5 -Ala-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Ser-Thr-
SEQ.8

-Gly-Ala-Met-Phe-Leu-Glu-Ala-Ile-
SEQ.9

-Ile-Pro-Glu-Asn-Phe-Phe-Gly-Val-
10 SEQ.10

-Thr-Glu-Gly-Glu-Ala-Arg-Gly-Ser-
SEQ.11

-Arg-Ala-Ile-His-Ile-Gln-Ala-Glu-
SEQ.12

15 -Leu-Arg-Ala-Tyr-Leu-Leu-Pro-Ala-
SEQ.13

-Gly-Pro-Leu-Gly-Met-Arg-Gly-Leu-
SEQ.14

20 -Pro-Gln-Gly-Leu-Glu-Ala-Lys-
SEQ.15

-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-D-Arg-
25 SEQ. 16

-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Ala-Arg-
30 SEQ. 17

-Pro-Cha-Abu-Cys (Me) -His-Ala-
SEQ.18

35 -Pro-Cha-Gly-Cys (Me) -His-Ala-
SEQ. 19

-Pro-Cha-Gly-Cys (Me) -His-Ala-

SEQ. 20

5 *-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-*

SEQ.21

10 *-Pro-Leu-Gly-[2-mercapto-4-methyl-pentanoyl]-Leu-Gl*

SEQ. 22

15 *-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Ala-Arg-*

SEQ. 17

-Pro-Leu-Gly-Cys (Me) -His-Ala-D-Arg-

20 *SEQ. 23*

-Arg-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Arg-

SEQ. 24

25

-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-

SEQ. 25

30

-Arg-Pro-Lys-Pro-Tyr-Ala-Nva-Trp-Met-

SEQ. 26

ou

35 *-lorsqu'elles sont cibles de l'enzyme MMP-2, la première séquence S₁ et/ou la seconde séquence S₂, répondent à l'une au moins des séquences suivantes :*

-Ile-Pro-Glu-Asn-Phe-Phe-Gly-Val-

40 *SEQ.10*

-Pro-Pro-Gly-Ala-Tyr-His-Gly-Ala-

SEQ.27

	-Arg-Ala-Ile-His-Ile-Gln-Ala-Glu-
	SEQ.12
	-Gly-Pro-His-Leu-Leu-Val-Glu-Ala-
	SEQ.28
5	-Leu-Arg-Ala-Tyr-Leu-Leu-Pro-Ala-
	SEQ.13
	-Pro-Gln-Gly-Leu-Glu-Ala-Lys-
	SEQ.29
10	-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-D-Arg-
	SEQ. 16
15	-Pro-Leu-Ala-Nva-Dpa-Ala-Arg-
	SEQ.30
20	-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-
	SEQ.21
	-Pro-Leu-Gly-Met-Trp-Ser-Arg-
25	SEQ. 31
	-Pro-Leu-Gly-SCH[CH ₂ CH(CH ₃) ₂]-CO-Leu-Gly-
30	SEQ. 32
	-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Ala-Phe-
	SEQ. 33
35	-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-
	SEQ.21
40	-Pro-Leu-Gly-[2-mercapto-4-methyl-pentanoyl]-Leu-Gly-
	SEQ.22
45	

-Pro-Leu-Gly-Cys (Me) -His-Ala-D-Arg-

SEQ.23

5 *-Arg-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Arg-*

SEQ.24

10 *-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-*

SEQ. 25

-Arg-Pro-Lys-Pro-Tyr-Ala-Nva-Trp-Met-

15 *SEQ. 26*

ou

-lorsqu'elles sont cibles de l'enzyme MMP-3, la
première séquence S₁ et/ou la seconde séquence S₂,
20 répondent à l'une au moins des séquences suivantes :

