

(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
23 septembre 2004 (23.09.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/081214 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C12N 15/12, A61K 38/17,
C07K 14/435, A01H 4/00, A61P 31/00

(74) Mandataires : BRESSE, Pierre etc.; Breesé-Majerowicz,
3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/000535

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

(22) Date de dépôt international : 5 mars 2004 (05.03.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

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

(30) Données relatives à la priorité :
03/02714 5 mars 2003 (05.03.2003) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCI-
ENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange,
F-75794 Paris Cedex 16 (FR). UNIVERSITE DE PER-
PIGNAN [FR/FR]; 52, Avenue de Villeneuve, F-66860
Perpignan (FR).

Publiée :

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

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MITTA,
Guillaume [FR/FR]; 7, avenue du Stade, F-66540 Baho
(FR). GALINIER, Richard [FR/FR]; 67, boulevard
Aristide Briand, F-66100 Perpignan (FR). BANAIKS,
Bernard [FR/FR]; 12, Traverse du Village, F-66140
Canet-en-Roussillon (FR). LASSERRE, Eric [FR/FR]; 4,
impasse de l'Aire, F-66180 Villeneuve-De-la-Raho (FR).

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

(54) Title: PAPILLOSIN ANTIMICROBIAL PEPTIDE, A GENE FOR CODING SAID PEPTIDE, A VECTOR, A
TRANSFORMED ORGANISM AND A COMPOUND CONTAINING SAID ORGANISM

(54) Titre : PEPTIDE ANTIMICROBIEN APPELE PAPILLOSIN, GENE CODANT LEDIT PEPTIDE, VECTEUR,
ORGANISME TRANSFORME ET COMPOSITION LE CONTENANT

(57) Abstract: The invention relates to an antimicrobial peptide, hereafter papillosin, isolated from the extract of a sea invertebrate animal whose amine acid sequence is GFWKKVGSAAWGGVKAAAKGAAVGGGLNALAKHIQ, to the derivatives and fragments thereof and to a polypeptide containing said papillosin. Said invention also relates to host organisms like microorganisms, animal cells, vegetable and plant cells which are transformed in such a way that they can produce the inventive peptide. An antimicrobial peptide-containing compound is also disclosed.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un peptide antimicrobien, ci-après appelé papillosin, isolé à partir d'un extrait d'un invertébré marin, dont la séquence en acides aminés est la suivante : GFWKKVGSAAWGGVKAAAKGAAVGGGLNALAKHIQ, ses dérivés, ses fragments et un polypeptide le comprenant. La présente invention concerne également des organismes hôtes transformés et capables de produire le peptide de l'invention tels que des microorganismes, des cellules animales, des cellules végétales et des plantes. La présente invention se rapporte enfin à une composition antimicrobienne contenant le peptide de l'invention.

WO 2004/081214 A1

PEPTIDE ANTIMICROBIEN APPELÉ PAPILLOSIN, GENE CODANT LEDIT PEPTIDE, VECTEUR, ORGANISME TRANSFORME ET COMPOSITION LE CONTENANT.

5 La présente invention concerne un nouveau peptide antimicrobien, ci-après appelé papillosin, identifié et purifié à partir d'un extrait d'un invertébré marin.

10 De nombreuses maladies (tuberculose, pneumonies, pathologies urinaires,...), pourtant bien contrôlées depuis l'avènement des antibiotiques, constituent aujourd'hui des pathologies réémergentes, de pronostic souvent fatal, par suite de l'impuissance des antibiotiques classiques.

15 En effet, autrefois fléau implacable, la tuberculose (causée par le bacille *Mycobacterium tuberculosis*) avait régressé ces quarante dernières années dans les pays industrialisés, grâce à l'amélioration des conditions sociales et à l'application d'un traitement antibiotique efficace. Elle est réapparue sous une forme plus virulente
20 vers le milieu des années 1980 dans de nombreux pays, dont la France et les Etats-Unis. Les "nouvelles" formes du bacille sont résistantes aux antituberculeux classiques (streptomycine, isoniazide, rifampicine) ainsi qu'à d'autres antibiotiques naguère efficaces.

