

(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
21 juillet 2011 (21.07.2011)

(10) Numéro de publication internationale
WO 2011/086293 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C07K 14/195 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2010/052893

(22) Date de dépôt international :
22 décembre 2010 (22.12.2010)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0959431 22 décembre 2009 (22.12.2009) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE - INRA [FR/FR]; 147 Rue de
l'Université, F-75341 Paris Cedex 07 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
BERTEAU, Olivier [FR/FR]; 12 Parc de Diane, F-78350
Jouy En Josas (FR). BENJIDIA, Alhosna [FR/FR]; 20
Avenue Alsace Lorraine, F-94450 Limeil-Brevannes
(FR). BONNAFFE, David [FR/FR]; 122 Avenue de la
République, F-75011 Paris (FR). LE NARVOR,
Christine [FR/FR]; 19A Rue Gabriel Péri, F-92650
Breux-Jouy (FR). MALLERON, Annie [FR/FR]; 2 Allée
Renoir, F-91460 Marcoussis (FR).

(74) Mandataires : CATHERINE, Alain et al.; Cabinet Harle
et Phelip, 7 rue de Madrid, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues (règle 48.2.h))

— avec la partie de la description réservée au listage des
séquences (règle 5.2.a))

(54) Title : SULFATASE SELECTIVELY MODIFYING GLYCOSAMINOGLYCANS

(54) Titre : SULFATASE MODIFIANT SELECTIVEMENT LES GLYCOSAMINOGLYCANS

(57) Abstract : The invention relates to a purified 4-O-sulfatase including a polypeptide that is at least 50% identical to amino acids, the polypeptide having the sequence SEQ ID NO: 1 such as defined in the description.

(57) Abrégé : L'invention se rapporte à une 4-O-sulfatase purifiée, comprenant un polypeptide ayant au moins 50% d'identité en acides aminés avec le polypeptide de séquence SEQ ID N°1 tel que défini dans la description.



WO 2011/086293 A1

SULFATASE MODIFIANT SELECTIVEMENT LES GLYCOSAMINOGLYCANES

DOMAINE DE L'INVENTION

L'invention se rapporte aux domaines de la synthèse des glycosaminoglycanes et de la
5 détection de leur présence dans un échantillon.

ETAT DE LA TECHNIQUE

Les glycosaminoglycanes (GAGs) sont des polysaccharides essentiels au bon
fonctionnement du corps humain.

10 En effet, les GAGs sont impliqués dans de très nombreuses fonctions biologiques, depuis la coagulation jusqu'aux processus de communication cellulaire. Ils jouent également un rôle majeur dans de nombreuses pathologies telles que le cancer, les maladies dégénératives, l'athérosclérose, etc. Il a ainsi déjà été identifié plus d'une centaine de protéines capables d'interagir avec les GAGs.

15 Ces polysaccharides revêtent par conséquent un intérêt majeur dans les domaines pharmaceutique, cosmétique mais également alimentaire.

Les GAGs forment une famille de polysaccharides hétérogènes, divisée en cinq sous-familles : les chondroïtines, le dermatane, l'acide hyaluronique, le kératane et la famille des héparanes sulfates/héparine. Ces sous-familles de GAGs ont des localisations et des rôles
20 distincts dans le corps humain. Ainsi les chondroïtines sont localisées principalement dans les os et les cartilages, où elles ont un rôle mécanique, tandis que les héparines sont retrouvées à l'intérieur des artères, où elles exercent une fonction d'agent anti-coagulant.

Les GAGs sont constitués d'une unité disaccharidique répétitive basée (i) soit sur un motif de *N*-acétyl-hexosamine et d'hexose, (ii) soit sur un motif de *N*-acétyl-hexosamine et
25 d'acide uronique. Les différents cycles osidiques sont reliés entres eux uniquement par des liaisons 1-4 ou 1-3.

En dépit de cette structure relativement simple, les GAGs possèdent une hétérogénéité structurelle et fonctionnelle considérable. En effet, le squelette des GAGs est hautement fonctionnalisé avec des groupements acétyle et un motif complexe de sulfatation, avec des
30 groupes sulfate localisés sur une ou plusieurs des positions 2, 3, 4 et 6 de chaque unité d'oside, ainsi que sur les fonctions amines de ces molécules.

La majorité des fonctions biologiques exercées par les divers GAGs sont liées à leur type de sulfatation (taux de sulfatation du polysaccharide, position(s) des groupements sulfate sur les cycles osidiques). On sait que les groupements sulfate confèrent aux GAGs une forte
35 charge négative. Les groupements sulfate ont également un rôle dans la conformation des GAGs et sur la capacité des GAGs à interagir avec de nombreux facteurs biologiques, tels que par exemple les enzymes et les facteurs de croissance.

Bien que les GAGs soient les polysaccharides les plus utilisés dans les domaines pharmaceutique et cosmétique, et que leur utilisation dans le domaine des additifs alimentaires
40 soit également croissante, seuls quelques GAGs sont aujourd'hui retrouvés dans le commerce.

Les GAGs qui sont commercialisés sont principalement, sinon exclusivement, des héparines, de l'acide hyaluronique et des chondroïtines. Ces polysaccharides trouvent un nombre croissant d'applications et représentent un marché mondial de plusieurs milliards d'euros. Toutefois, leur développement industriel est encore limité par les nombreuses difficultés liées à leur synthèse et à leur caractérisation physico-chimique.

Du fait de leur nature osidique, les GAGs sont des molécules difficiles à synthétiser. Les oses possèdent en effet de nombreux groupes hydroxyle de réactivités similaires ce qui rend difficile, dans les procédés de synthèse des GAGs, les étapes d'ajout ou d'élimination de groupements sulfate et oblige à recourir à des stratégies complexes de couplage et d'élimination de groupements protecteurs variés et de structure complexe. En outre, ces stratégies de synthèse de GAGs mettant en œuvre des étapes de couplage et d'élimination de groupements protecteurs ont bien entendu une incidence significative sur la durée, le rendement et les coûts des procédés de synthèse.

L'obtention de GAGs avec de bons rendements et de manière sélective peut être réalisée par des procédés de synthèse chimioenzymatique, dans lesquels sont combinées des étapes de synthèse chimique et des étapes de modification enzymatique. Toutefois, il existe actuellement peu d'outils enzymatiques disponibles, et notamment peu d'enzymes susceptibles d'être utilisées pour contrôler des étapes de sulfatation sélective ou de désulfatation sélective des GAGs.

Egalement, la caractérisation physico-chimique des GAGs inclut la détermination de leur type de sulfatation. Le type de sulfatation d'un GAG particulier peut être déterminé par des essais de désulfatation. Des enzymes catalysant la désulfatation sélective des GAGs à une position spécifique de l'unité osidique, parmi les positions 2, 3, 4 et 6 peuvent être utilisées en combinaison avec la détection/quantification des oses désulfatés ou des sulfates libérés après hydrolyse.

Dans l'état de la technique, on connaît les sulfatases, qui constituent une famille d'enzymes hautement conservée du point de vue structurel et fonctionnel, notamment dans leur partie N-terminale. Cette famille d'enzymes est décrite notamment comme la famille PFAM : PF00884 (voir par exemple à l'adresse <http://pfam.sanger.ac.uk/family?acc=PF00884>).

Certaines sulfatases sont potentiellement impliquées dans la modification des GAGs. A la connaissance du demandeur, seule une 2-O-sulfatase ayant une activité sélective de désulfatation des GAGs a été clonée et caractérisée, comme cela est décrit dans le brevet n° US 7,247,445.

Des auteurs ont décrit une activité de désulfatation sélective de la chondroïtine en position 4 et en position 6 chez la bactérie *Proteus vulgaris* (voir K. Sugahara et al., 1996, Eur. J. Biochem., 239(3):865-870). Toutefois, les enzymes responsables de cette activité, que ces auteurs ont désignées respectivement chondro-4-sulfatase et chondro-6-sulfatase, n'ont pas été clonées, et leur séquence respective n'a pas été déterminée. On connaît aussi une enzyme humaine ayant une activité chondro-4-sulfatase qui est l'arylsulfatase B (Numéro d'accès, par exemple dans la base de données d'enzymes « ExPASy » : P15848).

Il existe par conséquent un besoin d'identifier de nouvelles sulfatases, plus faciles à produire et présentant de nouvelles spécificités, utilisables pour la désulfatation sélective des GAGs, y compris à des fins de synthèse ou à des fins de caractérisation des GAGs.

5 **RESUME DE L'INVENTION**

La présente invention est relative à une 4-*O*-sulfatase purifiée capable d'hydrolyser sélectivement les groupements sulfate présents en position 4 de résidus de *N*-acétylgalactosamine substitués ou non.

En particulier, l'invention a pour objet une 4-*O*-sulfatase comprenant un polypeptide
10 ayant au moins 50 % d'identité en acides aminés avec le polypeptide de séquence SEQ ID N° 1, ou encore un fragment ou un variant dudit polypeptide.

L'invention est aussi relative à des acides nucléiques codant ladite 4-*O*-sulfatase, ainsi qu'à des cassettes d'expression et des vecteurs et cellules hôtes recombinants comprenant au moins un acide nucléique codant ladite 4-*O*-sulfatase.

15 La présente invention concerne aussi l'utilisation de la 4-*O*-sulfatase ci-dessus, ou d'acides nucléiques codant ladite 4-*O*-sulfatase, dans des procédés de synthèse de glycosaminoglycanes (GAGs).

La présente invention a également trait à l'utilisation de la 4-*O*-sulfatase ci-dessus, ou d'acides nucléiques codant ladite 4-*O*-sulfatase, dans des procédés de détermination de la
20 présence de glycosaminoglycanes 4-*O*-sulfatés dans un échantillon.

BREVE DESCRIPTION DES DESSINS

La **Figure 1** présente la structure chimique des différentes sous-familles de la famille des GAGs, respectivement de gauche à droite et du haut vers le bas de la Figure 1 :
25 Chondroïtine, Dermatan, Hyaluronate, Héparine et Kératane sulfate ; *n* est un nombre entier qui représente le nombre de motifs dans la molécule polymère finale.

La **Figure 2** décrit schématiquement la réaction catalysée par la 4-*O*-sulfatase, objet de l'invention.

La **Figure 3** présente la librairie des oligosaccharides testés dans les exemples et
30 précise l'action de la 4-*O*-sulfatase objet de l'invention qui a été observée sur ceux-ci. Une flèche barrée signifie que la 4-*O*-sulfatase ne réagit pas avec le groupe sulfate cible. Une flèche normale signifie que la 4-*O*-sulfatase catalyse une réaction de désulfatation sur le groupe sulfate cible.

La **Figure 4** représente la carte du plasmide pRSF dans lequel ont été clonés (i) l'acide
35 nucléique codant la 4-*O*-sulfatase et (ii) l'acide nucléique codant une enzyme de maturation des sulfatases (nommée anSME). La séquence du plasmide recombinant est référencée comme la séquence SEQ ID N° 53. Dans le plasmide de séquence SEQ ID N° 53, (i) la séquence codant la 4-*O*-sulfatase débute au nucléotide en position 113 et se termine au nucléotide en position 1639 et (ii) la séquence codant l'enzyme de maturation anSME débute au nucléotide en
40 position 1809 et se termine au nucléotide en position 2921.

La **Figure 5** représente un cliché d'un gel d'électrophorèse SDS PAGE (12%).

- Piste « MW » : Marqueurs de poids moléculaires
- Piste 1 : Induction de l'expression de la sulfatase et de l'enzyme de maturation (anSME) chez *E. coli*
- Piste 2 : Surnageant protéique
- Piste 3 : 4-*O*-Sulfatase purifiée

La **Figure 6** illustre les composés disaccharidiques de type chondroïtine sulfate contenus dans chacune des chimiothèques **2** {1-4} et **3** {1-4} décrites par Lubineau et al. (Lubineau et al., 1999, Eur J Org Chem, : 2523-2532).

La **Figure 7** illustre le profil de séparation et l'identification des 4 composés disaccharidiques contenus dans la Chimiothèque **2** {1-4}. Les deux cycles saccharidiques des disaccharides sont schématisés par des symboles ovales et la présence d'un groupe sulfate ou hydroxyle sur les positions d'intérêt est indiquée. Des symboles du même type sont représentés également dans les figures 8 à 12.

La **Figure 8** illustre le profil de séparation et l'identification des 4 composés disaccharidiques contenus dans la Chimiothèque **3** {1-4}.

La **Figure 9** illustre le profil de composés obtenus après avoir soumis les composés de la Chimiothèque **2** {1-4} à l'action de la 4-*O*-sulfatase sous une forme concentrée.

La **Figure 10** illustre le profil de composés obtenus après avoir soumis les composés de la Chimiothèque **3** {1-4} à l'action de la 4-*O*-sulfatase sous une forme concentrée.

La **Figure 11** illustre le profil de composés obtenus après avoir soumis les composés de la Chimiothèque **2** {1-4} à l'action de la 4-*O*-sulfatase sous une forme diluée 50 fois.

La **Figure 12** illustre le profil de composés obtenus après avoir soumis les composés de la Chimiothèque **3** {1-4} à l'action de la 4-*O*-sulfatase sous une forme diluée 50 fois.

La **Figure 13** (figures 13-1 à 13-8) illustre, du haut vers le bas de la figure, un alignement des séquences de sulfatase de SEQ ID N°1 à SEQ ID N°13, respectivement.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

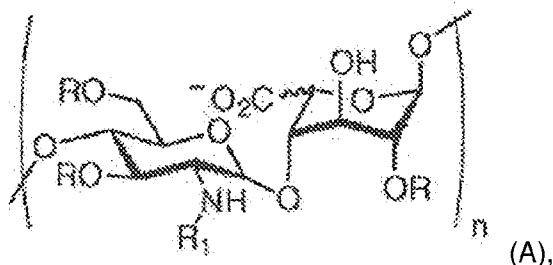
Le Demandeur a isolé et caractérisé une sulfatase apte à catalyser une réaction de désulfatation d'un glycosaminoglycane (GAG), sélectivement sur les groupes sulfate localisés en position 4 des unités osidiques constitutives dudit GAG. Ladite sulfatase peut être aussi désignée « *N*-acetylgalactosamine-4-sulfatase » ou encore « 4-*O*-sulfatase » dans la suite de la présente description.

Les GAGs englobent les composés osidiques incluant de 2 et jusqu'à 100 unités osidiques, ce qui inclut les GAGs disaccharides et les GAGs tétrasaccharides. Les GAGs englobent les chondroïtines sulfates (CS), les dermatanes sulfates, l'acide hyaluronique, les kératanes sulfates et la famille des héparanes sulfates (HS)/ héparines, qui sont représentées sur la Figure 1, et qui diffèrent entre eux par l'identité de leur sous-unité disaccharidique. Au niveau macromoléculaire, les divers GAGs de type HS et CS présentent des longueurs variées (généralement de 5 ou 10 à 100 unités saccharidiques) comprenant des régions de haut niveau

de sulfatation et des régions de faible niveau de sulfatation. Les GAGs englobent les composés constitués d'une unité disaccharidique répétitive basée (i) soit sur un motif de *N*-acétyl-hexosamine et d'hexose, (ii) soit sur un motif de *N*-acétyl-hexosamine et d'acide uronique. Les différents cycles osidiques sont reliés entre eux uniquement par des liaisons 1-4 ou 1-3. Par exemple, les héparanes sulfates et les héparines sont constitués de motifs disaccharidiques comprenant une D-glucosamine (GlcN) et un acide uronique pouvant être soit un acide D-glucuronique (GlcA), soit un acide L-iduronique (IdoA). Dans les héparanes sulfates et les héparines, les motifs disaccharidiques sont liés entre eux par des liaisons de type $\alpha(1,4)$ et $\beta(1,4)$. Les chondroïtines sulfates (CS) possèdent des sous-unités *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) et GlcA, et une alternance de liaisons $\beta(1,3)$ et $\beta(1,4)$. Le squelette des GAGs est hautement fonctionnalisé avec des groupements acétyle et un motif complexe de sulfatation, avec des groupes sulfate localisés sur une ou plusieurs des positions 2, 3, 4 et 6 de chaque unité d'oside, ainsi que sur les fonctions amines de ces molécules. Pour les héparanes sulfates et les héparines, la sulfatation a lieu principalement sur l'hydroxyle en C2 de l'unité IdoA et sur les hydroxyles en C3 et C6 de l'unité GlcN. Pour les chondroïtines sulfates (CS), la sulfatation peut avoir lieu sur n'importe le(s)quel(s) des hydroxyles libres, ce qui entraîne qu'un composé CS de type tétrasaccharide peut potentiellement donner lieu à 256 composés sulfatés de manière distincte. La structure des GAGs est notamment décrite en détail par Gandhi et al. (Gandhi et al., 2008, Chem Biol Drug Des, Vol. 72 : 455-482), auquel l'homme du métier peut avantageusement se référer.

Selon l'invention, les GAGs englobent en particulier les composés suivants :

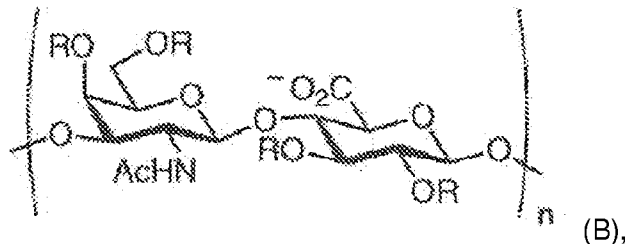
- les GAGs de type héparane sulfate/héparine de formule (A) ci-dessous :



dans laquelle R signifie SO_3^- ou H ; R1 signifie SO_3^- , H ou Ac et n est un entier allant de

1 à 50 ;

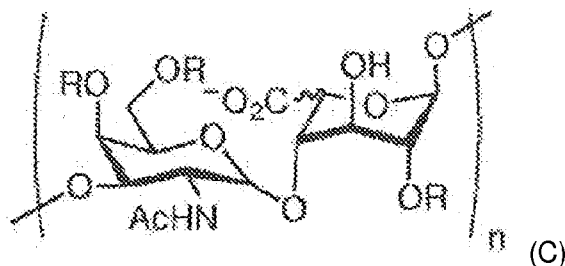
- les GAGs de type chondroïtine sulfate de formule (B) ci-dessous :



dans laquelle R signifie SO_3^- ou H ; R1 signifie SO_3^- , H ou Ac et n est un entier allant de

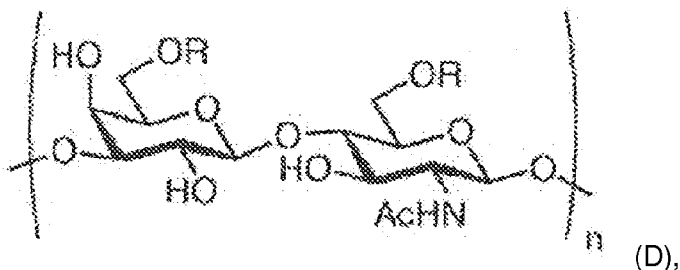
1 à 50 ;

- les GAGs de type dermatane sulfate de formule (C) ci-dessous :



dans laquelle R signifie SO_3^- ou H ; R1 signifie SO_3^- , H ou Ac et n est un entier allant de 1 à 50 ; et

- les GAGs de type kératane sulfate de formule (D) ci-dessous :



dans laquelle R signifie SO_3^- ou H ; R1 signifie SO_3^- , H ou Ac et n est un entier allant de 1 à 50.

Selon l'invention, on a en particulier isolé, cloné et caractérisé une 4-O-sulfatase provenant de *Bacteroides thetaiotaomicron* et exprimé cette 4-O-sulfatase dans *E. coli* afin d'obtenir la protéine recombinante correspondante.

Le demandeur a montré dans les exemples que la nouvelle 4-O-sulfatase catalyse la désulfatation sélective en position 4 des motifs osidiques constitutifs de divers glycosaminoglycanes (GAGs).

L'acide nucléique codant la nouvelle 4-O-sulfatase selon l'invention a été cloné, puis séquencé, et a été utilisé pour transfecter de cellules hôtes. Ladite 4-O-sulfatase a été produite sous forme recombinante par les cellules hôtes transfectées.

Enfin, le demandeur a identifié également une famille de 4-O-sulfatases possédant une grande similarité de séquences entre elles, qui englobe la 4-O-sulfatase ci-dessus, et qui peuvent être utilisées pour la synthèse et la caractérisation des GAGs, en particulier pour la détermination de la présence ou l'absence d'un groupe sulfate en position 4 des motifs osidiques.

Définitions générales

Par « polypeptide », on entend au sens de l'invention une chaîne d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques.

Aux fins de la présente description, l'expression "séquence nucléotidique" peut être employée pour désigner indifféremment un polynucléotide ou un acide nucléique. L'expression "séquence nucléotidique" englobe le matériel génétique lui-même et n'est donc pas restreinte à l'information concernant sa séquence.

Les termes "acide nucléique", "polynucléotide", "oligonucléotide" ou encore "séquence nucléotidique" englobent des séquences d'ARN, d'ADN, d'ADNc ou encore des séquences hybrides ARN/ADN de plus d'un nucléotide, indifféremment sous la forme simple brin ou sous la forme de duplex.

5 Le terme "nucléotide" désigne les nucléotides naturels (A, T, G, C et U).

Aux fins de la présente invention, un premier polynucléotide est considéré comme étant "complémentaire" d'un second polynucléotide lorsque chaque base du premier nucléotide est appariée à la base complémentaire du second polynucléotide dont l'orientation est inversée. Les « bases », complémentaires sont A et T (ou A et U), et C et G.

