

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
7 septembre 2001 (07.09.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/65258 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
G01N 33/53, 33/542

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/00603

(22) Date de dépôt international : 1 mars 2001 (01.03.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/02657 1 mars 2000 (01.03.2000) FR

(71) **Déposants** (pour tous les États désignés sauf US) : **INSTITUT PASTEUR** [FR/FR]; 28, rue du Docteur Roux, F-75724 Cedex 15 Paris (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS** [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Cedex 16 Paris (FR).

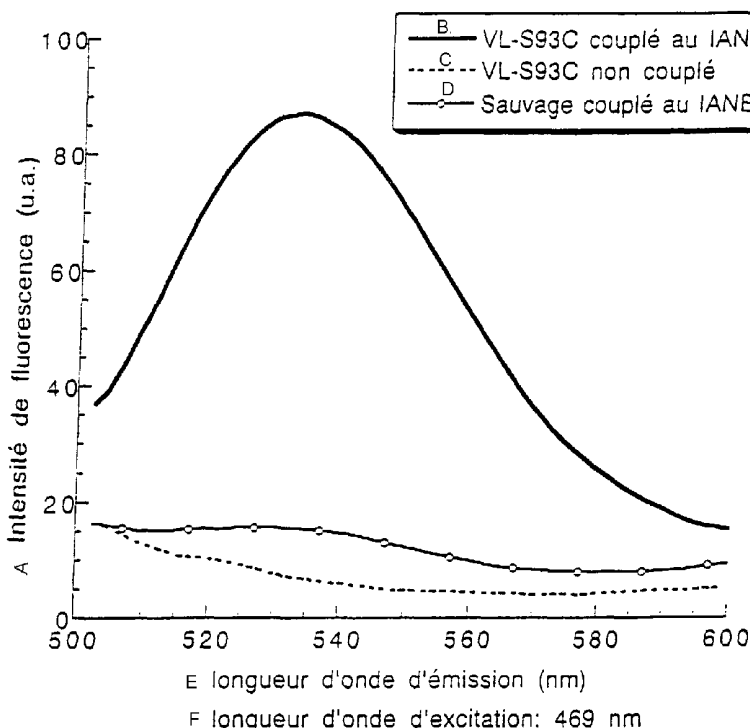
(72) **Inventeurs; et**

(75) **Inventeurs/Déposants** (pour US seulement) : **RENARD, Martial** [FR/FR]; 14, rue des Meuniers, F-75012 Paris (FR). **BELKADI, Laurent** [FR/FR]; 17, rue des Cordelières, F-75013 Paris (FR). **ENGLAND, Patrick** [FR/FR]; 43, rue de Saintonge, F-75003 Paris (FR). **BEDOUELLE, Hugues** [FR/FR]; 4, rue Auguste Bartholdi, F-75015 Paris (FR).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: BIOSENSORS, METHOD FOR OBTAINING SAME AND USES THEREOF

(54) Titre : BIOCAPTEURS, LEUR PROCÉDE D'OBTENTION ET LEURS APPLICATIONS



A...FLUORESCENCE INTENSITY (u.a.)
B...VL-S93C COUPLED TO IANBD
C...VL-S93C UNCOUPLED
D...WILD TYPE COUPLED TO IANBD
E...TRANSMISSION WAVELENGTH (nm)
F...ENERGIZING WAVELENGTH 469 nm

(57) **Abstract:** The invention concerns biosensors, the method for obtaining them and their uses in particular for detecting, assaying or locating, in direct immunofluorescence, a ligand such as an antigen or a hapten, in a heterogeneous population. Said biosensors consist of (i) at least a protein-type receptor fragment, capable of binding with a suitable ligand via an active site and in which fragment, at least one of its amino acid residues, located in the proximity of said active site is naturally present in the form of a Cys residue or is substituted in Cys residue, and (ii) a fluorophore coupled with said Cys residue(s).

(57) **Abrégé :** Biocapteurs, leur procédé d'obtention et leurs applications notamment pour la détection, le dosage ou la localisation, en immunofluorescence directe, d'un ligand tel qu'un antigène ou un haptène, dans une population hétérogène. Lesdits biocapteurs sont constitués par (i) au moins un fragment de récepteur de nature protéique, apte à se lier à un ligand convenable par l'intermédiaire d'un site actif et dans lequel fragment,

[Suite sur la page suivante]

WO 01/65258 A1



(74) **Mandataire :** CABINET ORES; 6, avenue de Messine,
F-75008 Paris (FR).

(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(81) **États désignés (national) :** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

Publiée :

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

(84) **États désignés (régional) :** brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen

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

BIOCAPTEURS, LEUR PROCEDE D'OBTENTION ET LEURS APPLICATIONS.

La présente invention est relative à des biocapteurs, à leur procédé d'obtention et à leurs applications notamment pour la détection, le dosage ou la localisation, en immunofluorescence directe, d'un ligand tel qu'un antigène ou un haptène, dans une population hétérogène.

Un biocapteur est une macromolécule biologique bifonctionnelle : d'une part, il est capable de fixer spécifiquement son ligand dans un mélange, d'autre part, il transduit l'événement de fixation en un signal mesurable directement et instantanément : au moyen d'un simple système de diodes, d'un spectrofluorimètre, d'un microscope à fluorescence, d'un microscope confocal, ou de tout autre appareil, avec pour conséquence l'immédiateté de la détection ainsi effectuée.

Si les « puces » à ADN permettant la détection des séquences d'acides nucléiques existent déjà, une solution générale pour la construction de biocapteurs et de puces à base de protéines, permettant la détection d'autres ligands n'existe pas et reste donc à mettre au point.

Plusieurs approches en ce sens ont été tentées :

- dans le cas de protéines qui ne possèdent pas de résidus cystéine (Cys) ou *a fortiori* de ponts disulfures, une cystéine a été introduite dans la protéine par mutagenèse dirigée. La cystéine est introduite soit au voisinage immédiat du site de liaison du ligand (protéine GB1 ; Sloan et al., 1998), soit à distance de ce site (protéine MBP ; Gilardi et al., 1994 ; Marvin et al., 1997 ; protéine GBP ; Marvin et al., 1998 ; Tolosa et al., 1999). La fonction thiol ainsi ajoutée permet le couplage à un fluorophore sensible à son environnement électronique. La fixation du ligand modifie alors cet environnement et le changement des propriétés du biocapteur est ainsi directement détectable par spectrofluorimétrie. Par exemple, Sloan et al. (1998) ont notamment montré que le fluorophore doit être positionné dans une région située à l'interface protéine-protéine et ils ont étudié le couplage d'un fluorophore dans une région de ce type, pour le complexe domaine GB1-Fc : dans ce contexte, la formation du complexe est analysée ; les meilleurs résultats sont obtenus, lorsque le fluorophore est couplé au niveau d'un acide aminé impliqué dans la formation du complexe.

Toutefois cette approche ne concerne que des protéines très particulières sans résidu de cystéine libre et sans résidus de cystéine impliqués dans des ponts disulfures. Par ailleurs, l'utilisation des biocapteurs précités est limitée à la détection de quelques ligands particuliers (maltose, glucose et fragment Fc d'anticorps). En effet, dans cette approche, la difficulté principale pour la création de biocapteurs, à partir d'une protéine qui contient des ponts disulfures vient de ce que les étapes du couplage du fluorophore à un résidu Cys peuvent résulter en une attaque de ponts disulfures essentiels pour la structure et la stabilité et une inactivation de la molécule. Parmi ces protéines, les anticorps représentent la classe de protéines naturellement dédiées à la fixation spécifique de ligands protéiques, peptidiques, polysaccharidiques ou hapténiques (antigènes) avec une grande affinité. Cependant, les molécules d'anticorps possèdent des résidus Cys formant des ponts disulfures intra- et inter-chaînes. En particulier, les fragments Fv d'anticorps comportent deux ponts disulfures, un dans chacun des domaines VH et VL, essentiels pour la stabilité du fragment Fv ou des fragments à chaîne unique scFv (Glockshuber et al., 1992).

- un biocapteur a été dérivé d'un anticorps qui fixe le 2,4-dinitrophénol par l'approche suivante. Un groupement thiol a été introduit au voisinage du site de fixation du ligand au moyen d'un marqueur d'affinité qui combinait, en une même molécule, un groupement 2,4-dinitrophénol reconnu spécifiquement par l'anticorps, un lien thiophényl ou disulfure, et un groupement réactif aldéhyde ou alpha-bromocétone. Le marqueur d'affinité était capable de se lier au site de fixation de l'anticorps par l'intermédiaire du groupement 2,4-dinitrophénol, puis de se coupler à l'anticorps par réaction au hasard de son groupement aldéhyde ou alpha-bromocétone avec les chaînes latérales des résidus de Lys, His ou Tyr situés à proximité. Le traitement de l'anticorps couplé, avec du dithiothréitol, libérait un groupement SH qui pouvait à son tour être couplé à un fluorophore (Pollack et al. 1988).

Cette méthode présente l'inconvénient d'être aléatoire et non généralisable et de ne s'appliquer qu'à des anticorps dirigés contre des haptènes car elle dépend de l'existence de résidus Lys, His ou Tyr à bonne distance du site de fixation de l'anticorps, et de la possibilité de synthétiser un marqueur d'affinité tripartite comme décrit ci-dessus.

Les Inventeurs se sont donnés pour but de permettre l'obtention de biocapteurs à base de protéines par une méthode rationnelle, générale et généralisable, apte à identifier les résidus d'acide aminé d'un récepteur protéique qui peuvent être substitués en résidus cystéine. De tels biocapteurs répondent mieux aux besoins de la pratique, notamment en ce qu'ils permettent le couplage d'un fluorophore à une position induisant un changement de l'environnement structural du fluorophore lors de la fixation du ligand, que la structure cristalline du complexe entre le récepteur et le ligand soit connue ou non.

De tels biocapteurs peuvent être construits à partir de tout type de protéines, notamment des protéines possédant des résidus cystéines importants pour leur structure ou leur stabilité, et constituent de nouveaux outils de détection, de dosage et de localisation d'une grande variété de ligands dans une population hétérogène de molécules

La présente invention a pour objet un biocapteur, caractérisé en ce qu'il est constitué par (i) au moins un fragment de récepteur de nature protéique, apte à se lier à un ligand convenable par l'intermédiaire d'un site actif et dans lequel fragment, au moins l'un de ses résidus d'acide aminé, situé au voisinage dudit site actif est naturellement présent sous forme de résidu Cys ou est substitué en résidu Cys, et (ii) un fluorophore couplé audit(auxdits) résidu(s) Cys.

Les résidus Cys qui ne sont pas essentiels, par exemple ceux qui sont situés loin du site actif, peuvent être changés en d'autres résidus par mutagenèse dirigée, notamment en résidus Ser ou Ala, pour éviter des couplages parasites avec les fluorophores.

On entend par récepteur, au sens de la présente invention, une macromolécule protéique possédant un site actif, capable de fixer un ligand, notamment un anticorps, un récepteur hormonal ou bactérien, une protéine affine, une protéine de transport ou un récepteur viral ou encore tout polypeptide ayant une affinité spécifique pour un ligand.

On entend par ligand, au sens de la présente invention, toute molécule apte à se lier audit récepteur par l'intermédiaire dudit site actif, notamment : un antigène protéique, peptidique ou hapténique, tel qu'un antigène bactérien, ou une

hormone, une cytokine, une interleukine, le TNF (*Tumor Necrosis Factor*), un facteur de croissance, une protéine virale ou une séquence peptidique ou nucléotidique.

Au sens de la présente invention, on entend par site actif du récepteur ou du fragment de récepteur l'ensemble des résidus qui participent à la liaison du
5 ligand. Ce site actif est encore appelé site de liaison ou paratope.

Au sens de la présente invention, le terme voisinage s'entend au sens défini par la théorie mathématique des espaces topologiques ; les résidus du récepteur, au voisinage du site actif sont les résidus qui sont en contact direct avec le ligand, ceux qui sont en contact par l'intermédiaire d'une molécule d'eau, et ceux dont la
10 surface accessible au solvant (ASA ; Creighton, 1993) est modifiée par la fixation du ligand. L'utilisation de sphères de rayon croissant, de 1,4 à 30 Å maximum, de préférence, de 1,4 à 2,9 Å, c'est-à-dire plus élevé que celui d'une molécule d'eau (1,4 Å), par exemple 1,4 ; 1,7 ; 2,0 ; 2,3 ; 2,6 et 2,9 Å, pour calculer la surface accessible au solvant, permet de définir un voisinage de plus en plus large du site de liaison du
15 récepteur, et ainsi d'augmenter l'ensemble des sites potentiels de couplage du fluorophore en tenant compte du volume important d'un fluorophore par rapport à celui d'une molécule d'eau. La mutation en cystéine ne doit pas être fortement délétère pour l'interaction avec le ligand, si l'on veut que le récepteur marqué conserve une bonne affinité pour le ligand.

20 Au sens de la présente invention, on entend par fluorophore, toute molécule dont la fluorescence est sensible à son micro-environnement et qui peut-être couplée à un résidu Cys.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit biocapteur, ledit récepteur possède un ou plusieurs ponts disulfures indispensables à son activité ou au
25 maintien de sa structure.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit biocapteur, ledit récepteur est un anticorps ou un fragment d'anticorps, tel qu'un fragment Fv, scFv, Fab ou un mini-anticorps ; ledit anticorps est avantageusement un anticorps monoclonal, naturel ou artificiel.

30 Conformément à l'invention, le fluorophore est notamment sélectionné dans le groupe constitué par : l'IANBD, le CNBD, l'acrylodan, la 5-iodo-

acétamidofluorescéine (5-IAF), ou un fluorophore possédant une chaîne aliphatique de 1 à 6 atomes de carbone.

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit biocapteur, le biocapteur est sous forme soluble ou est immobilisé sur un support solide convenable
5 en matière plastique ou en verre.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux dudit biocapteur, ledit support solide est une microplaque ou une fibre optique.

Parmi les procédés d'immobilisation, on peut citer ceux décrits dans Piervincenzi et al., 1998 ; Yoshioka et al., 1991 ; Turkova, 1999 ; Saleemuddin, 1999 ;
10 Weetall, 1993 ; Sara et al., 1996.

Lorsque le support est une fibre optique, de tels biocapteurs peuvent être implantés *in situ*, par exemple dans une veine d'un patient, d'un animal ou dans une cellule individuelle, pour doser le ligand *in vivo*, de façon continue, et ainsi suivre sa cinétique d'apparition et de disparition.

15 La présente invention a également pour objet une puce à base de protéines, caractérisée en ce qu'elle est constituée par un support solide sur lequel est immobilisé au moins un biocapteur selon l'invention.

De telles puces à base de protéines comprennent un support solide, par exemple une microplaque, sur laquelle les molécules de différents biocapteurs sont
20 avantageusement immobilisées en matrice et incluses dans des circuits microfluidiques. De tels biocapteurs permettent de détecter et de doser simultanément, et de façon instantanée, un grand nombre de ligands dans un échantillon, par exemple un échantillon de fluide corporel.

Les biocapteurs selon l'invention présentent un certain nombre
25 d'avantages :

- le résidu du récepteur sur lequel le couplage du fluorophore est réalisé, est prédéterminé et est un résidu Cys situé au voisinage du site actif du récepteur.

- le couplage du fluorophore sur des résidus cystéine prédéterminés
30 est réalisé dans des conditions où il n'attaque pas les ponts disulfures éventuellement présents sur le récepteur.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation de biocapteurs tels que définis ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- (a) sélection de résidus du récepteur par recherche des résidus qui
5 sont, dans le complexe récepteur-ligand, (i) en contact direct avec le ligand, ou (ii) en contact par l'intermédiaire d'une molécule d'eau, ou (iii) dont la surface accessible au solvant (ASA) est modifiée par la fixation du ligand, lorsqu'on utilise des sphères de rayon croissant de 1,4 à 30 Å, de préférence de 1,4 à 2,9 Å pour la molécule dudit solvant ;
- 10 (b) calcul de l'accessibilité au solvant (ASA), pour le récepteur libre, des atomes en position γ et éventuellement en position δ pour chaque résidu d'acide aminé sélectionné en (a), en utilisant une sphère de rayon 1,4 Å (correspondant à une molécule d'eau), et sélection des résidus dont l'atome en position γ ou l'atome en position δ est accessible au solvant ; l'accessibilité au solvant d'un atome en position δ
15 est informative sur celle du $S\gamma$ d'un résidu Cys correspondant. De manière habituelle, le seuil d'accessibilité est fixé au minimum à 2 %, de préférence, à 20 -25 % et plus favorablement, supérieur à 25 % ;
- (c) mutation dirigée d'au moins l'un des résidus, sélectionné en (b) en un résidu Cys, dans le cas où ledit résidu n'est pas naturellement un résidu Cys, et
- 20 (d) couplage de l'atome $S\gamma$ d'au moins un résidu Cys obtenu en (b) ou (c) avec un fluorophore. Dans ce cas, l'atome $S\gamma$ du résidu Cys mutant ou non qui est exposé au solvant est la cible de la molécule de fluorophore. On considère que le $S\gamma$ du résidu Cys mutant ou non se superpose avec l'atome en position γ du résidu de type sauvage. Cet atome en position γ doit donc être exposé au solvant dans la struc-
25 ture du récepteur sauvage. Lorsqu'un atome est présent en position δ dans le résidu de type sauvage, il peut masquer l'atome en position γ vis-à-vis du solvant alors que ce masquage n'existera plus après son changement en Cys.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, à l'étape (b), les valeurs d'ASA d'un résidu X_i en position i de la séquence du récepteur,
30 sont exprimées sous forme de pourcentages des valeurs d'ASAs correspondantes dans

un tripeptide Gly-X_i-Gly, qui adopterait la même conformation que le tripeptide X_{i-1}-X_i-X_{i+1} dans la structure du récepteur.