25 De même, les infections dites nosocomiales fréquemment contractées en milieu hospitalier sont le plus souvent très difficiles à maîtriser en raison des résistances aux antibiotiques disponibles. 20 à 25 % des Pneumocoques isolés en milieu hospitalier en France se sont
30 révélés être résistants aux antibiotiques de la famille des macrolides et 20 à 40 % des *Staphylococcus aureus* isolés en hôpital aux USA sont résistants à la méthicilline.

L'existence et l'apparition constante de bactéries de plus en plus résistantes aux antibiotiques induit une

importante demande de la part de l'industrie pharmaceutique et rend absolument nécessaire la découverte de nouvelles familles d'antibiotiques.

5 Le biotope marin est considéré comme le plus riche des différents habitats du globe mais également comme le moins bien connu des scientifiques. C'est aussi le berceau prébiotique de notre planète (3 milliards d'années d'évolution). Ceci a pour conséquence une diversité
10 d'espèces, de systèmes d'organisation, de formes et de solutions adaptatives. Cette biodiversité est la source d'une formidable chimiodiversité, une source potentielle de composés naturels nouveaux. Les recherches ont déjà conduit à la découverte de substances remarquables, tant par leurs
15 structures que par leurs activités biologiques. Plusieurs milliers de substances sont aujourd'hui répertoriées ; plus de 150 publications, décrivant de nouveaux métabolites secondaires, paraissent chaque année depuis plus de dix ans. Certains de ces métabolites font l'objet d'essais
20 cliniques ou sont déjà commercialisés. D'autres composés, comme les toxines de micro-organismes marins (ciguatoxine, brevetoxine, saxitoxine ou tétrodotoxine) sont des outils de choix en neurophysiologie et en particulier dans l'étude des canaux ioniques.

25 Aujourd'hui, plus de la moitié des molécules d'origine marine susceptibles d'être utilisées dans le domaine de la santé est destinée au traitement des cancers. En vingt-cinq ans, de 1970 à 1995, plus de 130 substances marines ont été brevetées dans le monde pour leurs
30 propriétés thérapeutiques.

Curieusement le domaine des antibiotiques a été quelque peu oublié. La recherche de nouveaux peptides antibiotiques dans des invertébrés marins n'a été que très récemment abordée. Les peptides antimicrobiens sont des

molécules dont la cible est la membrane bactérienne. Par conséquent, pour acquérir une résistance vis-à-vis de ce type de molécules, les micro-organismes devraient changer la composition et l'organisation de leurs lipides membranaires. Cette solution coûteuse d'un point de vue évolutif explique pourquoi la résistance des micro-organismes vis-à-vis de ce type d'antibiotiques n'est que rarement référencée.

10 Ainsi, les travaux de la Demanderesse ont permis de mettre en évidence et de purifier un nouveau peptide antibiotique, ci-après appelé papillosin, compte tenu du fait qu'il ne présente aucune homologie de structure primaire par rapport à d'autres molécules décrites dans la littérature et qu'il a été purifié à partir d'une espèce de tunicier, l'ascidie solitaire *Halocynthia papillosa* chez laquelle ce type de molécule n'avait jamais été recherché. L'activité antimicrobienne de la papillosin a été évaluée au laboratoire : il s'agit d'une molécule bactériolytique active sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Cette molécule est particulièrement intéressante de par le fait de son mode d'action particulier. En effet, ce dernier ne permet pas d'induire de résistance de la part des cibles bactériennes.

25

Dans les séquences peptidiques rapportées ci-après, les acides aminés sont représentés par leur code à une lettre, mais ils peuvent être aussi représentés par leur code à trois lettres selon la nomenclature ci-dessous.