-Gly-Pro-Glu-Gly-Leu-Arg-Val-Gly-

SEQ.5

25 *-Arg-Val-Gly-Phe-Tyr-Glu-Ser-Asp-*

SEQ.34

-Leu-Leu-Ser-Ala-Leu-Val-Glu-Thr-

30 *SEQ.35*

-Glu-Ala-Ile-Pro-Met-Ser-Ile-Pro-

35 *SEQ.36*

-Ile-Ala-Gly-Arg-Ser-Leu-Asn-Pro-

40 *SEQ.37*

-Ile-Pro-Glu-Asn-Phe-Phe-Gly-Val-

SEQ.10

-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-
SEQ.38
5
-Asp-Val-Ala-Gln-Phe-Val-Leu-Thr-
SEQ.39
10
-Asp-Thr-Leu-Glu-Val-Met-Arg-Lys-
SEQ.40
15
-Asp-Val-Gly-His-Phe-Arg-Thr-Phe-
SEQ.41
-Asp-Ser-Gly-Gly-Phe-Met-Leu-Thr-
20
SEQ.42
-Arg-Val-Ala-Glu-Met-Arg-Gly-Glu-
SEQ.43
25
-Asp-Leu-Gly-Arg-Phe-Gln-Thr-Phe-
SEQ.44
-Pro-Phe-Ser-Pro-Leu-Val-Ala-Thr-
30
SEQ.45
-Leu-Arg-Ala-Tyr-Leu-Leu-Pro-Ala-
35
SEQ.13
-Ala-Pro-Gly-Asn-Ala-Ser-Glu-Ser-
SEQ.46
40
-Phe-Ser-Ser-Glu-Ser-Lys-Arg-Glu-
SEQ.47
45
-Arg-Ala-Ile-His-Ile-Gln-Ala-Glu-
SEQ.12

-Gly-Pro-His-Leu-Leu-Val-Glu-Ala-
SEQ. 28
5
-Pro-Pro-Glu-Glu-Leu-Lys-Phe-Gln-
SEQ. 48
10
-Gly-Pro-Leu-Gly-Met-Arg-Gly-Leu-
SEQ. 49
-Pro-Gln-Gly-Leu-Glu-Ala-Lys-
15
SEQ. 15
-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Glu-Ala-Lys-
20
SEQ. 50
-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-D-Arg-
SEQ. 16
25
-Pro-Tyr-Ala-Tyr-Trp-Met-Arg-
SEQ. 51
30
-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-Trp-
SEQ. 52
-Pro-Cha-Gly-Cys (Me) -His-Ala-
35
SEQ. 20
-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-
40
SEQ. 21
-Pro-Leu-Gly-[2-mercapto-4-methyl-pentanoyl]-Leu-Gly-
SEQ. 22
45
-Arg-Pro-Lys-Pro-Tyr-Ala-Nva-Trp-Met-
SEQ. 26

-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-

SEQ. 50

5

ou

-lorsqu'elles sont cibles de l'enzyme MMP-5, la première séquence S₁ et/ou la seconde séquence S₂, répondent à l'une au moins des séquences suivantes :

10

-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Glu-Ala-Lys-

SEQ. 50

15 ou

-lorsqu'elles sont cibles de l'enzyme MMP-7, la première séquence S₁ et/ou la seconde séquence S₂, répondent à l'une au moins des séquences suivantes :

20

-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-D-Arg-

SEQ. 16

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

25

SEQ. 21

-Arg-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Arg-Ser-

SEQ. 24

30

-Pro-Cha-Gly-Cys (Me) -His-Ala-

SEQ. 20

35

-Pro-Leu-Gly-[2-mercapto-4-methyl-pentanoyl]-Leu-Gly-

SEQ. 22

40

-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Ala-Arg-

SEQ. 17

-Pro-Tyr-Ala-Tyr-Trp-Met-Arg-

45

SEQ. 51

-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-Trp-

SEQ. 52

5 ou

-lorsqu'elles sont cibles de l'enzyme MMP-8, la première séquence S₁ et/ou la seconde séquence S₂, répondent à l'une au moins des séquences suivantes :

10 *-Pro-Leu-Ala-Tyr-Trp-Ala-Arg-*

SEQ. 53

15 *-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-D-Arg-*

SEQ. 16

20 *-Pro-Cha-Gly-Cys (Me) -His-Ala-*

SEQ. 20

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

SEQ. 21

25 *-Pro-Leu-Gly-[2-mercapto-4-methyl-pentanoyl]-Leu-Gly-*

SEQ. 22

30 *-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Ala-Arg-*

SEQ. 17

35 *-Pro-Leu-Gly-Cys (Me) -His-Ala-D-Arg-*

SEQ. 23

-Arg-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Arg-

40 *SEQ. 24*

-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-

45 *SEQ. 25*

ou

-lorsqu'elles sont cibles de l'enzyme MMP-9, la première séquence S_1 et/ou la seconde séquence S_2 , répondent à l'une au moins des séquences suivantes :