Les résidus retenus à l'étape (b) sont divisés en trois classes :

- la première classe contient les résidus dont l'atome en position γ est accessible au solvant dans la structure du récepteur libre, et qui sont en contact avec le ligand soit directement, soit par l'intermédiaire d'une molécule d'eau ;
- la deuxième classe contient les résidus dont l'atome en position γ est accessible et qui ne sont pas en contact direct avec le ligand ;
- la troisième classe contient les résidus dont l'atome en position δ est accessible, mais pas l'atome en position γ .

Lorsque la structure cristalline de l'un des partenaires du couple récepteur/ligand ou de leur complexe n'est pas connue ou pas disponible, dans ce cas, ledit procédé comprend préalablement à l'étape (a) telle que définie ci-dessus, une étape de modélisation de la molécule dont la structure n'est pas connue ou pas disponible : récepteur ou fragment actif de ce récepteur (par exemple un fragment Fv d'anticorps), son ligand (antigène), ou leur complexe (récepteur-ligand).

De manière avantageuse, ladite étape de modélisation est mise en œuvre par une méthode assistée par ordinateur ; on peut citer par exemple les méthodes décrites dans Sternberg, 1996 ; Rees et al., 1996.

En variante, la présente Demande a pour objet un procédé de préparation de biocapteurs qui comprend les étapes suivantes :

(a₁) identification du site actif du récepteur par mutagenèse de l'ensemble ou d'un sous-ensemble des résidus du récepteur, et détermination des variations des paramètres d'interaction avec le ligand (K_D , k_{on} , k_{off}) qui sont dues à chaque mutation ou à des groupes limités de mutations ;

(b₁) sélection des résidus Cys ou des résidus à muter en cystéine parmi les résidus du récepteur qui sont situés au voisinage des résidus du site actif le long de la séquence ;

(c₁) mutation dirigée d'au moins l'un des résidus sélectionné en (b₁), en un résidu Cys dans le cas où ledit résidu n'est pas naturellement un résidu Cys ; et

(d₁) couplage de l'atome S γ d'au moins un résidu Cys obtenu en (b₁) ou en (c₁) avec un fluorophore.

Par exemple, les séquences des boucles hypervariables de l'anticorps mAbD1.3, dénommées CDRs (*Complementary Determining Regions* ou régions qui déterminent la complémentarité anticorps-antigène), peuvent être définies par des comparaisons de séquences (England et al., 1999). Le site actif de mAbD1.3 pour son interaction avec le lysozyme a été caractérisé par des changements des résidus des CDRs, principalement en Ala (Dall'Acqua et al., 1996, 1998 ; England et al., 1997, 1999 ; Ito et al., 1993, 1995 ; Hawkins et al., 1993 ; Ysern et al., 1994 ; Goldbaum et al., 1996). Les changements de résidus des chaînes légères (L) L-H30A, L-Y32A, L-Y49A, L-Y50A et L-Y92A augmentent la constante de dissociation entre le fragment Fv ou scFv de mAbD1.3 et le lysozyme, tandis que les changements L-I29T, L-T51A, L-T52K, L-T53A, L-S93A et L-T97S l'affectent très peu ou pas du tout. De même, les changements de résidus des chaînes lourdes (H) H-F27N, H-Y32A, H-W52A, H-D54A, H-D100A, H-Y101A, H-R102K ou H-R102M augmentent la constante de dissociation tandis que H-T30A, H-N56A, H-D58A et H-R99A l'affectent peu ou pas du tout.

Par conséquent, les résidus L-Thr51, L-Thr52, L-Thr53, L-Ser93, L-Thr94, H-Thr30, H-Asn56, H-Asp58 et H-Arg99 qui sont polaires et donc vraisemblablement exposés à la surface de l'anticorps mAbD1.3 et qui sont proches des résidus du site actif dans la séquence, constitueraient des sites potentiels de couplage suivant des critères purement fonctionnels. On retrouve bien certains sites potentiels communs lorsqu'on utilise des critères basés sur la structure (points (a) et (b) du procédé général, ci-dessus) ou sur la fonction (points (a₁) et (b₁) de la variante dudit procédé, ci-dessus), par exemple L-Thr52, L-Thr53, L-Ser93, H-Thr30, H-Asn56, H-Asp58 et H-Arg99.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, préalablement à l'étape (a) ou à l'étape (a₁), les résidus Cys non essentiels du récepteur sont substitués en résidus Ser ou Ala par mutagenèse dirigée.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, à l'étape (d) ou à l'étape (d₁), ledit fluorophore est sélectionné dans le groupe constitué par l'IANBD, le CNBD, l'acrylodan, la 5-iodoacétamidofluorescéine ou un fluorophore possédant une chaîne aliphatique de 1 à 6 atomes de carbone.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, préalablement à l'étape (d) ou à l'étape (d₁), le récepteur muté obtenu à l'étape (c) ou à l'étape (c₁) est soumis à une réduction ménagée ; en effet, le rendement de couplage peut-être significativement amélioré, lorsque l'on ajoute cette étape.

5 Selon encore un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, après l'étape (d) ou l'étape (d₁), il comprend une étape supplémentaire (e) ou (e₁), de purification du biocapteur, par exemple sur colonne d'exclusion ou d'affinité, en particulier une colonne d'ions nickel immobilisés, dans le cas où le fragment de récepteur ou d'anticorps comprend une extension de résidus His.

10 Selon encore un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, après l'étape (e) ou l'étape (e₁), il comprend une étape supplémentaire de mesure de la constante d'équilibre (K_D ou K'_D), ou des constantes de vitesse de dissociation (k_{off}) et d'association (k_{on}) entre le récepteur et le ligand.

 La constante d'équilibre est dénommée K_D lorsque le complexe est
15 en solution et K'_D lorsque l'un des partenaires du complexe est immobilisé.

 Ladite constante peut par exemple être déterminée à partir de mesures de fluorescence en intensité ou en anisotropie. L'ensemble des données obtenues (K_D , K'_D , k_{off} , k_{on} , amplitude du changement de fluorescence lors de la fixation du ligand, déplacement du maximum d'émission) permettent d'affiner la sélection des
20 résidus du récepteur les plus appropriés pour le couplage du fluorophore.

 Selon encore un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, après les étapes (d) ou (d₁), ou les étapes (e) ou (e₁), il comprend une étape supplémentaire d'immobilisation du biocapteur sur un support solide convenable tel que cité précédemment.

25 La présente invention a également pour objet l'utilisation desdits biocapteurs, seuls ou en mélange, pour des applications de détection, de dosage et de localisation de ligands.

 Les biocapteurs selon l'invention permettent par exemple de détecter, doser ou localiser un antigène ou un haptène dans une population hétérogène de
30 molécules, de façon instantanée.

 Dans le domaine de la santé, lesdits biocapteurs trouvent des applications :

- pour suivre la progression ou la régression d'une maladie, en réponse à un traitement ;
 - pour doser un agent infectieux (bactérie, virus), un agent pathogène (cellule tumorale), une macromolécule (hormone, cytokine) ou un haptène dans un fluide corporel (par exemple sang, sperme, etc) ;
 - pour déterminer le sérotype d'un agent infectieux ;
 - pour détecter un marqueur cellulaire et déterminer sa localisation ;
 - pour le tri de cellules, sur la base de la présence d'un marqueur de surface ;
 - pour le tri de molécules ;
 - pour quantifier un composant intra-cellulaire ou extracellulaire, suivre sa cinétique d'apparition et de disparition, et pour suivre sa localisation ;
 - pour déterminer la demi-vie d'une molécule (dépendant de son instabilité, de son métabolisme, ou de son élimination), sa diffusion, et sa concentration tissulaire ;
 - pour suivre l'effet d'une molécule chimique sur un composant cellulaire (criblage de banques, notamment de banques protéiques).
- Dans le domaine de l'environnement, de l'industrie et de la répression des fraudes, lesdits biocapteurs trouvent également des applications :
- pour détecter et doser un polluant, et suivre son élimination, par des processus naturels ou de biorémediation ;
 - pour doser un composant actif dans une préparation en cours de fabrication ou de commercialisation ;
 - pour suivre la cinétique d'une réaction de synthèse chimique.

Lesdits biocapteurs trouvent également application dans la fabrication de puces à base de protéines.

La présente invention a également pour objet des réactifs de détection, de dosage et/ou de localisation de ligands, caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un biocapteur tel que défini ci-dessus.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection, de dosage ou de localisation d'un ligand dans un échantillon hétérogène, caracté-

risé en ce qu'il comprend la mise en contact dudit échantillon hétérogène avec au moins un réactif selon l'invention.

La présente invention a également pour objet une trousse de détection, de dosage et/ou de localisation de ligands, caractérisée en ce qu'elle inclut au moins un réactif selon l'invention.

L'invention a en outre pour objet une trousse de criblage d'inhibiteurs de l'interaction ligand/récepteur, caractérisée en ce qu'elle inclut au moins un biocapteur selon l'invention.

La présente invention a également pour objet l'utilisation du plasmide pMR1 de séquence SEQ ID NO:10, déposé auprès de la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), sous le numéro I-2386, en date du 29 février 2000, pour la préparation d'un biocapteur conforme à l'invention.

La présente invention a en outre pour objet l'utilisation du plasmide pMR1(VL-S93C) de séquence SEQ ID NO:11, déposé auprès de la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), sous le numéro I-2387, en date du 29 février 2000, pour la préparation d'un biocapteur conforme à l'invention.

La présente invention a également pour objet le plasmide pMR1 de séquence SEQ ID NO:10, déposé auprès de la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), sous le numéro I-2386, en date du 29 février 2000.

La présente invention a en outre pour objet le plasmide pMR1(VL-S93C) de séquence SEQ ID NO:11, déposé auprès de la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), sous le numéro I-2387, en date du 29 février 2000.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- La figure 1 illustre les critères de détermination des résidus du fragment Fv de l'anticorps dénommé mAbD1.3 au voisinage du site actif de liaison au lysozyme, utilisables pour le couplage du fluorophore. Les **colonnes 1 et 2** indiquent les résidus du fragment Fv de l'anticorps dénommé mAbD1.3 qui sont en contact direct avec le lysozyme, soit au moins par leur chaîne latérale (**d**), soit par leur chaîne

peptidique (**b**) ; ceux qui sont en contact par l'intermédiaire d'une molécule d'eau (**i**), et ceux dont la surface accessible au solvant (ASA) est modifiée par la fixation du lysozyme lorsqu'on utilise des sphères de rayon 1,4 ; 1,7 ; 2,0 ; 2,3 ; 2,6 ou 2,9 Å pour la molécule de solvant. Les colonnes 3 et 4 indiquent les valeurs d'ASA, dans le Fv libre (en utilisant $R = 1,4 \text{ Å}$), des atomes en position γ et éventuellement δ de chacun des résidus X_i sélectionnés, en position i de la séquence du Fv, sous forme de pourcentages des ASAs correspondantes dans un tripeptide Gly- X_i -Gly qui adopterait la même conformation que le tripeptide X_{i-1} - X_i - X_{i+1} dans la structure du Fv. Les colonnes 5, 6 et 7 indiquent l'ASA dans la structure du complexe natif, des groupements en positions γ , δ et ϵ dans la chaîne latérale initiale. Les colonnes 8 et 9 indiquent les mutations de ces résidus connues dans mAbD1.3 et leurs effets, sous forme d'une variation $\Delta\Delta G$ d'énergie d'interaction avec le lysozyme. La colonne 10 résume le classement des résidus par ordre de priorité décroissante ; (+) correspond aux résidus dont l'atome en position γ est accessible au solvant dans la structure du Fv libre, et qui sont en contact avec le lysozyme soit directement, soit par l'intermédiaire d'une molécule d'eau dans la structure du complexe, (+/-) correspond aux résidus dont l'atome en position γ est accessible et qui ne sont pas en contact direct avec le lysozyme et (?) correspond aux résidus dont l'atome en position δ est accessible, mais pas l'atome en position γ .

20 - La figure 2 illustre l'optimisation de la production de Fv de mAbD1.3 recombinant (scFv-His6), à l'aide de vecteurs d'expression procaryotes (pMR1 et pMR5). Le contenu périsplasmique de souches HB2151 et BL21 (DE3) de *E. Coli* transformées respectivement par les plasmides pMR5 et pMR1, induites par l'IPTG (BL21 (DE3)) ou l'anhydrotétracycline (HB2151) et cultivées en faisant varier la température, le temps d'induction et la concentration de l'inducteur, a été mesuré par ELISA à l'aide d'un anticorps anti-His5. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires.

30 - La figure 3 illustre l'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS et coloration au bleu de Coomassie des fractions de la purification du scFv-His6(VL-S93C) mutant, sur colonne d'ions nickel. EP : extrait périsplasmique non-purifié, NR : fractions non retenues, M : marqueur de masse moléculaire, L₂₀ et L₄₀ : fractions de lavage à 20 et 40 mM d'imidazole, EL : fractions d'élution.

- Les figures 4 et 5 illustrent l'oligomérisation non-covalente du scFv-His6 de type sauvage et du mutant VL-S93C, analysée par chromatographie d'exclusion de taille. Les scFv-His6 purifiés ont été injectés à une concentration de 50 µg/ml pour le type sauvage et pour le mutant, dans un volume de 200 µL, en haut
5 d'une colonne Superdex^R 75 HR 10/30 (Pharmacia). Le chromatogramme a été développé à 25°C, à pH=7,5 pour le type sauvage et à pH=7,0 pour le mutant.

- La figure 6 représente les structures chimiques du CNBD, de l'IANBD, de la 5-iodoacétamidofluorescéine (5-IAF) et de l'acrylodan.

- La figure 7 illustre la proportionnalité entre intensité de fluorescence (excitation à 469 nm, émission à 535 nm) et concentration en protéine dans les
10 fractions d'élution issues de la séparation entre conjugué et fluorophore libre.

- La figure 8 illustre l'émission de fluorescence par des dérivés du scFv-His6, pour une excitation à 469 nm, en l'absence de lysozyme. Les espèces suivantes ont été analysées : scFv-His6 de type sauvage et scFv-His6(VL-S93C) après
15 couplages avec l'IANBD et séparations ; scFv-His6(VL-S93C) avant couplage.

- La figure 9 montre l'évolution du rendement de couplage (proportion de scFv-His6 mutants liés à un fluorophore, ici l'IANBD) et du rendement en matériel lors de la préparation du biocapteur, en fonction de la concentration en 2-mercaptoéthanol utilisée pour la réduction ménagée.

- La figure 10 montre le spectre d'absorption du dérivé fluorescent scFv-His6(VL-S93ANBD), enregistré pour des longueurs d'onde de 250 à 550 nm. La
20 hauteur du pic à 278 nm, correspondant à la protéine, et celle du pic à 500 nm, correspondant à l'IANBD couplé, ont permis de calculer le rendement de couplage (ici 83%).

- La figure 11 illustre l'émission de fluorescence par le dérivé scFv-His6(VL-S93ANBD) pour une excitation à 469 nm exprimée en unité arbitraire (v.a.). Les spectres ont été enregistrés en l'absence de lysozyme, ou 1 minute après addition de lysozyme à 100 nM et 1 µM (concentrations finales) et brève homogénéisation. La même exaltation maximale de fluorescence (+27%) est observée pour trois prépara-
30 tions différentes de ce même dérivé pour lesquelles différentes méthodes de couplage (avec ou sans traitement réducteur préalable) ont été utilisées, et différents rendements de couplage ont été obtenus.

- La figure 12 illustre l'émission de fluorescence à 535 nm par le conjugué scFv-His6(VL-S93ANBD) pour une excitation à 480 nm, exprimée en unité arbitraire (v.a.). Les intensités de fluorescence ont été enregistrées en l'absence ou en présence de concentrations variables de lysozyme (10 nM à 2 µM) dans un tampon
 5 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH=7,5. Dans ce tampon, l'intensité de fluorescence du conjugué scFv-His6(VL-S93ANBD) est proportionnelle à la concentration de lysozyme jusqu'à 400 nM et augmentée de 91 % à saturation. La courbe obtenue permet de titrer directement le lysozyme entre 10 et 400 nM.

- La figure 13 illustre les rendements de couplage et les propriétés de
 10 fluorescence des biocapteurs. La colonne 1 indique les résidus du fragment Fv de l'anticorps dénommé mAbD1.3 qui ont été mutés en résidus Cys ; ces résidus ont été choisis en fonction des données structurales exposées dans la figure 1. La colonne 2 indique le pourcentage de molécules du scFv-His6 mutant couplées à l'IANB, par comparaison au scFv-His6 de type sauvage (wt). La colonne 3 indique la variation de
 15 fluorescence à 535 nm entre les formes libres et complexées au lysozyme des conjugués scFv-Cys-ANBD, mesurée dans un tampon 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 160 mM imidazole, pH=7,9. Des exaltations importantes de fluorescence sont obtenues pour plus de la moitié des positions de couplage.

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

EXEMPLE 1 : Matériels et Méthodes.

1-Souches bactériennes, plasmides et phages parentaux

TABLEAU I

Souche	Principaux caractères	Référence
HB2151	<i>ara Δ(lac-pro) thi / F' proA⁺B⁺ lacI^qZΔM15</i>	Carter et al., 1985
RZ1032	<i>Hfr dut ung r⁺ m⁺</i>	Kunkel et al., 1987
BL21(DE3)	<i>F⁻ ompT hsdSB(rB⁻,mB⁻) gal dcm / lambdaDE3</i>	Studier et Moffatt, 1986

25

Le vecteur pASK98-D1.3 code pour un hybride entre un scFv de l'anticorps monoclonal mAbD1.3 et une étiquette de type streptavidine. Le gène

correspondant est sous contrôle du promoteur et de l'opérateur tétracycline (Skerra, 1994). pSPI1.0 est un dérivé de pET26b (Novagen) et permet le sous-clonage des scFv sous contrôle du promoteur du phage T7.

2-Milieus de culture et tampons

5 Les milieux LB et 2xYT ont été décrits (Sambrook et al., 1989). Le milieu SB contient 16 g/l bacto-tryptone, 10 g/l de bacto-levure, 10 g/l NaCl, 50 mM K_2HPO_4 , 5 mM $MgSO_4$ et 1 % glucose (Plückthun et al., 1996). L'ampicilline est utilisée à 200 μ g/ml et la kanamycine à 30 μ g/ml dans les milieux de croissance. Les tampons PBS et TBE ont été décrits (Sambrook et al, précité). Tampon P : 20 mM
10 Tris-HCl pH7,9 ; 500 mM NaCl. Tampon Q : 50 mM Tris-HCl pH7,5 ; 150 mM NaCl. Tampon C : 50 mM phosphate de sodium pH7,0 ; 150 mM NaCl.