30

A	Ala	alanine
C	Cys	cystéine
D	Asp	acide aspartique
E	Glu	acide glutamique
F	Phe	phénylalanine

	G	Gly	glycine
	H	His	histidine
	I	Ile	isoleucine
	K	Lys	lysine
5	L	Leu	leucine
	M	Met	méthionine
	N	Asn	asparagine
	P	Pro	proline
	Q	Gln	glutamine
10	R	Arg	arginine
	S	Ser	sérine
	T	Thr	thréonine
	V	Val	valine
	W	Trp	tryptophane
15	Y	Tyr	tyrosine

La présente invention concerne donc un peptide isolé de 34 acides aminés dont la séquence en acides aminés est la suivante : GFWKKVGSAAWGGVKAAAKGAAVGGLNALAKHIQ (SEQ ID
20 No. 1 dans la liste de séquences en annexe), ses dérivés et ses fragments.

A titre de « dérivés » du peptide de l'invention, on peut citer les peptides qui présentent une modification
25 post-traductionnelle et/ou une modification chimique en particulier une glycosylation, une amidation, une acylation, une acétylation, une méthylation ainsi que les peptides qui portent un groupement protecteur. On entend par " groupement protecteur " selon la présente invention,
30 tout groupement permettant d'éviter la dégradation du peptide de l'invention.

Les dérivés du peptide de l'invention peuvent également être ceux dont un ou plusieurs acides aminés sont des énantiomères, des diastéréoisomères, des acides aminés

naturels de conformation D, des acides aminés rares notamment l'hydroxyproline, l'hydroxylysine, l'allo-hydroxylysine, la 6-N méthyllysine, la N-éthylglycine, la N-méthylglycine, la N-éthylasparagine, l'allo-isoleucine, la N-méthylisoleucine, la N-méthylvaline, la pyroglutamine, l'acide aminobutyrique et les acides aminés synthétiques notamment l'ornithine, la norleucine, la norvaline, la cyclohexyl-alanine et les oméga-acides aminés. L'invention couvre également les rétropeptides et les rétro-inverso-peptides, de même que les peptides dont la chaîne latérale d'un ou plusieurs des acides aminés est substituée par des groupements qui ne modifient pas l'activité antimicrobienne du peptide de l'invention.

A titre de « dérivés » du peptide de l'invention, on entend également des peptides présentant 70%, 75%, 80%, 85%, 90% et/ou 95% d'homologie avec le peptide de séquence SEQ ID No. 1 dans la liste de séquences en annexe.

A titre de « fragments » du peptide de l'invention, on entend des fragments d'au moins 7 acides aminés qui présentent une activité antibactérienne. L'activité antimicrobienne des dérivés et des fragments du peptide de l'invention peut être mise en évidence grâce aux tests *in vitro* décrits ci-après dans les exemples.

L'invention concerne aussi un polypeptide isolé comprenant le peptide de l'invention. L'invention envisage plus particulièrement un polypeptide comprenant le peptide de l'invention dont l'une et/ou l'autre des extrémités dudit peptide comprend un ou plusieurs acides aminés nécessaires à son expression et/ou son ciblage dans un organisme hôte. Le polypeptide de l'invention peut présenter un peptide signal ou de transit de façon à

diriger la sécrétion du peptide ou polypeptide de l'invention dans un organisme hôte.

Le peptide, ses dérivés et ses fragments tout comme
5 les polypeptides de l'invention peuvent être synthétisés chimiquement selon des techniques connues de l'homme du métier.