- 5 -Gly-Pro-Pro-Gly-Val-Val-Gly-Pro-
 SEQ.54
- 10 -Gly-Pro-Pro-Gly-Leu-Arg-Gly-Glu-
 SEQ.55
- 15 -Gly-Pro-Gly-Gly-Val-Val-Gly-Pro-
 SEQ.56
- 20 -Ile-Pro-Gln-Asn-Phe-Phe-Gly-Val-
 SEQ.57
- 25 -Pro-Pro-Gly-Ala-Tyr-His-Gly-Ala-
 SEQ.58
- Arg-Ala-Ile-His-Ile-Gln-Ala-Glu-
 SEQ.12
- 30 -Gly-Pro-Leu-Gly-Met-Arg-Gly-Leu-
 SEQ. 14
- Pro-Gln-Gly-Leu-Glu-Ala-Lys-
 SEQ. 15
- 35 -Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Glu-Ala-Lys-
 SEQ.50
- 40 -Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-D-Arg-
 SEQ. 16
- 45

-Pro-Cha-Gly-Cys (Me) -His-Ala-

SEQ. 19

5 -Pro-Leu-Gly-SCH[CH₂CH(CH₃)₂]-CO-Leu-Gly-

SEQ. 32

10 -Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Ala-Phe-

SEQ. 33

-Pro-Cha-Gly-Cys (Me) -His-Ala-

15 SEQ. 20

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

20 SEQ. 21

-Pro-Leu-Gly-[2-mercapto-4-methyl-pentanoyl]-Leu-Gly-

SEQ. 22

25 -Pro-Leu-Gly-Cys (Me) -His-Ala-D-Arg-

SEQ. 23

30 ou

-lorsqu'elles sont cibles de l'enzyme MMP-10, la première séquence S₁ et/ou la seconde séquence S₂, répondent à l'une au moins des séquences suivantes :

35 -Arg-Ala-Ile-His-Ile-Gln-Ala-Glu-

SEQ.12

40 -Gly-Pro-His-Leu-Leu-Val-Glu-Ala-

SEQ.28

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

45 SEQ. 21

ou

5

-lorsqu'elles sont cibles de l'enzyme MMP-11, la première séquence S_1 et/ou la seconde séquence S_2 , répondent à l'une au moins des séquences suivantes :

10

-Pro-Cha-Gly-Cys (Me) -His-Ala-

SEQ. 20

15

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

SEQ. 21

ou

20

-lorsqu'elles sont cibles de l'enzyme MMP-12, la première séquence S_1 et/ou la seconde séquence S_2 , répondent à l'une au moins des séquences suivantes :

25

-Pro-Cha-Gly-Cys (Me) -His-Ala-

SEQ. 20

30

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

SEQ. 21

-Pro-Leu-Gly-[2-mercapto-4-methyl-pentanoyl]-Leu-Gly-

35

SEQ. 22

-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Ala-Arg-

SEQ. 17

40

-Pro-Leu-Gly-Cys (Me) -His-Ala-D-Arg-

SEQ. 23

45

-Pro-Tyr-Ala-Tyr-Trp-Met-Arg-

SEQ. 51

-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-Trp-

5

SEQ. 52

-Arg-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Arg-

10

SEQ. 24

-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-

15

SEQ. 25

-Arg-Pro-Lys-Pro-Tyr-Ala-Nva-Trp-Met-

SEQ. 26

20

-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-

SEQ. 50

-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Trp-

25

SEQ. 59

ou

30 -lorsqu'elles sont cibles de l'enzyme MMP-13, la
première séquence S₁ et/ou la seconde séquence S₂,
répondent à l'une au moins des séquences suivantes :