3-Oligonucléotides

Les séquences des oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse ou les constructions génétiques sont données dans le tableau suivant. Les codons modifiés sont notés en gras pour les oligonucléotides mutagènes.

15

TABLEAU II

Nom	Séquence	
pMR1-VL-H30C	5'-atggtacgatttattaaacattataagggtg-3'	SEQ ID NO :20
pMR1-VL-N31C	5'-catgctaaataacagtggatattcccacttg-3'	SEQ ID NO :17
pMR1-VL-Y49C	5'-agacgattccaacaacatatacactggctcctga-3'	SEQ ID NO :21
5 pMR1-VL-Y50C	5'gattccaacaacatatctggctcctgactcctcta-3'	SEQ ID NO :22
pMR1-VL-T52C	5'-catctgctaaggtaacatgtataatagac-3	SEQ ID NO :13
pMR1-VL-T53C	5'-catcgctaagcatgtgtataataga-3'	SEQ ID NO :1
pMR1-VL-D56C	5'-cttgatggcacaccgcatgctaagggtgttg-3'	SEQ ID NO :16
pMR1-VL-W52C	5'-gaggagtacgcaaaaatgttgacagtaa-3'	SEQ ID NO :12
10 pMR1-VL-S93C	5'-cgaggagtacacaaaaatgttgacagta-3'	SEQ ID NO :2
pMR1-VL-T94C	5'-cgtccgaggacaactccaaaatgtt-3'	SEQ ID NO :3
pMR1-VH-S28C	5'-acaccatagccagttaagcagaaccctgagacg-3'	SEQ ID NO :18
pMR1-VH-G31C	5'-caagagtaattggacaataccacatttg-3'	SEQ ID NO :24
pMR1-VH-T30C	5'-acaccatagccgcataatgagaaccctg-3'	SEQ ID NO :15
15 pMR1-VH-Y32C	5'-cagtttacaccacacccggttaatgaga-3'	SEQ ID NO :14
pMR1-VH-G53C	5'-acccttactaaacacaactaccttgtgtctg-3'	SEQ ID NO :25
pMR1-VH-N56C	5'-ttatagtctgtgcacccatcaccccaaatcat-3'	SEQ ID NO :19
pMR1-VH-R99C	5'-tgacacggctctctcacactaatatccgaactgatga-3'	SEQ ID NO :23
Séquençage:		
20 VL-CDR1-Rev	5'-agaatattgtgttcctga-3'	SEQ ID NO :4
VH-CDR1-Rev	5'-tgctgatgctcagctctgg-3'	SEQ ID NO :5
VH-Seq-CDR3	5'-ggatgatgaaacacagac-3'	SEQ ID NO :6
pASK98-seq-His	5'-cgccgcgcttaatgc-3'	SEQ ID NO :7
Construction de pMR1:		
25 pASK98-His6-For :	5'-tcgagatcaagcgccgctggaacaccatcaccatcaccatta-3'	SEQ ID NO :8
pASK98-His6-Back :	5'-agcttaatggatggtgatggtgtccagcgccgcttgatc-3'	SEQ ID NO :9

4-Techniques d'ADN recombinant

Préparation d'ADN plasmidique : les mini-préparations d'ADN plasmidiques sont effectuées à partir de 5 ml de culture bactérienne par la méthode de la lyse alcaline (Sambrook et al., précité). Les midi-préparations sont effectuées à partir de 30 à 60 ml de culture au moyen du kit QIAFilter Plasmid Midikit (QIAGEN).

Transformation : la préparation de bactéries compétentes par la méthode simple au CaCl_2 et la transformation par choc thermique sont effectuées comme décrit dans Sambrook et al., précité.

Purification de fragments d'ADN par électrophorèse : le mélange de restriction est chargé sur un gel d'agarose à 1 à 2 % (Easy Bag Agarose, Quantum Bioprobe). L'électrophorèse est menée 1 à 2 heures à 8 V/cm dans du tampon TBE. Le gel est ensuite coloré au bromure d'éthidium à 1 $\mu\text{g/ml}$ dans l'eau. La bande d'agarose contenant le fragment d'ADN est découpée sous lampe U.V puis l'ADN est extrait et purifié au moyen du kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

Ligation d'un fragment d'ADN dans un vecteur plasmidique : pour la ligation de fragments de restriction, leur mélange est précipité avec Precipitator (Appligene), resuspendu dans l'eau puis porté 5 minutes à 50°C. 400UI de ligase à ADN de T4 (New England Biolabs) et son tampon sont ajoutés et la ligation est poursuivie toute la nuit à 16°C. Les souches HB2151 sont ensuite transformées avec les produits de ligation.

Mutagenèse : la mutagenèse dirigée est effectuée comme décrit dans Kunkel et al., (1987) en utilisant la polynucléotide kinase de T4, la ligase à ADN de T4 et la polymérase à ADN de T4 (New England Biolabs).

Séquençage : la présence de mutation ou le contrôle des constructions génétiques sont effectués par séquençage au moyen du T7-Sequencing Kit (Pharmacia), avec les mélanges de nucléotides pour lecture courte, du dATP- ^{35}S et une amorce. La matrice est constituée par une mini-préparation d'ADN plasmidique, dénaturée par la soude puis neutralisée par passage sur colonne Microspin S-400-HR. Les gels de séquences (6 % acrylamide 1:19 bis, 42 % urée en TBE, 30 x 40 cm) sont soumis à une pré-électrophorèse de 45 min à 40 W, puis chargés avec les échantillons préalablement bouillis (Sambrook et al, précité). La migration est conduite à 40 W pendant 2 à 3 h. Les gels sont séchés et exposés une nuit avec un film BioMax MR (Kodak).

5-Constructions des plasmides recombinants

pMR1 : le vecteur pASK98-D1.3 est coupé par les enzymes XhoI et HindIII. Le mélange de restriction est passé sur colonne Microspin S-400-HR pour retirer le plus petit fragment de restriction (43 pb). Les oligonucléotides pASK98-

his6-for et pASK98-his6-back sont phosphorylés et hybridés à 60°C pour former un adaptateur à extrémités cohésives qui est inséré dans le grand fragment XhoI-HindIII de pASK98-D1.3. Le phagemide obtenu, pMR1 est contrôlé par analyse de restriction avec les enzymes NotI et PvuI et par séquençage au moyen de l'oligonucléotide
5 pASK98-seq-His6, il correspond à la SEQ ID NO :10.

PMR 5 : les plasmides pFBX et pSPI1.0 sont coupés par SfiI et NotI. Le petit fragment de pFBX (750 pb) contenant le gène du scFv de D1.3 et le grand fragment de pSPI1.0 (4650 pb) sont purifiés sur gel d'agarose puis assemblés par ligation. Le plasmide obtenu, pMR5 est contrôlé par analyse de restriction avec
10 l'enzyme AflIII.

6-Production des fragments d'anticorps

Production en faible quantité à partir de pMR1 ou pMR5 : 200 ml de milieu 2xYT ampicilline sont inoculés avec une colonie isolée des souches recombinantes HB2151(pMR1) ou BL21(DE3, pMR5). La culture est agitée à 22, 30 ou
15 37°C jusqu'à l'obtention de $A_{600nm} = 0,5$ où elle est induite avec 0,2 à 1,0 µg/ml d'anhydrotétracycline pour HB2151 ou avec 0,2 à 1,0 mM d'IPTG pour BL21(DE3) puis l'agitation est poursuivie pendant 2 h, 5 h ou 16 h. Un extrait périplasmique est préparé par choc osmotique (voir ci-dessous) à partir de 50 ml de culture centrifugés 20 min à 10500 g, à 4°C.

Production de quantités importantes : pour produire les scFv-His6, du milieu SB (100 ml) additionné d'ampicilline est inoculé avec une colonie isolée de la souche recombinante HB2151(pMR1). La culture est agitée pendant une nuit à 37°C puis 25 ml du contenu sont transférés dans 750 ml du même milieu pré-équilibré à 22°C. La culture est agitée à 22°C jusqu'à $A_{600nm} = 2,0$ puis induite par 0,22 µg/ml
25 anhydrotétracycline. La croissance est poursuivie pendant environ 2 h et 30 min, jusqu'à $A_{600nm} = 4$. La culture est centrifugée 20 minutes à 9500 g, à 4°C. L'extrait périplasmique est préparé par la méthode à la polymyxine décrite ci-après (exemple 1-7).

7-Préparation d'extraits périplasmiques

30 Les cultures bactériennes sont centrifugées et des extraits périplasmiques sont préparés à partir des culots bactériens par l'une des quatre méthodes suivantes. Les volumes sont indiqués par rapport au volume de culture traité.

Méthode du choc osmotique : le culot bactérien est resuspendu dans 20 % Saccharose dans 100 mM Tris-HCl pH 7,5 (1/20e volume). La suspension est maintenue 10 minutes sur la glace puis centrifugée 15 minutes à 10.000 g, à 4°C. Le culot est repris dans 0,5 mM MgCl₂ (1/20e volume). La suspension est de nouveau
5 maintenue 10 minutes sur glace et centrifugée de même. Ce second surnageant constitue l'extrait périplasmique proprement dit. Le premier surnageant peut néanmoins être utilisé après dialyse contre du tampon P.

Méthode au Tris-EDTA : le culot bactérien est resuspendu dans 100 mM Tris-HCl pH7,5 ; 1 mM EDTA (1/20e volume). La suspension est homogénéisée
10 30 minutes par agitation magnétique à 4°C, puis centrifugée 30 minutes à 35000 g. Le surnageant constitue l'extrait périplasmique. Le culot est resuspendu dans 1/20e volume de SDS à 1% dans l'eau. Il contient les protéines insolubles, membranaires ou cytoplasmiques.

Méthode Tris-EDTA-NaCl : cette méthode est identique à la
15 méthode au Tris-EDTA sauf que la resuspension du culot bactérien se fait dans 100 mM Tris-HCl pH7,5 ; 1 mM EDTA et 1M NaCl.

Méthode à la polymyxine : cette méthode est identique à la méthode au Tris-EDTA-NaCl à la seule différence que la resuspension du culot bactérien se fait dans du tampon P contenant 1 mg/ml de sulfate de polymyxine B (ICN).

20 **8-Purification de fragments d'anticorps**

Purification des scFv-His6 : l'extrait périplasmique est filtré sur filtre Millex (0,45 µm de porosité, Millipore) puis chargé sur une colonne contenant 1,5 ml de résine Ni-NTA Superflow (QIAGEN) équilibrée avec 10 ml de Tampon P. La colonne est successivement lavée avec 10 ml de 5 mM imidazole, 20 mM imidazole,
25 40 mM imidazole en tampon P. Les scFv-His6 sont élués par 4 x 1,5 ml de 100 mM imidazole en tampon P. Les fractions d'éluion sont analysées par SDS-PAGE à 15 %, selon le protocole décrit à l'exemple 1-10. Leur concentration en protéine est mesurée soit au moyen d'un réactif de Bradford (BioRad) en utilisant la serum albumine bovine (BSA) comme étalon, soit au moyen de A_{280nm} en prenant $\epsilon = 51\ 130$
30 M⁻¹.cm⁻¹, calculé comme décrit dans Pace et al. (1995).

9-Quantification de scFv-His6 par ELISA indirect

Une plaque de microtitration (Nunc) est recouverte de lysozyme de blanc d'oeuf de poule (HEL, 10 µg/ml) en tampon 50 mM NaHCO₃ pH9,6 et incubée une nuit à température ambiante. La plaque est saturée pendant 2 h à 37°C par de la BSA (3 %
5 poids/volume) en tampon PBS. Les échantillons sont dilués au moins 2 fois dans du PBS à 3 % BSA, déposés sur la plaque et laissés 1 h à température ambiante. La plaque est lavée 5 fois avec du PBS à 0,05 % Tween 20, puis incubée pendant 1 h en présence d'un anticorps primaire (anticorps monoclonal de souris anti-His5, QIAgen) dilué à 0,2 µg/ml dans du PBS à 3 % BSA. La plaque est lavée comme précédemment,
10 puis incubée pendant 1 h, en présence d'un anticorps secondaire (anticorps monoclonal anti-Fc de souris, couplé à la phosphatase alcaline) dilué au 1/10.000. La plaque est lavée comme précédemment et les complexes immuns sont révélés avec 2 mg/ml de p-nitrophénylphosphate (Sigma) dans 1M diéthanolamine-HCl pH9,8, 10 mM MgSO₄. Le signal A_{405nm} est mesuré sur un lecteur de microplaques Labsystem
15 Multiskan MS. Dans les conditions expérimentales utilisées, la zone de linéarité est obtenue pour des concentrations de scFv-His6 inférieures à 0,8 µg/ml.

10-Electrophorèse des protéines et techniques de Western-blot ou d'immuno-empreinte.

SDS-PAGE : Le gel de concentration est un gel 4 %
20 acrylamide:bisacrylamide (1:29) dans 125 mM Tris-HCl pH6,8 ; 0,1 % SDS et le gel de séparation est un gel 15 % acrylamide dans 375 mM Tris-HCl pH8,8 ; 0,1% SDS. Le tampon d'électrophorèse contient 190 mM Glycine, 25 mM Tris-base et 0,1 % SDS. Les gels (8 x 7 cm) sont coulés et l'électrophorèse est réalisée à l'aide d'un appareil Hoefer Mighty Small II. Les échantillons sont additionnés de tampon de
25 charge 2x (125 mM Tris-HCl pH8,0 ; 2,5 % SDS ; 20 % Glycérol ; 2 mg/ml bleu de bromophénol, et 10 % 2-mercaptoéthanol dans le cas des gels SDS réducteurs), et chauffés 5 min à 90°C avant d'être chargés. L'électrophorèse est réalisée pendant 1h30 à 30 mA. Les marqueurs ont les masses moléculaires suivantes: 21,5 ; 31 ; 45 ; 66,2, et 97,4 kDa (Pre-stained Molecular Weight Marker low range, Bio-Rad). Les pro-
30 téines sont révélées par coloration du gel dans un bain de 1 mg/ml bleu de Coomassie R250, 42 % méthanol, 16 % acide acétique puis décoloration dans plusieurs bains de 40 % méthanol, 10 % acide acétique.

Technique de Western-blot : Les protéines sont séparées par SDS-PAGE puis transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond-C (Amersham), pendant une nuit, sous 10V, dans une cuve TE22 Series Transphor Electrophoresis Unit HSI (Hoefer), contenant 25 mM Tris-base, 190 mM glycine, 20% méthanol.

5 Ensuite, la membrane est saturée par 3 % BSA (poids:volume) en tampon TBS (100 mM Tris-HCl pH7,5 ; 150 mM NaCl), puis incubée pendant 1 h à température ambiante avec les anticorps primaires et secondaires, dilués dans du TBS à 3 % BSA, aux concentrations décrites pour l'ELISA (exemple 1-9). Après chaque incubation avec un anticorps, la membrane est lavée dans deux bains de tampon TTT (200 mM

10 Tris-HCl pH7,5 ; 500 mM NaCl; 0,05 % Tween 20 ; 0,2 % Triton X-100) suivi d'un bain de tampon TBS. La révélation des protéines se fait en incubant la membrane dans 100 mM Tris-HCl pH9,5 ; 100 mM NaCl ; 50 mM MgCl₂ ; 0,4 mg/ml Nitro Blue Tetrazolium (Sigma) et 0,2 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (Sigma). Elle est arrêtée en plongeant la membrane dans l'eau.

15 **11-Analyse de l'interaction entre scFv de mAbD1.3 et le lysozyme de poule au moyen du BIAcore**

Les mesures sont faites sur une puce de CM5 (BIAcore AB) à surface de carboxyméthyl-dextran, comme décrit dans England et al., (1999). Brielèvement, le lysozyme est immobilisé dans un canal par liaison amide jusqu'à un niveau

20 de 500 RU ($1 \text{ RU} = 1 \text{ ng/mm}^2$). Les constantes de vitesse d'association (k_{on}) et de dissociation (k_{off}) à l'interface, ainsi que leur rapport K_D (constante de dissociation à l'interface), sont mesurées à 20°C avec un flux de 10 $\mu\text{l/min}$ de scFv-His6 en tampon PBS additionné de 0,005 % Tween 20. Le tampon contient en plus 1 μM de lysozyme

25 immobilisé. Un canal sans lysozyme immobilisé donne le signal de fixation non spécifique.

12-Chromatographie d'exclusion

Le scFv-His6 est dialysé contre du tampon Q puis concentré par ultrafiltration sur Centricon^R 10 (Amicon). Les chromatographies sont réalisées au

30 moyen d'une colonne Superdex^R 75 HR10/30 (Pharmacia), en tampon Q, à un flux de 0,5 ml/min. La colonne est pré-équilibrée dans les mêmes conditions. Les protéines

sont détectées dans l'effluent de la colonne au moyen de A280nm. Les échantillons préparés en tampon Q sont injectés au moyen d'une boucle de 200 µl. Ils ont les compositions suivantes : scFv-His6, 200 µL à 50 µg/ml ; BSA, 40 µg ; chymotrypsinogène, 14 µg ; Acétone, 0,1 %. Le rapport des concentrations entre dimère et monomère est déterminé d'après la surface des pics obtenus.

13-Couplage de fluorophores sur la cystéine libre d'un scFv-His6 mutant

Les scFv-His6 mutants fraîchement purifiés et conservés rigoureusement à 4°C sont dialysés pendant une nuit contre du tampon C. Alternativement, les scFv-His6 mutants purifiés sont ajustés à une concentration d'au moins 100 µg/ml par ultrafiltration sur filtre Centricon^R 10 (Amicon) puis réduits par addition de 2-mercaptoéthanol à une concentration finale de 0,1 mM, 1 mM, 10 mM ou 50 mM. Le mélange est incubé pendant 1 heure à 22°C. La protéine réduite est séparée du réducteur en excès par désalage, au moyen d'une colonne HiTrap Desalting (Pharmacia) prééquilibrée en tampon C fortement dégazé.