L'invention concerne également un polynucléotide
10 isolé caractérisé en ce qu'il code le peptide ou un polypeptide de l'invention. On entend par " polynucléotide " selon la présente invention, une séquence nucléique de type ADN ou ARN, de préférence ADN, notamment double brin. L'homme du métier connaissant le
15 code génétique et la séquence en acides aminés du peptide de l'invention est à même d'isoler un polynucléotide codant le peptide de l'invention par criblage de banques d'acide nucléique en utilisant un ou plusieurs oligonucléotides déduits à partir de la séquence en acides aminés du peptide
20 de l'invention. L'homme du métier a également à sa disposition des logiciels informatiques capables, à partir d'une séquence en acides aminés, de fournir la séquence nucléotidique correspondante (Protéine en code reverse).

L'invention concerne également les polynucléotides
25 isolés qui comprennent des modifications au niveau d'un ou plusieurs nucléotides résultant de la dégénérescence du code génétique et qui codent pour une même séquence d'acides aminés du peptide de l'invention.

L'invention couvre également les polynucléotides
30 isolés codant pour le peptide ou un polypeptide de l'invention et capables de s'hybrider dans des conditions stringentes audit peptide ou auxdits polypeptides. On entend par « conditions stringentes » selon la présente invention, les conditions enseignées par Sambrook et al.

(Molecular cloning, 1989, Noland C. ed., New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press).

L'invention couvre également les séquences nucléotidiques complémentaires des polynucléotides isolés
5 définis ci-dessus ainsi que les ARN correspondants.

La présente invention concerne également un vecteur de clonage et/ou d'expression caractérisé en ce qu'il contient un polynucléotide selon l'invention pour
10 transformer un organisme hôte et exprimer dans ce dernier le peptide ou un polypeptide de l'invention. De façon avantageuse, le vecteur de clonage et/ou d'expression peut contenir, outre le polynucléotide codant un peptide ou un polypeptide de l'invention, au moins un élément choisi dans
15 le groupe des promoteurs constitutifs, des promoteurs inductibles, des éléments terminateurs.

De façon préférée, ledit vecteur comprend, liés entre eux de façon opérationnelle, un promoteur, un polynucléotide codant le peptide ou un polypeptide de
20 l'invention et un élément terminateur. On entend par " liés entre eux de façon opérationnelle " selon l'invention, des éléments liés entre eux de façon à ce que le fonctionnement d'un des éléments soit affecté par celui d'un autre. A titre d'exemple, un promoteur est lié de façon
25 opérationnelle à une séquence codante lorsqu'il est capable d'affecter l'expression de cette dernière. Les éléments régulateurs de la transcription, de la traduction et de la maturation des peptides que le vecteur peut comprendre sont connus de l'homme du métier et ce dernier est capable de
30 les choisir en fonction de l'organisme hôte dans lequel l'expression ou le clonage doivent être réalisés.

Le vecteur de l'invention est avantageusement choisi parmi un plasmide, un cosmide, un bactériophage et un virus en particulier un baculovirus. De façon

préférée, le peptide de l'invention est un vecteur à répllication autonome comportant des éléments permettant son maintien et sa répllication dans l'organisme hôte comme une origine de répllication.

5 En outre, le vecteur peut comporter des éléments permettant sa sélection dans l'organisme hôte comme, par exemple, un gène de résistance à un antibiotique ou un gène de sélection qui assurent la complémentation avec le gène respectif délété au niveau du génome de l'organisme
10 hôte. De tels vecteurs de clonage et/ou d'expression sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature.

L'invention concerne également un organisme hôte
15 caractérisé en ce qu'il est transformé à l'aide d'un vecteur de l'invention. Par « organisme hôte » selon la présente invention, on entend tout organisme mono ou pluricellulaire, inférieur ou supérieur, dans lequel un polynucléotide de l'invention est introduit pour la
20 production d'un peptide ou d'un polypeptide de l'invention. L'homme du métier connaît différentes méthodes pour introduire de façon efficace un polynucléotide dans un organisme hôte et ce, afin que, dans l'organisme hôte, le peptide ou polypeptide codé par
25 ledit polynucléotide soit produit. A titre d'exemple et de façon non exhaustive, cette méthode peut être une électroporation, une lipofection, une transformation biologique d'un végétal en utilisant *Agrobacterium tumefasciens*, etc...