-Gly-Pro-Leu-Gly-Met-Arg-Gly-Leu-

35

SEQ. 49

-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Glu-Ala-Lys-

SEQ. 50

40

-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-Dpa-

SEQ. 25

45

-Pro-Cha-Gly-Cys (Me) -His-Ala-

SEQ. 20

	<i>-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-</i>
	<i>SEQ. 21</i>
5	<i>-Pro-Leu-Gly-[2-mercapto-4-methyl-pentanoyl]-Leu-Gly-</i>
	<i>SEQ. 22</i>
10	<i>-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-D-Arg-</i>
	<i>SEQ. 16</i>
15	<i>-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Ala-Arg-</i>
	<i>SEQ. 17</i>
20	<i>-Pro-Leu-Gly-Cys (Me) -His-Ala-D-Arg-</i>
	<i>SEQ. 23</i>
	<i>-Pro-Leu-Gly-Met-Trp-Ser-Arg-</i>
25	<i>SEQ. 31</i>
	<i>-Pro-Tyr-Ala-Tyr-Trp-Met-Arg-</i>
	<i>SEQ. 51</i>
30	<i>-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-Trp-</i>
	<i>SEQ. 52</i>
35	<i>-Arg-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Arg-</i>
	<i>SEQ. 24</i>
	<i>-Pro-Leu-Ala-Tyr-Trp-Ala-Arg-</i>
40	<i>SEQ. 53</i>
	<i>-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-</i>
45	<i>SEQ. 25</i>
	<i>-Arg-Pro-Lys-Pro-Tyr-Ala-Nva-Trp-Met-</i>
	<i>SEQ. 26</i>

-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Trp-

SEQ. 59

5

ou

-lorsqu'elles sont cibles de l'enzyme MMP-14, la
première séquence S₁ et/ou la seconde séquence S₂,
10 répondent à l'une au moins des séquences suivantes :

-Pro-Leu-Ala-Cys(p-OMeBz)-Trp-Ala-Arg-

SEQ. 60

15

-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-

SEQ. 20

20

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

SEQ. 21

25

-Pro-Leu-Gly-[2-mercapto-4-methyl-pentanoyl]-Leu-Gly-

SEQ. 22

ou

30 - lorsqu'elles sont cibles de l'enzyme MMP-15, la
première séquence S₁ et/ou la seconde séquence S₂,
répondent à l'une au moins des séquences suivantes :

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

35

SEQ. 21

ou

40 -lorsqu'elles sont cibles de l'enzyme MMP-16, la
première séquence S₁ et/ou la seconde séquence S₂,
répondent à l'une au moins des séquences suivantes :

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

SEQ. 21

5 ou

-lorsqu'elles sont cibles de l'enzyme MMP-17, la première séquence S_1 et/ou la seconde séquence S_2 , répondent à l'une au moins des séquences suivantes :

10

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

SEQ. 21

15 *-Pro-Leu-Gly-[2-mercapto-4-methyl-pentanoyl]-Leu-Gly-*

SEQ. 22

ou

20

-lorsqu'elles sont cibles de l'enzyme MMP-19, la première séquence S_1 et/ou la seconde séquence S_2 , répondent à l'une au moins des séquences suivantes :

25

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

SEQ. 21

ou

30

-lorsqu'elles sont cibles de l'enzyme MMP-23, la première séquence S_1 et/ou la seconde séquence S_2 , répondent à l'une au moins des séquences suivantes :

35

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

SEQ. 21

ou

40

-lorsqu'elles sont cibles de l'enzyme MMP-25, la première séquence S_1 et/ou la seconde séquence S_2 , répondent à l'une au moins des séquences suivantes :

-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-

SEQ. 21

5 ou
- lorsqu'elles sont cibles de l'enzyme MMP-26, la première séquence S_1 et/ou la seconde séquence S_2 , répondent à l'une au moins des séquences suivantes :

10 *-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-D-Arg-*

SEQ. 16

15 6. Peptide cyclique selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le groupe donneur porté par la sonde X_1 et le groupe accepteur porté par la sonde X_2 comprennent un noyau aromatique.

20 7. Peptide cyclique selon la revendication 6, dans le noyau aromatique est un noyau benzénique, anthracénique ou coumarine.

25 8. Peptide cyclique selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le groupe donneur porté par la sonde X_1 et le groupe accepteur porté par la sonde X_2 sont choisis parmi les couples suivants :

*Tryptophane/2,4-dinitrophényle ;

30 *Acide o-aminobenzoïque/2,4-dinitrophényle ;

*(7-méthoxycoumarin-4-yl)-acétyle/2,4-dinitrophényle ;

*(7-méthoxycoumarin-4-yl)-acétyle/N-3-(2,4-dinitrophényl)-L-2,3-diaminopropyle ;

*Tryptophane/Dansyle ;

35 *N-méthylanthranoyl/2,4-dinitrophényle ;

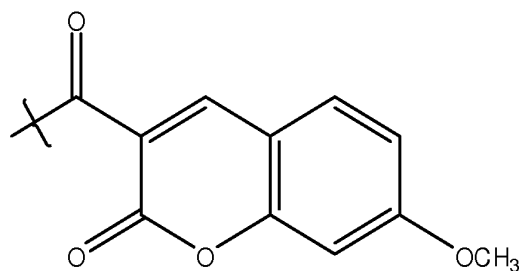
*6,7-diméthoxycoumarin-4-yl-acétyle/acide 6-N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)aminohexanoïque ;