10 Le terme « purifié », au sens de l'invention, ne requiert pas que la substance considérée, par exemple le polypeptide considéré ou l'acide nucléique considéré, soit sous une forme de pureté absolue. Par exemple, un polynucléotide purifié, ou un acide nucléique purifié, englobe ledit polypeptide, ou ledit acide nucléique, à une concentration plus grande que la concentration dans laquelle ledit polypeptide, ou ledit acide nucléique, est retrouvé dans son
15 environnement naturel, dans l'organisme qui le contient ou dans lequel il est produit. Un polypeptide est « purifié » si sa concentration pondérale, ou son activité spécifique, est supérieur d'au moins 10 fois, et mieux d'au moins 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 1000, 1500, ou au moins 2000 fois, par rapport à la concentration pondérale, ou l'activité spécifique, dudit polypeptide non recombinant tel qu'il est retrouvé dans son environnement
20 naturel, y compris par exemple dans un lysat cellulaire ou un surnageant de culture cellulaire, préparé à partir de cellules qui produisent ledit polypeptide naturellement, sous forme non recombinante.

Un polypeptide purifié englobe un polypeptide qui est présent, dans la composition dans laquelle il est contenu, à raison d'au moins 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%,
25 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 97,5%, 98%, 98,3% 98,6%, 99% ou au moins 99,6% de la teneur totale en protéines de ladite composition.

Un acide nucléique purifié englobe un acide nucléique qui est présent, dans la
30 composition dans laquelle il est contenu, à raison d'au moins 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 97,5%, 98%, 98,3% 98,6%, 99% ou au moins 99,6% de la teneur totale en acides nucléiques de ladite composition.

35 Le « pourcentage d'identité » entre deux séquences d'acides nucléiques, ou entre deux séquences d'acides aminés, au sens de la présente invention, est déterminé en comparant les deux séquences alignées de manière optimale, à travers une fenêtre de comparaison.

La partie de la séquence nucléotidique, ou de la séquence d'acides aminés, dans la fenêtre de comparaison peut ainsi comprendre des additions ou des délétions (par exemple des

« gaps ») par rapport à la séquence de référence (qui ne comprend pas ces additions ou ces délétions) de manière à obtenir un alignement optimal entre les deux séquences.

Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions auxquelles une base nucléique identique, ou un acide aminé, est observé pour les deux séquences comparées, puis en divisant le nombre de positions auxquelles il y a identité entre les deux bases nucléiques, ou entre les deux acides aminés, par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison, puis en multipliant le résultat par cent afin d'obtenir le pourcentage d'identité en nucléotides, ou le pourcentage en acides aminés, des deux séquences entre elles.

L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé de manière informatique à l'aide d'algorithmes connus.

De manière tout à fait préférée, le pourcentage d'identité de séquence est déterminé à l'aide du logiciel CLUSTAL W (version 1.82) les paramètres étant fixés comme suit : (1) CPU MODE = ClustalW mp ; (2) ALIGNMENT = « full » ; (3) OUTPUT FORMAT = « aln w/numbers » ; (4) OUTPUT ORDER = « aligned » ; (5) COLOR ALIGNMENT = « no » ; (6) KTUP (word size) = « default » ; (7) WINDOW LENGTH = « default » ; (8) SCORE TYPE = « percent » ; (9) TOPDIAG = « default » ; (10) PAIRGAP = « default » ; (11) PHYLOGENETIC TREE/TREE TYPE = « none » ; (12) MATRIX = « default » ; (13) GAP OPEN = « default » ; (14) END GAPS = « default » ; (15) GAP EXTENSION = « default » ; (16) GAP DISTANCES = « default » ; (17) TREE TYPE = « cladogram » et (18) TREE GRAP DISTANCES = « hide ».

Aux fins de la présente description, des conditions d'hybridation hautement stringentes entre deux acides nucléiques, respectivement entre un acide nucléique de référence et un acide nucléique qui hybride, dans lesdites conditions de haute stringence, avec l'acide nucléique de référence, sont définies ci-dessous.

Par conditions d'hybridation de forte stringence, au sens de l'invention, on entend les conditions d'hybridation suivantes:

Préhybridation:

mêmes conditions que pour l'hybridation
durée: 1 nuit.

Hybridation:

5 x SSPE (0.9 M NaCl, 50 mM phosphate de sodium pH 7.7, 5 mM EDTA)
5 x Denhardt's (0.2% PVP, 0.2% Ficoll, 0.2% SAB)
100 µg/ml ADN de sperme de saumon
0.1% SDS
durée: 1 nuit.

Lavages:

2 x SSC, 0.1% SDS 10 min 65°C
1 x SSC, 0.1 % SDS 10 min 65°C
0.5 x SSC, 0.1 % SDS 10 min 65°C
0.1 x SSC, 0.1% SDS 10 min 65°C.

Les paramètres définissant les conditions de stringence dépendent de la température à laquelle 50% des brins appariés se séparent (T_m).

Pour les séquences comprenant plus de 360 bases, T_m est définie par la relation:

5 $T_m = 81,5 + 0,41 (\%G+C) + 16,6 \log(\text{concentration en cations}) - 0,63 (\% \text{ formamide}) - (600/\text{nombre de bases})$ (SAMBROOK, J. FRITSCH, E. F., and T. Maniatis, 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, New York., pages 9.54-9.62).

Pour les séquences de longueur inférieure à 30 bases, T_m est définie par la relation:

10 $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$.

Dans des conditions de stringence appropriées, dans lesquelles les séquences aspécifiques n'hybrident pas, la température d'hybridation est approximativement de 5 à 30°C, de préférence de 5 à 10°C en-dessous de T_m .

15 Les conditions d'hybridation ci-dessus décrites sont mises en œuvre pour l'hybridation d'un acide nucléique de 20 bases de longueur et peuvent être adaptées en fonction de la longueur de l'acide nucléique dont l'hybridation est recherchée ou du type de marquage choisi, selon les techniques connues de l'homme du métier.

Les conditions convenables d'hybridation peuvent par exemple être adaptées selon l'enseignement contenu dans l'ouvrage de HAMES et HIGGINS (HAMES and HIGGINS, 1985. Nucleic Acid Hybridization: a practical approach, Hames & Higgins Ed. IRL Press, Oxford.) ou encore dans l'ouvrage de AUSUBEL et al. (AUSUBEL et T al., 1989. Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y).

En particulier, il faut prendre en compte que le niveau et la spécificité d'hybridation dépendent de différents paramètres, tels que :

25 a) la pureté de la préparation de l'acide nucléique sur lequel la sonde ou l'amorce doit s'hybrider ;

b) la composition en base de la sonde ou de l'amorce, les paires de bases G-C possédant une plus grande stabilité thermique que les paires de bases A-T ou A-U ;

30 c) la longueur de la séquence de bases homologue entre la sonde ou l'amorce et l'acide nucléique ;

d) la force ionique : le taux d'hybridation augmente avec l'accroissement de la force ionique et la durée du temps d'incubation ;

e) la température d'incubation ;

f) la concentration de l'acide nucléique sur lequel la sonde ou l'amorce doit s'hybrider ;

35 g) la présence d'agents dénaturants, tels que des agents favorisant la rupture de liaisons hydrogène, comme le formamide ou l'urée, qui accroissent la stringence de l'hybridation ;

h) le temps d'incubation, le taux d'incubation augmentant avec la durée de l'incubation ;

40 i) la présence d'agents d'exclusion de volume, tels que le dextran ou le sulfate de dextran, qui augmentent le taux d'hybridation du fait qu'ils accroissent les concentrations

effectives de la sonde ou de l'amorce et de l'acide nucléique qui doit s'hybrider, au sein de la préparation.

Par "variant" d'un acide nucléique selon l'invention, on entend un acide nucléique qui diffère de l'acide nucléique de référence par une ou plusieurs substitutions, additions ou
5 déléctions d'un nucléotide, par rapport à l'acide nucléique de référence. Un variant d'un acide nucléique selon l'invention peut être d'origine naturelle, tel qu'un variant allélique qui existe naturellement. Un tel acide nucléique variant peut être également un acide nucléique non naturel obtenu, par exemple, par des techniques de mutagenèse.

En général, les différences entre l'acide nucléique de référence et l'acide nucléique
10 "variant" sont réduites de telle sorte que l'acide nucléique de référence et l'acide nucléique variant ont des séquences nucléotidiques très similaires et, dans de nombreuses régions, identiques. Les modifications nucléotidiques présentes dans un acide nucléique variant peuvent être silencieuses, ce qui signifie qu'elles n'affectent pas la séquence d'acides aminés qui peut être codée par cet acide nucléique variant.

15 Les modifications de nucléotides dans l'acide nucléique variant peuvent aussi résulter en des substitutions, additions ou déléctions d'un ou plusieurs acides aminés dans la séquence du polypeptide qui peut être codé par cet acide nucléique variant.

De manière tout à fait préférée, un acide nucléique variant selon l'invention comportant une phase de lecture ouverte, code pour un polypeptide qui conserve la même fonction ou la
20 même activité biologique que le polypeptide codé par l'acide nucléique de référence.

De manière tout à fait préférée, un acide nucléique variant selon l'invention et qui comporte une phase de lecture ouverte, code pour un polypeptide qui conserve la capacité d'être reconnu par des anticorps dirigés contre le polypeptide codé par l'acide nucléique de référence.

25 Par « fragment » d'un polypeptide selon l'invention, on entend un fragment polypeptidique d'une longueur réduite par rapport au polypeptide de référence, le fragment polypeptidique possédant une séquence en acides aminés identique à la séquence en acides aminés du polypeptide de référence sur la partie commune. De tels fragments d'un polypeptide selon l'invention possèdent au moins 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 100, 120, 130, 140, 150,
30 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510 ou 520 acides aminés consécutifs d'un polypeptide 4-O-sulfatase de référence, étant entendu que la longueur maximale dudit fragment est par définition limitée par la longueur en acides aminés du polypeptide dont ledit fragment peptidique dérive.

35 Un fragment d'un polypeptide de l'invention est « biologiquement actif » si ledit fragment polypeptidique possède une activité 4-O-sulfatase, y compris vis-à-vis d'un GAG substrat 4-O sulfaté comprenant au moins un autre groupement sulfate sur le cycle osidique.

Par "fragment" d'un acide nucléique selon l'invention, on entend une séquence nucléotidique d'une longueur réduite par rapport à l'acide nucléique de référence, le fragment
40 d'acide nucléique possédant une séquence nucléotidique identique à la séquence nucléotidique

de l'acide nucléique de référence sur la partie commune. De tels fragments d'un acide nucléique selon l'invention possèdent au moins 12, 15, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1510, 1520, ou 1528 nucléotides consécutifs de l'acide nucléique de référence, la longueur maximale en nucléotides d'un fragment d'un acide nucléique selon l'invention étant bien entendue limitée par la longueur maximale en nucléotides de l'acide nucléique de référence.

Polypeptides 4-O-sulfatase et compositions les contenant

La présente invention concerne une 4-O-sulfatase purifiée, comprenant un polypeptide ayant au moins 50% d'identité en acides aminés avec le polypeptide de séquence SEQ ID N°1, ou un fragment peptidique biologiquement actif ou un variant de celui-ci.

Le demandeur a réalisé une comparaison de la séquence en acides aminés de l'arylsulfatase B humaine connue et de la séquence SEQ ID N°1 et a ainsi déterminé que l'arylsulfatase B humaine connue ne comporte pas d'homologie significative en acides aminés avec la 4-O-sulfatase objet de la présente invention.

Le demandeur a aussi identifié une pluralité de 4-O-sulfatases ayant des similarités de séquence et donc de fonction avec la 4-O-sulfatase de séquence SEQ ID N°1, en particulier une pluralité de 4-O-sulfatases ayant au moins 50% d'identité en acides aminés avec la 4-O-sulfatase de séquence SEQ ID N°1.

L'ensemble des 4-O-sulfatases identifiées par le demandeur constitue une famille de 4-O-sulfatases possédant des caractéristiques structurales et fonctionnelles communes, à savoir le type de réaction catalysée et le type de substrat qui est transformé.

La famille de 4-O-sulfatase de l'invention, dont chaque membre possède au moins 50% d'identité de séquence en acides aminés avec la 4-O-sulfatase de séquence SEQ ID N°1 englobe les 4-O-sulfatase comprenant un polypeptide choisi dans le groupe constitué des séquences SEQ ID N°1 à SEQ ID N°13.

La présente invention est aussi relative à des fragments biologiquement actifs d'un polypeptide ayant au moins 50% d'identité de séquence en acides aminés avec la 4-O-sulfatase de séquence SEQ ID N°1.

La présente invention concerne aussi des variants d'un polypeptide ayant au moins 50% d'identité de séquence en acides aminés avec la 4-O-sulfatase de séquence SEQ ID N°1, et notamment des variants d'un polypeptide choisi dans le groupe constitué des séquences SEQ ID N°1 à SEQ ID N°13.

Selon l'invention, un premier polypeptide ayant au moins 50% d'identité avec un second polypeptide de référence, possède de préférence au moins 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 97,5%, 98%, 98,3% 98,6%, 99%, ou au moins 99,6% d'identité en acides aminés avec ledit second polypeptide de référence.

Dans certains modes de réalisation préférés, la 4-*O*-sulfatase objet de l'invention comprend un polypeptide ayant au moins 50% d'identité en acides aminés avec le polypeptide de séquence SEQ ID N°1. On précise que les polypeptides de séquences SEQ ID N° 2 à SEQ ID N° 12 possèdent au moins 66% d'identité en acides aminés avec le polypeptide de séquence SEQ ID N°1. On précise aussi que les polypeptides de séquences SEQ ID N° 2, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°6, SEQ ID N°8 et SEQ ID N°9 possèdent au moins 80% d'identité en acides aminés avec le polypeptide de séquence SEQ ID N°1

Dans certains modes de réalisation préférés, la 4-*O*-sulfatase objet de l'invention comprend un polypeptide ayant au moins 90% d'identité en acides aminés avec le polypeptide de séquence SEQ ID N°1. On précise que les polypeptides de séquences SEQ ID N° 2, SEQ ID N°5, SEQ ID N°6 et SEQ ID N° 9 possèdent au moins 90% d'identité en acides aminés avec le polypeptide de séquence SEQ ID N°1

Les différences en acides aminés entre un polypeptide de l'invention et le polypeptide de séquence SEQ ID N°1, lorsqu'elles existent, englobent :

- une ou plusieurs substitutions d'un acide aminé, et/ou
- une ou plusieurs délétions d'un acide aminé, et/ou
- une ou plusieurs additions d'un acide aminé.

La ou les substitution(s) d'un acide aminé consiste(nt) préférentiellement en une (des) substitution(s) « conservative(s). Une « substitution conservative » d'un acide aminé est la substitution d'un acide aminé d'une classe donnée par un acide aminé de la même classe donnée, dans laquelle la classe donnée est définie par les propriétés physicochimiques des chaînes latérales d'acides aminés ainsi que par la haute valeur de fréquence de ladite substitution conservative des protéines homologues retrouvées dans la nature. Six classes générales d'acides aminés sont reconnues, qui incluent la Classe I (Cys), la Classe II (Ser, Thr, Pro, ala, Gly), la Classe III (Asn, Asp, Gln, Glu), la Classe IV (His, Arg, Lys), la Classe V (Ile, Leu, Val, Met) et la Classe VI (Phe, Tyr, Trp). Par exemple, la substitution d'un résidu Asp par un autre résidu d'acide aminé appartenant à la Classe III choisi parmi Asn, Gln ou Glu consiste en une « substitution conservative » d'un acide aminé.

Dans un mode de réalisation préféré, la 4-*O*-sulfatase objet de l'invention comprend un polypeptide de séquence SEQ ID N°1. Ce mode de réalisation englobe les polypeptides qui comprennent, par rapport à la séquence SEQ ID N°1, ou encore par rapport à une séquence ayant au moins 50% d'identité en acides aminés avec la séquence SEQ ID N°1, une ou deux séquences en acides aminés additionnelles, localisées indifféremment à l'extrémité N-terminale ou C-terminale du polypeptide de séquence SEQ ID N°1. Certains modes de réalisation englobent des polypeptides comprenant une seule séquence en acides aminés additionnelle qui est localisée à l'extrémité N-terminale de la séquence SEQ ID N°1. Certains autres modes de réalisation englobent des polypeptides comprenant une seule séquence en acides aminés additionnelle qui est localisée à l'extrémité C-terminale de la séquence SEQ ID N°1. La ou les séquence(s) additionnelle(s) ont une longueur en acides aminés allant de 1 à 50 acides aminés, ce qui englobe les séquences additionnelles ayant 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15,

16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, ou 50 acides aminés de longueur. Dans certains modes de réalisation, la ou les séquence(s) additionnelle(s) possèdent moins de 20 acides aminés de longueur, par exemple moins de 10 acides aminés de longueur. Lorsqu'un polypeptide comprend deux séquences additionnelles, respectivement à l'extrémité N-terminale et à l'extrémité C-terminale de la séquence SEQ ID N°1, lesdites séquences additionnelles peuvent être identiques ou différentes. Les séquences additionnelles englobent des séquences facilitant la purification d'une sulfatase selon l'invention, par exemple des séquences retenues par un support de chromatographie, y compris un support de chromatographie par immunoaffinité, telles qu'une séquence de GST (Glutathion-S-Transférase), une séquence d'antigène HA (Schneider, C. et al. Arch. Virol. 125, 103 (1992); Sleight, MJ. et al. J. Virol. 37, 845 (1981); Czech, M. et al. J. Cell Biol. 123, 127 (1993)), une séquence d'antigène FLAG sous forme de monomère ou de trimère (Chiang et al., Peptide Research, 6(2):62-64), ou encore une séquence de poly-histidine (Hengen, 1995, Trends Biochem Sci, n°20(7) : 285-286), ces séquences étant par ailleurs bien connues de l'homme du métier.

Un polypeptide de l'invention comprenant la séquence de la 4-O-sulfatase de séquence SEQ ID N°1 possédant une séquence de poly-histidine à son extrémité C-terminale est concrètement illustrée dans les exemples.

La présente invention englobe aussi les 4-O-sulfatases codées par un acide nucléique hybridant, dans les conditions de stringence définies précédemment, avec un acide nucléique codant le polypeptide de séquence SEQ ID N° 1. La présente invention englobe aussi les 4-O-sulfatases codées par un acide nucléique hybridant, dans les conditions de stringence définies précédemment, avec un acide nucléique codant un polypeptide de séquence choisie parmi les séquences SEQ ID N° 2 à 13. La présente invention englobe donc les 4-O-sulfatases codées par un acide nucléique hybridant, dans les conditions de stringence définies précédemment, avec un acide nucléique choisi parmi les acides nucléiques de séquences SEQ ID N° 14 à 26.

Les polypeptides ci-dessus englobés par la présente invention, autres que le polypeptide de séquence SEQ ID N°1, possèdent une activité enzymatique 4-O-sulfatase et un niveau d'activité 4-O-sulfatase d'au moins 0,1 fois le niveau d'activité de la 4-O-sulfatase de séquence SEQ ID N°1. Les polypeptides définis ci-dessus englobent ceux dont le niveau d'activité 4-O-sulfatase est d'au moins 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, ou au moins 200 fois le niveau d'activité de la 4-O-sulfatase de séquence SEQ ID N°1.

Le niveau relatif d'activité 4-O-sulfatase peut être déterminé en comparant, pour une quantité ou une concentration finale donnée et identique respectivement de la 4-O-sulfatase de SEQ ID N° 1 de référence et de la 4-O-sulfatase comparative, et pour un composé substrat donné et pour une durée donnée d'incubation avec chacune des deux enzymes, la quantité de

produit final désulfaté généré. La quantité de produit final généré par la réaction enzymatique est préférentiellement déterminée par électrophorèse capillaire, en calculant la surface du pic de signal d'absorbance à la longueur d'onde de 200 nanomètres correspondant au produit généré par la réaction enzymatique, comme cela est décrit dans les exemples. Comme substrat, on utilise préférentiellement un composé de chondroïtine sulfate tel que décrit dans les exemples. Le composé substrat peut être utilisé à la concentration finale de 1 mg/ml. La valeur du rapport entre (i) la quantité de produit final désulfaté généré avec l'enzyme comparée et (ii) la quantité de produit final désulfaté généré avec le polypeptide de séquence SEQ ID N° 1 consiste en le niveau d'activité de l'enzyme comparative testée par rapport à la 4-O-sulfatase de séquence SEQ ID N°1.

Dans un mode de réalisation préféré, la 4-O-sulfatase objet de l'invention consiste en un polypeptide de séquence SEQ ID N°1.