30 Selon une forme préférée de l'invention, l'organisme hôte est un microorganisme tel qu'une levure, une bactérie ou un champignon. La transformation de tels microorganismes permet de produire le peptide de l'invention à échelle semi-industrielle ou industrielle.

L'homme du métier connaît de tels microorganismes et sait comment les transformer sans faire preuve d'un effort inventif.

Selon une autre forme de l'invention, l'organisme
5 hôte est une cellule animale telle qu'une cellule de mammifère.

Selon une autre forme de l'invention, l'organisme hôte est une cellule végétale ou une plante. Par « cellule de plante » on entend, selon la présente invention, toute
10 cellule issue d'une plante et pouvant constituer des tissus indifférenciés tels que des cals, des tissus différenciés tels que des embryons, des parties de plantes, des plantes ou des semences. Par « plante », on entend selon l'invention, tout organisme multicellulaire différencié
15 capable de photosynthèse, en particulier des monocotylédones ou des dicotylédones, plus particulièrement des plantes de culture destinées ou non à l'alimentation animale ou humaine.

Par conséquent, l'organisme hôte selon l'invention
20 est choisi parmi les microorganismes, les cellules animales, les cellules végétales et les plantes.

Le peptide de l'invention est également utile pour conférer aux plantes un caractère de résistance aux
25 maladies microbiennes. L'invention concerne donc également une cellule végétale résistante aux maladies microbiennes comprenant un polynucléotide de l'invention et exprimant le peptide ou un polypeptide de l'invention. L'invention se rapporte également à une plante comprenant
30 au moins une cellule végétale résistante aux maladies microbiennes telle que définie ci-dessus.

Enfin, l'invention vise la mise à profit des propriétés antimicrobiennes du peptide de l'invention

pour prévenir et/ou traiter les infections microbiennes tant chez l'homme et l'animal que chez les plantes. Dans le cadre de la présente invention, on entend par « propriétés antimicrobiennes », aussi bien des propriétés antibactériennes que des propriétés antifongiques. L'invention concerne donc avantagement l'utilisation du peptide de l'invention à titre de médicament en thérapie humaine et animale. Elle concerne également l'utilisation du peptide de l'invention pour le traitement des plantes contre les infections microbiennes, en appliquant ledit peptide directement sur les plantes. La présente invention concerne donc l'utilisation d'un peptide ou d'un polypeptide de l'invention comme agent antimicrobien et, plus particulièrement comme agent antibactérien actif contre les bactéries à Gram positif et contre les bactéries à Gram négatif. La présente invention concerne également l'utilisation d'un peptide ou d'un polypeptide de l'invention pour la préparation d'une composition antimicrobienne et, plus particulièrement, antibactérienne destinée à lutter contre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif.

L'invention concerne ainsi une composition antimicrobienne comprenant à titre d'agent actif le peptide de l'invention ou un polypeptide de l'invention avantagement associé dans ladite composition à un véhicule acceptable. La composition agit plus particulièrement contre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. La composition antimicrobienne de l'invention peut en outre comprendre un autre principe actif tel qu'un autre agent antimicrobien.

Par " véhicule ", on entend selon la présente invention, toute substance qui est ajoutée au peptide ou

au polypeptide de l'invention pour favoriser leur transport, éviter leur dégradation substantielle dans ladite composition et préserver leurs propriétés antimicrobiennes. Le véhicule est choisi en fonction du type d'application de la composition. Notamment, lorsque la composition est appliquée à un usage pharmaceutique en santé humaine et animale, l'homme du métier choisira le véhicule pharmaceutiquement acceptable adapté à la voie d'administration de la composition pharmaceutique de l'invention.