*Acide 5-(2'-aminométhyl)naphtalène sulfonique/acide 4-(4'-diméthylaminophénylaza)benzoïque

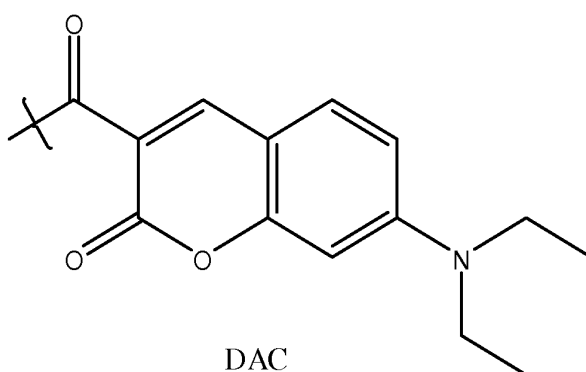
5 * acide 7-méthoxycoumarin-3-carboxylique/acide 7-diéthylaminocoumarin-3-carboxylique.

9. Peptide cyclique selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le groupe
10 donneur porté par la sonde X_1 et le groupe accepteur porté par la sonde X_2 comprennent un noyau coumarine.

10. Peptide cyclique selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le groupe
15 donneur porté par la sonde X_1 et le groupe accepteur porté par la sonde X_2 répondent respectivement aux formules suivantes :



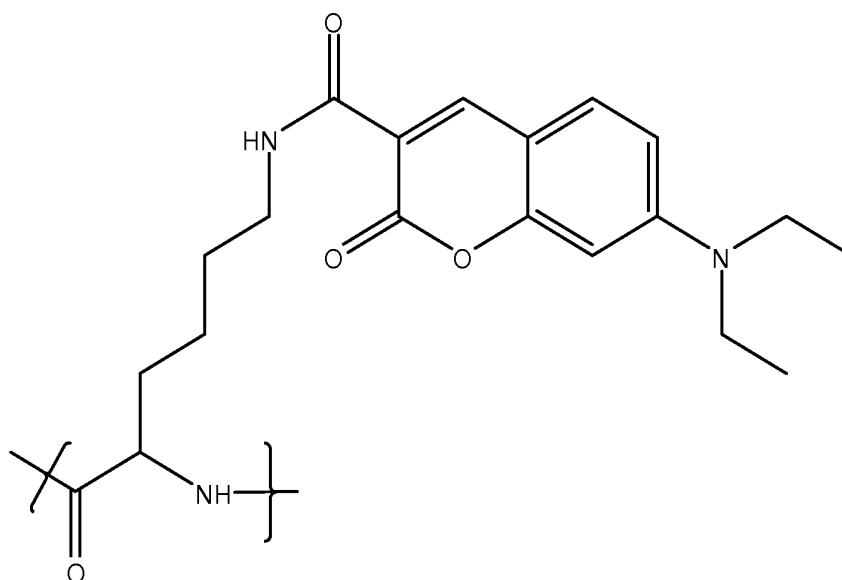
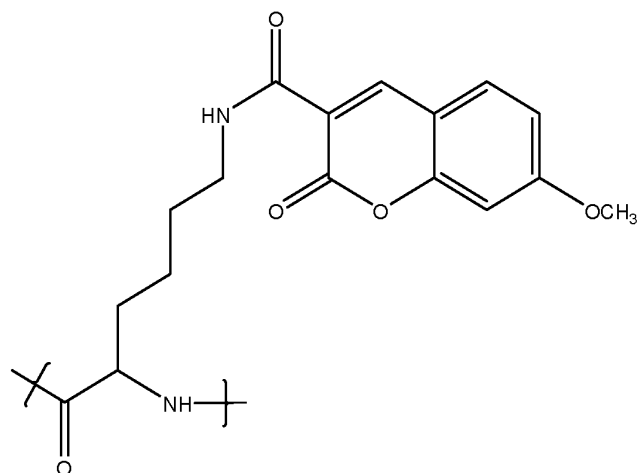
MC



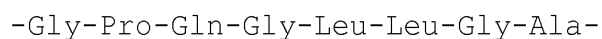
DAC

11. Peptide cyclique selon l'une quelconque
des revendications précédentes, dans lequel les sondes
5 X_1 et X_2 sont des restes d'acide aminé.