La 4-O-sulfatase de séquence SEQ ID N°1 possède 508 acides aminés de longueur. La 4-O-sulfatase de séquence SEQ ID N°1 possède l'enchaînement d'acides aminés de formule (I) « SX₁PX₂R », dans laquelle X₁ et X₂ représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, un résidu d'acide aminé. Dans la 4-O-sulfatase de séquence SEQ ID N°1, l'enchaînement de formule (I) est localisé du résidu Sérine (« S ») en position 84 jusqu'au résidu Arginine (« R ») en position 88. Dans l'enchaînement d'acides aminés de formule (I), qui est caractéristique des polypeptides à activité sulfatase, le résidu Sérine (« S ») subit une modification post-traductionnelle par transformation en résidu 3-oxoalanine, aussi appelé résidu C_α-formylglycine ou « FGly ». Cette modification post-traductionnelle du résidu Sérine en résidu 3-oxoalanine est essentielle pour l'activité catalytique de la 4-O-sulfatase. La transformation du résidu Sérine de l'enchaînement de formule (I) peut être réalisée par l'action d'une enzyme de maturation des sulfatases, qui peut être aussi désignée « anaerobic Sulfatase Maturing Enzyme » ou « anSME », ou « atsB », bien connue de l'homme du métier, et qui a été décrite notamment par Benjdia et al. (Benjdia et al., 2008, J Biol Chem, Vol. 283 (26) : 17815-17826) et par Berteau et al. (Berteau et al., 2006, J Biol Chem, Vol. 281 (32) : 22464-22470). Toutefois, lorsque le résidu Sérine de l'enchaînement de formule (I) est remplacé par un résidu Cystéine (« C »), la 4-O-sulfatase est alors susceptible d'être active, en particulier chez *E. coli*, sans nécessiter la présence d'une enzyme de maturation des sulfatases du type « anSME », comme décrit par exemple par Benjdia et al. (Benjdia et al., 2007, FEBS Letters, Vol ; 581 (5) : 1009-1014).

On précise aussi que l'activation de la 4-O-sulfatase de séquence SEQ ID N° 1 peut également être réalisée chez différents hôtes, procaryotes ou eucaryotes, incluant *B. thetaiotaomicron*, ne nécessitant pas l'expression hétérologue d'un système de maturation. Enfin, des modes d'activation chimique des sulfatases possédant un résidu de sérine ont été également décrits dans l'état de la technique et pourraient permettre l'activation *in vitro* de la présente sulfatase, notamment par l'emploi de composés de type vanadyles.

Ainsi, dans d'autres modes de réalisation préférés, la 4-O-sulfatase objet de l'invention consiste en un polypeptide dérivé du polypeptide de séquence SEQ ID N°1, dans lequel le résidu Sérine en position 84 de la séquence SEQ ID N°1 est remplacé par une résidu Cystéine.

Comme cela a été indiqué, la 4-*O*-sulfatase objet de l'invention a été clonée et produite sous forme purifiée, ce qui signifie qu'elle représente au moins 50% en poids des protéines contenues dans l'échantillon final obtenu.

5 Dans d'autres modes de réalisation, la 4-*O*-sulfatase représente de 50% à 100% en poids des protéines contenues dans l'échantillon final obtenu, ledit échantillon final étant exempt de toute contamination par une quelconque autre enzyme susceptible de désulfater les GAGs.

Dans le mode de réalisation particulier où la 4-*O*-sulfatase représente plus de 99% en poids des protéines contenues dans l'échantillon final obtenu, ladite 4-*O*-sulfatase purifiée peut
10 aussi être désignée « 4-*O*-sulfatase isolée ».

L'invention concerne aussi une composition comprenant une 4-*O*-sulfatase telle que décrite précédemment.

Dans certains modes de réalisation, la composition comprenant une 4-*O*-sulfatase selon l'invention se présente sous la forme d'une composition liquide ou d'une composition solide.
15 Ladite composition peut se présenter sous la forme d'une solution aqueuse, et est préférentiellement exempte de toute contamination par une quelconque autre enzyme susceptible de désulfater les GAGs. Les autres constituants de la composition solide ou liquide englobent essentiellement un ou plusieurs constituants choisis parmi le solvant, en général de l'eau ou une solution tampon adaptée à la conservation des protéines, des sels, des
20 antibiotiques, des agents stabilisants mais également des solvants organiques notamment pour la solubilisation de substrats.

Dans d'autres modes de réalisation, la composition comprenant une 4-*O*-sulfatase selon l'invention se présente sous la forme d'une composition solide, y compris une composition lyophilisée. Pour la préparation d'une composition solide lyophilisée comprenant
25 une 4-*O*-sulfatase selon l'invention, l'homme du métier peut avantageusement se référer à la demande PCT n° WO 03/018778 ou à la demande PCT n° WO 2006/079722.

Pour la préparation d'une composition comprenant une 4-*O*-sulfatase selon l'invention sous forme solide ou liquide, l'homme du métier peut de manière générale se référer aux demandes PCT n° WO 2009/030728, WO200202727, les demandes de brevet aux Etats-Unis
30 US20090144840, US2008090276, US2007232514, la demande de brevet européen n° EP1252879, les demandes de brevet au Royaume Uni GB0620494, GB0020379, les demandes de brevet japonais n° JP2007097586, JP2006191863, JP2004141162, les demandes de brevet coréen n° KR20040042636, KR20030055442.

Un polypeptide à activité 4-*O*-sulfatase ou une composition comprenant ledit
35 polypeptide, est utile comme catalyseur biologique dans un procédé de synthèse d'un GAG. Un polypeptide à activité 4-*O*-sulfatase ou une composition comprenant ledit polypeptide, complète avantageusement le répertoire d'outils enzymatiques actuellement disponibles, qui est applicable notamment dans le domaine pharmaceutique, y compris dans des procédés de synthèse de glycosaminoglycanes et de détermination de la présence de glycosaminoglycanes
40 4-*O*-sulfatés dans un échantillon (séquençage diagnostique des GAGs).

Acides nucléiques codant une 4-O-sulfatase et compositions les contenantAcides nucléiques

L'invention concerne donc également un acide nucléique codant une 4-O-sulfatase telle que décrite précédemment.

Ainsi, la présente invention est relative à un acide nucléique comprenant un polynucléotide codant un polypeptide ayant au moins 50% d'identité en acides aminés avec un polypeptide comprenant le polypeptide de séquence SEQ ID N°1, ou un acide nucléique de séquence complémentaire. Elle est aussi relative à un acide nucléique comprenant un polynucléotide codant un polypeptide ayant au moins 50% d'identité en acides aminés le polypeptide de séquence SEQ ID N°1, ou un acide nucléique de séquence complémentaire. Elle est également relative à un acide nucléique codant un polypeptide ayant au moins 50% d'identité en acides aminés avec le polypeptide de séquence SEQ ID N° 1, ou un acide nucléique complémentaire.

En particulier, l'invention a trait à un acide nucléique comprenant un polynucléotide codant un polypeptide choisi dans le groupe constitué des séquences SEQ ID N°1 à SEQ ID N°13, ou un acide nucléique de séquence complémentaire. L'invention concerne aussi un acide nucléique codant un polypeptide choisi dans le groupe constitué des séquences SEQ ID N°1 à SEQ ID N°13, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

Dans certains modes de réalisation, l'acide nucléique objet de l'invention comprend un polynucléotide de séquence SEQ ID N° 14 à SEQ ID N° 26, qui code respectivement pour les polypeptides de séquences SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 13, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

Dans un mode de réalisation préféré, l'acide nucléique objet de l'invention comprend un polynucléotide de séquence SEQ ID N° 14 ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

La présente invention a aussi pour objet un acide nucléique ayant au moins 50% d'identité en nucléotides avec un acide nucléique choisi dans le groupe constitué des séquences SEQ ID N° 14 à SEQ ID N° 26, ou un acide nucléique de séquence complémentaire, ou un fragment ou un variant de celui-ci.

Selon l'invention, un premier acide nucléique ayant au moins 50 % d'identité avec un second acide nucléique de référence, possède au moins 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 97,5%, 98%, 98,3% 98,6%, 99%, ou au moins 99,6% d'identité en nucléotides avec ledit second acide nucléique de référence.

La présente invention a aussi trait à un acide nucléique hybridant, dans les conditions d'hybridation hautement stringentes telles que définies précédemment, avec un acide nucléique choisi dans le groupe constitué des séquences SEQ ID N° 14 à SEQ ID N° 26, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

Par définition, un premier acide nucléique qui hybride dans les conditions de haute stringence ci-dessus, avec un second acide nucléique signifie que les deux acides nucléiques possèdent des séquences complémentaires ayant entre elles un très haut niveau d'identité structurelle.

5 Les acides nucléiques dont la séquence nucléotidique est complémentaire à un acide nucléique qui hybride, dans les conditions de haute stringence ci-dessus, avec acide nucléique choisi dans le groupe constitué des séquences SEQ ID N° 14 à SEQ ID N° 26, est un acide nucléique codant un polypeptide 4-O-sulfatase selon l'invention.

10 Les acides nucléiques qui hybrident, dans les conditions de haute stringence ci-dessus, avec acide nucléique choisi dans le groupe constitué des séquences SEQ ID N° 14 à SEQ ID N° 26, peuvent aussi être utilisés comme sondes ou amorces pour la détection ou l'amplification spécifique d'un acide nucléique codant une 4-O-sulfatase, ou d'un acide nucléique complémentaire à un polynucléotide codant une 4-O-sulfatase.

15 Sondes et amorces nucléotidiques

Les fragments d'acides nucléiques dérivés de l'une quelconque des séquences nucléotidiques SEQ ID N° 14 à SEQ ID N° 26 sont utiles pour la détection de la présence d'au moins une copie d'une séquence nucléotidique choisie parmi les séquences SEQ ID N° 14 à SEQ ID N° 26 ou encore d'un fragment ou d'un variant de cette dernière dans un échantillon.

20 Les sondes ou les amorces nucléotidiques selon l'invention comprennent au moins huit nucléotides consécutifs d'un acide nucléique choisi dans le groupe constitué des séquences SEQ ID N° 14 à SEQ ID N° 26, ou d'un acide nucléique de séquence complémentaire.

De préférence, des sondes ou amorces nucléotidiques selon l'invention auront une longueur de 10, 12, 15, 18 ou 20 à 25, 35, 40, 50, 70, 80, 100, 200, 500, 1000, 1500
25 nucléotides consécutifs d'un acide nucléique selon l'invention, en particulier un acide nucléique de séquence nucléotidique choisie parmi les séquences SEQ ID N° 14 à SEQ ID N° 26 ou d'un acide nucléique de séquence complémentaire.

Alternativement, une sonde ou une amorce nucléotidique selon l'invention consistera et/ou comprendra les fragments d'une longueur de 9, 12, 15, 18, 20, 25, 35, 40, 50, 100, 200,
30 500, 1000, 1500 nucléotides consécutifs d'un acide nucléique selon l'invention, plus particulièrement d'un acide nucléique choisi parmi les séquences SEQ ID N° 14 à SEQ ID N° 26, ou d'un acide nucléique de séquence complémentaire.

La définition d'une sonde et d'une amorce nucléotidique selon l'invention englobe donc des oligonucléotides qui hybrident, dans les conditions d'hybridation de forte stringence définies
35 ci-avant, avec un acide nucléique choisi parmi les séquences SEQ ID N° 14 à SEQ ID N° 26 ou avec une séquence complémentaire de ces derniers.

A titre illustratif, on décrit dans les exemples l'utilisation des amorces de séquences SEQ ID N° 27 et SEQ ID N° 28 pour amplifier un acide nucléique codant une 4-O-sulfatase, et en particulier la 4-O-sulfatase de séquence SEQ ID N° 1.

Dans le Tableau 1 localisé à la fin de la présente description, on décrit aussi des illustrations de couples d'amorces qui peuvent être utilisées pour amplifier les acides nucléiques codant chacun des polypeptides de séquences SEQ ID N° 2 à SEQ ID N° 13 ; il s'agit des amorces de séquences SEQ ID N° 29 à SEQ ID N° 52 ;

5 Dans les amorces de séquences SEQ ID N° 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49 et 51, la séquence « GGATCC » permet la réalisation d'un amplicon qui peut être ensuite introduit au niveau d'un site de restriction BamHI présente dans un polysite de clonage d'un vecteur de clonage ou d'expression.

10 Dans les amorces de séquences SEQ ID N° 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50 et 52, la séquence « CTGCAG » permet la réalisation d'un amplicon qui peut être ensuite introduit au niveau d'un site de restriction PSTI présente dans un polysite de clonage d'un vecteur de clonage ou d'expression.

15 La présente invention englobe aussi des amorces nucléotidiques dérivées des amorces de séquences SEQ ID N° 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50 et 52, dans lesquelles la séquence « CTGCAG » a été éliminée ou est absente.

La présente invention englobe aussi des amorces nucléotidiques dérivées des amorces de séquences SEQ ID N° 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50 et 52, dans lesquelles la séquence « CTGCAG » a été éliminée ou est absente.

20 Une amorce ou une sonde nucléotidique selon l'invention peut être préparée par toute méthode adaptée bien connue de l'homme du métier, y compris par clonage et action d'enzymes de restriction ou encore par synthèse chimique directe selon des techniques telles que la méthode au phosphodiester de NARANG et al. (Narang SA, Hsiung HM, Brousseau R, *Methods Enzymol* 1979; Vol. 68:90-98) ou de BROWN et al. (Brown EL, Belagaje R, Ryan MJ, Khorana HG, *Methods Enzymol* 1979; Vol. 68:109-151), la méthode aux diéthylphosphoramidites de BEAUCAGE et al. (Beaucage et al., *Tetrahedron Lett* 1981, Vol. 22: 1859-1862) ou encore la technique sur support solide décrite dans la demande de brevet européen n°EP 0 707 592.

30 Chacun des acides nucléiques selon l'invention, y compris les sondes et amorces oligonucléotidiques décrites ci-dessus, peuvent être marqués, si désiré, en incorporant un marqueur détectable par des moyens spectroscopiques, photochimiques, biochimiques, immunochimiques ou encore chimiques.

Par exemple, de tels marqueurs peuvent consister en des isotopes radioactifs (^{32}P , ^{33}P , ^3H , ^{35}S ,), des molécules fluorescentes (5-bromodeoxyuridine, fluorescéine, acétylaminofluorène, digoxigénine) ou encore des ligands tels que la biotine.

35 Le marquage des sondes est fait de préférence par incorporation de molécules marquées au sein des polynucléotides par extension d'amorces, ou bien par rajout sur les extrémités 5' ou 3'

Les sondes oligonucléotides selon l'invention peuvent être utilisées notamment dans des hybridations de type Southern à l'ADN génomique ou encore dans des hybridations à l'ARN

messager correspondant lorsque l'expression du transcrit correspondant est recherchée dans un échantillon.

Les sondes selon l'invention peuvent aussi être utilisées pour la détection de produits d'amplification PCR ou encore pour la détection de mésappariements.

5 Des sondes ou amorces nucléotidiques selon l'invention peuvent être immobilisées sur un support solide. De tels supports solides sont bien connus de l'homme du métier et comprennent des surfaces des puits de plaques de microtitration, des lits de polystyrène, des lits magnétiques, des bandes de nitrocellulose, ou encore des microparticules telles que des particules de latex.

10 En conséquence, la présente invention concerne également un procédé de détection de la présence d'un acide nucléique tel que décrit ci-avant dans un échantillon, ladite méthode comprenant les étapes de :

1) mettre en contact une ou plusieurs sondes nucléotidiques selon l'invention avec l'échantillon à tester.

15 2) détecter le complexe éventuellement formé entre la ou les sondes et l'acide nucléique présent dans l'échantillon.

Selon un mode de réalisation particulier du procédé de détection selon l'invention, la ou les sondes oligonucléotidiques sont immobilisées sur un support.

20 Selon un autre aspect, les sondes oligonucléotidiques comprennent un marqueur détectable.

L'invention concerne en outre un nécessaire ou kit pour la détection de la présence d'un acide nucléique selon l'invention dans un échantillon, ledit nécessaire comprenant :

- 25 a) une ou plusieurs sondes nucléotidiques telles que décrites ci-dessus ;
b) le cas échéant, les réactifs nécessaires à la réaction d'hybridation.

Selon un premier aspect, le nécessaire ou kit de détection est caractérisé en ce que la ou les sondes sont immobilisées sur un support.

Selon un second aspect, le nécessaire ou kit de détection est caractérisé en ce que les sondes oligonucléotidiques comprennent un marqueur détectable.

30 Selon un mode de réalisation particulier du kit de détection décrit ci-dessus, un tel kit comprendra une pluralité de sondes oligonucléotidiques conformes à l'invention qui pourront être utilisées pour détecter des séquences cibles d'intérêt ou alternativement détecter des mutations dans les régions codantes ou les régions non codantes des acides nucléiques selon l'invention, plus particulièrement des acides nucléiques de séquences SEQ ID N° 14 à SEQ ID
35 N° 26 ou les acides nucléiques de séquence complémentaire.

Ainsi, les sondes selon l'invention immobilisées sur un support peuvent être ordonnées en matrices telles que les "puces à ADN". De telles matrices ordonnées ont été en particulier décrites dans le brevet US N° 5,143,854, dans les demandes PCT N° WO 90/150 70 et 92/10092.

Des matrices supports sur lesquelles des sondes oligonucléotidiques ont été immobilisées à une haute densité sont par exemple décrites dans les brevets US N°5,412,087 et dans la demande PCT N°WO 95/11995.

Les amorces nucléotidiques selon l'invention peuvent être utilisées pour amplifier l'un quelconque des acides nucléiques selon l'invention, et plus particulièrement tout ou partie d'un acide nucléique de séquences SEQ ID N° 14 à SEQ ID N° 26, ou encore un variant de celui-ci.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé pour l'amplification d'un acide nucléique selon l'invention, et plus particulièrement un acide nucléique de séquences SEQ ID N° 14 à SEQ ID N° 26 ou un fragment ou un variant de celui-ci contenu dans un échantillon, ledit procédé comprenant les étapes de :

a) mettre en contact l'échantillon dans lequel la présence de l'acide nucléique cible est suspectée avec une paire d'amorces nucléotidiques dont la position d'hybridation est localisée respectivement du côté 5' et du côté 3' de la région de l'acide nucléique cible dont l'amplification est recherchée, en présence des réactifs nécessaires à la réaction d'amplification ; et

b) détection des acides nucléiques amplifiés.

Pour mettre en oeuvre le procédé d'amplification tel que défini ci-dessus, on aura avantageusement recours à l'une quelconque des amorces nucléotidiques décrites ci-avant.

L'invention a en outre pour objet un nécessaire ou kit pour l'amplification d'un acide nucléique selon l'invention, et plus particulièrement tout ou partie d'un acide nucléique de séquences SEQ ID N° 14 à SEQ ID N° 26, ledit nécessaire ou kit comprenant :

a) un couple d'amorces nucléotidiques conformes à l'invention, dont la position d'hybridation est localisée respectivement du côté 5' et du côté 3' de l'acide nucléique cible dont l'amplification est recherchée ;

b) le cas échéant, les réactifs nécessaires à la réaction d'amplification.

Un tel nécessaire ou kit d'amplification comprendra avantageusement au moins une paire d'amorces nucléotidiques telles que décrites ci-dessus.

Pour la réalisation des procédés ci-dessus, on peut mettre en oeuvre une sonde ou une amorce définie dans la présente description, et en particulier les acides nucléiques choisis parmi les séquences SEQ ID N° 27 à 52.

Cassettes d'expression

Le clonage de la 4-O-sulfatase objet de l'invention peut être réalisé selon les méthodes classiques de génie génétique impliquant l'amplification du gène par PCR, sa digestion par des enzymes de restriction spécifiques des amorces utilisées et sa ligation dans différents vecteurs d'expression préalablement digérés par les même enzymes.

L'acide nucléique objet de l'invention, qui code une 4-O-sulfatase telle que décrite précédemment, peut être amplifié par PCR au moyen d'amorces spécifiques, puis purifié.

Il peut ensuite être introduit dans une cassette d'expression, au moyen d'enzymes de restriction spécifiques et d'une étape de ligation. L'invention concerne donc également une cassette d'expression d'une 4-O-sulfatase, comprenant un acide nucléique tel que décrit précédemment.

5 Tout acide nucléique selon l'invention peut être inséré dans un vecteur à des fins de clonage ou à des fins d'expression.

Selon un mode de réalisation avantageux, une cassette d'expression selon l'invention comprendra notamment les éléments suivants :

10 (1) des éléments de régulation de l'expression de l'acide nucléique à insérer, tels que des promoteurs et des « enhanceurs » ;

(2) la séquence codante comprise dans l'acide nucléique conforme à l'invention à insérer dans un tel vecteur, ladite séquence codante étant placée en phase avec les signaux de régulation décrits aux (1) ; et

(3) des séquences d'initiation et d'arrêt de la transcription appropriées.

15 Les différents modes de réalisation d'une cassette d'expression comprenant un acide nucléique selon l'invention sont décrits plus particulièrement en relation avec les vecteurs recombinants de l'invention qui comprennent au moins une cassette d'expression.

Vecteurs recombinants

20 Tout acide nucléique selon l'invention peut être inséré dans un vecteur à des fins de clonage ou à des fins d'expression.

Ladite cassette d'expression, ou bien directement ledit acide nucléique, peut ensuite être introduit(e) dans un vecteur recombinant, en vue de l'expression de la 4-O-sulfatase objet de l'invention dans une cellule hôte. L'invention concerne donc également un vecteur
25 recombinant, comprenant un acide nucléique tel que décrit précédemment ou une cassette d'expression telle que décrite précédemment.

L'invention est également relative à un vecteur recombinant comprenant un acide nucléique, ou une cassette d'expression, codant pour un polypeptide 4-O-sulfatase, un fragment ou un variant de ce polypeptide, éventuellement fusionné avec un polypeptide hétérologue et
30 pour lequel ledit acide nucléique a été artificiellement inséré dans le vecteur.