Le couplage est réalisé par addition de chlorure de NBD, d'ester d'IANBD, de 5-IAF ou d'acrylodan (BioProbe) dans un rapport molaire (protéine:fluorophore) d'au moins 1:20. Le mélange est incubé 24 heures à 22°C puis centrifugé au moins 15 minutes à 10.000 g, à 4°C. Le scFv-His6 marqué est ensuite repurifié. Pour cela, le mélange réactionnel est dilué 7 fois dans 5 mM imidazole en tampon P et chargé successivement 3 fois sur une colonne contenant 500 µl de résine Ni-NTA. Le fluorophore en excès est éliminé en lavant 6 fois par 5 ml de 5 mM imidazole en tampon P. Le scFv-His6 marqué est élué par 1 ml de 40 mM imidazole en tampon P puis soit par 4 fois 500 µl de 100 mM imidazole en tampon P, soit par 3 fois 600 µl de 160 mM imidazole en tampon P. Un échantillon de référence est obtenu en traitant du tampon C seul d'une manière identique. Il est utilisé comme contrôle pour les dosages protéiques et les mesures de fluorescence. Le rendement de couplage peut être estimé par le rapport des absorbances du fluorophore et de la protéine :

$$\varepsilon_{280\text{nm}}(\text{scFv-His6}) = 51,13 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}, \varepsilon_{435\text{nm}}(\text{CNBD}) = 9,6 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1},$$

$$\varepsilon_{500\text{nm}}(\text{IANBD}) = 31,1 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}, \varepsilon_{492\text{nm}}(5\text{-IAF}) = 75 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}, \varepsilon_{391\text{nm}}(\text{acrylodan}) = 20 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1},$$

comme décrit dans Haugland et al., (1996).

EXEMPLE 2: Exemple de mise en œuvre du procédé selon l'invention.**1-Recherche des résidus du fragment Fv libre de mAbD1.3 utilisables pour le couplage du fluorophore (figure 1).**

La structure du fragment Fv libre de mAbD1.3 et celle de son
5 complexe avec le lysozyme sont connues (Bhat et al., 1994). Néanmoins, pour simplifier la recherche des résidus du Fv qui sont situés au voisinage du site actif de liaison au lysozyme et utilisables pour le couplage du fluorophore, et pour rendre cette recherche applicable à d'autres couples de macromolécules pour lesquels seule la structure du complexe existe, les données expérimentales concernant le Fv libre de
10 mAbD1.3 n'ont pas été utilisées. Un modèle structural du Fv libre a été construit en déléant les coordonnées cristallographiques du lysozyme dans la structure du complexe. Les structures ont été analysées avec la suite de logiciels WHAT IF (Vriends, 1990 ; <http://www.sander.embl-heidelberg.de/whatif/>). Les principes suivants ont été utilisés :

15 1-. Trois types de résidus ont été recherchés dans le mAbD1.3 : ceux qui sont en contact direct avec le lysozyme, ceux qui sont en contact par l'intermédiaire d'une molécule d'eau, et ceux dont la surface accessible au solvant (ASA) est modifiée par la fixation du lysozyme lorsqu'on utilise des sphères de rayon 1,4 ; 1,7 ; 2,0 ; 2,3 ; 2,6 ou 2,9 Å pour la molécule de solvant. L'utilisation de rayons plus élevés
20 que celui d'une molécule d'eau (1,4 Å), permet de définir un voisinage élargi de l'antigène à la surface de l'anticorps et de tenir compte du volume important d'un fluorophore par rapport à celui d'une molécule d'eau. Les résidus de mAbD1.3 qui satisfont à l'un de ces critères, et la nature du critère utilisé sont indiqués dans les colonnes 1 et 2 de la figure 1. Les colonnes 8 et 9 de la figure 1 donnent la nature des mutations
25 connues dans mAbD1.3 et leurs effets, sous forme d'une variation $\Delta\Delta G$ d'énergie d'interaction avec le lysozyme ;

2- Les résidus du récepteur sélectionnés en (1) doivent être changés en Cys par mutagenèse, puis couplés au fluorophore. L'atome S_γ du résidu Cys mutant doit donc être exposé au solvant dans le Fv libre, pour pouvoir être attaqué par la
30 molécule de fluorophore. On peut supposer, en première approximation, que le S_γ du résidu Cys mutant se superpose avec l'atome en position γ du résidu de type sauvage. Cet atome en position γ doit donc être exposé au solvant dans la structure du Fv libre

sauvage. Lorsqu'un atome est présent en position δ dans le résidu de type sauvage, il peut masquer l'atome en position γ vis-à-vis du solvant alors que ce masquage n'existera plus après son changement en Cys. Il a donc été considéré que l'accessibilité au solvant d'un atome en position δ pouvait être informative sur celle du Sy du résidu Cys mutant. Les valeurs d'ASA des atomes en position γ et éventuellement δ , pour chaque résidu sélectionné au point 1), sont données dans les colonnes 3 et 4 de la figure 1 (en utilisant $R = 1,4 \text{ \AA}$) ;

3- Le fluorophore peut avantageusement être couplé au Sy du résidu de Cys par l'intermédiaire d'une chaîne aliphatique dont la longueur varie de 1 à 6 atomes de carbone pour les fluorophores les plus courants, mais peut être plus longue. Après couplage, les groupements polaires et aromatiques du fluorophore doivent préférentiellement se trouver à la périphérie de l'interface de contact entre l'anticorps et l'antigène, et non dans cette interface où ils entreraient en conflit avec l'antigène. Pour cela, il faut que le bras aliphatique du fluorophore ait accès au solvant dans la structure du complexe entre l'anticorps marqué et l'antigène. En première approximation, cette condition est remplie si l'un des groupements qui sont situés en positions γ , δ et ϵ dans la chaîne latérale initiale est accessible au solvant dans la structure du complexe natif. L'ASA de ces groupements de chaînes latérales est donné dans le même format qu'au point 2), dans les colonnes 5, 6 et 7 de la figure 1 ;

4- Les mutations des résidus du récepteur ne doivent pas être trop délétères pour l'interaction avec l'antigène si on veut que l'anticorps marqué conserve une affinité suffisante. Les colonnes 8 et 9 de la figure 1 donnent la nature des mutations connues dans mAbD1.3 et leurs effets, sous forme d'une variation $\Delta\Delta G$ d'énergie d'interaction avec le lysozyme (England et al., 1997 et 1999 ; Hawkins et al., 1993 ; Dall'Acqua et al. 1996 ; Dall'Acqua et Carter, 1998).

La colonne 10 de la figure 1 résume les critères utilisés. Les résidus retenus sont divisés en trois classes de priorités différentes. La première classe contient les résidus dont l'atome en position γ est accessible au solvant dans la structure du Fv libre, et qui sont en contact avec le lysozyme soit directement, soit par l'intermédiaire d'une molécule d'eau : VL-Thr53, VL-Ser93, VL-Thr94 et VH-Thr30. La deuxième classe contient les résidus dont l'atome en position γ est accessible et qui

ne sont pas en contact direct avec le lysozyme : VL-Asn31, VL-Thr52, VL-Asp56, VH-Ser28, VH-Asn56. La troisième classe contient les résidus dont l'atome en position δ est accessible, mais pas l'atome en position γ : VL-Asn28, VL-His30, VH-Asp58, VH-Arg99.

5 **2-Construction de vecteurs d'expression du scFv-His6 et optimisation de la production du scFv-His6 (figure 2)**

a) Construction de vecteurs d'expression du scFv-His6

 L'étude de l'effet du couplage de fluorophores à des résidus du scFv de mAbD1.3 tels que définis en 1, sur la fixation au lysozyme, a été réalisée à l'aide
10 de scFv de mAbD1.3 recombinants possédant une extension C-terminale de 6 résidus histidine (scFv-His6), exprimés à l'aide de vecteurs d'expression procaryotes. La forme sauvage ainsi que les formes mutées de scFv ont été exprimées et purifiées sur colonne de nickel.

 Deux vecteurs qui codent pour le scFv-His6, pMR1 et pMR5, ont
15 été construits selon le protocole décrit à l'exemple 1-5. Ils portent le gène de résistance à la kanamycine ou à l'ampicilline, l'origine de répllication du phage M13 (f1IG), et des séquences d'adressage périplasmique, dérivés des gènes pelB ou ompA, en amont du gène du scFv. Le vecteur pMR5 porte le gène du scFv-His6 sous contrôle d'un promoteur du phage T7 et de l'opérateur lactose, et le gène du répresseur lactose.
20 L'expression se fait dans la souche BL21(DE3) qui porte le gène de l'ARN polymérase de T7 sous contrôle du promoteur/opérateur lacO_{lacp}(UV5) sur le prophage λ DE3. L'addition d'IPTG dans le milieu de culture induit l'expression des gènes de l'ARN polymérase et du scFv. Le vecteur pMR1 porte le gène du scFv-His6 sous contrôle du promoteur/opérateur tétracycline (tet^{p/o}), et le gène du répresseur correspondant.
25 L'induction se fait par ajout d'un analogue non toxique de la tétracycline, l'anhydrotétracycline, efficace à très faible concentration.

b) Optimisation de la production du scFv-His6

 La production du scHis6, estimée par la quantité de scFv-His6 présente dans un extrait périplasmique brut, est mesurée par ELISA indirect au moyen
30 d'un anticorps anti-His5, selon les techniques décrites dans l'exemple 1-9. Cette méthode permet de tester rapidement de nombreuses combinaisons de paramètres de

production, tels que la température de culture, le temps d'induction et la concentration en inducteur (figure 2).

La production de faibles quantité de fragments d'anticorps à partir de pMR1 ou de pMR5, dans les conditions décrites à l'exemple 1-6, a montré que le vecteur pMR1 donnait le meilleur rendement à 22°C, en induisant 2 heures avec 0,2 µg/ml d'anhydrotétracycline. Ces mêmes conditions ont été utilisées pour produire des scFv-His6 mutants de mAbD1.3 (figure 2).

La production de quantités importantes de fragments d'anticorps à partir de pMR1 ou de pMR5, dans les conditions décrites à l'exemple 1-6, a montré que le rendement de production était meilleur lorsque l'induction avait lieu en phase exponentielle de croissance. Or à 22°C, le milieu 2xYT ne permet qu'une courte phase exponentielle de croissance pour la souche HB2151, entre $A_{600nm}=0,3$ et $A_{600nm}=1,1$ environ. De plus, il a été observé que les bactéries lysaient dans ce milieu. Ce dernier a donc été complémenté par une base faible (K_2HPO_4), pour éviter son acidification en cours de culture, et par des composés stabilisant la membrane bactérienne externe ($MgSO_4$, glucose, NaCl). Il a été observé qu'avec le milieu résultant (milieu SB), la phase exponentielle de croissance était fortement allongée à 22°C, jusqu'à $A_{600nm}=3,8$. Ce milieu a permis d'obtenir 4 fois plus de scFv-His6 qu'en milieu 2xYT, à partir d'un volume donné de culture.

Deux types de méthodes existent pour extraire le fluide périplasmique d'une bactérie: 1) les bactéries sont équilibrées dans un milieu à forte pression osmotique puis transférées dans un tampon hypoosmotique. Le choc osmotique fait éclater la membrane externe et le contenu du périplasme est récupéré dans le second tampon; 2) les bactéries sont resuspendues dans un tampon lysant la membrane externe (EDTA, peptides amphiphiles comme la polymyxine B). Le contenu du périplasme est alors récupéré en une seule étape. Quatre méthodes de préparation de l'extrait périplasmique de HB2151(pMR1), décrites dans l'exemple 1-7 ont été testées, et la quantité de scFv-His6 présente dans chaque extrait a été estimée par ELISA. Le produit des mesures de A_{405nm} par le volume de l'extrait a donné les valeurs relatives suivantes: 100 ± 6 pour la méthode du choc osmotique (moyenne $\pm$ erreur standard sur 3 mesures), 58 ± 9 pour la méthode au Tris-EDTA, 61 ± 8 pour la méthode au Tris-EDTA-NaCl et 106 ± 9 pour la méthode à la polymyxine B. Cette

dernière méthode a donné les meilleurs résultats et a donc été utilisée pour les productions des scFv-His6 sauvage et mutants en grand volume.

3- Purification du scFv-His6

La queue de polyhistidine des scFv-His6 permet leur purification sur
5 colonne de nickel immobilisé Ni-NTA, selon le protocole décrit à l'exemple 1-8. Après chargement de la colonne avec l'extrait périplasmique, les lavages et l'élution se font avec différentes concentrations d'imidazole, qui entre en compétition avec les histidines pour la coordination du nickel. La concentration d'imidazole pour le lavage, qui permet de décrocher les impuretés sans déplacer le scFv-His6 lui-même, et la
10 concentration pour l'élution qui permet de décrocher le scFv-His6 en un minimum de fractions sans le dénaturer sont précisées à l'exemple 1-8. La pureté des fractions d'élution a été analysée par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS et coloration au bleu de Coomassie, selon le protocole décrit à l'exemple 1-10. Ces fractions contiennent une protéine qui a une masse moléculaire apparente égale à la masse
15 attendue pour les scFv-His6, et sont pures à 95%. Les pertes de matériel dues à la non-fixation sur le nickel ou au décrochement au cours des lavages ont été estimées. Le produit des mesures de A_{405nm} par le volume de chaque fraction a donné les valeurs relatives suivantes : des 100% contenus dans l'extrait brut, 6,7% des scFv-His6 ne se fixent pas sur la colonne, 7,6% sont décrochés au cours des lavages et 85,6% se
20 retrouvent dans les fractions d'élution. Dans les conditions optimales de culture, d'extraction et de purification, 650 μg de scFv-His6 sauvage purifié ont été obtenus par litre de culture.

4-Propriétés d'oligomérisation et de fixation au lysozyme du scFv-His6 de type sauvage (figure 4)

25 L'appareil BIAcore permet d'obtenir rapidement les constantes de vitesse d'association k_{on} et de dissociation k_{off} entre anticorps et antigène, ainsi que la constante d'équilibre $K'_D = k_{off}/k_{on}$, à l'interface entre le tampon et la surface sur laquelle a été immobilisé l'antigène. Les mesures s'effectuant à flux continu sur la surface, elles peuvent être faussées par la recapture des scFv récemment dissociés sur
30 un autre site d'antigène immobilisé. Cette recapture a peu d'influence avec un fragment d'anticorps monovalent, et elle est limitée par l'adjonction d'antigène en solution dans le tampon de dissociation. Cependant les scFv sont susceptibles de former

des dimères par association du domaine VH d'une molécule avec le domaine VL d'une autre (Arndt et al., 1998). Ces dimères possèdent deux sites de fixation à l'antigène. Ils mènent à une probabilité de recapture accrue.

Avant d'effectuer les mesures sur BIAcore, il est donc nécessaire de
5 vérifier l'état de dimérisation du scFv-His6 de mAbD1.3. Les proportions de monomère et de dimère au pH utilisé pour le BIAcore (pH7,5) et à une concentration de 50 µg/ml ont été estimées par la hauteur des pics correspondant en chromatographie d'exclusion, selon le protocole de l'exemple 1-12, et les résultats sont présentés à la figure 4. Le rapport des surfaces des pics du dimère et du monomère donne un taux de
10 dimérisation de 9,8%. Ce taux faible permet de négliger l'effet de la recapture sur la surface lors des mesures sur BIAcore. De plus ces mesures ont été faites à des concentrations de 0,1 à 20 µg/ml, inférieures aux 50 µg/ml utilisés pour la chromatographie d'exclusion. Les paramètres cinétiques de l'interaction entre le scFv-His6 et le lysozyme, déterminés sur BIAcore, selon le protocole décrit à l'exemple 1-11, sont les
15 suivantes :

$$k_{on} = 1,15 (\pm 0,15) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$k_{off} = 1,20 (\pm 0,22) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

$$K_D = 10,5 (\pm 3,3) \text{ nM}$$

5-Construction, production et purification des scFv-His6 20 **mutants (figure 3)**

Les mutations en cystéine des résidus de l'anticorps mAbD1.3, placés dans la première classe (VH-T30C, VL-T53C, VL-S93C et VL-T94C, voir également le paragraphe 1 de cet exemple et la colonne 10 de la figure 1) ont été introduites dans le vecteur d'expression pMR1 par la méthode de Kunkel décrite à
25 l'exemple 1-4. Les oligonucléotides utilisés, décrits à l'exemple 1-3, ont été conçus pour introduire ou supprimer des sites de restriction. La mutation est alors détectable par analyse des fragments obtenus après coupure. Les clones mutants ont été de plus séquencés dans la région de la mutation, à l'aide des oligonucléotides décrits à l'exemple 1-3, selon la méthode décrite à l'exemple 1-4, afin de vérifier l'intégrité de
30 la séquence. Le plasmide dérivé de pMR1 portant la mutation VL-S93C, dénommé pMR1(VL-S93C), correspond à la SEQ ID NO :11. La capacité de plusieurs dérivés

mutants de pMR1 à exprimer le scFv-His6 a été testée dans les conditions décrites pour la production du scFv-His6 sauvage à partir de pMR1 (exemple 2-2). Les résultats montrent que ces mutants sont produits efficacement en comparaison du sauvage : 100 $\pm$ 12 pour le type sauvage, 100 $\pm$ 29 pour VL-S93C, 97 $\pm$ 5 pour VL-T94C. Le mutant VL-S93C a été purifié avec des rendements de 575 μ g par litre de culture, comparables à ceux obtenus avec le scFv-His6 sauvage.

La pureté des fractions d'élution a été analysée par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS et coloration au bleu de Coomassie, selon le protocole décrit à l'exemple 1-10. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 3. Ces fractions contiennent une protéine qui a une masse moléculaire apparente égale à la masse attendue pour les scFv-His6, et sont pures à 95 %.