Ainsi, les compositions pharmaceutiques selon l'invention sont constituées par au moins le peptide ou le polypeptide de l'invention sous forme libre ou sous forme d'un sel d'addition avec un acide pharmaceutiquement acceptable, à l'état pur ou sous forme d'une composition dans laquelle il est associé à tout autre produit pharmaceutiquement compatible. Les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être employées par voie orale, parentérale, rectale ou topique.

A titre de compositions solides pour administration orale, on peut utiliser des comprimés, des pilules, des poudres, etc... où le peptide ou le polypeptide de l'invention sont mélangés à un ou plusieurs diluants inertes classiquement utilisés, et éventuellement à d'autres substances, tels que par exemple un lubrifiant, un colorant, un enrobage etc...

A titre de compositions liquides pour administration orale ou oculaire, on peut utiliser des suspensions, des solutions, des émulsions, des sirops pharmaceutiquement acceptables contenant des diluants inertes classiquement utilisés, et éventuellement d'autres substances comme des produits mouillants, édulcorants, épaississants, etc...

Les compositions stériles pour administration parentérale peuvent être des solutions aqueuses ou non, des

suspensions ou des émulsions. Comme solvant ou véhicule, on peut employer l'eau, le propylèneglycol, des huiles végétales ou d'autres solvants organiques convenables. Ces compositions peuvent également contenir des adjuvants, 5 comme des agents mouillants, isotonisants, émulsifiants, etc...

Les compositions pour l'administration topique peuvent être par exemple des crèmes, lotions, 10 collutoires, gouttes nasales ou oculaires ou aérosol.

Lorsque la composition antimicrobienne de l'invention est réservée à un usage agrochimique, le véhicule est un véhicule agrochimiquement acceptable adapté à une administration sur les plantes ou à 15 proximité des plantes sans les dégrader.

Dans les compositions antimicrobiennes objet de la présente invention, la quantité de peptide ou de polypeptide objet de l'invention avantageusement utilisée 20 est comprise entre 0,1 et 50 μM selon les applications. Cependant, il est évident que l'homme du métier saura adapter cette quantité en fonction du type de compositions antimicrobiennes i.e. compositions pharmaceutiques ou compositions agrochimiques et en 25 fonction du mode d'administration desdites compositions.

La présente invention concerne également une méthode pour prévenir et/ou traiter une infection microbienne et, plus particulièrement, une infection 30 bactérienne causée aussi par des bactéries à Gram positif qu'à Gram négatif. La présente méthode comprend l'administration à un sujet d'une quantité efficace d'un peptide, d'un polypeptide, d'un polynucléotide ou d'une composition selon la présente invention. Par « sujet »,

on entend dans la présente invention tout animal ou tout humain pour lequel une infection microbienne a été diagnostiquée mais également tout animal ou tout humain susceptible de souffrir de cette infection.

5

Les exemples qui suivent permettent d'illustrer la présente invention et ne sauraient être interprétés comme limitant sa portée. Ces exemples font plus particulièrement référence à la mise en évidence de la papillosin, sa purification et son activité antibactérienne.

10

I. Isolement de la papillosin.

La caractérisation biochimique de cette molécule est complète. La papillosin a été isolée à partir des cellules circulantes (hémocytes) de l'ascidie. Elle a été purifiée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en suivant son activité par des tests réalisés *in vitro* tout au long du protocole de purification.

15

I.1. Isolement à partir des hémocytes des ascidies.

La récolte d'hémolymphe est effectuée, après lavage dans l'éthanol des ascidies (élimination des mucilages), par section au niveau du pied. La séparation des deux compartiments sanguins (le plasma et les hémocytes) se fait par centrifugation de l'hémolymphe (1000g pendant 10 minutes). On obtient ainsi les hémocytes au culot.