Avantageusement, un tel vecteur recombinant comprendra un acide nucléique choisi parmi les acides nucléiques suivants :

a) un acide nucléique codant pour un polypeptide ayant une séquence en acides aminés choisie dans le groupe des séquences SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 13 ou un fragment ou un
35 variant de ce polypeptide, éventuellement fusionné à un polypeptide hétérologue ;

b) un acide nucléique comprenant un polynucléotide choisi parmi les séquences SEQ ID N° 14 à SEQ ID N° 26, ou un fragment ou un variant de ce dernier ;

c) un acide nucléique ayant au moins 95% d'identité en nucléotides avec un acide nucléique choisi dans le groupe constitué des séquences SEQ ID N° 14 à SEQ ID N° 26 ou un fragment ou un variant de ce dernier ;

5 d) un acide nucléique hybridant, dans des conditions d'hybridation de forte stringence, avec un acide nucléique de séquences SEQ ID N° 14 à SEQ ID N° 26, ou un fragment ou un variant de ce dernier.

Par "vecteur" au sens de la présente invention on entendra une molécule d'ADN ou d'ARN circulaire ou linéaire qui est indifféremment sous forme de simple brin ou double brin.

10 Selon un premier mode de réalisation, un vecteur recombinant selon l'invention est utilisé afin d'amplifier l'acide nucléique qui y est inséré après transformation ou transfection de l'hôte cellulaire désiré.

Selon un second mode de réalisation, il s'agit de vecteurs d'expression comprenant, outre un acide nucléique conforme à l'invention, des séquences régulatrices permettant d'en diriger la transcription et/ou la traduction, c'est à dire les éléments polynucléotidiques constitutif
15 d'une cassette d'expression selon l'invention.

Selon un mode de réalisation avantageux, un vecteur recombinant selon l'invention comprendra notamment les éléments suivants, constitutifs d'une cassette d'expression selon l'invention:

20 (1) des éléments de régulation de l'expression de l'acide nucléique à insérer, tels que des promoteurs et des enhanceurs ;

(2) la séquence codante comprise dans l'acide nucléique conforme à l'invention à insérer dans un tel vecteur, ladite séquence codante étant placée en phase avec les signaux de régulation décrits aux (1) ; et

(3) des séquences d'initiation et d'arrêt de la transcription appropriées.

25 Les éléments de régulation de l'expression d'un polynucléotide codant une 4-O-sulfatase de l'invention englobent les promoteurs fonctionnels dans des cellules procaryotes et les promoteurs fonctionnels dans les cellules eucaryotes, y compris les promoteurs fonctionnels dans les cellules de levure, les promoteurs fonctionnels dans les cellules d'insecte et les promoteurs fonctionnels dans les cellules de mammifère. Les promoteurs englobent les
30 promoteurs constitutifs, les promoteurs inducibles et les promoteurs répressibles.

Les promoteurs fonctionnels dans les cellules procaryotes englobent le promoteur « int » du phage lambda, le promoteur CAT du gène de la chloramphenicol acétyl transférase, les promoteurs « droit » (P_R) et « gauche » (P_L) du bactériophage lambda, ainsi que les promoteurs trp, recA, lacZ, lacI et gal de *E. coli*, bien connus de l'homme du métier. De manière générale,
35 pour la sélection d'un promoteur fonctionnel dans les cellules eucaryotes, l'homme du métier peut se référer avantageusement à Glick (Glick, 1987, J. Ind. Microbiol., Vol. 1 : 277-282).

Pour une expression optimale du polynucléotide codant la 4-O-sulfatase de l'invention, la cassette d'expression ou le vecteur d'expression comprend aussi avantageusement un site de liaison aux ribosomes, qui est placé préférentiellement en amont, c'est à dire en 5', par
40 rapport au cadre de lecture ouvert codant la 4-O-sulfatase. Les sites de liaison aux ribosomes

englobent ceux décrits par Gold et al. (Gold et al., 1981, Ann. Rev. Microbiol., Vol . 35 : 365-404).

On précise que, dans certains modes de réalisation d'un vecteur recombinant selon l'invention, on insère dans un vecteur receveur un acide nucléique codant un polypeptide de l'invention, ledit vecteur receveur comprenant déjà un ou plusieurs des éléments choisis parmi les éléments de régulation, les séquences d'initiation et les séquences d'arrêt de la traduction ci-dessus. Dans ces modes de réalisation, la cassette d'expression ne préexiste pas dans l'acide nucléique qui est inséré dans le vecteur receveur. Dans ces modes de réalisation, la cassette d'expression est présente dans le vecteur recombinant, après insertion à l'endroit approprié de l'acide nucléique codant un polypeptide selon l'invention.

Dans d'autres modes de réalisation d'un vecteur recombinant selon l'invention, l'acide nucléique, qui peut être aussi appelé insert d'ADN, comprend ladite cassette d'expression. Dans ces modes de réalisation, l'insertion de l'insert d'ADN consiste en l'insertion de la cassette d'expression d'intérêt.

En outre, les vecteurs recombinants selon l'invention peuvent inclure une ou plusieurs origines de réplication chez les hôtes cellulaires dans lesquels leur amplification ou leur expression est recherchée, des gènes marqueurs ou des gènes marqueurs de sélection.

Dans une cassette d'expression ou dans un vecteur d'expression selon l'invention, le polynucléotide codant une 4-O-sulfatase est placé sous le contrôle (« operably linked to ») des différents éléments régulateurs de la transcription ou de la traduction.

Les polypeptides 4-O-sulfatase de l'invention consistent en des, ou proviennent de, polypeptides produits dans des cellules bactériennes. Les polypeptides de l'invention peuvent donc être produits sous forme recombinante sans inconvénient dans des cellules bactériennes. Du fait que ces polypeptides ne comprennent pas de motifs de glycosylation spécifiques, ils peuvent aussi être produits de manière tout à fait satisfaisante dans des cellules eucaryotes, y compris des cellules de levure ou des cellules de mammifère.

A titre d'exemple, les promoteurs bactériens englobent les promoteurs LacI, LacZ, les promoteurs de l'ARN polymérase du bactériophage T3 ou T7, les promoteurs PR, ou PL du phage lambda.

Les promoteurs pour cellules eucaryotes englobent le promoteur de la thymidine kinase du virus HSV ou encore le promoteur de la métallothionéine-L de souris.

De manière générale, pour le choix d'un promoteur adapté, l'homme du métier pourra avantageusement se référer à l'ouvrage de SAMBROOK et al. (Sambrook, J., Fritsch, E. F., and T. Maniatis, 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, New York.) précité ou encore aux techniques décrites par FULLER et al. (Fuller S.A. et al., 1996, *Immunology in Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al).

Les vecteurs bactériens préférés selon l'invention sont par exemple les vecteurs pBR322(ATCC37017) pUC18 (ATCC 37253), pUC19c (ATCC 37254), ou encore des vecteurs

tels que pAA223-3 (Pharmacia, Uppsala, Suède), et pGEM1 (Promega Biotech, Madison, WI, ETATS-UNIS).

On peut encore citer d'autres vecteurs commercialisés tels que les vecteurs pQE70, pQE60, pQE9 (Qiagen), psiX174, pBluescript SA, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A, pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXTI, pSG(Stratagene).

On peut aussi utiliser les vecteurs bactériens pRSF-1b, pRSF-2 Ek/LIC et pRSFDuet-1 commercialisés par la société Novagen (Nottingham, Royaume-Uni).

Il peut s'agir également de vecteurs de type *baculovirus* tel que le vecteur pVL1392/1393 (Pharmingen) utilisé pour transfecter les cellules de la lignée Sf9 (ATCC N°CRL 1711) dérivées de *Spodoptera frugiperda*.

Il peut encore s'agir de vecteurs adénoviraux tels que l'adénovirus humain de type 2 ou 5.

Un vecteur recombinant selon l'invention peut aussi être un vecteur rétroviral ou encore un vecteur adéno-associé (AAV). De tels vecteurs adéno-associés sont par exemple décrits par FLOTTE et al. (Flotte et al., 1992, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, Vol. 7 : 349-356), SAMULSKI et al. (Samulski et al., 1989, *J. Virol.*, Vol. 63 : 3822-3828), ou encore McLAUGHLIN BA et al. (Samulski et al., 1989, *J. Virol.*, Vol. 63 : 3822-3828).

A titre illustratif, on décrit dans les exemples la préparation d'un vecteur recombinant pour l'expression d'une 4-O-sulfatase dans *E. coli*.

Dans certains modes de réalisation d'un vecteur d'expression recombinant selon l'invention, ledit vecteur d'expression recombinant comprend dans sa séquence à la fois (i) une cassette d'expression codant la 4-O-sulfatase et (ii) une cassette d'expression codant un enzyme de maturation du type « anSME ». La transfection de cellules bactériennes, et en particulier de cellules de *E. coli*, avec de tels vecteurs recombinants, permet de réaliser de manière autonome, c'est-à-dire indifféremment du type de cellule bactérienne transfectée, la production de la 4-O-sulfatase d'intérêt et son activation par maturation à l'aide de l'enzyme anSME qui est simultanément produite dans la même cellule bactérienne.

Un mode de réalisation d'un vecteur d'expression recombinant comprenant à la fois (i) une cassette d'expression codant la 4-O-sulfatase et (ii) une cassette d'expression codant un enzyme de maturation du type « anSME » est illustré dans les exemples. Il s'agit du vecteur désigné « pRSF-4Sulf-anSME » de séquence SEQ ID N° 53, dont la structure générale est décrite dans la figure 4.

Cellules hôtes recombinantes

L'invention concerne aussi une cellule hôte recombinante qui a été artificiellement transfectée ou transformée par un acide nucléique ou par un vecteur recombinant tels que définis ci-dessus.

De préférence, une cellule hôte recombinante selon l'invention est une cellule eucaryote, et de manière tout à fait préférée une cellule hôte recombinante humaine.

Les cellules hôtes préférées selon l'invention sont par exemple les suivantes :

a) cellules hôtes procaryotes: souches d'*Escherichia coli*, de *Bacillus subtilis*, de *Salmonella typhimurium*, ou encore des souches d'espèces telles que *Pseudomonas*, *Streptomyces* et *Staphylococcus*. On peut aussi utiliser une bactérie choisie parmi *Bacillus subtilis* (Palva et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582 ; EP 0 036 259 et EP 0 063 953; WO 84/04541) ; *Escherichia coli* (Shimatake et al. (1981) Nature 292:128; Amann et al. (1985) Gene 40:183; Studier et al. (1986) J. Mol. Biol. 189:113; EP 0 036 776, EP 0 136 829 et EP 0 136 907) ; *Streptococcus cremoris* (Powell et al. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655] ; *Streptococcus lividans* [Powell et al. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655] ; *Streptomyces lividans* (US 4,745,056)

b) cellules hôtes eucaryotes: cellules HeLa (ATCC N°CCL2), cellules Cv 1 (ATCC N°CCL70), cellules COS (ATCC N°CRL 1650), cellules Sf-9 (ATCC N°CRL 1711), cellules CHO (ATCC N°CCL-61) ou encore cellules 3T3 (ATCC N°CRL-6361). On peut aussi utiliser les cellules hôtes eucaryotes suivantes : BHK (Baby Hamster Kidney) et notamment BHK tk^{ts}13 (CRL 10314, Waechter and Baserga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:1106-1110, 1982), CHO (ATCC CCL 61), COS-1 (ATCC CRL 1650), HEK293 (ATCC CRL 1573; Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36:59-72, 1977), Rat Hep I (Rat hepatoma; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (Rat hepatoma; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), Human lung (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1) and DUKX cells (CHO cell line) (Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, 1980), cellules YB2/0, cellules 3T3, cellules Namalwa, ou des cellules BHK adaptées à la culture sans sérum (Document US 6,903,069). On peut aussi utiliser des cellules de levures choisies parmi *Candida* (Kurtz et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:142; Kunze et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25:141) ; *Hansenula* (Gleeson et al. (1986) J. Gen. Microbiol. 132:3459; Roggenkamp et al. (1986) Mol. Gen. Genet. 202:302) ; *Kluyveromyces* (Das et al. (1984) J. Bacteriol. 158:1165; De Louvencourt et al. (1983) J. Bacteriol. 154:1165; Van den Berg et al. (1990) Bio/Technology 8:135) ; *Pichia* (Cregg et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:3376; Kunze et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25:141; U.S. Pat. Nos. 4,837,148 and 4,929,555) ; *Saccharomyces* (Hinnen et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929; Ito et al. (1983) J. Bacteriol. 153:163) ; *Schizosaccharomyces* (Beach and Nurse (1981) Nature 300:706) ; *Yarrowia* (Davidow et al. (1985) Curr. Genet. 10:39; Gaillardin et al. (1985) Curr. Genet. 10:49).

Par « polypeptide recombinant », on désigne tout polypeptide selon l'invention obtenu à partir d'une cellule transformée ou d'un organisme génétiquement modifié, c'est à dire à partir d'un microorganisme, ou d'une cellule eucaryote, y compris des cellules de levure, des cellules d'insecte, des cellules de mammifère ou encore des cellules végétales.

Ainsi, un polypeptide recombinant de l'invention est issu de la transcription puis de la traduction d'une molécule d'ADN codant pour ledit polypeptide selon l'invention et produit par une cellule recombinante. Ainsi un polypeptide recombinant de l'invention peut être obtenu au moyen de techniques standard, bien connues de l'homme du métier, permettant l'expression d'une protéine recombinante dans un système biologique.

La présente invention concerne également un procédé de fabrication d'un polypeptide recombinant selon la présente invention comprenant les étapes suivantes :

a) transformation d'une cellule hôte avec un acide nucléique codant pour un polypeptide tel que défini dans la présente description,

b) mise en culture de la cellule transformée obtenue à l'étape a) de manière à ce que la cellule exprime ledit polypeptide recombinant, et

c) purification dudit polypeptide recombinant exprimé par la cellule transformée mise en culture à l'étape b).

La cellule transformée est mise en culture dans un milieu approprié lui permettant d'exprimer un polypeptide selon l'invention. Les milieux de cultures utilisés sont choisis à dessein par l'homme du métier en fonction des cellules cultivées. Des milieux appropriés pour la culture cellulaire comprennent l'IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium), le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), le RPMI 1640 ou autres. Ces milieux de culture sont composés pour l'essentiel de sels inorganiques, d'acides aminés, de vitamines et d'autres composants, notamment le glucose pour son apport énergétique et l'HEPES pour son pouvoir tampon, des compléments de base tels que notamment des acides aminés, des minéraux, des éléments traces, des compléments moléculaires spécifiques de la croissance et des activités métaboliques pour chaque type cellulaire cultivé etc.

L'expression de la 4-O-sulfatase objet de l'invention par les techniques de génie génétique décrites ci-dessus permet d'obtenir, après purification par des méthodes classiques connues de l'homme du métier, soit une 4-O-sulfatase purifiée telle que décrite précédemment, soit une composition comprenant une 4-O-sulfatase telle que décrite précédemment.

Dans certains modes de réalisation de cellules hôtes recombinantes selon l'invention, lesdites cellules hôtes sont transfectées à la fois avec (i) une cassette d'expression codant la 4-O-sulfatase et (ii) une cassette d'expression codant un enzyme de maturation du type « anSME ». En particulier, si un mutant « cysteine » de la 4-O-sulfatase est utilisé, lesdites cellules hôtes peuvent être transfectées à la fois avec (i) une cassette d'expression codant le variant de la 4-O-sulfatase et (ii) une cassette d'expression codant un enzyme de maturation du type « anSME » ou FGE (Dierks et al. 2005 *Cell* 121, 541-552 ; Carlson et al. 2008 *J Biol Chem* 283, 20117-20125). Selon une première alternative, chacune des deux cassettes d'expression est comprise dans un vecteur spécifique et la cellule hôte recombinante de l'invention est obtenue après transfection par chacun des deux vecteurs d'expression distincts. Selon une seconde alternative, les deux cassettes d'expression sont insérées de manière appropriée dans le même vecteur récepteur, pour obtenir un vecteur recombinant dans lequel sont présentes les deux cassettes d'expression, ledit vecteur final étant ensuite utilisé pour transfecter des cellules hôtes et obtenir des cellules hôtes recombinantes selon l'invention. Cette seconde alternative est illustrée dans les exemples.

Utilisation d'un polypeptide ou d'un acide nucléique selon l'invention

Comme cela a été décrit précédemment dans la présente description, la 4-*O*-sulfatase objet de l'invention peut être notamment utilisée comme outil d'ingénierie des GAGs.

5 L'action de la 4-*O*-sulfatase objet de l'invention est décrite dans la Figure 2. Il s'agit d'une action de désulfatation sélective en position 4 d'un cycle osidique d'un GAG.

Dans certains modes de réalisation de l'invention, la 4-*O*-sulfatase purifiée objet de l'invention, ou bien la composition comprenant une 4-*O*-sulfatase telle que décrite précédemment, est utilisée dans un procédé de synthèse d'un GAG.

10 De préférence, le GAG que l'on souhaite synthétiser est un disaccharide de chondroïtine.

Un exemple d'utilisation d'une 4-*O*-sulfatase purifiée objet de l'invention dans un procédé de synthèse d'un disaccharide de chondroïtine est donné dans l'exemple 4.

15 Dans d'autres modes de réalisation de l'invention, la 4-*O*-sulfatase purifiée objet de l'invention, ou bien la composition comprenant une 4-*O*-sulfatase telle que décrite précédemment, est utilisée dans un procédé de détermination de la présence d'un GAG 4-*O*-sulfaté dans un échantillon.

Par « échantillon », on entend au sens de l'invention une solution contenant au moins un GAG.

20 De préférence, le GAG 4-*O*-sulfaté dont on souhaite déterminer la présence dans un échantillon est un disaccharide de chondroïtine.

Un exemple d'utilisation d'une 4-*O*-sulfatase purifiée objet de l'invention dans un procédé de détermination de la présence d'un disaccharide de chondroïtine 4-*O*-sulfaté dans un échantillon est donné dans l'exemple 5.

25 L'invention concerne également un procédé de synthèse d'un GAG, comprenant une étape de réaction d'un GAG avec une 4-*O*-sulfatase telle que décrite précédemment. Ladite 4-*O*-sulfatase peut être comprise dans une composition telle que décrite plus haut.

L'invention est donc aussi relative à un procédé de synthèse d'un composé GAG comprenant les étapes suivantes :

- 30 a) fournir un composé précurseur du GAG désiré, ledit composé précurseur consistant en un GAG comprenant au moins un groupe *O*-sulfate en position 4 dans au moins une unité osidique constitutive dudit GAG,
b) incuber ledit précurseur de GAG avec une 4-*O*-sulfatase de l'invention,
c) récupérer le produit GAG final.

35 Le composé précurseur du GAG utilisé est un précurseur comportant des fonctions alcools sulfatées sur les cycles osidiques, que l'on veut spécifiquement désulfater en position 4. Dans ce cas, on mettra en œuvre une étape de désulfatation sélective dudit précurseur en l'incubant avec la 4-*O*-sulfatase de l'invention.

Par « précurseur », on entend au sens de l'invention un motif osidique comportant de une à plus de 100 unités osidiques présentes ou non naturellement dans les GAGs et dans lequel au moins une unité osidique comprend un groupe O-sulfate en position 4.

De préférence, le GAG que l'on souhaite synthétiser est un disaccharide de chondroïtine, désulfaté en position 4 des unités osidiques qui le constituent. De même, de préférence, le composé GAG précurseur que l'on fait réagir avec une 4-O-sulfatase telle que décrite précédemment est un disaccharide de chondroïtine.

A l'étape a), le composé précurseur de GAG se présente de préférence sous la forme d'une solution contenant ledit précurseur sous forme dissoute, à une concentration finale appropriée pour réaliser la réaction de désulfatation en présence de la 4-O-sulfatase. La concentration finale de composé précurseur déterminera notamment la durée nécessaire à l'hydrolyse complète des groupes 4-O-sulfates des molécules du composé précurseur de GAG par la 4-O-sulfatase.

A l'étape b), on incube le composé précurseur de GAG avec la 4-O-sulfatase qui est à une concentration finale appropriée pour réaliser l'hydrolyse des groupes 4-O-sulfates des molécules du composé précurseur de GAG.

Lorsque, à l'étape b) du procédé de synthèse de GAGs ci-dessus, on utilise la 4-O-sulfatase sous forme concentrée, c'est-à-dire à une concentration finale supérieure à 1mg/ml, on obtient à l'étape c) un GAG produit final dont tous les groupes sulfate en position 4 des unités osidiques ont été hydrolysés.

Lorsque, à l'étape b) du procédé de synthèse GAGs ci-dessus, on utilise la 4-O-sulfatase à faible concentration, c'est-à-dire à une concentration inférieure à 0.5mg/ml, on obtient à l'étape c) un GAG produit final désulfaté en position 4 seulement sur les unités osidiques non sulfatées en position 6. La durée de l'étape b) varie avec (i) la concentration finale en composé précurseur de GAG et (ii) la concentration finale de 4-O-sulfatase.

L'étape de désulfatation sélective d'un GAG par une 4-O-sulfatase telle que décrite précédemment peut être réalisée notamment dans les conditions opératoires suivantes : 1µL de la solution enzymatique de 4-O-sulfatase est ajouté à une solution de tampon Tris/HCl 34 mM pH 7.5 contenant l'oligosaccharide ou les oligosaccharides à désulfater. L'incubation est effectuée à 25°C. A des intervalles réguliers des prélèvements sont effectués. De préférence, le mélange réactionnel est analysé en continu pour contrôler le taux de désulfatation. La réaction est alors arrêtée lorsqu'il n'y a plus d'évolution des produits dans le mélange réactionnel.