12. Peptide cyclique selon la revendication
11, dans lequel les sondes X_1 et X_2 répondent
respectivement aux formules suivantes :

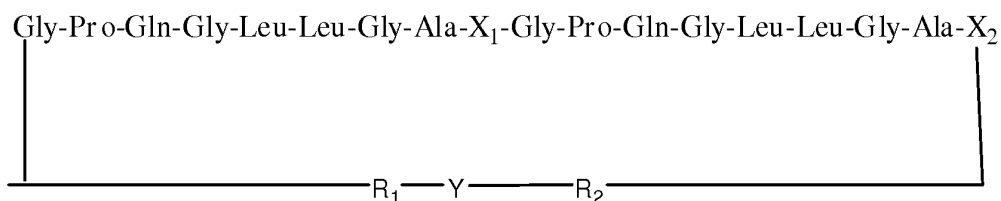


5 13. Peptide cyclique selon la revendication
1 ou 2, dans lequel les séquences peptidiques S₁ et S₂
répondent à la formule suivante :



10

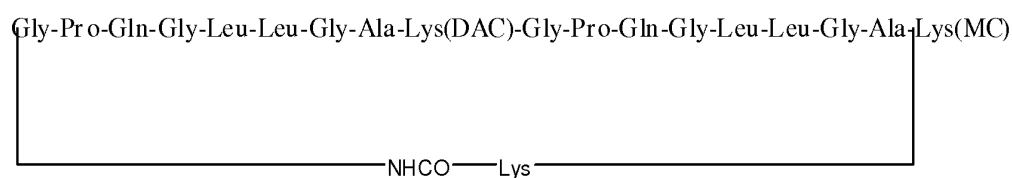
14. Peptide cyclique selon la revendication
13, répondant à la formule suivante :



R₁, Y et R₂ répondant à la même définition que celle donnée à la revendication 2.

5

15. Peptide cyclique selon la revendication 13 ou 14, répondant à la formule suivante :



10

16. Procédé de préparation d'un peptide cyclique tel que défini selon la revendication 1 ou 2, comprenant les étapes suivantes :

- a) une étape de préparation d'un peptide linéaire par
15 synthèse chimique sur une phase solide ;
- b) une étape de libération du peptide linéaire de la phase solide ; et
- c) une étape de couplage des extrémités du peptide linéaire pour former le peptide cyclique.

20

17. Procédé de préparation d'un peptide cyclique tel que défini selon la revendication 1 ou 2, comprenant les étapes suivantes :

- a) une étape de préparation du peptide
25 linéaire par synthèse chimique sur une phase solide ;

b) une étape de couplage de l'extrémité libre du peptide linéaire avec une fonction terminale d'un résidu linéaire du peptide linéaire ; et

c) une étape de libération du peptide cyclique de la phase solide, les étapes b) et c) pouvant être réalisées de façon concomitante.

18. Réactif prêt à l'emploi comprenant au moins un peptide cyclique tel que défini selon l'une
10 quelconque des revendications 1 à 15.

19. Kit comprenant au moins :

- un premier compartiment comprenant au moins un peptide cyclique tel que défini selon l'une
15 quelconque des revendications 1 à 15 ; et

- un second compartiment comprenant une solution tampon.

20. Utilisation d'au moins un peptide cyclique tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 15 pour déterminer *in vitro* l'activité d'une enzyme protéase.