20

Le culot cellulaire est homogénéisé dans 10 volumes d'acide acétique 2 M en utilisant un homogénéisateur, puis l'homogénat est laissé pendant 12 heures sous agitation à 4°C. Ensuite, cet homogénat est centrifugé à 10000g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est alors soumis à un premier fractionnement sur cartouche Sep-Pak C18 de phase inverse (Sep-Pak Vac 12cc, Waters Corporation, USA, réf: WAT036915). Le surnageant est

30

déposé sur la cartouche et trois fractions de polarité décroissante sont éluées grâce à 3 solutions préparées à partir d'eau ultrapure (EUP) et d'acétonitrile (ACN, HPLC Gradient Grade, ACROS Organics, réf: 32573-0025) additionnés de 0,05% d'acide trifluoroacétique (TFA, Fluka Chemika, réf: 91707):

10% d'ACN + 90% d'EUP + 0,05% TFA

60% d'ACN + 40% d'EUP + 0,05% TFA

80% d'ACN + 20% d'EUP + 0,05% TFA

10 Les extraits hémocytaires sont donc séparés en trois fractions. Ces différentes fractions sont ensuite congelées à - 80°C, lyophilisées et reprises dans 1 ml d'EUP additionnée de 0,05% de TFA. Une centrifugation est ensuite réalisée (10000g, 20 minutes à 4°C). Le surnageant
15 constitue le matériel qui sera utilisé pour l'HPLC.

I.2. Purification par HPLC.

Toutes les étapes de purification sont effectuées sur une HPLC de type Waters (modèle 1525 HPLC Binary Pump) équipée d'un détecteur spectrophotométrique (modèle 20 2487 Dual λ absorbance detector, Waters), d'un four thermostaté à effet Peltier (modèle 560-CIL, Cluzeau info labo) et relié à un système d'acquisition des données (logiciel Breeze). Les molécules éluées de la colonne
25 sont analysées au niveau du détecteur UV à deux longueurs d'onde (224 et 280 nm).

La première étape d'HPLC s'applique à la fraction Sep-Pak 60% qui contient la papillosin. L'éluution est effectuée en phase inverse sur une colonne Sephasil C18
30 (250*4.6mm, Waters, réf : WAT054275) suivant un gradient binaire linéaire: ACN et EUP additionnés de 0,05% TFA. Ce gradient varie de 2% à 72% d'ACN sur un temps de 90 minutes, le débit appliqué étant de 1ml /minute.

Les fractions éluées sont détectées par la visualisation de pics d'absorbance sur le moniteur et sont collectées dans des tubes de polyéthylène (tubes low-binding Minisorp, Merck eurolab, réf: 13183.01). Ces fractions seront ensuite congelées, lyophilisées et reprises dans de l'EUP TFA 0,05%.

Elles sont ensuite testées pour leurs activités antibactériennes. La fraction contenant la papillosin est soumise à une dernière étape de purification effectuée en phase inverse sur une colonne Sephasil C8 (150*2.1mm, Waters, réf : WAT056955). Le gradient d'élution utilisé encadre le pourcentage d'élution de la fraction concernée lors de l'étape de séparation précédente (29% ACN) : la fenêtre d'élution est étalée sur des pourcentages en acétonitrile de - 5% jusqu'à + 5% par rapport au pourcentage d'élution obtenu précédemment.

De plus, un étalement du gradient dans le temps (10 % en 40 minutes) est effectué afin d'obtenir une séparation plus fine. Cette seconde étape d'HPLC permet l'obtention du produit pur. L'élution est effectuée en 40 minutes, à un débit de 0,3 ml/minutes, avec un gradient binaire linéaire: ACN/TFA et EUP/TFA.

II. Caractérisation de la papillosin.

25 II.1. Tests d'activité antibactérienne au cours des étapes de purification.

Les tests d'activités antibactériennes, qui permettent de suivre l'activité biologique au cours des étapes de purification, sont réalisés en micro-plaque (96 puits, Becton Dickinson, USA, réf: 18572). Les différentes fractions récoltées après la séparation (Sep-Pak ou HPLC) sont congelées, lyophilisées puis reprises dans l'EUP/TFA.