Dans certains modes de réalisation, on analyse à l'étape b) la composition en composés GAGs du mélange réactionnel, afin de suivre le degré d'avancement de l'hydrolyse des groupes sulfate en position 4 et ainsi stopper la réaction lorsque les résultats d'analyse ont révélé que la totalité des molécules du composé précurseur de GAG ont été enzymatiquement transformées. L'analyse du mélange réactionnel, au cours de l'étape b) du procédé de synthèse ci-dessus, peut être effectuée selon la technique d'électrophorèse capillaire, qui est décrite ci-dessous pour la mise en œuvre d'un procédé de détermination de la présence d'un GAG 4-O-sulfaté dans un échantillon.

A l'étape c), le produit GAG final est préférentiellement récupéré par purification, selon toute technique connue de purification bien connue de l'homme du métier.

Comme cela est décrit ci-après, on peut utiliser une 4-O-sulfatase de l'invention dans un procédé d'analyse d'une composition comprenant des composés GAGs, et plus particulièrement dans un procédé de détermination de la présence de composés GAGs 4-O-sulfatés dans une telle composition.

L'invention concerne également un procédé de détermination de la présence d'un GAG 4-O-sulfaté dans un échantillon, comprenant les étapes suivantes :

(a) la mise en contact de l'échantillon avec une 4-O-sulfatase telle que décrite précédemment, et

(b) l'analyse du produit obtenu en présence d'une quantité efficace d'enzyme.

Par « quantité efficace », on entend au sens de l'invention une quantité appropriée d'enzyme, aisément déterminable par l'homme du métier, permettant l'élimination de plus de 5% des groupements sulfate par rapport au contrôle incubé sans enzyme.

Ladite 4-O-sulfatase peut être comprise dans une composition telle que décrite plus haut.

De préférence, le GAG 4-O-sulfaté dont on souhaite déterminer la présence dans un échantillon est un disaccharide de chondroïtine.

L'étape (b) dudit procédé peut être mise en œuvre selon n'importe quelle technique d'analyse connue de l'homme du métier spécialiste de la chimie des sucres.

Dans certains modes de réalisation préférés de l'invention, l'analyse du produit obtenu dans l'étape (a) dudit procédé est effectuée par spectrométrie de masse, par électrophorèse capillaire, chromatographie couche mince, HPLC, RMN ou tout autre type d'analyses. Les caractéristiques et avantages de l'invention ressortiront mieux des exemples qui suivent, donnés à titre illustratif et non limitatif.

On décrit dans les exemples un procédé de détermination de la présence d'un composé GAG 4-O-sulfaté dans lequel l'étape b) consiste en une analyse du mélange réactionnel selon la technique d'électrophorèse capillaire, avec détection des pics à la longueur d'onde de 200 nanomètres.

EXEMPLES

Exemple 1 : Clonage et expression d'une 4-O-sulfatase purifiée.

Un volume de 1 µL d'ADN génomique de *B. thetaiotaomicron* VPI-5482 a été mélangé à deux amorces nucléotidiques (10 µM) ciblant spécifiquement le gène BT3349 (Seq ID N°1) selon un protocole standard, en utilisant la paire d'amorces suivante :

- Amorce aller : GGA TCC A ATG GGA GGC TTG ACC CTC TTT GCA GCG (SEQ ID N° 27)

- Amorce Retour : CTG CAG TCA GTA AGG TAT ACG GTC CGA AAG (SEQ ID N° 28)

Dans l'amorce SEQ ID N° 27, la séquence « GGATCC » de l'amorce Aller ci-dessus permet la réalisation d'un amplicon qui peut être ensuite introduit au niveau d'un site de

restriction BamHI présente dans un polysite de clonage d'un vecteur de clonage ou d'expression.

Dans l'amorce SEQ ID N° 28, la séquence « CTGCAG » de l'amorce Retour ci-dessus permet la réalisation d'un amplicon qui peut être ensuite introduit au niveau d'un site de restriction PSTI présente dans un polysite de clonage d'un vecteur de clonage ou d'expression.

Le cycle d'amplification suivant a été réalisé : 1min de dénaturation à 95°C, 1min d'hybridation à 55°C et 1min30 d'élongation à 72°C, ledit cycle étant répété 25 fois.

A l'issue de ces 25 cycles d'amplification, une dernière étape d'élongation à 72°C pendant 10 minutes a été réalisée. Le produit de PCR ainsi obtenu a été purifié à l'aide du kit « QIAquick PCR Purification Kit » de la Société Qiagen (Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fabricant.

L'ADN ainsi amplifié a été ligué dans un plasmide pGEMT selon le kit pGEMT-Easy (Promega). Après transformation de *E. coli* DH5 α , plusieurs transformants ont été sélectionnés sur milieu LB + Ampicilline (100 μ g/ml) et les plasmides ont été extraits et séquencés selon les techniques classiques de biologie moléculaire.

Un plasmide contenant la séquence SEQ ID N° 14 et les deux sites de restriction a été ensuite digéré par les enzymes BamHI/PstI et le gène de sulfatase ainsi digéré a été purifié sur gel d'agarose en utilisant le kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) selon les instructions du fabricant.

L'amplicon a ensuite été cloné dans le site 1 d'un vecteur pRSF dans lequel avait déjà été inséré l'acide nucléique codant pour une anSME dans le site 2, selon la même procédure que le gène de 4-O-sulfatase. Ainsi soit l'anSME de *Clostridium perfringens* soit l'anSME de *B. thetaiotaomicron* décrites dans Benjdia et al., 2008, J Biol Chem, Vol. 283 (26) : 17815-17826 ont été utilisées pour activer avec succès la 4-O-sulfatase (Voir Figure 4).

La carte du vecteur recombinant final comprenant (i) une cassette d'expression codant la 4-O-sulfatase de séquence SEQ ID N°1 et (ii) une cassette d'expression codant l'enzyme anSME est représentée sur la Figure 4. La séquence du vecteur est la séquence SEQ ID N° 53.

Le vecteur recombinant final, désigné pRSF-4Sulf-anSME, a été utilisé pour transfecter des cellules de *E. coli* de la souche BL21(DE3) (Andreishcheva et al., 2006, Gene, Vol. 384 : 113-119) exprimant le gène de la polymérase T7, selon un protocole standard décrit dans (Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.), ce qui permet l'expression des deux gènes clonés respectivement dans les sites 1 et 2.

En réalisant une analyse sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes selon le protocole de Laemmli (gel SDS PAGE 12%), on a démontré l'expression à la fois de la 4-O-sulfatase et de l'anSME, comme cela a été illustré sur la Figure 5.

La 4-O-sulfatase recombinante produite par les cellules recombinantes de *E. coli* BL21(DE3) obtenues comme cela est décrit ci-dessus a été purifiée grâce à son tag histidine (6-His) sur une colonne de Ni NTA agarose (Qiagen) selon les recommandations du fabricant.

La sulfatase a été éluée spécifiquement en appliquant un tampon Tris/HCl pH 7.5 contenant 500 mM d'imidazole.

Exemple 2 : Identification d'une famille de 4-O-sulfatase

Le demandeur a identifié une famille de polypeptides possédant au moins 50% d'identité en acides aminés avec la 4-O-sulfatase de *Bacteroides thetaiotaomicron* de séquence SEQ ID N° 1. Il s'agit des polypeptides de séquences SEQ ID N° 2 à SEQ ID N° 13.

Un alignement des séquences des polypeptides SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 13 est représenté sur la Figure 13 (Figures 13-1 à 13-8).

Exemple 3 : Détermination de l'action de la 4-O-sulfatase objet de l'invention

On a utilisé la 4-O-sulfatase de séquence SEQ ID N°1 recombinante produite par les cellules recombinantes de *E. coli* obtenues comme cela est décrit à l'exemple 1 ci-dessus, puis purifiée.

L'activité et la spécificité de la 4-O-sulfatase recombinante purifiée a été testée sur une variété de disaccharides de chondroïtine sulfate ayant des profils distincts de sulfatation.

On a utilisé respectivement la chimiothèque 2 {1-4} et la chimiothèque 3 {1-4} décrite par Lubineau et al. (Lubineau et al., 1999, Eur J Org Chem, : 2523-2532).

La composition de chacune des chimiothèques 2 {1-4} et 3 {1-4} est illustrée dans la Figure 1 de Lubineau et al. (1999), qui est reproduite dans la Figure 6 de la présente description.

Les 4 composés disaccharidiques de type chondroïtine sulfate contenus dans les Chimiothèques 2 {1-4} et 3 {1-4} ont été séparés et identifiés par électrophorèse capillaire, en utilisant un appareil Agilent équipé d'un capillaire de 72 cm de longueur, de diamètre intérieur 50 µm. Le capillaire est lavé avec de la soude 1N, de l'eau et rempli avec du tampon borate 20 mM à pH 9,3. L'essai d'électrophorèse est réalisé en appliquant un voltage constant de 30 kV. La détection des pics est suivie à la longueur d'onde de 200 nm. Pour la séparation des produits composant les chimiothèques, on injecte de 1 à 2 nanolitres d'une solution à 1 mg/ml des composés de la chimiothèque 2 {1-4} ou de la chimiothèque 3 {1-4}

La Figure 7 illustre le profil de séparation et l'identification des 4 composés disaccharidiques contenus dans la Chimiothèque 2 {1-4}.

La Figure 8 illustre le profil de séparation et l'identification des 4 composés disaccharidiques contenus dans la Chimiothèque 3 {1-4}.

Spécificité de la 4-O-sulfatase

Les essais de réaction enzymatique ont été réalisés avec 6 microlitres d'une solution de 2 {1-4} ou 3 {1-4} à 15 mg/mL, 68 microlitres de tampon Tris 34 mM pH7.5 et 1 microlitre de la solution enzymatique de 4-O-sulfatase recombinante.

Pour les essais, la 4-O-sulfatase a été utilisée sous forme purifiée 25 µM et sous une forme diluée 50 fois dans une solution tampon Tris pH 7.4.

Les résultats sont illustrés dans les figures 9 à 12 :

- La figure 9 illustre le profil de composés obtenus après avoir soumis les composés de la Chimiothèque 2 {1-4} à l'action de la 4-*O*-sulfatase sous une forme concentrée,
- La figure 10 illustre le profil de composés obtenus après avoir soumis les composés de la Chimiothèque 3 {1-4} à l'action de la 4-*O*-sulfatase sous une forme concentrée,
- La figure 11 illustre le profil de composés obtenus après avoir soumis les composés de la Chimiothèque 2 {1-4} à l'action de la 4-*O*-sulfatase sous une forme diluée 50 fois,
- La figure 12 illustre le profil de composés obtenus après avoir soumis les composés de la Chimiothèque 3 {1-4} à l'action de la 4-*O*-sulfatase sous une forme diluée 50 fois.

Lorsque l'enzyme est utilisée non diluée, on constate la disparition de tous les composés sulfatés en 4 qu'ils soient sulfatés ou non en 6 et/ou 2, comme cela est illustré dans les figures 9 et 10.

Lorsque l'enzyme est diluée 50 fois, seuls les composés sulfatés en 4, n'ayant pas de sulfate en 6 mais qu'ils soient ou non sulfatés en 2 sont désulfatés ; comme cela est illustré dans les Figures 11 et 12.

Les résultats présentés dans cet exemple montrent que la sulfatase clonée et purifiée, après activation par l'enzyme anSME, catalyse spécifiquement l'hydrolyse des groupements sulfate portés sur les résidus de *N*-acétyl-galactosamine en position 4.

En revanche, cette enzyme est inactive vis-à-vis des résidus en position 6 et 2.

L'enzyme ainsi identifiée présente donc une spécificité stricte vis-à-vis de la position 4 et constitue une nouvelle enzyme capable de modifier sélectivement les GAGs.

Ainsi, afin de vérifier la spécificité de la 4-*O*-sulfatase objet de l'invention, différents disaccharides de chondroïtines représentant les différentes combinaisons possibles de sulfatation ont été mis en contact avec la 4-*O*-sulfatase purifiée objet de l'invention.

La Figure 3 rappelle la série des oligosaccharides testés dans cet exemple et précise l'action de la 4-*O*-sulfatase objet de l'invention qui a été observée sur ceux-ci.

Le schéma de la Figure 3 rappelle les résultats ci-dessus, à savoir que la 4-*O*-sulfatase objet de l'invention est incapable de désulfater les fonctions alcool sulfatées présentes en position 2 et 6 sur les disaccharides de chondroïtines. En revanche, elle permet de désulfater sélectivement la fonction alcool présente en position 4 sur les disaccharides de chondroïtines.

Exemple 4 : Utilisation d'une 4-*O*-sulfatase purifiée dans un procédé de synthèse d'un disaccharide de chondroïtine

Un composé disaccharidique de type chondroïtine sulfate synthétisé comme décrit par Lubineau et al est mis en présence d'une solution de 4-*O*-sulfatase dans du tampon Tris/HCl 34 mM pH 7.5, à 25 °C. La réaction de désulfatation est suivie par électrophorèse capillaire, en utilisant un appareil Agilent équipé d'un capillaire de 72 cm de longueur, de diamètre intérieur

50 µm. Le capillaire est lavé avec de la soude 1N, de l'eau et rempli avec du tampon borate 20 mM à pH 9,3. L'essai d'électrophorèse est réalisé en injectant 1 nanolitre du mélange enzymatique et en appliquant un voltage constant de 30 kV. La détection des pics est suivie à la longueur d'onde de 200 nm.

- 5 Tous les composés possédant un sulfate en position 4 du résidu *N*-acétylglucosamine sont désulfatés quand l'enzyme est utilisée très concentrée. Lorsque l'enzyme est diluée 50 fois, seuls les composés n'ayant pas de sulfate en 6 perdent le sulfate en 4.

Exemple 5 : Utilisation d'une 4-O-sulfatase purifiée dans un procédé de détermination de la présence d'un disaccharide de chondroïtine 4-O-sulfaté dans un échantillon

- 10 Les Chimiothèques **2** {1-4} et **3** {1-4} composées de quatre disaccharides dont deux seulement sont sulfatés en position 4 de la *N*-acétylglucosamine sont soumis à l'action de la 4-O-sulfatase. Les essais de réaction enzymatique ont été réalisés avec 6 microlitres d'une solution de **2** {1-4} ou **3** {1-4} à 15 mg/mL, 68 microlitres de tampon Tris 34 mM pH7.5 et 1
15 microlitre de la 4-O-sulfatase recombinante. La réaction est analysée par électrophorèse capillaire, en utilisant un appareil Agilent équipé d'un capillaire de 72 cm de longueur, de diamètre intérieur 50 µm. Le capillaire est lavé avec de la soude 1N, de l'eau et rempli avec du tampon borate 20 mM à pH 9,3. L'essai d'électrophorèse est réalisé en appliquant un voltage constant de 30 kV après injection de 1 nanolitre de la réaction. La détection des pics est suivie
20 à la longueur d'onde de 200 nm.

Comme montré dans les Figures 9 et 10, seuls les produits possédant un sulfate en 4 de la position *N*-acétylglucosamine sont désulfatés. L'enzyme est capable dans un mélange de plusieurs composés de ne désulfater que les composés possédant un sulfate en 4 de la *N*-acétylglucosamine.

Tableau 1 : Séquences

SEQ ID N°	Type	Description
1	polypeptide	4-O-sulfatase NP 812261
2	polypeptide	4-O-sulfatase ZP 01959927
3	polypeptide	4-O-sulfatase ZP 03677283
4	polypeptide	4-O-sulfatase ZP 03207093
5	polypeptide	4-O-sulfatase ZP 02064997
6	polypeptide	4-O-sulfatase ZP 04547232.1
7	polypeptide	4-O-sulfatase ZP 02031487
8	polypeptide	4-O-sulfatase ZP 03013818
9	polypeptide	4-O-sulfatase ZP 04846309
10	polypeptide	4-O-sulfatase ZP 03478349
11	polypeptide	4-O-sulfatase ZP 02436215
12	polypeptide	4-O-sulfatase ZP 03460590
13	polypeptide	4-O-sulfatase AAO 08013
14	Acide nucléique	code le polypeptide de séquence SEQ ID N° 1
15	Acide nucléique	code le polypeptide de séquence SEQ ID N° 2
16	Acide nucléique	code le polypeptide de séquence SEQ ID N° 3
17	Acide nucléique	code le polypeptide de séquence SEQ ID N° 4
18	Acide nucléique	code le polypeptide de séquence SEQ ID N° 5
19	Acide nucléique	code le polypeptide de séquence SEQ ID N° 6
20	Acide nucléique	code le polypeptide de séquence SEQ ID N° 7
21	Acide nucléique	code le polypeptide de séquence SEQ ID N° 8
22	Acide nucléique	code le polypeptide de séquence SEQ ID N° 9
23	Acide nucléique	code le polypeptide de séquence SEQ ID N° 10
24	Acide nucléique	code le polypeptide de séquence SEQ ID N° 11
25	Acide nucléique	code le polypeptide de séquence SEQ ID N° 12
26	Acide nucléique	code le polypeptide de séquence SEQ ID N° 13
27	Acide nucléique	Amorce BT3349 Aller pour SEQ ID N° 1
28	Acide nucléique	Amorce BT3349 Retour pour SEQ ID N° 1
29	Acide nucléique	Amorce Aller pour SEQ ID N° 2
30	Acide nucléique	Amorce Retour pour SEQ ID N° 2
31	Acide nucléique	Amorce Aller pour SEQ ID N° 3
32	Acide nucléique	Amorce Retour pour SEQ ID N° 3
33	Acide nucléique	Amorce Aller pour SEQ ID N° 4
34	Acide nucléique	Amorce Retour pour SEQ ID N° 4
35	Acide nucléique	Amorce Aller pour SEQ ID N° 5
36	Acide nucléique	Amorce Retour pour SEQ ID N° 5

SEQ ID N°	Type	Description
37	Acide nucléique	Amorce Aller pour SEQ ID N° 6
38	Acide nucléique	Amorce Retour pour SEQ ID N° 6
39	Acide nucléique	Amorce Aller pour SEQ ID N° 7
40	Acide nucléique	Amorce Retour pour SEQ ID N° 7
41	Acide nucléique	Amorce Aller pour SEQ ID N° 8
42	Acide nucléique	Amorce Retour pour SEQ ID N° 8
43	Acide nucléique	Amorce Aller pour SEQ ID N° 9
44	Acide nucléique	Amorce Retour pour SEQ ID N° 9
45	Acide nucléique	Amorce Aller pour SEQ ID N° 10
46	Acide nucléique	Amorce Retour pour SEQ ID N° 10
47	Acide nucléique	Amorce Aller pour SEQ ID N° 11
48	Acide nucléique	Amorce Retour pour SEQ ID N° 11
49	Acide nucléique	Amorce Aller pour SEQ ID N° 12
50	Acide nucléique	Amorce Retour pour SEQ ID N° 12
51	Acide nucléique	Amorce Aller pour SEQ ID N° 13
52	Acide nucléique	Amorce Retour pour SEQ ID N° 13
53	Acide nucléique	Séquence du plasmide prSF-4Sulf-anSME exprimant la 4-O-sulfatase de séquence SEQ ID N° 1 et une enzyme de maturation (anSME)

REVENDICATIONS

1. 4-*O*-sulfatase recombinante, comprenant un polypeptide ayant au moins 50% d'identité en acides aminés avec le polypeptide de séquence SEQ ID N°1.

2. 4-*O*-sulfatase selon la revendication 1, comprenant un polypeptide choisi parmi
5 les polypeptides de séquences SEQ ID N°1 à 13.

3. 4-*O*-sulfatase selon la revendication 1 ou 2, comprenant un polypeptide de séquence SEQ ID N°1.

10 4. Composition comprenant une 4-*O*-sulfatase selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

5. Cassette d'expression d'une 4-*O*-sulfatase, comprenant un acide nucléique choisi parmi :

15 a) un acide nucléique codant une 4-*O*-sulfatase selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, ou un acide nucléique de séquence complémentaire,

b) un acide nucléique codant une 4-*O*-sulfatase selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou un acide nucléique de séquence complémentaire, comprenant un polynucléotide de séquence SEQ ID N° 14 à SEQ ID N° 26 ou un acide nucléique de séquence
20 complémentaire.

6. Vecteur recombinant, comprenant un acide nucléique tel que décrit dans la revendication 5 ou une cassette d'expression selon la revendication 5.

25 7. Cellule hôte eucaryote ou procaryote, transformée par un acide nucléique tel que décrit dans la revendication 5, par une cassette d'expression selon la revendication 5, ou par un vecteur recombinant selon la revendication 6.

8. Utilisation d'une 4-*O*-sulfatase selon l'une quelconque des revendications 1 à 3
30 ou d'une composition selon la revendication 4, dans un procédé de synthèse d'un glycosaminoglycane.

9. Utilisation d'une 4-*O*-sulfatase selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou d'une composition selon la revendication 4, dans un procédé de détermination de la
35 présence d'un glycosaminoglycane 4-*O*-sulfaté dans un échantillon.

10. Utilisation selon la revendication 8 ou 9, dans laquelle le glycosaminoglycane est un disaccharide de chondroïtine.

5 11. Procédé de synthèse d'un glycosaminoglycane, comprenant une étape de réaction d'un glycosaminoglycane avec une 4-*O*-sulfatase selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

10 12. Procédé selon la revendication 11, dans lequel l'étape de réaction est une étape de sulfatation sélective ou une étape de désulfatation sélective.

13. Procédé de détermination de la présence d'un glycosaminoglycane 4-*O*-sulfaté dans un échantillon, comprenant (a) la mise en contact de l'échantillon avec une 4-*O*-sulfatase selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, puis (b) l'analyse du produit obtenu.