6-Absence de dimérisation covalente du mutant VL-S93C (figure 5)

La présence d'une cystéine libre sur les scFv-His6 mutants pourrait entraîner la formation de ponts disulfures intermoléculaires parasites pendant la production, la purification ou au cours du couplage du fluorophore. Le scFv-His6(VL-S93C), dialysé contre le tampon de couplage, a été analysé par chromatographie d'exclusion dans les conditions utilisées pour le scFv-His6 de type sauvage (exemple 1-12 et exemple 2-4). Le chromatogramme ne présente qu'un seul pic, suggérant que le scFv-His6(VL-S93C) n'existe que dans un seul état d'oligomérisation dans le tampon utilisé (figure 5). La position de ce pic correspond presque à celle du scFv-His6 monomérique de type sauvage. La faible différence entre les positions de ces deux pics pourrait être due au fait que les deux chromatogrammes ont été développés dans des tampons de nature et de pH légèrement différents.

7-Couplage de fluorophores au mutant VL-S93C (figures 6 à 10)

Le couplage de l'IANBD (figure 6) au scFv-His6(VL-S93C) est effectué après traitement du fragment d'anticorps par différentes concentrations de 2-mercaptoéthanol et désalage, selon le protocole décrit à l'exemple 1-13. La réaction est faite à pH=7,0 pour éviter le couplage parasite sur des lysines déprotonées à pH basique (Houk et al., 1983 ; Del Boccio et al., 1991). Après couplage, le fluorophore en excès et le dérivé du scFv-His6(VL-S93C) sont séparés par une nouvelle purification sur colonne de Nickel. Plusieurs arguments convergent pour confirmer la spécifi-

cité du couplage sur la cystéine VL-Cys93 du scFv mutant. Lors de la repurification, le fluorophore est efficacement lavé et la fluorescence résiduelle est éluée de la colonne en même temps que le scFv. Dans les fractions d'élution, l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité de protéine, ce qui suggère un couplage
5 stoechiométrique (figure 7).

En l'absence de traitement réducteur, le scFv-His6 de type sauvage ne réagit pratiquement pas avec l'IANBD, alors que le scFv-His6(VL-S93C) est marqué à 8% par le fluorophore (figure 8). Ce dernier rendement est fortement amélioré lorsque le scFv-His6(VL-S93C) est réduit par le 2-mercaptoéthanol, rapidement
10 desalé et mis en présence du IANBD. En contrepartie, ce traitement occasionne une perte de matériel d'autant plus importante que la réduction est poussée. Il est probable que le scFv-His6 soit rendu en partie insoluble par la réduction de ses ponts disulfures. La perte de matériel lors des étapes de désalage (-30%) et de repurification (-15%) intervient également dans le rendement global du couplage. La concentration de 10
15 mM en 2-mercaptoéthanol a permis d'obtenir des rendements de couplages satisfaisants avec deux mutants différents (figures 9 et 10), tout en préservant suffisamment de matériel pour les mesures de fluorescence.

8-Variations de la fluorescence du mutant VL-S93C couplé à un fluorophore en fonction de la concentration en antigène (figure 11 et figure 12)

20 Un spectre d'émission du conjugué scFv-His6(VL-S93ANBD), effectué immédiatement après l'adjonction d'antigène (lysozyme) montre une exaltation de la fluorescence qui dépend de la concentration finale en antigène. L'intensité de fluorescence sature à $1,26 \pm 0,05$ fois celle du biocapteur libre lorsque la concentration en antigène est suffisante, et de manière reproductible sur plusieurs prépara-
25 tions de biocapteurs. Aucun déplacement significatif de la longueur d'onde du maximum d'émission n'est observée (figure 11).

Les intensités de fluorescence ont été enregistrées en l'absence ou en présence de concentrations variables de lysozyme (10 nM à 2 μ M) dans un tampon 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5.

30 Les résultats présentés à la figure 12 montrent que dans ce tampon, l'intensité de fluorescence du conjugué scFv-His6 (VL-S93ANBD) est proportion-

nelle à la concentration de lysozyme jusqu'à 400 nM et augmentée de 91 % à saturation. La courbe obtenue permet de titrer directement le lysozyme entre 10 et 400 nM.

Par conséquent, les résultats obtenus à la figure 12 démontrent que le biocapteur selon l'invention permet avantageusement de titrer directement un anti-
5 gène ou un haptène, par exemple dans un fluide corporel.

9- Rendement de couplage et variation de la fluorescence en fonction de la concentration en antigène d'une série de mutants scFv-His6 (figure 13).

Des mutants scFv-His6, sélectionnés selon le procédé décrit à l'exemple 2-1, ont été produits de façon similaire au mutant VL-S93C (exemple 2-5), selon les méthodes décrites à l'exemple 1 (1-1 à 1-12). Ainsi, des plasmides dérivés de pMR1 (SEQ ID NO:10) portant les mutations décrites dans la figure 12 ont été construits par mutagenèse dirigée à l'aide des oligonucléotides présentés dans le Tableau II. Les mutants scFv-His6 produits à partir de ces plasmides ont été couplés à
15 l'IANBD, de façon similaire au mutant VL-S93C (exemple 2-7), en utilisant une concentration de mercaptoéthanol de 10 mM, selon le protocole décrit à l'exemple 1-13. Les résultats présentés à la figure 13 montrent que des rendements de couplage satisfaisants sont obtenus pour la quasi-totalité des positions de couplage sélectionnées et que des exaltations importantes de fluorescence sont observées pour plus de la
20 moitié de ces positions de couplage.

RÉFÉRENCES

- Arndt K.M. et al., *Biochemistry*, 1998, **37**, 12918-12926.
- Bhat T.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, **91**, 1089-1096.
- Braden B.C. et al., *Immunological Review*, 1998, **163**, 45-57.
- 25 - Carter P. et al., *Nucleic Acids Research*, 1985, **13**, 4431-4443.
- Creighton T.E., *Proteins: Structure and molecular properties* (Second edition). *W.H. Freeman and Cie*, 1996, 227-229.
- Dall'Acqua W. et al., *Biochemistry*, 1996, **35**, 9667-9676
- Dall'Acqua W. et al., *Current Opinion in Structural Biology*, 1998, **8**, 443-450
- 30 - Del Boccio G. et al., *The Journal of Biochemical Chemistry*, 1991, **266**, 13777-13782.
- England P. et al., *Biochemistry*, 1997, **36**, 164-172
- England P. et al., *The Journal of Immunology*, 1999, **162**, 2129-2136

- Gilardi G. et al., *Analytical Chem.*, 1994, **66**, 3840-3847.
- Glockshuber R. et al., *Biochemistry*, 1992, **31**, 1270-1279.
- Goldbaum FA. et al., *J. Mol. Recogn.*, 1996, **9**, 6-12.
- Haugland R.P, Handbook of fluorescent probes and research chemicals (sixth
5 edition). *Molecular Probes Inc., Eugene OR*, 1996.
- Hawkins RE. et al., *J. Mol. Biol.*, 1993, **234**, 958-964.
- Houk W.T. et al., *The Journal of Biological Chemistry*, 1983, **258**, 9:5419-5423.
- Ito W. et al., *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 16639-16647.
- Ito W. et al., *J. Mol. Biol.*, 1995, **248**, 729-732.
- 10 - Kunkel T.A et al., *Methods in Enzymology*, 1987, **154**, 367-382.
- Langedijk A.C. et al., *Journal of Molecular Biology*, 1998, **283**, 95-110.
- Marvin J.S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1997, **94**, 4366-4371.
- Marvin J.S. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 7-11.
- Pace C.N. et al., *Protein Structure*, 1995, **4**, 2411-2423.
- 15 - Piervincenzi RT. et al., *Biosensors & Bioelectronics*, 1998, **13**, 305-312.
- Pollack S.J. et al., *Science*, 1988, **242**, 1038-1040.
- Plückthun A. et al., Antibody engineering, a practical approach. *McCaffert, J.,
Hoogenboom, H.R. and Chiswell, D.J. Eds. Oxford University Press*, 1996, 203-252.
- Rees A.R. et al., Protein structure prediction, a practical approach. *Sternberg M.J. E. Ed.*
20 *Oxford University Press*, 1996, 141-172.
- Saleemuddin M., *Adv. Biochem. Eng. Biotech.*, 1999, **64**, 203-226.
- Sambrook J. et al., Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory
Press*, 1989.
- Sara M. et al., *Micron.*, 1996, **27**, 141-156.
- 25 - Skerra, A., *Gene*, 1994, **51**, 131-135.
- Sloan D.J. et al., *Protein Engineering*, 1998, **11**, 819-23.
- Sternberg M.J.E., Protein Structure Prediction, a practical approach. *Oxford Univer-
sity Press*, 1996.
- Studier F.W. et Moffatt, B.A., *Journal of Molecular Biology*, 1986, **189**, 113-130.
- 30 - Tolosa L. et al., *Analytical Biochem.*, 1999, **267**, 114-120.
- Turkova J., *J. Chromatography*, 1999, **722**, 11-31.
- Vriends G., *Journal of Molecular Graphism*, 1990, **8**, 52-56.

- Weetall H.H., *Appl. Biochem. Biotech.*, 1993, **41**, 157-188.
- Yoshioka M. et al., *J. Chromatography*, 1991, **566**, 361-368.
- Ysem X. et al., *J. Mol. Biol.*, 1994, **238**, 496-500.

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

REVENDICATIONS

1°) Biocapteur, caractérisé en ce qu'il est constitué par (i) au moins un fragment de récepteur de nature protéique, apte à se lier à un ligand convenable par l'intermédiaire d'un site actif et dans lequel fragment, au moins l'un de ses résidus d'acide aminé, situé au voisinage dudit site actif est naturellement présent sous forme de résidu Cys ou est substitué en résidu Cys, et (ii) un fluorophore couplé audit(auxdits) résidu(s) Cys.

2°) Biocapteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit récepteur possède un ou plusieurs ponts disulfures.

3°) Biocapteur selon la revendication 2, caractérisé en ce que ledit récepteur est un anticorps ou un fragment d'anticorps.

4°) Biocapteur selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit récepteur est un anticorps monoclonal, naturel ou artificiel.

5°) Biocapteur selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le fluorophore est sélectionné dans le groupe constitué par : l'IANBD, le CNBD, l'acrylodan, la 5-iodoacétamidofluorescéine, ou un fluorophore possédant une chaîne aliphatique de 1 à 6 atomes de carbone.

6°) Biocapteur selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ledit biocapteur est sous forme soluble.

7°) Biocapteur selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ledit biocapteur est immobilisé sur un support solide convenable.

8°) Biocapteur selon la revendication 7, caractérisé en ce que ledit support solide est sélectionné dans le groupe constitué par les microplaques et les fibres optiques.

9°) Puce à base de protéines, caractérisée en ce qu'elle est constituée par un support solide sur lequel est immobilisé au moins un biocapteur selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

10°) Procédé de préparation de biocapteurs selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

(a) sélection de résidus du récepteur par recherche des résidus qui sont, dans le complexe récepteur-ligand, (i) en contact direct avec le ligand, ou (ii) en contact par l'intermédiaire d'une molécule d'eau, ou (iii) dont la surface accessible au

solvant (ASA) est modifiée par la fixation du ligand, lorsqu'on utilise des sphères de rayon croissant de 1,4 à 30 Å, de préférence de 1,4 à 2,9 Å pour la molécule dudit solvant ;

b) calcul de l'accessibilité au solvant (ASA), pour le récepteur libre,
5 des atomes en position γ et éventuellement en position δ pour chaque résidu sélectionné en (a), en utilisant une sphère de 1,4 Å, et sélection des résidus dont l'atome en position γ ou l'atome en position δ est accessible au solvant ;

(c) mutation dirigée d'au moins l'un des résidus sélectionné en (b) en un résidu Cys, dans le cas où ledit résidu n'est pas naturellement un résidu Cys, et

10 (d) couplage de l'atome S_{γ} d'au moins un résidu Cys obtenu en (b) ou en (c) avec un fluorophore.

11°) Procédé de préparation selon la revendication 10, caractérisé en ce que, à l'étape (b), les valeurs d'ASA d'un résidu X_i en position i de la séquence du récepteur, sont exprimées sous forme de pourcentages des valeurs d'ASAs correspondantes dans un tripeptide Gly- X_i -Gly, qui adopterait la même conformation que le
15 tripeptide X_{i-1} - X_i - X_{i+1} dans la structure du récepteur.

12°) Procédé de préparation selon la revendication 10 ou la revendication 11, caractérisé en ce que préalablement à l'étape (a), il comprend une étape de modélisation du récepteur et/ou du ligand et/ou du complexe récepteur-ligand.

20 13°) Procédé de préparation de biocapteurs selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

(a₁) identification du site actif du récepteur par mutagenèse de l'ensemble ou d'un sous-ensemble des résidus du récepteur, et détermination des variations des paramètres d'interaction avec le ligand (K_D , k_{on} , k_{off}) qui sont dues à
25 chaque mutation ou à des groupes limités de mutations ;

(b₁) sélection des résidus Cys ou des résidus à muter en cystéine parmi les résidus du récepteur qui sont situés au voisinage des résidus du site actif le long de la séquence ;

(c₁) mutation dirigée d'au moins l'un des résidus sélectionné en (b₁),
30 en un résidu Cys, dans le cas où ledit résidu n'est pas naturellement un résidu Cys ; et

(d₁) couplage de l'atome S_{γ} d'au moins un résidu Cys obtenu en (b₁) ou en (c₁) avec un fluorophore.

14°) Procédé de préparation selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, caractérisé en ce que, préalablement à l'étape (a) ou à l'étape (a₁), les résidus Cys non essentiels du récepteur sont substitués en résidus Ser ou Ala par mutagenèse dirigée.

5 15°) Procédé de préparation selon l'une quelconque des revendications 10 à 14, caractérisé en ce que, à l'étape (d) ou à l'étape (d₁), ledit fluorophore est sélectionné dans le groupe constitué par l'IANBD, le CNBD, l'acrylodan, la 5-iodo-acétamidofluorescéine ou un fluorophore possédant une chaîne aliphatique de 1 à 6 atomes de carbone.

10 16°) Procédé de préparation selon l'une quelconque des revendications 10 à 15, caractérisé en ce que, préalablement à l'étape (d) ou à l'étape (d₁), le récepteur muté obtenu à l'étape (c) ou à l'étape (c₁) est soumis à une réduction ménagée.

15 17°) Procédé de préparation selon l'une quelconque des revendications 10 à 16, caractérisé en ce qu'après l'étape (d) ou l'étape (d₁), il comprend une étape supplémentaire (e) ou (e₁) de purification du biocapteur.

18°) Procédé de préparation selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'après l'étape (e) ou l'étape (e₁), il comprend une étape supplémentaire de mesure de la constante d'équilibre (K_D ou K'_D) dudit biocapteur purifié ou des
20 constantes de vitesse de dissociation (k_{off}) et d'association (k_{on}) entre le récepteur et le ligand.

19°) Procédé de préparation selon l'une quelconque des revendications 10 à 18, caractérisé en ce qu'après les étapes (d) ou (d₁), ou les étapes (e) ou (e₁), il comprend une étape supplémentaire d'immobilisation du biocapteur sur un support
25 solide.

20°) Utilisation *in vitro* des biocapteurs selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, pour des applications de détection, de dosage et de localisation de ligands.

21°) Utilisation de biocapteurs selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, pour le criblage de banques protéiques.
30

22°) Utilisation de biocapteurs selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, pour le tri de molécules.

23°) Utilisation des biocapteurs selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 pour le tri de cellules.

24°) Utilisation des biocapteurs selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, pour la fabrication de puces à base de protéines.

5 25°) Utilisation du plasmide pMR1 de séquence SEQ ID NO:10, déposé auprès de la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), sous le numéro I-2386, en date du 29 février 2000, ou de ses dérivés, pour la préparation d'un biocapteur selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

 26°) Utilisation du plasmide pMR1(VL-S93C) de séquence SEQ ID
10 NO:11, déposé auprès de la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), sous le numéro I-2387, en date du 29 février 2000, dérivé du plasmide pMR1 de séquence SEQ ID NO:10 selon la revendication 25, pour la préparation d'un biocapteur selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

 27°) Réactif de détection, de dosage ou de localisation de ligands,
15 caractérisé en ce qu'il inclut au moins un biocapteur selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

 28°) Procédé de détection, de dosage ou de localisation d'un ligand dans un échantillon hétérogène, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact dudit échantillon hétérogène avec au moins un réactif selon la revendication 27.

20 29°) Trousse de détection, de dosage ou de localisation de ligands, caractérisée en ce qu'elle inclut au moins un réactif selon la revendication 27.

 30°) Trousse de criblage d'inhibiteurs de l'interaction ligands-récepteurs, caractérisée en ce qu'elle inclut au moins un réactif selon la revendication 27.

25 31°) Plasmide pMR1, déposé auprès de la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), sous le numéro I-2386, en date du 29 février 2000 .

 32°) Plasmide pMR1(VL-S93C), déposé auprès de la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), sous le numéro I-2387, en date du
30 29 février 2000.