1 / 1

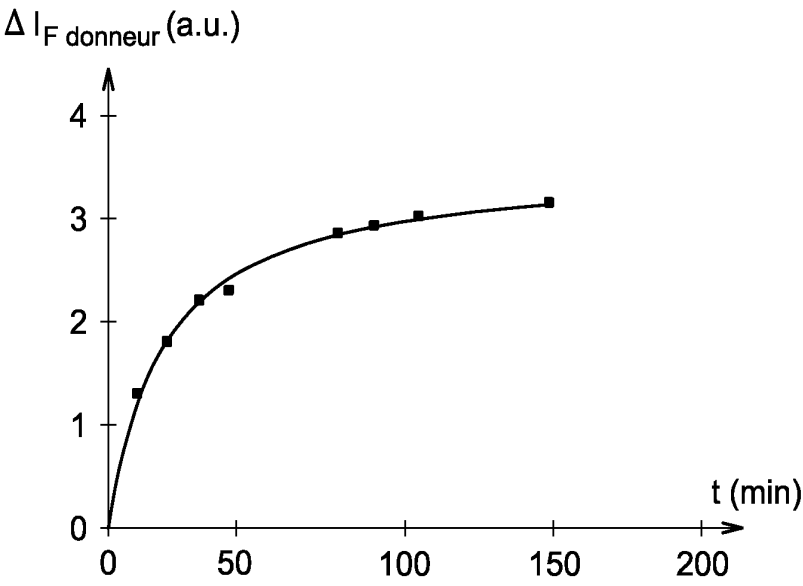


FIG. 1

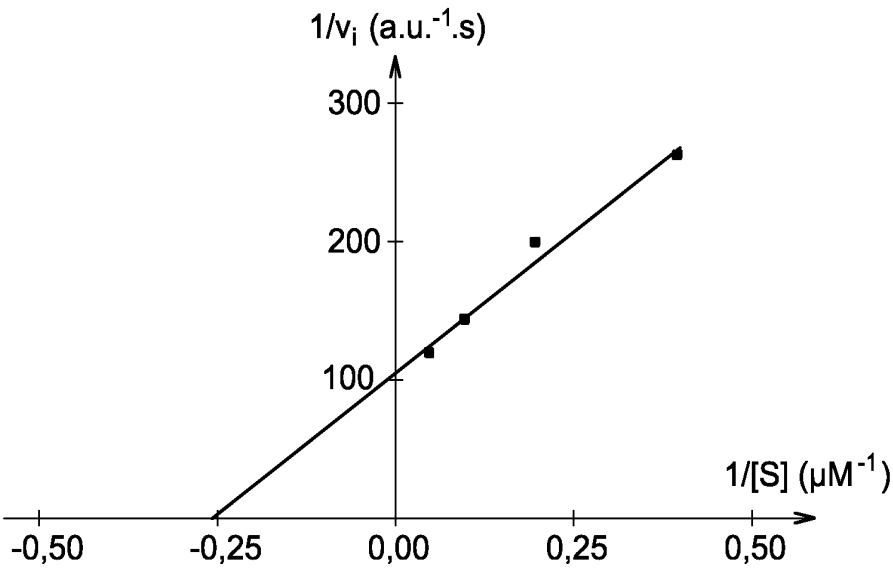


FIG. 2



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE PARTIEL

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

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

N° d'enregistrement
national

FA 711813
FR 0853850

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	GRUENEWALD JAN ET AL.: "Fluorescence resonance energy transfer as a probe of peptide cyclization catalyzed by nonribosomal thioesterase domains" CHEMISTRY & BIOLOGY, vol. 12, no. 8, août 2005 (2005-08), pages 873-881, XP005042258 CAMBRIDGE, doi:10.1016/j.chembiol.2005.05.019 ISSN: 1074-5521 * figures 1-3 * * page 874, colonne de droite *	1,2,6,7, 11,16,18	C12Q1/37 C07K7/64 C07K1/10 G01N33/52 G01N33/58
A	NAGASE H ET AL.: "Human matrix metalloproteinase specificity studies using collagen sequence-based synthetic peptides" BIOPOLYMERS, vol. 40, no. 4, 1 janvier 1996 (1996-01-01), pages 399-416, XP009112150 NEW YORK, NY, US doi:10.1002/(SICI)1097-0282(1996)40:4<399: :AID-BIP5>3.0.CO;2-R ISSN: 0006-3525 * tableaux II-VIII *	1-20	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) C07K C12Q G01N
----- -/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
18 mars 2009		Jenn, Thierry	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES 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			



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE PARTIEL

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

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

N° d'enregistrement
national

FA 711813
FR 0853850

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	BERTHELOT THOMAS ET AL.: "Synthesis of N-epsilon-(7-diethylaminocoumarin-3-carboxyl)- and N-epsilon-(7-methoxycoumarin-3-carboxyl)-L-Fmoc lysine as tools for protease cleavage detection by fluorescence" JOURNAL OF PEPTIDE SCIENCE,, vol. 11, no. 3, 1 mars 2005 (2005-03-01), pages 153-160, XP009111804 JOHN WILEY AND SONS LTD doi:10.1002/psc.608 ISSN: 1075-2617 [extrait le 2004-10-11] * abrégé * * page 155, colonne de droite, ligne 1 - ligne 3; composés 8,9 * -----	1-20	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
18 mars 2009		Jenn, Thierry	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES 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	

ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B

Numéro de la demande

FA 711813
 FR 0853850

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

Invention 1 (Revendications 13-15 et partie des revendications 1-12 et 16-20)

Un peptide cyclique selon la revendication 1, comprenant la séquence S1-X1-S2-X2, dans laquelle S1 et/ou S2 sont des séquences peptidiques comprenant la séquence SEQ ID No: 1;
 Un procédé de préparation d'un tel peptide cyclique,
 Un réactif/kit comprenant un tel peptide; et
 L'utilisation d'un tel peptide pour déterminer in vitro l'activité d'une protéase.