15 14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, dans lequel le glycosaminoglycane est un disaccharide de chondroïtine.

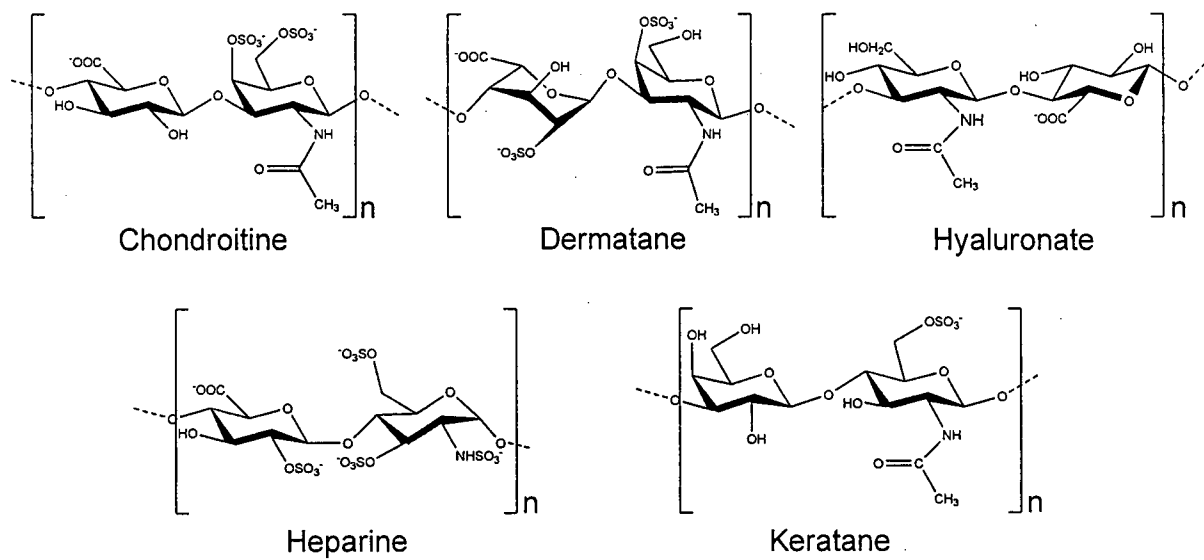
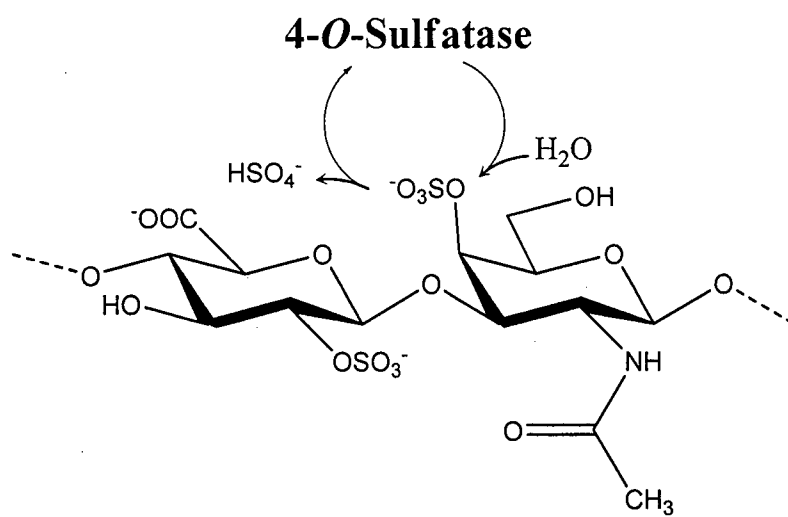


Figure 1

**Figure 2**

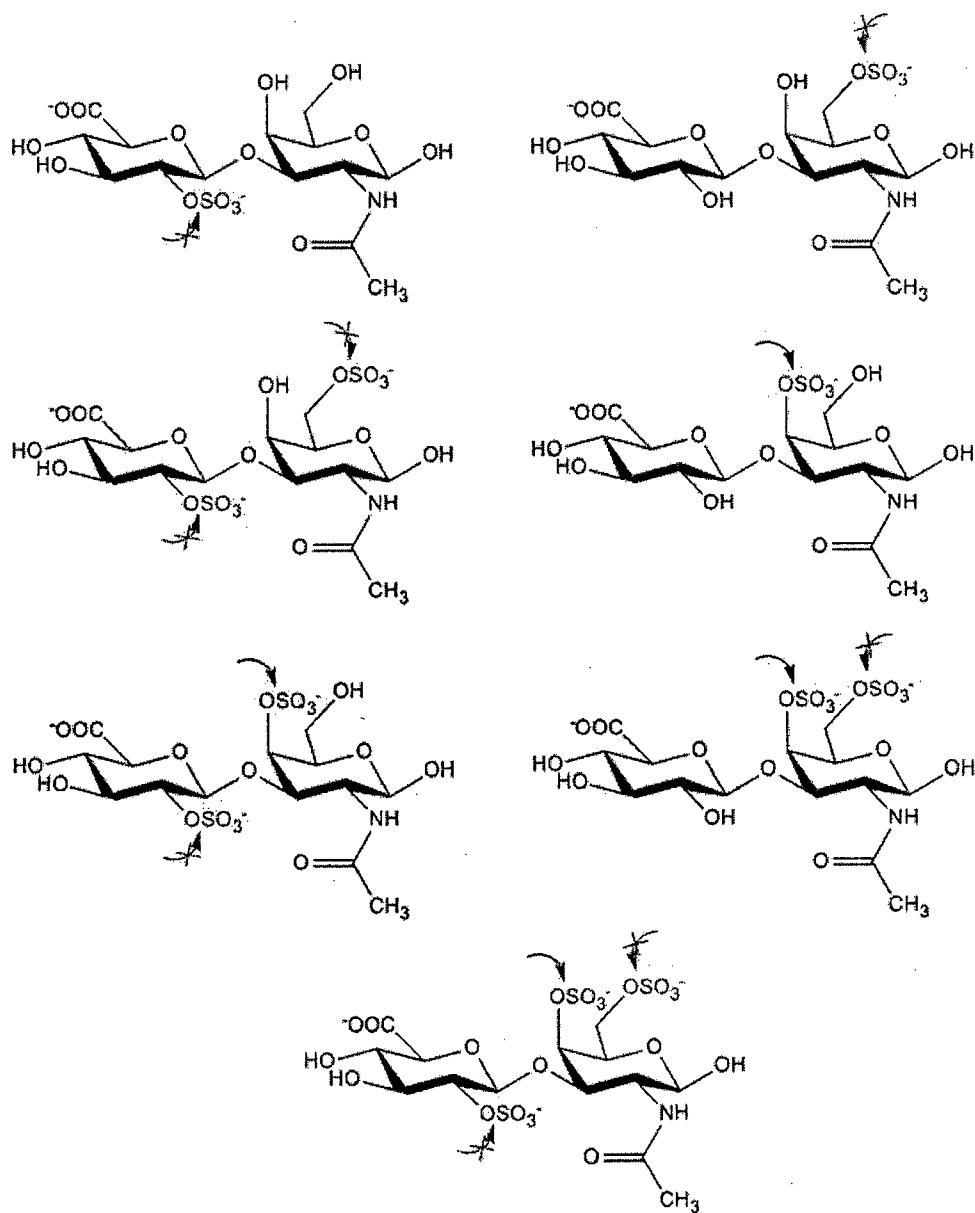
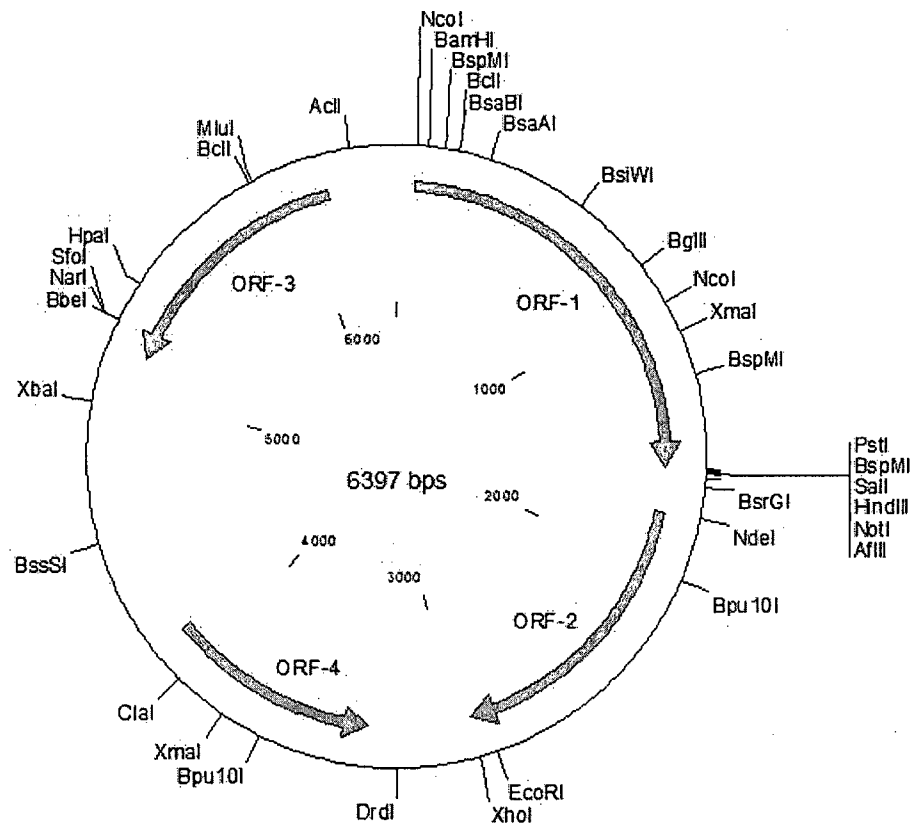