1/13

Résidu	voisinage (Å)	ASA dans Fv libre (%)		ASA dans Fv:HEL (%)			Mutation	ΔΔG kcal/mol	Choix
		X _I	X _B	X _I	X _B	X _E			
VL-Asn28	2.0	7.4	2.3, 59.8	7.8	2.5, 59.9	41.3, 36.2	A	0.8	?
VL-His30	d	0.0	81.4, 0.0	0.0	17.4, 0.0				?
VL-Asn31	2.0	54.8	39.3, 35.6	54.5	39.2, 35.6				±
VL-Tyr32	d	0.0	5.4, 0.0	0.0	5.3, 0.0	2.9, 11.0	A, F	1.7, 2.0	-
VL-Tyr49	d	0.0	0.0, 17.5	0.0	0.0, 16.0	22.0, 0.0	A	0.8	-
VL-Tyr50	d	10.0	17.7, 83.0	53.3	10.2, 14.2	0.0, 27.7	A, F, N	0.5, 0.5, 2.3	-
VL-Thr52	1.4	67.6, 46.2		65.0, 46.2			K	0	±
VL-Thr53	d	50.6, 53.8		12.7, 44.4			A	<0.5	±
VL-Asp56	2.6	100	99.4, 98.8	100	99.6, 98.8				±
VL-Gly68	2.9								
VL-Phe91	d (b)	0.0	0.0, 0.0	0.0	0.0, 0.0	0.0, 0.0			-
VL-Trp92	d	0.0	14.5, 0.0	0.0	14.6, 0.0	68.3, 0.0, 0.0	A	3.7	-
VL-Ser93	d	89.7		56.0			A	0.3	+
VL-Thr94	1, 1.7	54.5, 7.2		54.5, 7.2					+
VH-Phe27	2.9	0.0	0.0, 0.0	0.0	0.0, 0.0		N(E46Q)	1.1	-
VH-Ser28	2.0	45.0		44.8					±
VH-Thr30	1, 1.4	62.6, 51.7		62.5, 51.7			A	0.1	+
VH-Gly31	d								
VH-Tyr32	d	0.0	0.0, 5.3	0.0	0.0, 5.3	18.7, 4.9	A, F	1.1, 0.4	-
VH-Gly33	d								
VH-Trp52	d	65.6	6.4, 59.5	40.0	6.4, 0.0	8.1, 0.0, 8.6	A	0.9	-
VH-Gly53	d								
VH-Asp54	d	24.3	0.0, 83.8	5.7	0.0, 36.7		A	1.9	-
VH-Asn56	2.3	89.7	46.9, 100	89.2	47.0, 100		A, S	0.2, 0.2	±
VH-Asp58	1.7	14.4	79.3, 26.0	14.3	79.2, 26.1		A	0	?
VH-Arg97	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0			-
VH-Arg99	d	23.0	1.7	23.2	1.8	44.8	A	0.1	?
VH-Asp100	d	96.9	54.5, 72.4	6.5	2.8	1.2	A, N	3.1, 3.7	-
VH-Tyr101	d	0.0	0.0, 12.7	0.0	0.0, 0.0	4.2, 7.9	A, F	>4, 2.5	-
VH-Arg102	d	0.8	1.5	0.9	1.5	18.6	K, M	1.6, 3.2	-

Figure 1

2/13

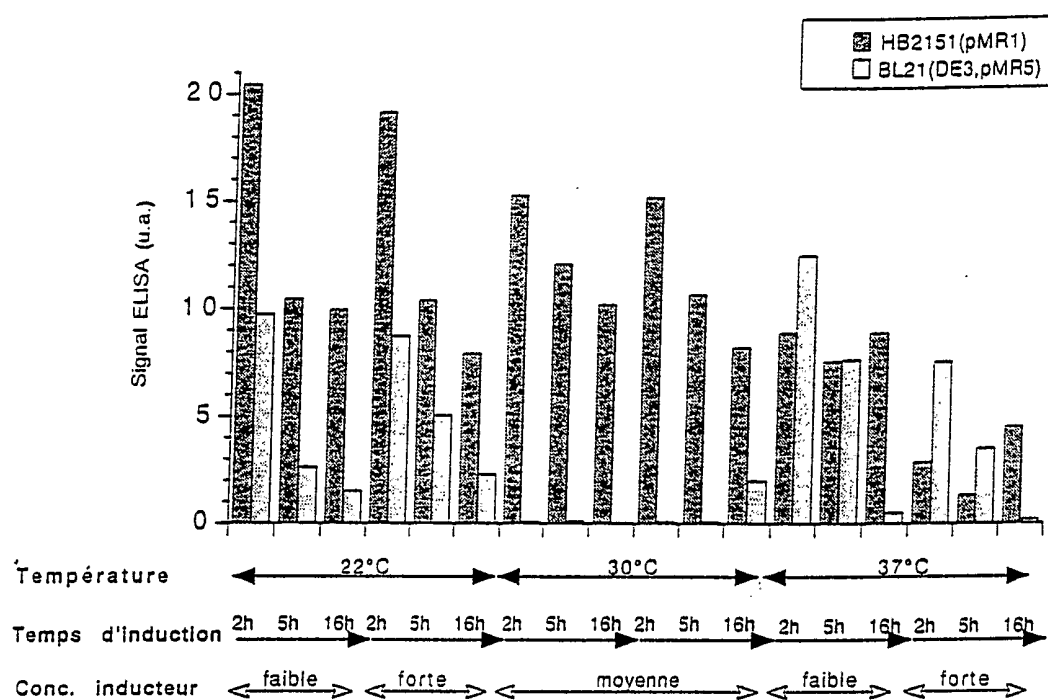


FIGURE 2

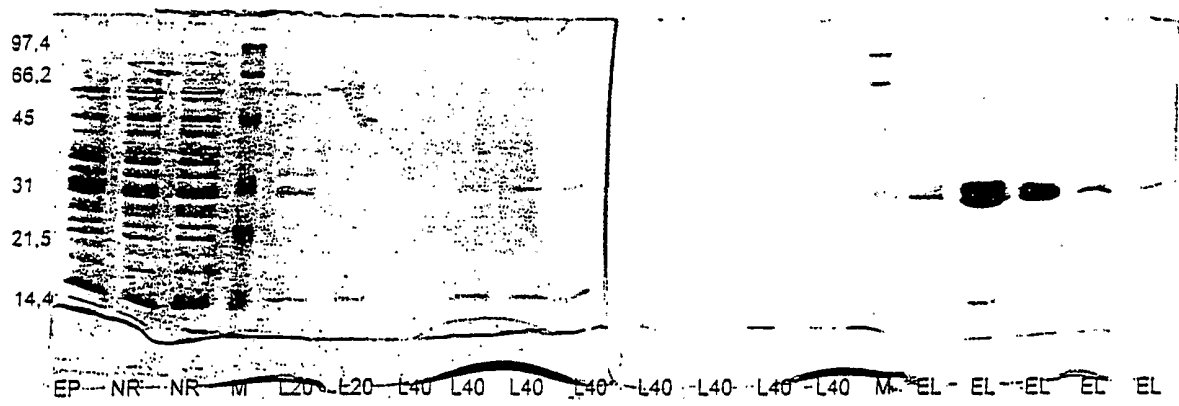


FIGURE 3

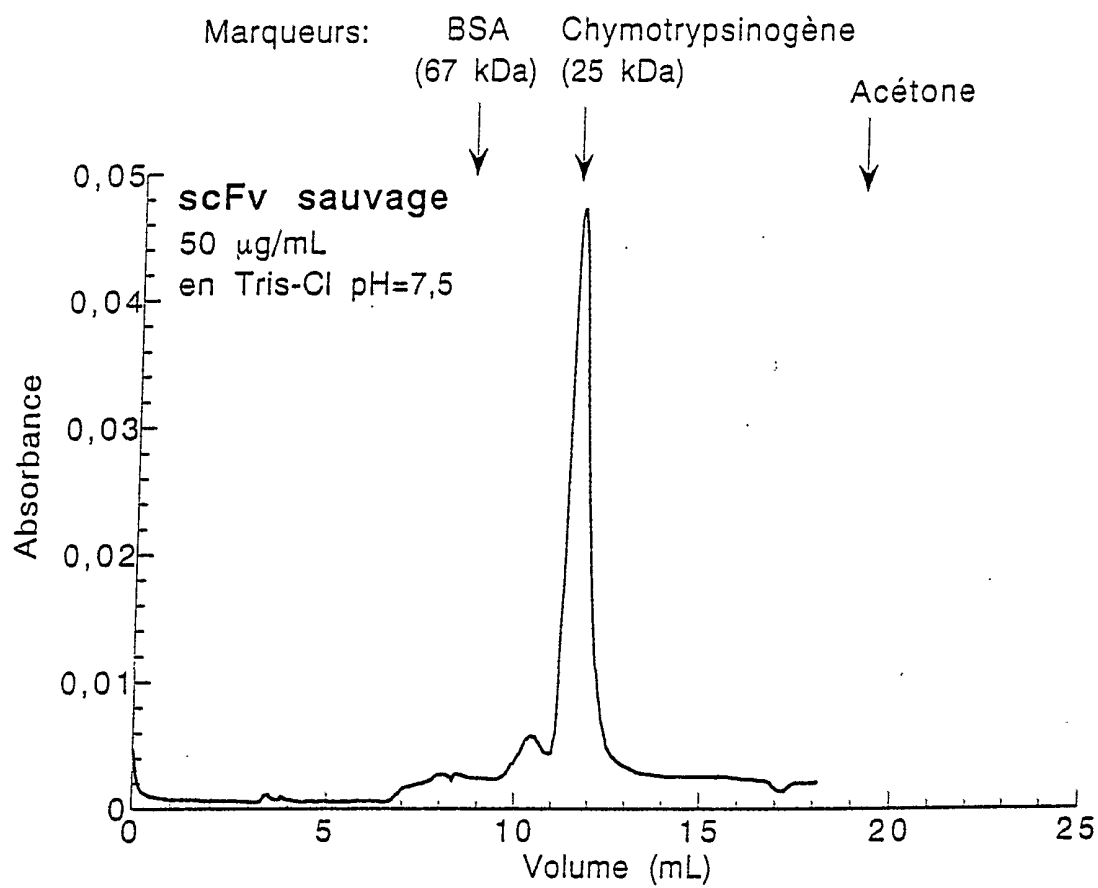


FIGURE 4

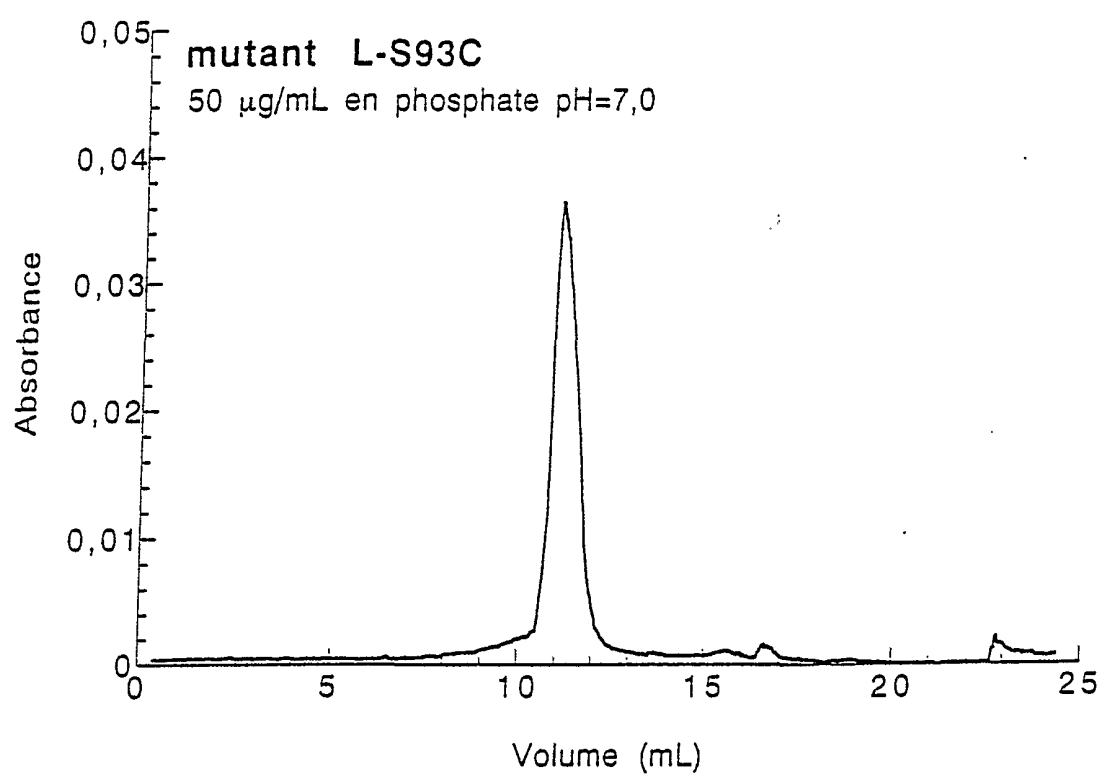
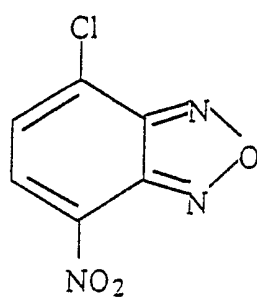


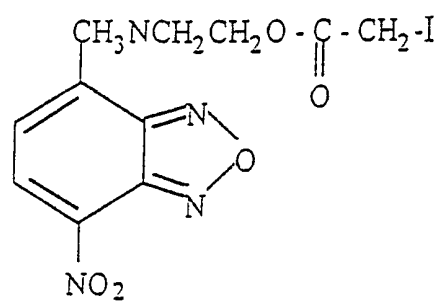
FIGURE 5

6/13

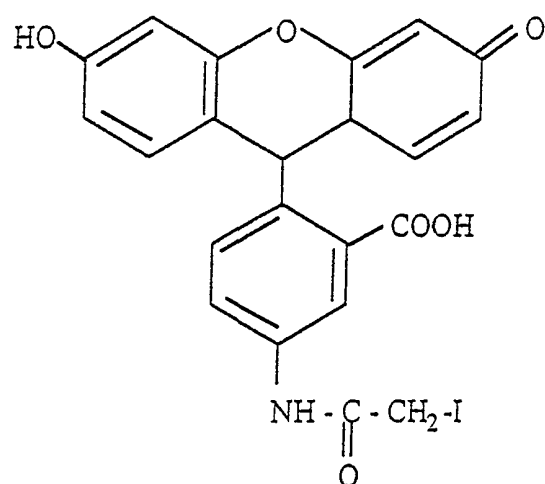
CNBD



IANBD



5-IAF



Acrylodan

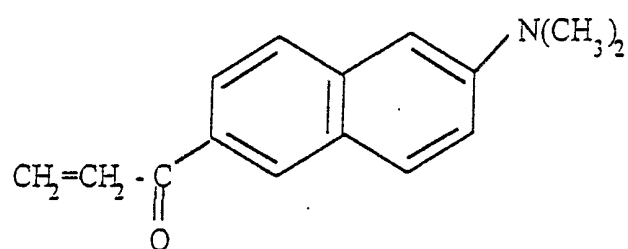


FIGURE 6

7/13

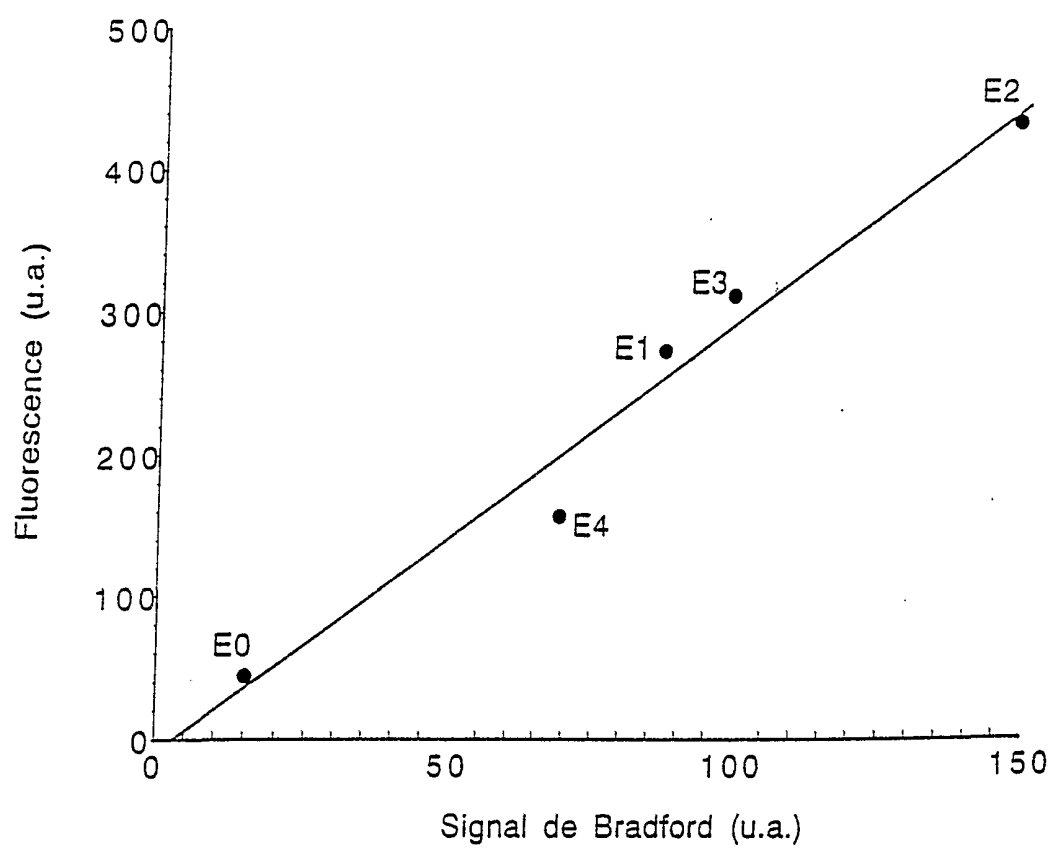


FIGURE 7

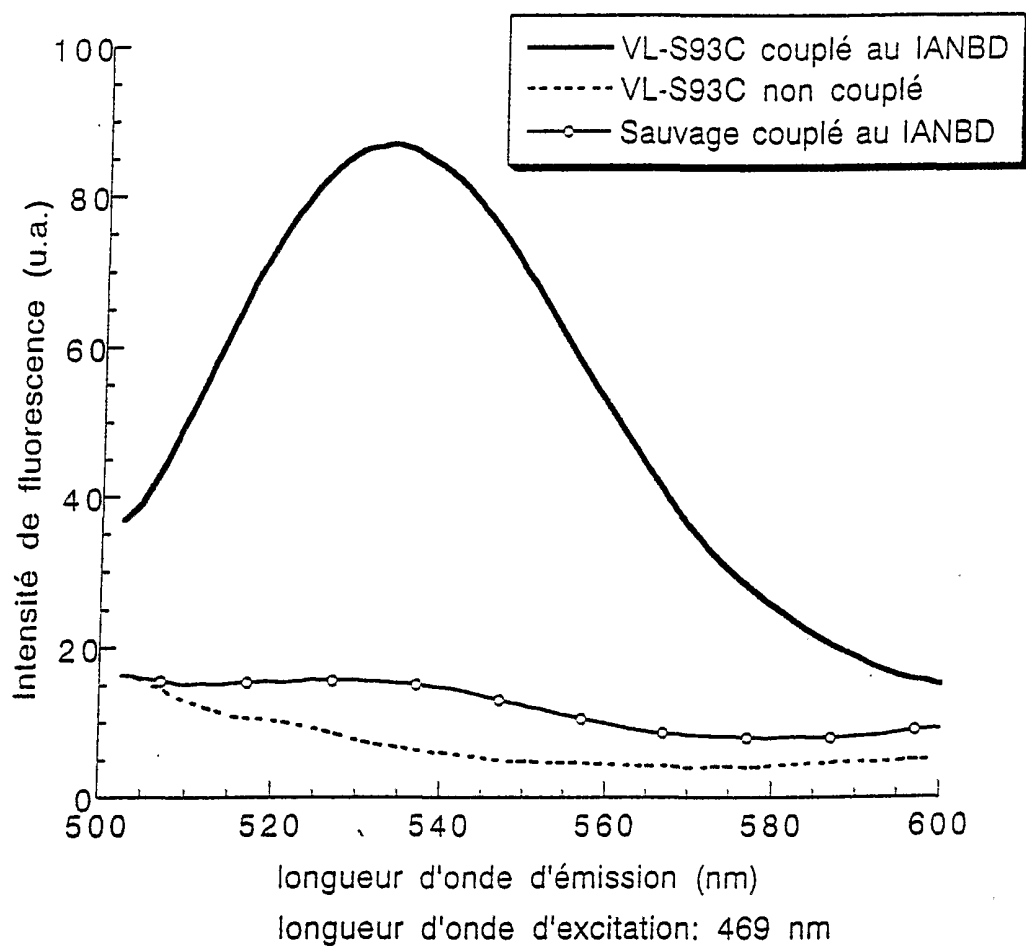


FIGURE 8

β -mercaptoéthanol	Mutant	Rendement de couplage	Rendement matériel
50 mM	VH-T30C	non mesurable	5 %
10 mM	VH-T30C	72 %	19 %
50 mM	VL-S93C	> 168 %	4 %
10 mM	VL-S93C	83 %	9 %
1 mM	VL-S93C	34 %	12 %
1 mM	VL-S93C	34 %	12 %
sans réduction	VL-S93C	8 %	85 %