Inventions 2-60 (Revendications 1-12 et 16-20, toutes en partie)

Un peptide cyclique selon la revendication 1, comprenant la séquence S1-X1-S2-X2, dans laquelle S1 et/ou S2 sont des séquences peptidiques comprenant la séquence SEQ ID No: 2, resp. 3, resp. 4, resp. 5 ... resp. 60;
 Un procédé de préparation d'un tel peptide cyclique,
 Un réactif/kit comprenant un tel peptide; et
 L'utilisation d'un tel peptide pour déterminer in vitro l'activité d'une protéase.

Invention 61 (Revendications 1-4, 6-12 et 16-20, toutes en partie)

Un peptide cyclique selon la revendication 1, comprenant la séquence S1-X1-S2-X2, dans laquelle S1 et/ou S2 sont des séquences peptidiques ne comprenant aucune des séquences SEQ ID No: 1 à 60;
 Un procédé de préparation d'un tel peptide cyclique,
 Un réactif/kit comprenant un tel peptide; et
 L'utilisation d'un tel peptide pour déterminer in vitro l'activité d'une protéase.

La première invention a été recherchée.

La présente demande ne satisfait pas aux dispositions de l'article L.612-4 du CPI car elle concerne une pluralité d'inventions qui ne sont pas liées entre elles en formant un seul concept inventif général.

Les raisons pour lesquelles la présente demande porte sur 61 inventions non liées entre elles de telle sorte qu'elles ne formeraient qu'un seul concept inventif général, sont les suivantes:

L'état de la technique est représenté par le document D1 (Grünwald et al., 2005, XP5042258), qui décrit (les références entre parenthèses s'appliquent à ce document) un déca-peptide cyclique (Fig 1) et une série de peptides cycliques (Fig 3) comprenant un résidu kyn (le fluorophore kynurenine) et un résidu Trp à proximité (permettant un transfert

ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B

Numéro de la demande

FA 711813
FR 0853850

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

d'énergie de fluorescence FRET). Les dits peptides sont préparés par synthèse chimique sur une phase solide du peptide linéaire correspondant, suivie de libération du peptide linéaire acide, et cyclisation en présence de CDA cyclase (page 874, col. droite).

Etant donné la définition vague des séquences S1 et S2 (toute séquence peptidique peut être considérée cible d'une protéase/peptidase), le document D1 anticipe au moins l'objet des revendications indépendantes 1, 16 et 18 de la demande.

L'exigence d'unité de l'invention n'est donc pas observée, dans la mesure où il n'existe pas entre les objets des groupes d'inventions 1 à 61 (tels que définis ci-dessus) de relation portant sur un ou plusieurs éléments techniques particuliers identiques ou correspondants.

Le présent rapport de recherche concerne uniquement l'invention 1, étant donné qu'il n'est pas possible de rechercher l'ensemble des revendications sans fournir d'effort particulier.

Observation:

Les revendications 1-4 présentes couvrent des composés définis seulement par leur fonction ("séquence [...] cible d'une enzyme protéase" / "du type MMP"), contrairement aux exigences de clarté, car une définition du type "résultat recherché" ne permet pas de déterminer l'étendue de la protection.

Le fait que chaque composé puisse être testé ne permet pas de surmonter cette objection, car l'homme du métier, à l'exception des composés décrits dans la description et la revendication 5 (voir les séquences SEQ ID No: 1-60) ne sait pas de prime abord si un tel composé tombe sous la revendication. Un nombre excessif d'essais serait nécessaire afin de tester aléatoirement chaque composé.

La non-conformité avec les exigences quant au fond est telle, qu'il devrait en être tenu compte pour effectuer la recherche portant sur les revendications 1-4, 6-12 et 16-20 (et l'invention 61) ainsi que pour déterminer l'étendue de celles-ci.

L'invention 61 telle que définie ci-dessus ne peut pas, en l'état, faire l'objet d'une recherche complète.