Figure 3

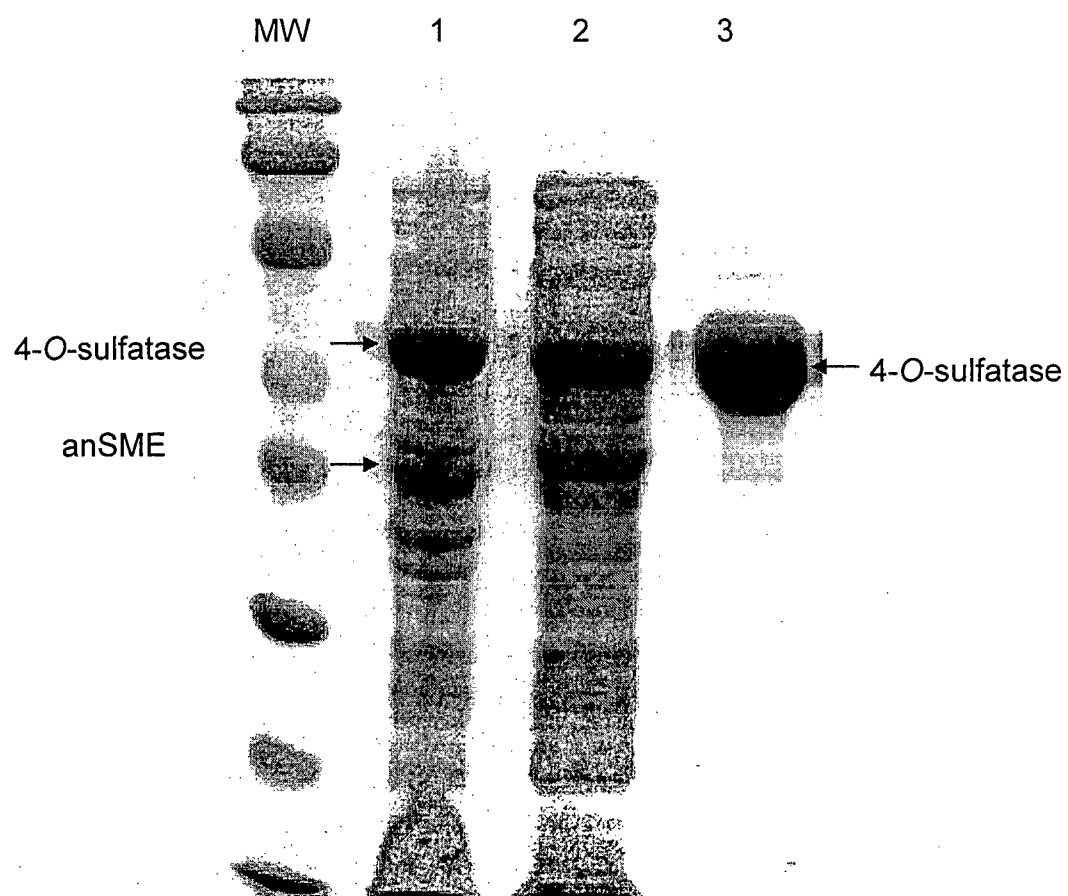
4/20

A



Orf-1 : 4-O-Sulfatase, Orf-2 : anSME, Orf-3 : LacI, Orf-4: KanR

Figure 4

**Figure 5**

6/20

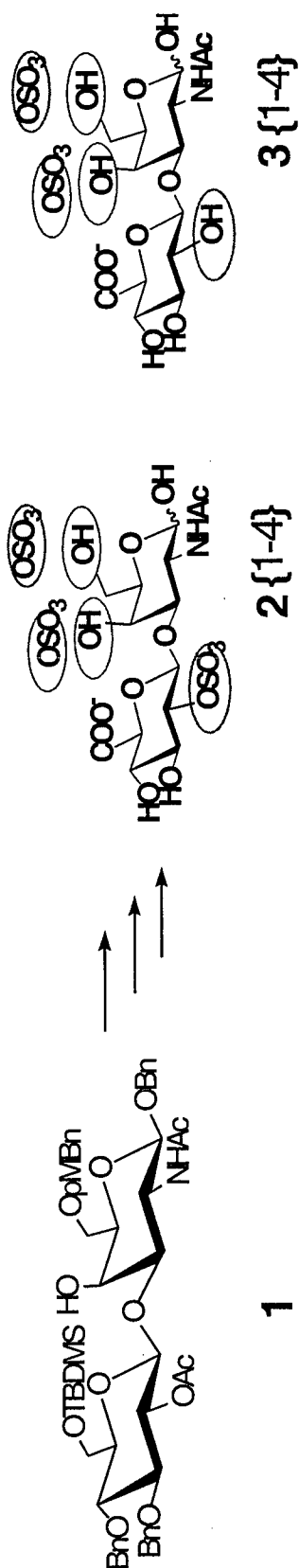


Figure 6

7/20

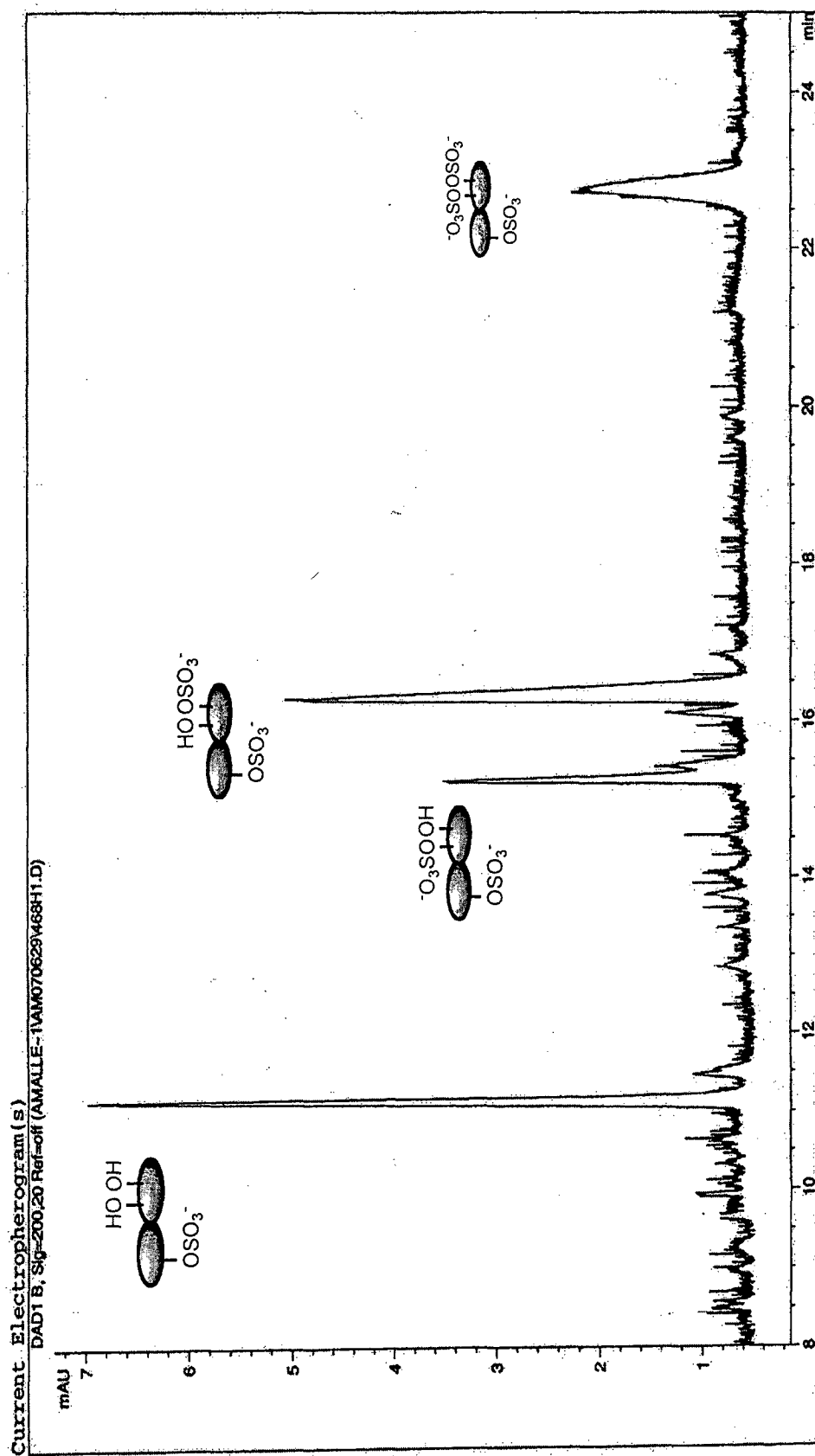


Figure 7

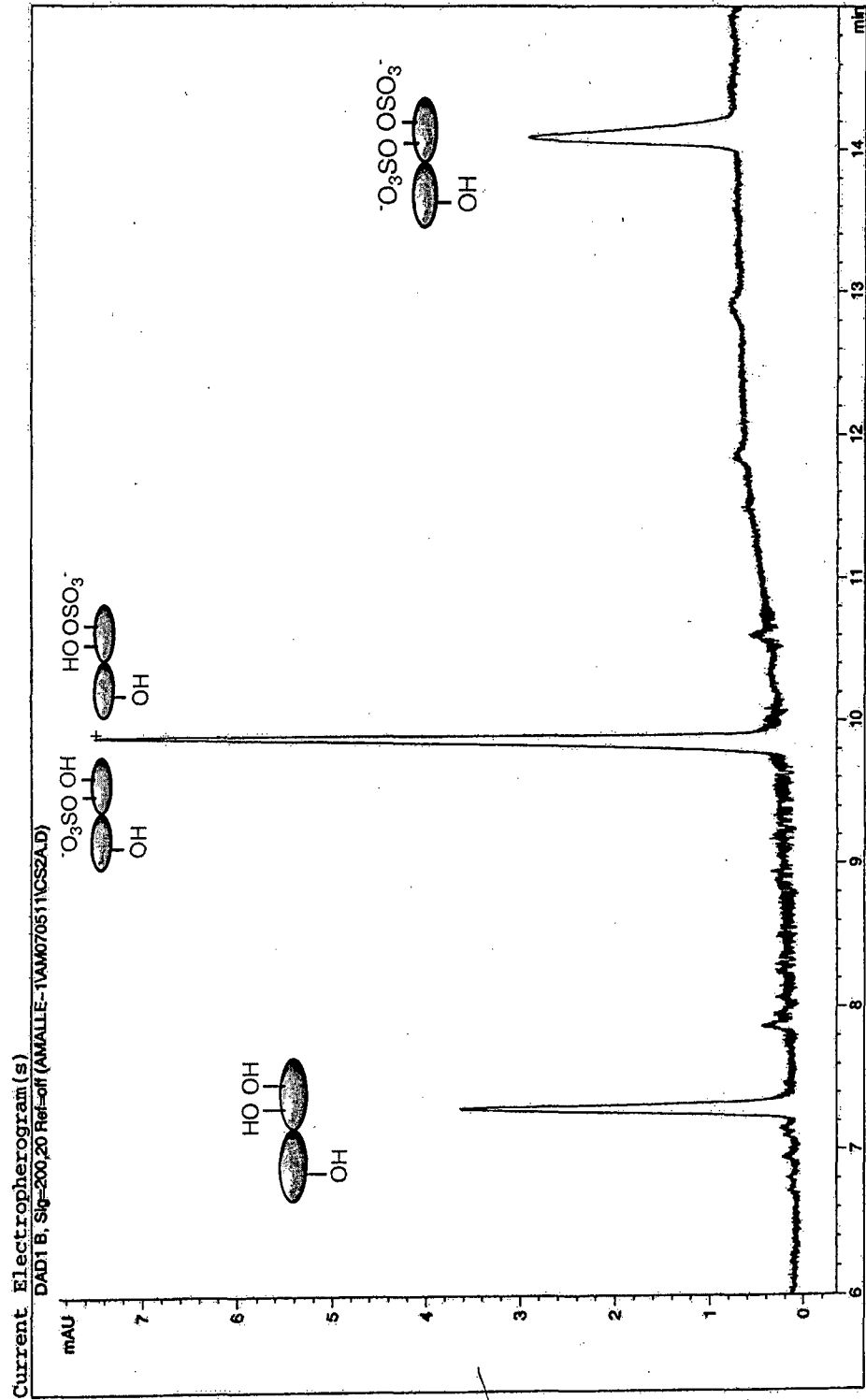


Figure 8

9/20

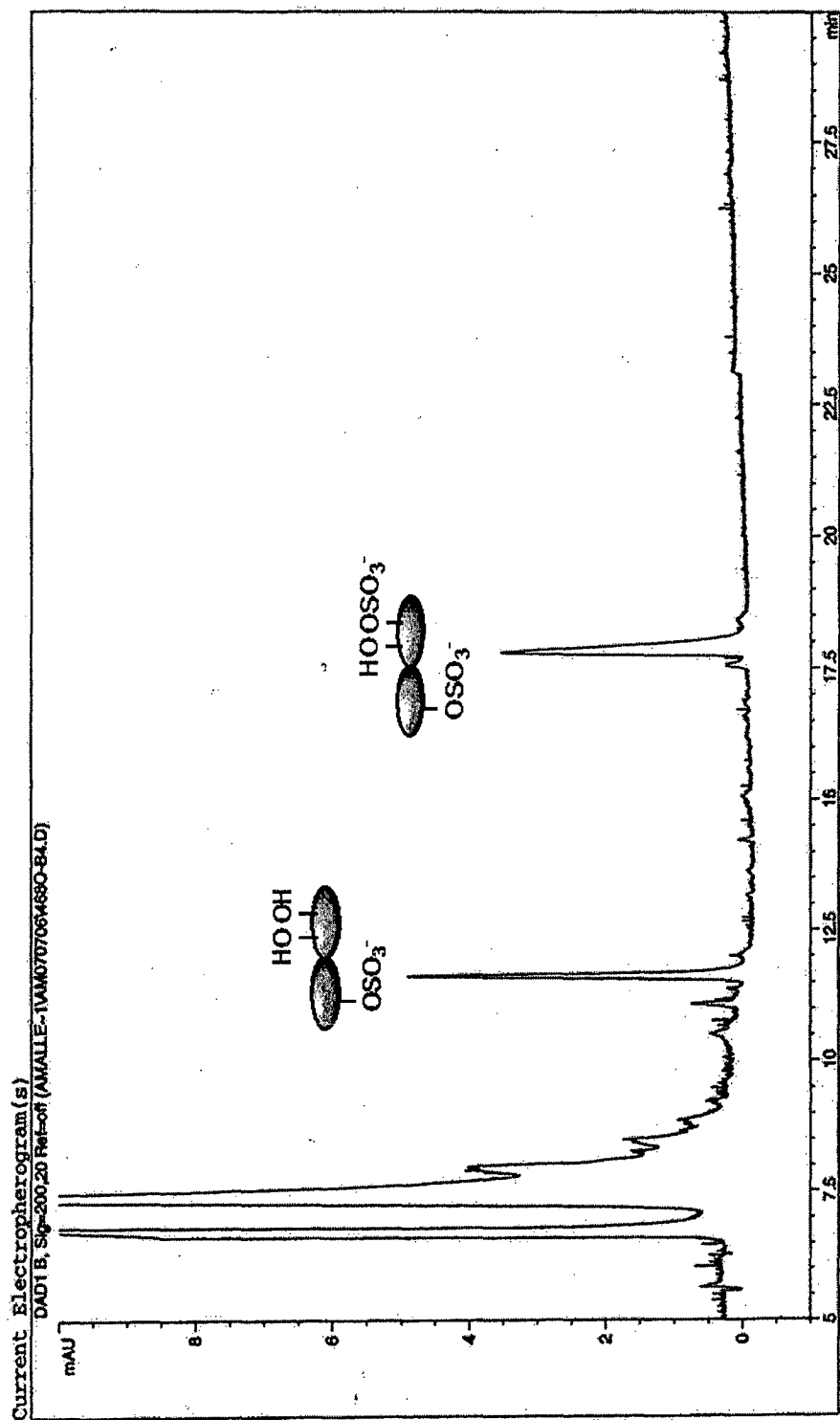


Figure 9

10/20

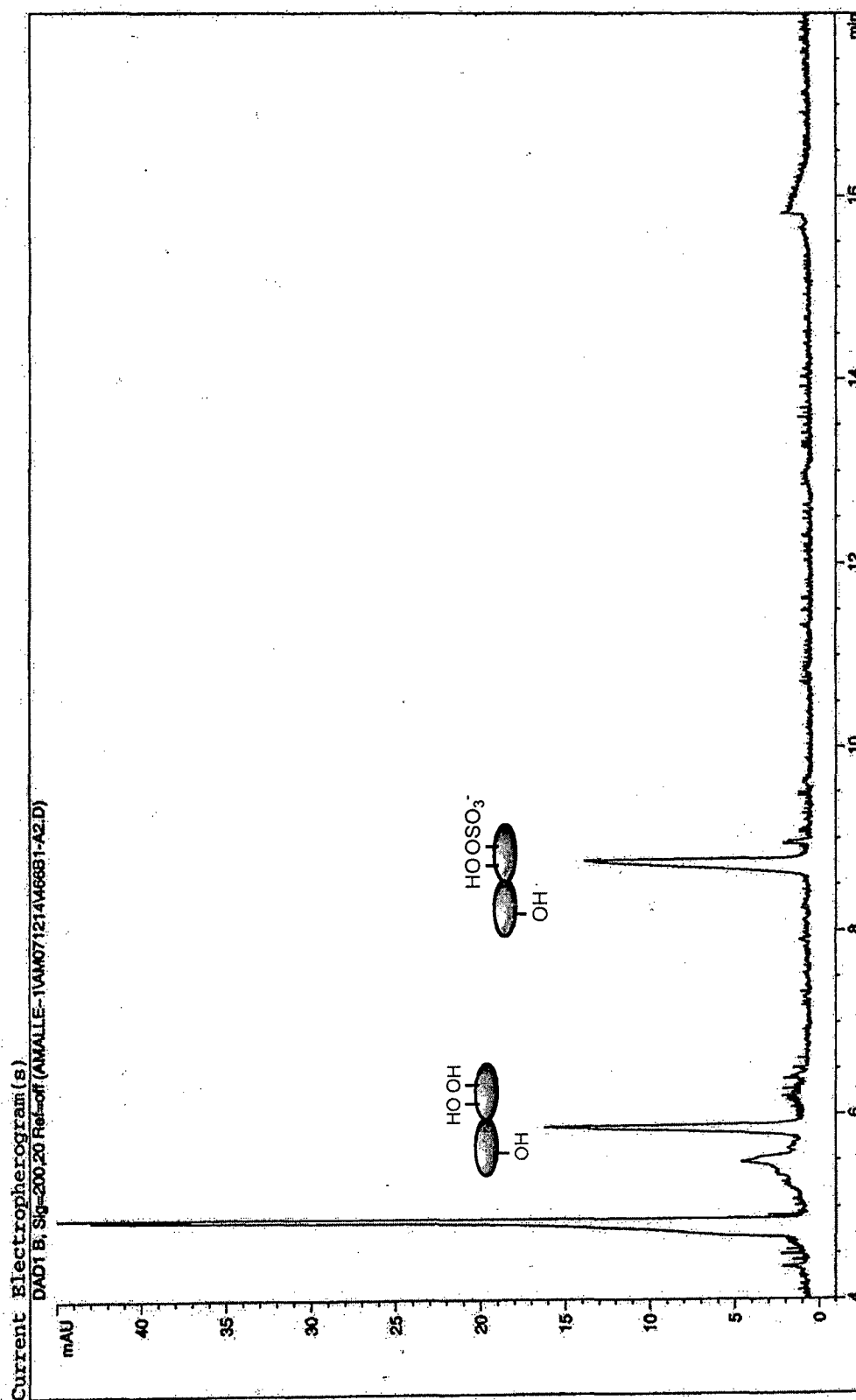


Figure 10

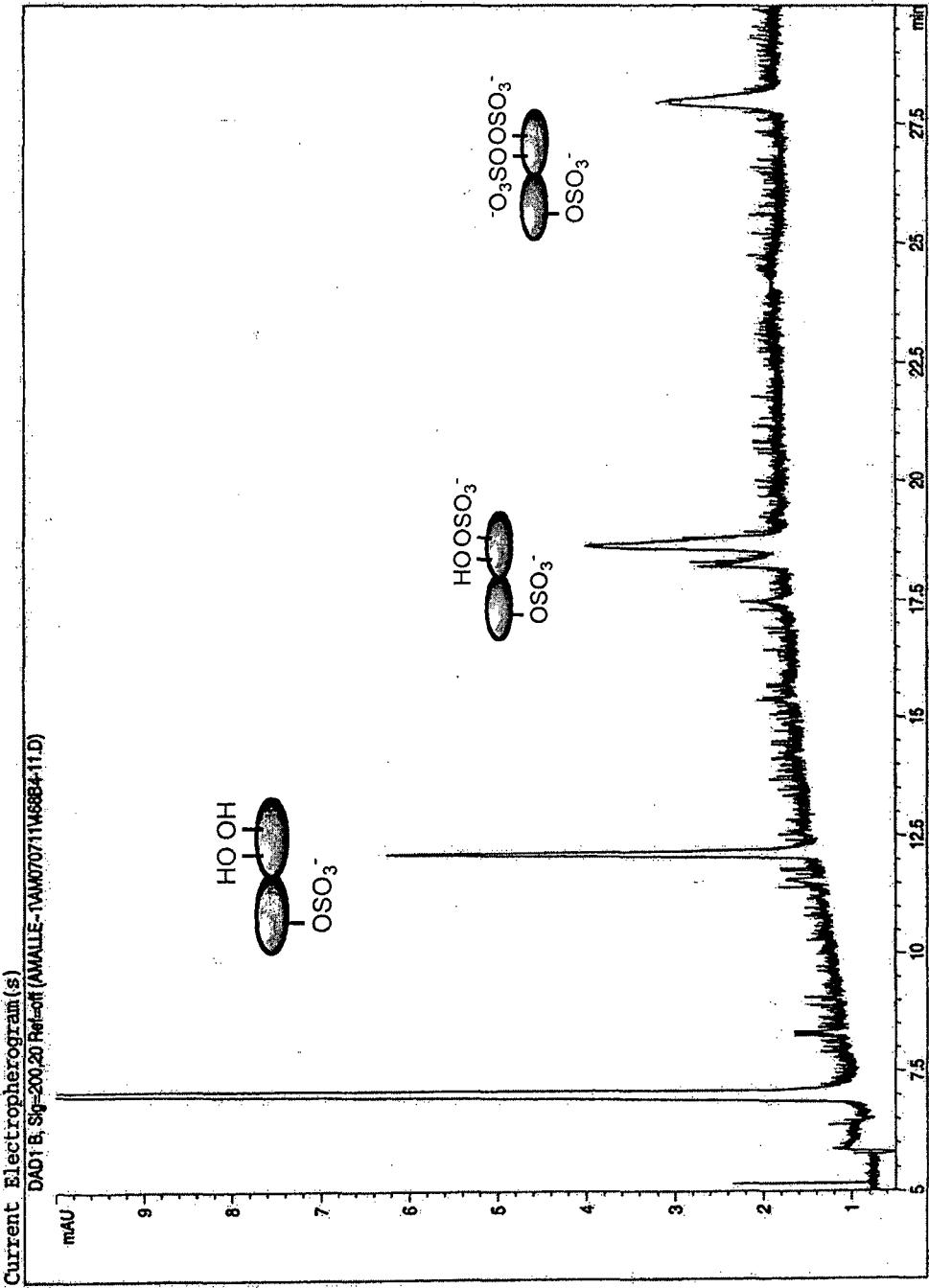


Figure 11

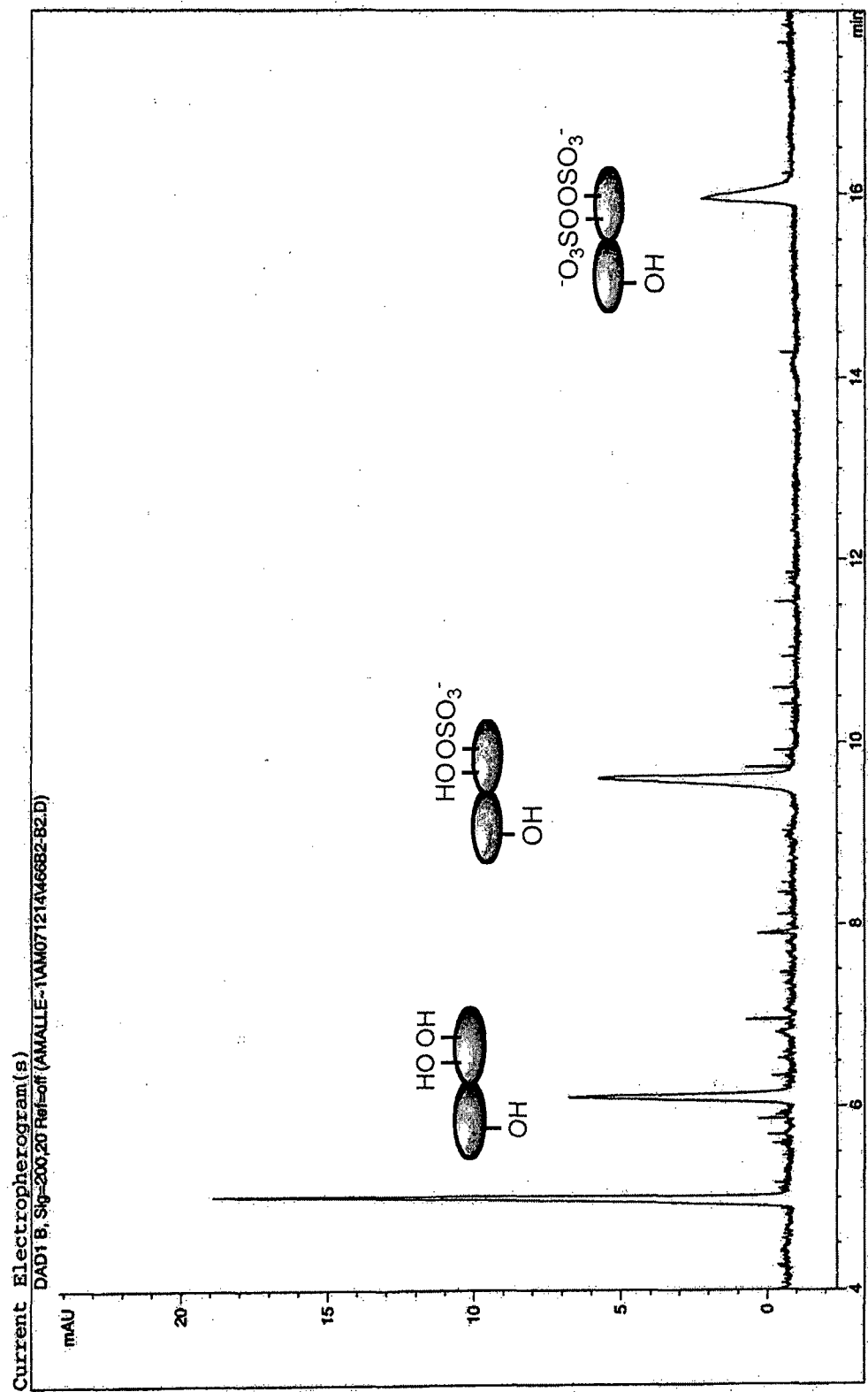


Figure 12

NP_812261	MGGLTLFAAQGCKAPK-QVAEQAEHPNII	YVFDPQYRNQAMGFWNQEGFRDK
ZP_01959927	MKPINLLVGGTLTLTAQGCKAPK-QVVEQSEHPNII	YVFDPQYRNQAMGFWSQDGFDRDK
ZP_03677283	MINRFSLEFLGGLFALQGCKTQQ---GEQAQLPNVI	YVFDPQYRNQAMEFFWGQDGFDRDK
ZP_03207093	MKHLPSYSLIGGIGLLSLQSCASKQ-QVAEQA-YPNVI	YVFDPQYRNQAMGFWHENGFEKH
ZP_02064997	MNKPINLLVGGTLTLFAAQGCKAPK-QASQQAHPNII	YVFDPQYRNQAMGFWRQDGFDRDK
ZP_04547232.1	MNKPINLLVGGTLTLFAAQGCKAPK-QVPQQAHPNII	YVFDPQYRNQAMGFWSQDGFDRDK
ZP_02031487	MKNKSRFYLSNLIIFSLI-GCKTQK-----SSTPNVI	YIFPDQMRNHAMGFWKEAGFRDA
ZP_03013818	MIINRFSLEFLGGLFALQGCKTQQ---EEQAQLPNVI	YVFDPQYRNQAMEFFWGQEGFRDK
ZP_04846309	MINKSVNLLMGGTLTLFAAQGCKAPK-QVAEQAEHPNII	YVFDPQYRNQAMGFWNQEGFRDK
ZP_03478349	MYKQLNHSSHDAAAYLLGGIILFSFQGCKEKPVTPOGLSSTPNVI	YIFPDQMRNHAMGFWRAGFREA
ZP_02436215	MKSQNLNILLGGLFALQGCKTPQA---EQAQQPNVI	YVFDPQFRNQAMEFFWGQSEFREK
ZP_03460590	MKNRLNILLGGLFALQGCKAPQGGQAR---QPNVI	YVFDPQYRNQAMEFFWGQEGFRER
AAO08013	MKKPNLL	YVFDPQFRLMSLGIWQDPHYQSL

Figure 13-1

NP_812261	VNFRGDPVHTPNIDTFARESMVLTSAAQSNCPVLS	SPHRGMILL	TGMYPNRSGVPLNCNSTRPISS	LLRDDA
ZP_01959927	VNFRGDPVHTPNIDTFARESMVLTSAAQSNCPVLS	SPHRGMILL	TGMYPNRSGVPLNCNSTRPISS	LLREDA
ZP_03677283	VNFRNDPVHTPNLNSFAREALVLSAAQSNCPVLS	SPHRGMILL	TGMYPNKSGIPLNCNSNRPISS	LLRADV
ZP_03207093	IHFADPVHTPNIDQFAKESVLSAAQSNCPVLS	SPHRGSL	TGMYPNKSGIPLNCNSTRPISS	LLRTDV
ZP_02064997	VNFRGDPVHTPNLDAFARESMVLTSAAQSNCPVLS	SPHRGMILL	TGMYPNKSGVPLNCNSTRPISS	LLREDA
ZP_04547232.1	VNFRGDPVHTPNLDAFARESMVLTSAAQSNCPVLS	SPHRGMILL	TGMYPNKSGVPLNCNSTRPISS	LLREDA
ZP_02031487	VNFRGDPVHTPNLDRFAKESVLSAAQSNCPVLS	SPHRGILL	TGMYPEHSGVPLNCNANRPISS	LLREDA
ZP_03013818	VNFRNDPVHTPNLNGFAREALVLSAAQSNCPVLS	SPHRGMILL	TGMYPNKSGIPLNCNSTRPISS	LLRTDV
ZP_04846309	VNFRGDPVHTPNIDTFARESMVLTSAAQSNCPVLS	SPHRGMILL	TGMYPNRSGVPLNCNSTRPISS	LLRDDA
ZP_03478349	VNFRGDPVHTPNLNRFAKESVLSAAQSNCPVLS	SPHRGILL	TGMYPEHSGVPLNCNANRPISS	LLREDA
ZP_02436215	VNFRNDPVHTPRLNDFARESLSVLSAAQSNCPVLS	SPHRGSL	TGMYPNKSGIPLNCNSTRPISS	LLREDV
ZP_03460590	VNFRNDPVHTPRLNDFARESLSVLSAAQSNCPVLS	SPHRGSL	TGMYPNKSGVPLNCNSTRPISS	LLRADV
AAO08013	LPGKGDVHTPNLDPHFAEQATLLSNAVSNCPCVCS	SPHRGSL	FTGQFPKSGVPLNCNSTRPISS	QLPEKA