FIGURE 9

scFv-His6 (VL-S93ANBD)
Spectre d'Absorption

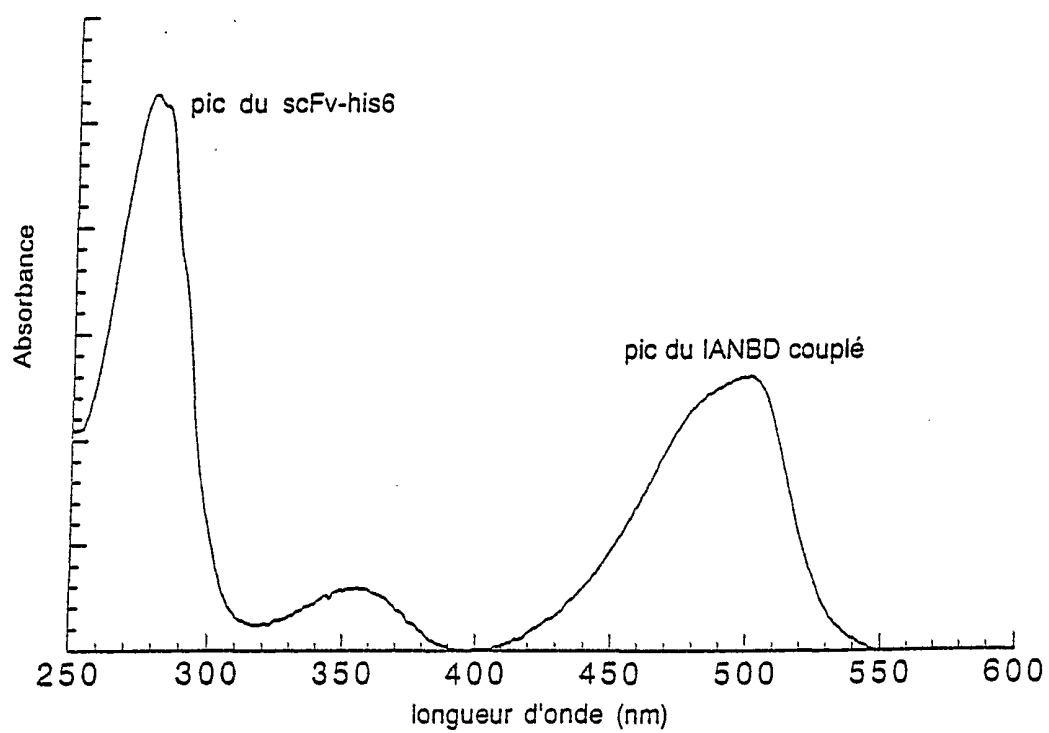


FIGURE 10

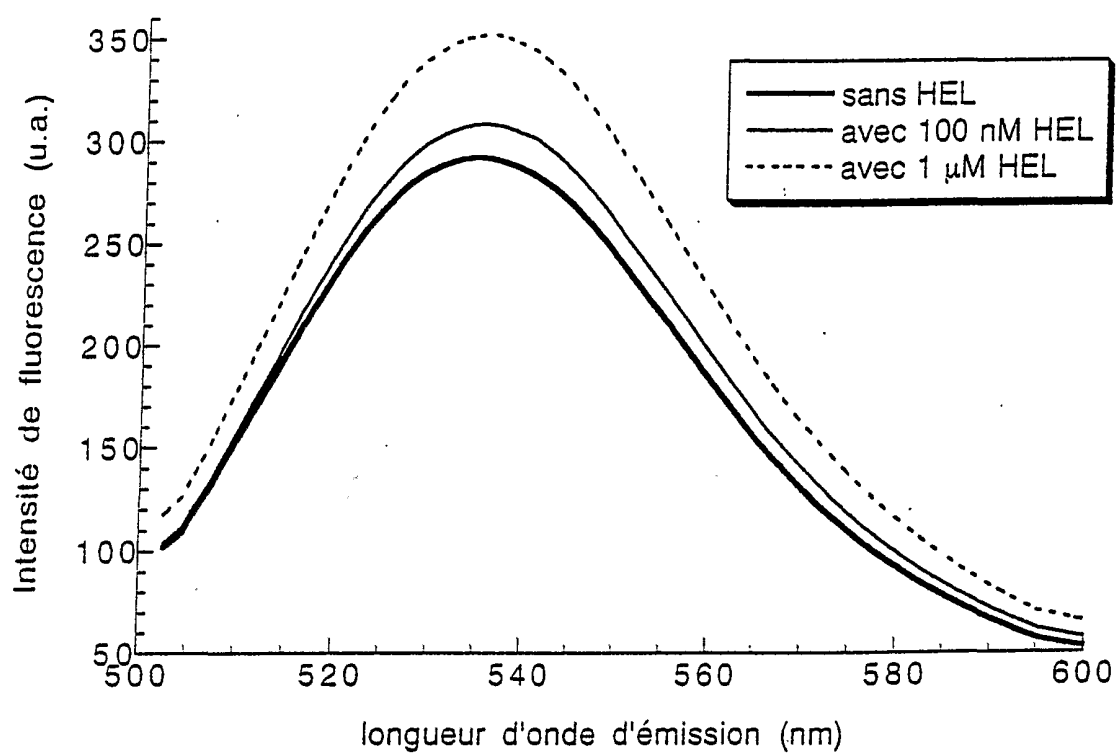


FIGURE 11

12/13

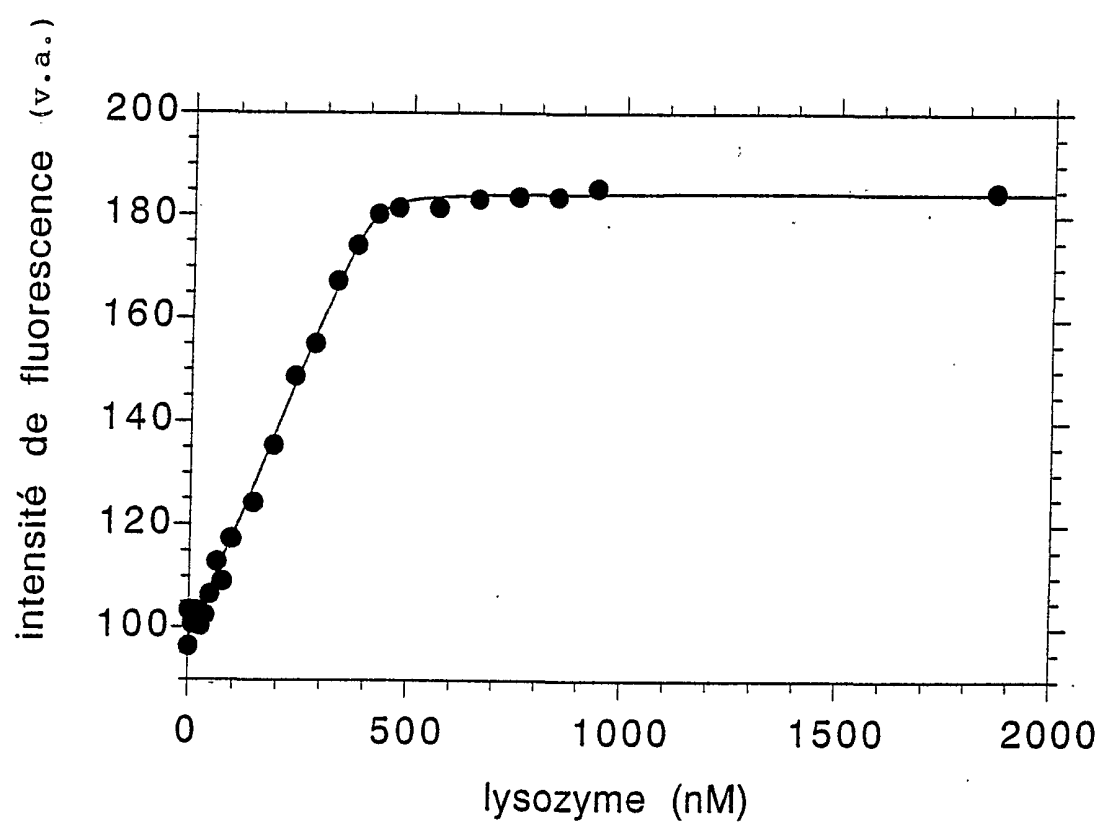


FIGURE 12

13/13

Position	Rendement de couplage (%)	Variation de Fluorescence (%)
wt	< 8%	
VL-His30	116%	+ 7 %
VL-Asn31	103%	+ 16 %
VL-Tyr49	78%	+ 75 %
VL-Tyr50	88%	+ 1 %
VL-Thr52	83%	+ 12 %
VL-Thr53	104%	+ 13 %
VL-Asp56	116%	- 1 %
VL-Trp92	107%	+ 53 %
VL-Ser93	83%	+ 26 %
VL-Thr94	94%	+ 55 %
VH-Ser28	111%	- 2 %
VH-Thr30	72%	- 6 %
VH-Gly31	130%	- 2 %
VH-Tyr32	85%	+ 26 %
VH-Gly53	42%	+ 1 %
VH-Asn56	92%	+ 5 %
VH-Arg99	101%	- 6 %

FIGURE 13

LISTE DE SEQUENCES

<110> INSTITUT PASTEUR
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS
RENARD, Martial
BELKADI, Laurent
ENGLAND, Patrick
BEDOUELLE, Hugues

<120> BIOCAPTEURS, LEUR PROCEDE D'OBTENTION ET LEURS
APPLICATIONS

<130> 226 cas 82

<140>
<141>

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 27
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide

<400> 1
catctgctaa gcatgttgta taataga 27

<210> 2
<211> 29
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide

<400> 2
cgaggagtac accaaaaatg ttgacagta 29

<210> 3
<211> 26
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide

<400> 3
cgtccgagga caactccaaa aatggtt 26

<210> 4
<211> 18
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<400> 4
agaatattgt gttcctga 18

<210> 5
<211> 18
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide

<400> 5
tgctgatgct cagtctgg 18

<210> 6
<211> 18
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide

<400> 6
ggtgatggaa acacagac 18

<210> 7
<211> 15
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<400> 7
cgccgcgctt aatgc 15

<210> 8
<211> 43
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<400> 8
tcgagatcaa gcggccgctg gaacaccatc accatcacca tta 43

<210> 9
<211> 43
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:

oligonucléotide

<400> 9

agcttaatgg tgatggtgat ggtggtccag cggccgcttg atc

43

<210> 10

<211> 3922

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<400> 10

```

acccgacacc atcgaatggc cagatgatta attcctaatt tttgttgaca ctctatcatt 60
gatagagtta ttttaccact cccatcagtg gatagagaaa agtgaaatga atagtctcgac 120
aaaaatctag ataacgaggg caaaaaatga aaaagacagc tatcgcgatt gcagtggcac 180
tggctggttt cgctaccgta gcgcaggccg aagttaaact gcaggagtca ggacctggcc 240
tgggtggcgcc ctacagagc ctgtccatca catgcaccgt ctcaagggtt cattaaccg 300
gctatggtgt aaactgggtt cggcagcctc caggaaaggg tctggagtgg ctgggaatga 360
tttggggtga tggaaacaca gactataatt cagctctcaa atccagactg agcatcagca 420
aggacaactc caagagccaa gttttcttaa aaatgaacag tctgcacact gatgacacag 480
ccaggtacta ctgtgccaga gagagagatt ataggcttga ctactggggc caagggacca 540
cggtcaccgt ctctcaggt ggaggcgggt caggcggagg tggctctggc ggtggcggat 600
cggacatcga gctcaccag tctccagcct ccctttctgc gtctgtggga gaaactgtca 660
ccatcacatg tcgagcaagt gggaatatcc acaattattt agcatgggat cagcagaaac 720
agggaaaatc tcctcagctc ctggtctatt atacaacaac cttagcagat ggtgtgccat 780
caaggttcag tggcagtggg tcaggaacac aatattctct caagatcaac agcctgcaac 840
ctgaagattt tgggagtatt tactgtcaac atttttggag tactcctcgg acgttcgggtg 900
gagggaccaâ gctcgagatc aagcggccgc tggaaacacca tcaccatcac cattaagctt 960
gacctgtgaa gtgaaaaatg gcgcacattg tgcgacattt tttttgtctg ccgtttaccg 1020
ctactgcgtc acggatctcc acgcgccttg tagcggcgca ttaagcggcg cgggtgtggt 1080
ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcctta gcgcccgtc ctttcgcttt 1140
cttcccttcc tttctcgcca cgttcgcccgt ctttccccgt caagctctaa atcgggggct 1200
ccctttaggg ttccgattta gtgctttacg gcacctcgac cccaaaaaac ttgattaggg 1260
tgatggttca cgtagtgggc catcgccctg atagacggtt tttcgccctt tgacgttgga 1320
gtccacgttc ttaaatagtg gactcttggt ccaaactgga acaacactca accctatctc 1380
ggtctattct tttgatttat aagggatttt gccgatttgc gcctattggt taaaaaatga 1440
gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgctta caatttcagg 1500
tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac cccatattgt ttatttttct aaatacattc 1560
aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag 1620
gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg 1680
ccttctgttt tttgtcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt 1740
gggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt 1800
tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcggtt 1860
attatcccggt attgacgccc ggcaagagca actcgggtgc cgcatacact attctcagaa 1920
tgacttgggt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag 1980
agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac 2040
aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac 2100
tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac 2160
cacgatgcct gtagcaatgg caacaacggt gcgcaaaact ttaactggcg aactacttac 2220
tctagcttcc cggcaacaat tgatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact 2280
tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg 2340
tggctctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt 2400
tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat 2460
aggtgcctca ctgattaaagc attggttaga attaatgatg tctcgtttag ataaaagtaa 2520
agtgattaac agcgcattag agctgcttaa tgaggtcgga atcgaaggtt taacaaccgg 2580
taaaactgcc cagaagctag gtgtagagca gcctacattg tattggcatg taaaaataa 2640
gcgggctttg ctcgacgcct tagccattga gatgttagat aggcaccata ctcacttttg 2700
cccttttagaa ggggaaagct ggcaagattt tttacgtaat aacgctaaaa gttttagatg 2760
tgctttacta agtcacgcg atggagcaaa agtacattta ggtacacggc ctacagaaaa 2820
acagtatgaa actctcgaââ atcaattagc ctttttatgc caacaagggt tttcactaga 2880

```

```

gaatgcatta tatgcactca gcgcagtgagg gcatttttact ttaggttgcg tatttgaaga 2940
tcaagagcat caagtcgcta aagaagaaag ggaaacacct actactgata gtatgccgcc 3000
attattacga caagctatcg aattatttga tcaccaaggt gcagagccag ccttcttatt 3060
cggccttgaa ttgatcatat gcggattaga aaaacaactt aaatgtgaaa gtgggtctta 3120
aaagcagcat aacctttttc cgtgatggta acttcactag tttaaaagga tctaggtgaa 3180
gatccttttt gataatctca tgacccaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc 3240
gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc tgcgcgtaat 3300
ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcgggtg gtttggttgc cggatcaaga 3360
gctaccaact ctttttccga aggttaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt 3420
ccttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgctacata 3480
cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac 3540
cgggttgga tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggt gaacgggggg 3600
ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg 3660
tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaa gcggacaggt atccggtaag 3720
cggcaggggtc ggaacaggag agcgacagag ggagcttcca gggggaaaacg cctgggtatg 3780
ttatagtcct tcgggttttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc 3840
aggggggagg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tccctggcctt 3900
ttgctggcct tttgctcaca tg 3922