Figure 13-2

NP_812261	ECIGDVFSKAGYDCAYFGKLGHADFFPTPNDPENPGQYVETQRPVWDAYTPKEQRHGFNFWYSYGTFFDEH
ZP_01959927	ECIGDVFSKAGYDCAYFGKLGHADFFPTPNDPENPGQYVESKRVPWDAYTPKERRRHGFNFWYSYGTFFDEH
ZP_03677283	DCIGDVFNKSGYDCAYFGKLGHADFFPTPNDPQRPCHYVEDRIPAWDAYTPKERRRHGFNFWYSYGTFFDEH
ZP_03207093	ECVSDVFSKNGYDCAYFGKLGHADFFPTPNDPENPGQYVETKRVPWDAYTPKERRRHGFNFWYSYGTFFDEH
ZP_02064997	ECIGDVFSKAGYDCAYFGKLGHADFFPTPNDPENPGQYVEEKRPWDAYTPKERRRHGFNFWYSYGTFFDEH
ZP_04547232.1	ECIGDVFSKAGYDCAYFGKLGHADFFPTPNDPENPGQYVEEKRPWDAYTPKERRRHGFNFWYSYGTFFDEH
ZP_02031487	TCISDVFSQAGYNCAIIGKLGHVDCPTPNDPERPGKYVEDRVPWDAYTPAERRHGFNFWYSYGTFFDEH
ZP_03013818	DCISDVFNKSGYDCAYFGKLGHADFFPTPNDPQRPCHYVEDRIPAWDAYTPKERRRHGFNFWYSYGTFFDEH
ZP_04846309	ECIGDVFSKAGYDCAYFGKLGHADFFPTPNDPENPGQYVETQRPVWDAYTPKEQRHGFNFWYSYGTFFDEH
ZP_03478349	TCISDVFSQAGYNCAIIGKLGHVDCPTPNDPERPGKYVEDRVPWDAYTPADRRHGFNFWYSYGTFFDEH
ZP_02436215	DCVSDVFSNAGYDCAYFGKLGHADFFPTPNDPQRPCHYVEDRIPAWDAYTPKDRRHGFNFWYSYGTFFDEH
ZP_03460590	DCVSDVFSGAGYDCAYFGKLGHTDFFPTPNDPQRPCHYVEDRIPAWDAYTPKERRRHGFNFWYSYGTFFDEH
AAO08013	RCFTDVLSDAGYILGYIGKWHLDWPTENDPANPGQYVDSKRPAWDSYTEPNRRHGIDEWYGYGTFFDQH

Figure 13-3

NP_812261	KNPHYWDTD	GKRHD	PKEWS	PLHESGKVS	YLKNEGNVR	DTKKPFF	FIMVGMNPPHSPYRSL	DCEEQDF
ZP_0195927	KNPHYWDTD	GKRHD	PKEWS	PLHESGKVS	YLKNEGNVR	DTKKPFF	FIMVGMNPPHSPYRSL	DDCEEQDF
ZP_03677283	KNPRYWD	TDGKRHD	PKEWS	PLHESKMVS	YLKNEGNVR	DPKKPFF	FIMVGMNPPHSPYRSL	DDCMEEDF
ZP_03207093	KNPHYWDTD	INGKRHD	PKEWS	PLHEAKQVS	YLRNDKNQVR	DPKKPFF	FIMVGMNPPHSPYRSL	DDCMEEDF
ZP_02064997	KNPHYWDTD	GKRHD	PKEWS	PLHESGKVS	YLKNDGNVR	DTKKPFF	FIMVGMNPPHSPYRSL	DDCEEQDF
ZP_04547232.1	KNPHYWDTD	GKRHD	PKEWS	PLHEAGKVS	YLKNDGNVR	DTKKPFF	FIMVGMNPPHSPYRSL	DDCEEQDF
ZP_02031487	KHPHYWDTD	TEGVKHE	INEWS	PEHEADKALS	YLRNEGNVR	DEKPEKPF	FMMVSFNPPHSPYASLE	DCMEEDY
ZP_03013818	KNPRYWDTD	GKRHD	PKEWS	PLHESKVS	YLKNEGNVR	DPKKPFF	FIMVGMNPPHSPYRSL	DDCMEEDF
ZP_04846309	KNPHYWDTD	GKRHD	PKEWS	PLHESGKVS	YLKNEGNVR	DTKKPFF	FIMVGMNPPHSPYRSL	DDCEEQDF
ZP_03478349	KHPHYWDTD	TEGVKHE	INEWS	PEHEADKALS	YLRNEGNVR	DPKKPFF	FMMVSFNPPHSPYASLE	DCMEEDY
ZP_02436215	KNPHYWDTD	GKRHD	PREWS	PLHESGKVS	YLKNEGNVR	DPKKPFF	FIMVGMNPPHSPYRSL	DDCMEQDF
ZP_03460590	KNPHYWDTD	GKRHD	PHEWS	PLHEAGKVS	YLRNEGNVR	NPKKPFF	FIMVGMNPPHSPYRSL	DDCMEQDF
AAO08013	CNPHYWDTD	IGQRHE	PRKWSAE	HETDKALIE	FLTRHQQR	PEQ-PE	ALFVSMNPPHSPYSSL	HDCREADW

Figure 13-4

NP_81226	NLYK	DQ	PL	D	S	L	I	R	P	N	V	D	L	N	M	K	K	A	E	S	V	R	Y	F	A	S	V	T	G	V	D	R	A	F	G	Q	I	L	E	A	L	K	Q	L	G	L	D	K	N	T	V	V	I	F	A	S	D	H	G	E	T	
ZP_01959927	DLYK	NQ	PL	D	S	L	I	R	P	N	V	D	L	K	M	K	K	A	E	S	A	R	Y	F	A	S	V	T	G	V	D	R	A	F	G	Q	I	L	E	T	L	K	E	M	G	L	D	K	N	T	V	V	I	F	A	S	D	H	G	E	T	
ZP_03677283	NLYK	DQ	PL	D	S	L	I	R	P	N	A	D	K	K	R	E	K	A	E	S	V	R	Y	F	A	S	V	T	G	V	D	R	A	F	G	Q	I	L	E	T	L	K	E	Q	L	D	K	N	T	V	V	I	F	A	S	D	H	G	E	T		
ZP_03207093	NLYK	DQ	P	I	D	S	L	I	R	P	N	A	D	K	Q	K	A	E	S	A	R	Y	F	A	S	V	S	G	V	D	R	A	F	G	Q	I	L	D	C	L	K	E	L	K	L	D	K	N	T	I	V	V	T	S	D	H	G	E	T			
ZP_02064997	NLYK	DQ	PL	D	S	L	I	R	P	N	V	D	L	K	M	K	K	A	E	S	A	R	Y	F	A	S	V	T	G	V	D	R	A	F	G	Q	I	L	T	L	K	E	L	G	L	D	K	N	T	V	V	I	F	A	S	D	H	G	E	T		
ZP_04547232.1	NLYK	DQ	PL	D	S	L	I	R	P	N	V	D	L	K	M	K	K	A	E	S	A	R	Y	F	A	S	V	T	G	V	D	R	A	F	G	Q	I	L	E	T	L	K	E	M	G	L	D	K	N	T	V	V	I	F	A	S	D	H	G	E	T	
ZP_02031487	NLYK	D	L	P	L	D	S	L	I	R	P	N	A	N	R	E	M	K	K	A	P	S	V	R	Y	F	A	S	V	T	G	V	D	R	A	F	G	R	I	L	D	E	L	E	K	Q	L	D	K	N	T	L	V	I	F	S	S	D	H	G	E	T
ZP_03013818	NLYK	DQ	PL	D	S	L	I	R	P	N	A	D	K	K	R	E	K	A	E	S	V	R	Y	F	A	S	V	T	G	V	D	R	A	F	G	Q	I	L	E	T	L	K	E	Q	L	D	K	N	T	I	V	I	F	A	S	D	H	G	E	T		
ZP_04846309	NLYK	DQ	PL	D	S	L	I	R	P	N	V	D	L	N	M	K	K	A	E	S	V	R	Y	F	A	S	V	T	G	V	D	R	A	F	G	Q	I	L	E	A	L	K	Q	L	G	L	D	K	N	T	V	V	I	F	A	S	D	H	G	E	T	
ZP_03478349	DLYK	D	L	P	L	D	S	L	I	R	P	N	A	N	R	E	M	K	K	A	S	V	R	Y	F	A	S	V	T	G	V	D	R	A	F	G	R	I	L	D	E	L	E	K	Q	L	D	K	N	T	L	V	I	F	S	S	D	H	G	E	T	
ZP_02436215	NLYK	DQ	PL	D	S	L	I	V	R	P	N	A	D	S	K	M	A	K	A	E	S	V	R	Y	F	A	S	V	T	G	V	D	R	A	F	G	Q	I	L	D	A	L	K	E	L	G	L	D	K	N	T	I	V	V	F	S	S	D	H	G	E	T
ZP_03460590	NLYK	D	R	P	L	D	S	L	I	R	P	N	A	D	P	E	M	A	K	A	S	A	R	Y	F	A	S	V	T	G	V	D	R	A	F	G	Q	I	L	D	A	L	E	E	L	G	L	D	N	T	I	V	V	F	S	S	D	H	G	E	T	
AAO08013	QRYC	DQ	P	L	T	S	L	T	R	D	N	A	D	H	H	M	E	K	A	H	S	A	P	F	Y	F	A	N	V	T	G	V	D	Q	E	F	G	R	L	V	D	T	L	K	T	L	G	E	W	E	N	T	I	V	V	T	S	D	H	G	E	T

Figure 13-5

NP_812261	MCSQRTDDPKNSPYSESMNIPFLVRFPGKIQPRVD-DLLLSAPDIMPTVLGLCGLGDSIPSEVQGRNF
ZP_01959927	MCSQRTDDPKNSPYSESMNIPFLVRFPGKIQPRVD-DLLLSAPDIMPTVLGLCGLGDSIPAEVQGRNF
ZP_03677283	MCSQFTDDPKNSPYSESMNIPFLVRYPGHIQPRVD-NLLMSAPDIMPTVLGLCGLGDSIPSNVQGRNW
ZP_03207093	MCSQFTDDPKNSPYAESMNVPFLIRYPQHIRPRVD-NLLSSPDIMPTLLGLCNLDKDI PANVQGGNY
ZP_02064997	MCSQRTDDPKNSPYSESMNIPFLVRFPGKIQPRVD-DLLLSAPDIMPTVLGLCGLGDSIPAEVQGRNF
ZP_04547232.1	MCSQRTDDPKNSPYSESMNIPFLVRFPGKIQPRVD-DLLLSAPDIMPTVLGLCGLGDSIPAEVQGRNF
ZP_02031487	MCSQNTDDPKNSPYAESMNVPFIVRFPEKVI PRIDSELLSSPDIMPTIILGLCGLEKQIPATVEGRNY
ZP_03013818	MCSQFTDDPKNSPYSESMNIPFLVRYPGHVQPRVD-NLLMSAPDIMPTIILGLCGLGDSIPANVQGRNW
ZP_04846309	MCSQRTDDPKNSPYESMNIPFLVRFPGKIQPRVD-DLLLSAPDIMPTVLGLCGLGDSIPSEVQGRNF
ZP_03478349	MCSQRTDDPKNSPYSESMNIPFLVRFPGKIQPRVD-DLLLSAPDIMPTVLGLCGLGDSIPSEVQGRNF
ZP_02436215	MCSQHTDDPKNSPFESMNVPFLVRFPGKIQPRLD-DLMLSSPDIMPTLLGLAGLSDSIPANVQGHNY
ZP_03460590	MCSQHTDDPKNSPFESMNVPFIVRFPGKIKPRLD-DLMLSSPDIMPTLLGLAGLSDSIPATVQGHNY
AAO08013	LCSHGVTDAKNSIYNESLCVPFLLKDDAMQNAQQH-PAFLSSADIMPTVLGLMGLSDLCFDDIHGRNL

Figure 13-6

NP_812261
 ZP_01959927
 ZP_03677283
 ZP_03207093
 ZP_02064997
 ZP_04547232.1
 ZP_02031487
 ZP_03013818
 ZP_04846309
 ZP_03478349
 ZP_02436215
 ZP_03460590
 AAO08013

APLFFFEDEKAE-IVRPAGALYIQNLGGEKDKDGLVQSYFPSSRGIKKTARYTTLALYIDRKTQQLKKSLLF
 APLFFFEDEKAE-IVRPTGALYIQNLGGEKDENGLVKTYFPSSRGIKKTADYTLALYIDRKTQQLKKSLLF
 APLFFFEDEKAE-IERPGGALYIQNLGGEKDADGKVQTYFPSSRGYKTARYTLAFYIDKKDHKLKKSLLF
 APIFYEDSIQTVTRPTGALYIQNMDGDKDSDSNVISYFPRSRGIKTLHYTLALYIDREN-KLTKTLLF
 APLFFFEDEKAE-IVRPTGALYIQNVGDKDENGLVQTYFPSSRGIKKTAAQYTLALYIDRDTKQLKKSLLF
 APLFFFEDEKAE-IVRPTGALYIQNVGDKDENGLVQTYFPSSRGIKKTAAQYTLALYIDRDTKELKKSLLF
 AGRFTGKDSS-VPLRQGALYIKNIDGEEKDADGKVISYFPVSRGIKTHQYTMSLTIDRKTKEIKDILLF
 APLFFFEDEKAE-IERPGGALYIQNLGDKDADGKVQTYFPSSRGYKTARYTLAFYIDKKDRKLQKSLLF
 APLFFFEDEKAE-IVRPAGALYIQNLGGEKDKDGLVQSYFPSSRGIKKTARYTLALYIDRKTQQLKKSLLF
 AGRFTGKDSS-VPLRQGALYIKNIDGEEKDAEGKVISYFPVARGIKTHQYTMSLTIDRKTTLKEALLF
 APLFFFEKAD-IVRPAGALYIQNVGKKDEDEGKVRSYFPSSRGFKSARYTLALYVDRDNHKLVKSFLLF
 APLFLDEKAD-VVRPTGALYIQNLGGEKDADGKIRSYFPASRGFKSSHYTALYIDRDSRKLVKSLFF
 AEVFRSPSV--AVGPTCALYLNKIDSPPCADGKIRDYFAVSRGIKKTARYSLALHIDAFG-QLSESQFF

Figure 13-7

NP_812261	DDVNDPYQLNNLPLDENKEVVEQLYREMGTMMLKEIIDDPWYTEKILSDR	PY
ZP_01959927	NDAKDPYQLNNLPLEENKEIVAQLYREMGAMLKEIINDPWYTEKILSDKI	PY
ZP_03677283	DDEKDPYQMNNLPLEENKEIVAELCREMGKELKAIIDDPWYKERILSDMI	PY
ZP_03207093	DDVKDPYQLNLSPLEENKEIVKGLYQELARQLKEIIDDPWYQQILSDIL	PY
ZP_02064997	DDVKDPYQLHNLPLEENKEIVAQLCGEMGAMLKEIINDPWYTEKILSDRI	PY
ZP_04547232.1	DDVKDPYQLHNLPLEENKEIVAQLCGEMGAMLKEIINDPWYTEKILSDRI	PY
ZP_02031487	NDLEDPYQMQLPWQENKGINVSDLCCKQMVPLLKEADDPWYKEQILKELI	PYGKE
ZP_03013818	DDEKDPYQMNNLPLEENKEIVAELCREMGKELKAIIDDPWYKERILSDMI	PY
ZP_04846309	DDVNDPYQLNNLPLEENKEVVEQLYREMGTMMLKEIIDDPWYTEKILSDRI	PY
ZP_03478349	DDLKDPYQMNNLPLEENKEIVSELCRQMVPLLKEADDPWYKEQILKELI	PYEG
ZP_02436215	DDEKDPYQMNNLPLEENKEIVDELCAEMGKVLKEIIDDPWYRERILSDMI	PYDK
ZP_03460590	DDRNDPYQMNNLPLEENKDVVDGLCAEMGKVLKEIIDDPWYRERILSDMI	PYGE
AAO08013	DNQTDPYQTTNNRHHFDPNDPVVRRLLHAMAAQELVRVDDPWAEEQVLAHLL	PYDLFTQVGINKEFS

Figure 13-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2010/052893

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C07K14/195
 ADD.

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)
 C07K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE UniProt [Online] 1 June 2003 (2003-06-01), "SubName: Full=Putative sulfatase yidJ;", XP002583120, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q8A2F6 Database accession no. Q8A2F6 the whole document ----- -/--	1-8, 10-12,14



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

12 April 2011

Date of mailing of the international search report

31/05/2011

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Chavanne, Franz

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2010/052893

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE UniProt [Online] 24 July 2007 (2007-07-24), "SubName: Full=Putative uncharacterized protein;", XP002583121, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:A5ZF73 Database accession no. A5ZF73 the whole document -----	1-8, 10-12,14
A	DATABASE UniProt [Online] 14 October 2008 (2008-10-14), "SubName: Full=Putative uncharacterized protein;", XP002583122, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:B5CVI0 Database accession no. B5CVI0 the whole document -----	1-8, 10-12,14
A	DATABASE UniProt [Online] 1 March 2003 (2003-03-01), "SubName: Full=Arylsulfatase A;", XP002583123, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q8D520 Database accession no. Q8D520 the whole document -----	1-8, 10-12,14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2010/052893

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

See supplemental sheet

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.:

3 (in full); 1, 2, 4-14 (in part)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has found that the international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 3 (in full); 1, 2, 4-14 (in part)

4-0-sulfatase containing a polypeptide of SEQ ID No. 1, a nucleic acid of SEQ ID No. 14 which codes for said 4-0-sulfatase, an expression cassette or vector containing said nucleic acid, a host cell transformed by said nucleic acid, the use of said 4-0-sulfatase of SEQ ID No. 1 in a method for synthesizing a glycosaminoglycan or detecting the presence of a glycosaminoglycan 4-0-sulfate in a sample, a method for synthesizing a glycosaminoglycan or detecting the presence of a glycosaminoglycan 4-0-sulfate in a sample based on the use of 4-0-sulfatase of SEQ ID No. 1

2-13. Claims 1, 2, 4-14 (all in part)

4-0-sulfatase containing a polypeptide of SEQ ID No. 2-13, a nucleic acid of SEQ ID No. 15-26 which codes for said 4-0-sulfatase, an expression cassette or vector containing said nucleic acid, a host cell transformed by said nucleic acid, the use of said 4-0-sulfatase of SEQ ID No. 2-3 in a method for synthesizing a glycosaminoglycan or detecting the presence of a glycosaminoglycan 4-0-sulfate in a sample, a method for synthesizing a glycosaminoglycan or detecting the presence of a glycosaminoglycan 4-0-sulfate in a sample based on the use of 4-0-sulfatase of SEQ ID No. 2-13.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2010/052893

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C07K14/195
ADD.

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)
C07K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE UniProt [Online] 1 juin 2003 (2003-06-01), "SubName: Full=Putative sulfatase yidJ;", XP002583120, extrait de EBI accession no. UNIPROT:Q8A2F6 Database accession no. Q8A2F6 le document en entier ----- -/--	1-8, 10-12,14



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

12 avril 2011

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

31/05/2011

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,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chavanne, Franz

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2010/052893

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	DATABASE UniProt [Online] 24 juillet 2007 (2007-07-24), "SubName: Full=Putative uncharacterized protein;", XP002583121, extrait de EBI accession no. UNIPROT:A5ZF73 Database accession no. A5ZF73 le document en entier -----	1-8, 10-12,14
A	DATABASE UniProt [Online] 14 octobre 2008 (2008-10-14), "SubName: Full=Putative uncharacterized protein;", XP002583122, extrait de EBI accession no. UNIPROT:B5CVI0 Database accession no. B5CVI0 le document en entier -----	1-8, 10-12,14
A	DATABASE UniProt [Online] 1 mars 2003 (2003-03-01), "SubName: Full=Arylsulfatase A;", XP002583123, extrait de EBI accession no. UNIPROT:Q8D520 Database accession no. Q8D520 le document en entier -----	1-8, 10-12,14

Cadre n° II Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 2 de la première feuille)

Le rapport de recherche internationale n'a pas été établi en ce qui concerne certaines revendications conformément à l'article 17.2)a) pour les raisons suivantes :

1. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration chargée de la recherche internationale n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir :
2. ☐ Les revendications n^{os} parce qu'elles 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} parce qu'elles 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 n° III Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 3 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 exigées 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 revendications qui se prêtent à la recherche ont pu faire l'objet de cette recherche sans effort particulier justifiant des taxes additionnelles, l'administration chargée de la recherche internationale n'a sollicité le paiement d'aucunes taxes 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 taxes additionnelles demandées n'ont été payées 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} :
3(complètement); 1, 2, 4-14(en partie)

- Remarque quant à la réserve**
- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant et, le cas échéant, du paiement de la taxe de réserve.
- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant mais la taxe de réserve n'a pas été payée dans le délai prescrit dans l'invitation.
- ☐ 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: 3(complètement); 1, 2, 4-14(en partie)

4-0-sulfatase comprenant un polypeptide de SEQ ID No.1, acide nucléique de SEQ ID No. 14 codant pour cette 4-0-sulfatase, cassette ou vecteur d'expression comprenant cet acide nucléique, cellule hôte transformée par cet acide nucléique, utilisation de cette 4-0-sulfatase de SEQ ID No.1 dans un procédé de synthèse d'un glycosaminoglycane ou de détermination de la présence d'un glycosaminoglycane 4-0-sulfaté dans un échantillon, procédé de synthèse d'un glycosaminoglycane ou de détermination de la présence d'un glycosaminoglycane 4-0-sulfaté dans un échantillon fondé sur l'utilisation de la 4-0-sulfatase de SEQ ID No.1.

2-13. revendications: 1, 2, 4-14(toutes en partie)

4-0-sulfatase comprenant un polypeptide de SEQ ID No.2-13, acide nucléique de SEQ ID No. 15-26 codant pour cette 4-0-sulfatase, cassette ou vecteur d'expression comprenant cet acide nucléique, cellule hôte transformée par cet acide nucléique, utilisation de cette 4-0-sulfatase de SEQ ID No.2-3 dans un procédé de synthèse d'un glycosaminoglycane ou de détermination de la présence d'un glycosaminoglycane 4-0-sulfaté dans un échantillon, procédé de synthèse d'un glycosaminoglycane ou de détermination de la présence d'un glycosaminoglycane 4-0-sulfaté dans un échantillon fondé sur l'utilisation de la 4-0-sulfatase de SEQ ID No.2-13.