```

<210> 11

<211> 3922

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<400> 11

```

acccgacacc atcgaatggc cagatgatta attcctaatt tttgttgaca ctctatcatt 60
gatagagtta ttttaccact ccctatcagt gatagagaaa agtgaaatga atagtctgac 120
aaaaatctag ataacgaggg caaaaaatga aaaagacagc tatcgcgatt gcagtggcac 180
tggtctggtt cgctaccgta gcgcaggcgg aagttaaact gcaggagtca ggacctggcc 240
tggtggcgcc ctacagagac ctgtccatca catgcaccgt ctcagggttc tattaaccg 300
gctatggtgt aaactgggtt cgccagcctc caggaaaagg tctggagtgg ctgggaatga 360
tttgggtgga tggaaacaca gactataatt cagctctcaa atccagactg agcatcagca 420
aggacaactc caagagccaa gttttcttaa aaatgaacag tctgcacact gatgacacag 480
ccaggctacta ctgtgccaga gagagagatt ataggcttga ctactggggc caagggacca 540
cggtcaccgt ctctcagggt ggaggcgggt caggcggagg tggctctggc ggtggcggat 600
cggacatcga gctcaccag tctccagcct ccctttctgc gtctgtggga gaaactgtca 660
ccatcacatg tgcagcaagt gggaatattc acaattattt agcatggtat cagcagaaac 720
agggaaaatc tcctcagctc ctggtctatt atacaacaac cttagcagat ggtgtgccat 780
caagggttcag tggcagtggga tcaggaacac aatattctct caagatcaac agcctgcaac 840
ctgaagattt tgggagttat tactgtcaac atttttgggt tactcctcgg acgttcggtg 900
gagggaacca gctcgagatc aagcggccgc tggaaacacca tcaccatcac cattaagctt 960
gacctgtgaa gtgaaaaatg gcgcacattg tgcgacattt tttttgtctg ccgtttaccg 1020
ctactgcgtc acggatctcc acgcgccttg tagcgccgca ttaagcggcg cgggtgtggt 1080
ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcccta gcgccgctc ctttcgcttt 1140
cttcccttcc tttctcgcca cgttcgcccgt ctttccccgt caagctctaa atcgggggct 1200
ccctttagggt ttccgattta gtgctttacg gcacctcgac cccaaaaaac ttgattagggt 1260
tgatgggttca cgtagtgggc catcgccctg atagacgggt tttcgccctt tgacgttggg 1320
gtccacgttc tttaatagt gactcttggt ccaaaactgga acaacactca acctatctc 1380
ggtctattct tttgatttat aagggatttt gccgatttcg gcctattggt taaaaaatga 1440
gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgctta caatttcagg 1500
tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacatct 1560
aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag 1620
gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg 1680
ccttctctgt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt 1740
gggtccacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt 1800
tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt 1860
attatccgtt attgacgccc ggcaagagca actcgggtcg cgcatacact attctcagaa 1920
tgacttgggt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag 1980
agaattatgc agtgctgcca taacctagag tgataacact gcggccaact tacttctgac 2040

```

```

aacgatcggga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac 2100
tcgccttgat cggtgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac 2160
cacgatgcct gtagcaatgg caacaacggt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac 2220
tctagcttcc cggcaacaat tgatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact 2280
tctgcgtcgc gcccttccgg ctggctgggt tatfgctgat aaatctggag ccggtgagcg 2340
tggtctctgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggg aagccctccc gtatcgtagt 2400
tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat 2460
aggtgcctca ctgattaagc attggtagga attaattgat tctcgtttag ataaaagtaa 2520
agtgattaac agcgcattag agctgcttaa tgaggtcgga atcgaagggt taacaacccg 2580
taaactcgcc cagaagctag gtgtagagca gcctacattg tattggcatg taaaaataa 2640
gcgggctttg ctgcacgcct tagccattga gatgttagat aggcaccata ctacttttg 2700
ccctttagaa ggggaaagct ggcaagattt tttacgtaat aacgctaaaa gtttttagatg 2760
tgctttacta agtcatcgcg atggagcaaa agtacattta ggtacacggc ctacagaaaa 2820
acagtatgaa actctcgaaa atcaattagc ctttttatgc caacaagggt tttcactaga 2880
gaatgcatta tatgcactca gcgcagtggg gcattttact ttagggttgcg tattggaaga 2940
tcaagagcat caagtcgcta aagaagaaag ggaaacacct actactgata gtatgccgcc 3000
attattacga caagctatcg aattatttga tcaccaaggt gcagagccag ccttcttatt 3060
cggccttgaa ttgatcatat gcggattaga aaaacaactt aaatgtgaaa gtgggtctta 3120
aaagcagcat aacctttttc cgtgatggta acttcactag tttaaaagga tctaggtgaa 3180
gatccttttt gataatctca tgaccaaact cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc 3240
gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc tgcgcgtaat 3300
ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga 3360
gctaccaact cttttttccga aggttaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt 3420
ccttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata 3480
cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac 3540
cgggttgga tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggct gaacgggggg 3600
ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg 3660
tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaaag gcggacagg atccggtaag 3720
cggcaggggtc ggaacaggag agcgacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct 3780
ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc 3840
agggggggcgg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggg tcctggcctt 3900
ttgctggcct tttgctcaca tg 3920

```

<210> 12

<211> 28

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide

<400> 12

gaggagtacg caaaaatggt gacagtaa

28

<210> 13

<211> 28

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide

<400> 13

catctgctaa ggtacatgta taatagac

28

<210> 14
<211> 28
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide

<400> 14
cagtttacac cacacccggt taatgaga

28

<210> 15
<211> 28
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide

<400> 15
acaccatagc cgcataatga gaaccctg

28

<210> 16
<211> 31
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide

<400> 16
cttgatggca caccgcatgc taagggtgtt g

31

<210> 17
<211> 31
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide

<400> 17
catgctaaat aacagtggat attcccactt g

31

<210> 18
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide

<400> 18
acaccatagc cagttaagca gaaccctgag acg 33

<210> 19
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide

<400> 19
ttatagtctg tgcacccatc accccaaatc at 32

<210> 20
<211> 31
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide

<400> 20
atggtacgat ttattaaaca ttataagggt g 31

<210> 21
<211> 34
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide

<400> 21
agacgattcc aacaacatat aactggtcc tcga 34

<210> 22
<211> 35
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide

<400> 22
gattccaaca acatatctgg tcctcgactc ctcta 35

<210> 23
<211> 36
<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide

<400> 23

tgacacgggc tctcacacta atatccgaac tgatga

36

<210> 24

<211> 28

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide

<400> 24

caagagtaat tggacaatac cacatttg

28

<210> 25

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide

<400> 25

acccttacta aacacaacta cctttgtgtc tg

32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 01/00603

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

CIB 7 G01N33/53 G01N33/542

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

CIB 7 G01N

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

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

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 34212 A (UNIV DUKE) 8 July 1999 (08.07.1999) Page 2, line 16 - page 3, line 14 Page 6, line 11 - line 17 Page 8, line 16 - line 18 Page 9, line 19 - page 10, line 13 Page 12, line 15 - page 13, line 11 Page 18 - page 22; examples 2, 3; table 1 Page 28 - page 30; claims 1-4, 13-18	1, 5-9, 20, 24, 27, 28
Y		10,15,19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 July 2001 (17.07.01)

Date of mailing of the international search report

30 July 2001 (30.07.01)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 01/00603

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SLOAN DAVID J ET AL: "Structure-based engineering of environmentally sensitive fluorophores for monitoring protein-protein interactions." PROTEIN ENGINEERING, vol. 11, no. 9, 1998, pages 819-823, XP002161420 ISSN: 0269-2139 Cited in the application the whole document	1,10,12
Y	---	10,19
X	NARAZAKI RYUICHI ET AL: "Probing the cysteine 34 residue in human serum albumin using fluorescence techniques." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1338, no. 2, 1997, pages 275-281, XP000987357 ISSN: 0006-3002 abstract	1,2,5
X	---	
A	US 5 756 351 A (ISACOFF EHUD Y ET AL) 26 mai 1998 (1998-05-26) column 1, line 61 - column 2, line 15 column 4, line 20 - line 45 column 9 - column 10; claims 1-6	1,2,20, 22,27 21,23, 28-30
X	---	
A	WO 98 37226 A (PACKARD BEVERLY S ;KOMORIYA AKIRA (US); ONCOIMMUNIN INC (US)) 27 août 1998 (1998-08-27) page 76 -page 77; claims 1 page 47, line 1 - line 32 page 49, line 26 - page 50, line 23 page 79; claims 15-21	1,20,22, 29,30 21
A	---	
A	PACKARD B ET AL: "SITE-DIRECTED LABELING OF A MONOCLONAL ANTIBODY: TARGETING TO A DISULFIDE BOND" BIOCHEMISTRY,US,AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, PA, vol. 25, no. 12, 1986, pages 3548-3552, XP002036908 ISSN: 0006-2960 abstract page 3548, column 2, line 5 - line 16 ---	1-4,6,23

	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 01/00603

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SERRANO L ET AL: "THE FOLDING OF AN ENZYME II. SUBSTRUCTURE OF BARNASE AND THE CONTRIBUTION OF DIFFERENT INTERACTIONS TO PROTEIN STABILITY" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 224, no. 3, 1992, pages 783-804, XP000989519 ISSN: 0022-2836 abstract	10,11
X	--- BANDTLOW CHRISTINE ET AL: "The Escherichia coli-derived Fab fragment of the IgM/kappa antibody IN-1 recognizes and neutralizes myelin-associated inhibitors of neurite growth." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 241, no. 2, 1996, pages 468-475, XP000991434 ISSN: 0014-2956 abstract	25,31
A	page 469, left hand column, line 3 - line 60 page 471; figure 1	26,32
X	-& DATABASE EMBL 'en ligne! ID:PASK85 ; Ac: Y08011, 17 september 1996 (1996-09-17) BANDTLOW, C. ETAL.: "Artificial sequence expression vector pASK85 encoding V regions of antibody" XP002172187 the whole document --- -/--	25,31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 01/00603

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WU JIANHUA ET AL: "Cysteine 148 in the lactose permease of Escherichia coli is a component of a substrate binding site: 2. Site-directed fluorescence studies." BIOCHEMISTRY, vol. 33, no. 40, 1994, pages 12166-12171, XP002172185 ISSN: 0006-2960	13,14, 17,18
Y	abstract page 12167, left hand column, line 25 - line 50 page 12168, right-hand column, line 20 right-hand column, line 14; figure 2 page 12169; figures 4,5 -& JUNG HEINRICH ET AL: "Cysteine 148 in the lactose permease of Escherichia coli is a component of a substrate binding site: 1. Site-directed mutagenesis studies." BIOCHEMISTRY, vol. 33, no. 40, 1994, pages 12160-12165, XP002172186 abstract page 12164; table 2	15
A	----- POLLACK S J ET AL: "INTRODUCTION OF NUCLEOPHILES AND SPECTROSCOPIC PROBES INTO ANTIBODY COMBINING SITES" SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 242, no. 4881, 1988, pages 1038-1040, XP000996977 ISSN: 0036-8075 cited in the application abstract figure 2 -----	13,16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 01/00603

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See next page

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 01/00603

The International Searching Authority found several (groups of) inventions in the international application, namely:

1. Claims: 1-9, 18-32 (partly), 10 –12 (completely)

Biosensors and method for preparing same, comprising a protein-type receptor fragment, having a Cys residue capable of being substituted into a Cys residue in the ligand-binding site, said fragment having been selected by computing its accessibility to the solvent.

2. Claims: 1-9, 19-30 (partly), 13-18 (completely)

Biosensors and method for preparing same, comprising a protein-type receptor fragment, having a Cys residue or a residue capable of being substituted into a Cys residue in the ligand-binding site, said fragment having been selected by variations of the parameters of interaction with the ligand after mutagenesis.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 01/00603

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9934212 A	08-07-1999	AU 2210199 A EP 1044374 A	19-07-1999 18-10-2000
US 5756351 A	26-05-1998	NONE	
WO 9837226 A	27-08-1998	US 6037137 A AU 6656798 A EP 0988394 A	14-03-2000 09-09-1998 29-03-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D internationale No
PCT/FR 01/00603

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 G01N33/53 G01N33/542

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

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 G01N

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

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
WPI Data, EPO-Internal, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 99 34212 A (UNIV DUKE) 8 juillet 1999 (1999-07-08) page 2, ligne 16 -page 3, ligne 14 page 6, ligne 11 - ligne 17 page 8, ligne 16 - ligne 18 page 9, ligne 19 -page 10, ligne 13 page 12, ligne 15 -page 13, ligne 11 page 18 -page 22; exemples 2,3; tableau 1 page 28 -page 30; revendications 1-4,13-18	1,5-9, 20,24, 27,28
Y	--- -/--	10,15,19

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

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

17 juillet 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30. 07. 2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Tuynman, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De internationale No
PCT/FR 01/00603

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	SLOAN DAVID J ET AL: "Structure-based engineering of environmentally sensitive fluorophores for monitoring protein-protein interactions." PROTEIN ENGINEERING, vol. 11, no. 9, 1998, pages 819-823, XP002161420 ISSN: 0269-2139 cité dans la demande le document en entier	1,10,12
Y	---	10,19
X	NARAZAKI RYUICHI ET AL: "Probing the cysteine 34 residue in human serum albumin using fluorescence techniques." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1338, no. 2, 1997, pages 275-281, XP000987357 ISSN: 0006-3002 abrégé	1,2,5
X	---	
X	US 5 756 351 A (ISACOFF EHUD Y ET AL) 26 mai 1998 (1998-05-26)	1,2,20, 22,27 21,23, 28-30
A	colonne 1, ligne 61 -colonne 2, ligne 15 colonne 4, ligne 20 - ligne 45 colonne 9 -colonne 10; revendications 1-6	
X	---	
X	WO 98 37226 A (PACKARD BEVERLY S ;KOMORIYA AKIRA (US); ONCOIMMUNIN INC (US)) 27 août 1998 (1998-08-27)	1,20,22, 29,30
A	page 76 -page 77; revendication 1 page 47, ligne 1 - ligne 32 page 49, ligne 26 -page 50, ligne 23 page 79; revendications 15-21	21
A	---	
A	PACKARD B ET AL: "SITE-DIRECTED LABELING OF A MONOCLONAL ANTIBODY: TARGETING TO A DISULFIDE BOND" BIOCHEMISTRY,US,AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, PA, vol. 25, no. 12, 1986, pages 3548-3552, XP002036908 ISSN: 0006-2960 abrégé page 3548, colonne 2, ligne 5 - ligne 16	1-4,6,23

	-/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den internationale No
PCT/FR 01/00603

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	SERRANO L ET AL: "THE FOLDING OF AN ENZYME II. SUBSTRUCTURE OF BARNASE AND THE CONTRIBUTION OF DIFFERENT INTERACTIONS TO PROTEIN STABILITY" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 224, no. 3, 1992, pages 783-804, XP000989519 ISSN: 0022-2836 abrégé	10,11
X	--- BANDTLOW CHRISTINE ET AL: "The Escherichia coli-derived Fab fragment of the IgM/kappa antibody IN-1 recognizes and neutralizes myelin-associated inhibitors of neurite growth." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 241, no. 2, 1996, pages 468-475, XP000991434 ISSN: 0014-2956 abrégé	25,31
A	page 469, colonne de gauche, ligne 3 - ligne 60 page 471; figure 1	26,32
X	-& DATABASE EMBL 'en ligne! ID:PASK85 ; Ac: Y08011, 17 septembre 1996 (1996-09-17) BANDTLOW, C. ETAL.: "Artificial sequence expression vector pASK85 encoding V regions of antibody" XP002172187 le document en entier --- -/--	25,31

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Di Internationale No
PCT/FR 01/00603

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WU JIANHUA ET AL: "Cysteine 148 in the lactose permease of Escherichia coli is a component of a substrate binding site: 2. Site-directed fluorescence studies." BIOCHEMISTRY, vol. 33, no. 40, 1994, pages 12166-12171, XP002172185 ISSN: 0006-2960	13,14, 17,18
Y	abrégé page 12167, colonne de gauche, ligne 25 - ligne 50 page 12168, colonne de gauche, ligne 20 -colonne de droite, ligne 14; figure 2 page 12169; figures 4,5 -& JUNG HEINRICH ET AL: "Cysteine 148 in the lactose permease of Escherichia coli is a component of a substrate binding site: 1. Site-directed mutagenesis studies." BIOCHEMISTRY, vol. 33, no. 40, 1994, pages 12160-12165, XP002172186 abrégé page 12164; tableau 2	15
A	POLLACK S J ET AL: "INTRODUCTION OF NUCLEOPHILES AND SPECTROSCOPIC PROBES INTO ANTIBODY COMBINING SITES" SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 242, no. 4881, 1988, pages 1038-1040, XP000996977 ISSN: 0036-8075 cité dans la demande abrégé figure 2	13,16

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR 01/00603

Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:

2. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:

3. ☐ Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. ☒ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☒ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1-9,18-32 (partiellement), 10-12 (entièrement)

Biocapteurs et le procédé de leur préparation, comprenant un fragment de récepteur de nature protéique, ayant un résidu Cys ou un résidu substituable en résidu Cys dans le site de liaison de ligand, ledit fragment ayant été sélectionné par calcul de son accessibilité au solvant.

2. revendications: 1-9,19-30 (partiellement), 13-18 (entièrement)

Biocapteurs et le procédé de leur préparation, comprenant un fragment de récepteur de nature protéique, ayant un résidu Cys ou un résidu substituable en résidu Cys dans le site de liaison de ligand, ledit fragment ayant été sélectionné par variations des paramètres d'interaction avec le ligand après mutagénèse.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Internationale No

PCT/FR 01/00603

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9934212 A	08-07-1999	AU 2210199 A EP 1044374 A	19-07-1999 18-10-2000
US 5756351 A	26-05-1998	AUCUN	
WO 9837226 A	27-08-1998	US 6037137 A AU 6656798 A EP 0988394 A	14-03-2000 09-09-1998 29-03-2000