Elles sont ensuite déposées à raison de 10 μ l dans chaque puit de la micro-plaque et additionnées de 100 μ l de

culture bactérienne (*E. coli*) en milieu Poor Broth (1% bactotryptone, 0,5% NaCl, pH 7,5) dont la densité optique (DO) est amenée à 0,001. Le tout est placé sous agitation (250 rpm) à 37°C durant 12 heures.

5

II.2. Caractérisation biochimique de la papillosin.

Après purification, une combinaison de techniques de spectrométrie de masse et de dégradation d'Edman, a permis à la Demanderesse d'obtenir la caractérisation biochimique
10 complète de ce peptide. Il s'agit d'un peptide de 34 acides aminés dont la séquence suit :
GFWKKVGSAAWGGVKAAAKGAAVGGLNALAKHIQ (SEQ ID No. 1 dans le listage de séquences en annexe). Ce peptide est une molécule cationique (point isoélectrique estimé : 10,60)
15 qui se structure vraisemblablement en hélice α amphipatique comme le suggère les prédictions de structure secondaire.

II.3. Activité antibactérienne de la papillosin.

Pour déterminer le spectre d'activité de la
20 papillosin, des tests complémentaires ont été réalisés. La concentration minimale bactéricide (MBC) pour chaque souche bactérienne testée est déterminée de la façon suivante : le peptide est repris dans une solution contenant 0,01% d'acide acétique et 0,2% de serumalbumine bovine (BSA) ;
25 puis des dilutions sérielles de 2 en 2 sont réalisées dans la même solution 0,01% d'acide acétique et 0,2% de BSA. 10 μ l de chaque dilution sont incubés dans des plaques 96 puits stériles (Becton Dickinson, USA, réf: 18572) en présence de 100 μ l d'une suspension de bactéries ramenée à
30 une densité optique de 0,001 à 600 nm dans le milieu Mueller Hinton (MHB, SIGMA, réf: M-9677).

La croissance bactérienne est contrôlée après 18 heures d'incubation sous agitation. La MBC est déterminée en étalant le contenu des trois premiers puits où aucune

croissance bactérienne n'est observée ; cet étalement se fait sur des boîtes de Pétri coulées avec un agar préparé à partir du milieu de Mueller Hinton. Ces boîtes sont ensuite incubées 18 heures. La MBC correspond à la concentration la plus basse en peptide pour laquelle aucune colonie bactérienne n'est observée sur les boîtes incubées.

Le tableau 1 donne le spectre d'activité de la molécule. En résumé, la papillosin a une activité bactériolytique puissante sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

Tableau 1:

Spectre d'activité de la papillosin(Valeurs des MBC exprimées en μM)

Bacteria	MBC
Bacteries à Gram-positif	
<i>M. luteus</i>	0,125-0,25
<i>S. aureus</i>	0,5-1
Bacteries à Gram-négatif	
<i>E. coli</i> DH5a	0,25-0,5

REVENDEICATIONS

1) Peptide isolé dont la séquence en acides aminés est la suivante : GFWKKVGSAAWGGVKAAAKGAAVGGGLNALAKHIQ (SEQ ID No. 1 dans la liste de séquences en annexe), ses dérivés et ses fragments.

2) Polypeptide isolé comprenant un peptide selon la revendication 1.

10

3) Polynucléotide isolé caractérisé en ce qu'il code un peptide selon la revendication 1 ou un polypeptide selon la revendication 2.

4) Vecteur de clonage et/ou d'expression caractérisé en ce qu'il contient un polynucléotide selon la revendication 3.

5) Vecteur selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il contient en outre au moins un élément choisi dans le groupe des promoteurs constitutifs, des promoteurs inductibles, des éléments terminateurs.

6) Vecteur selon l'une quelconque des revendications 4 ou 5, caractérisé en ce qu'il comporte des éléments permettant son maintien et sa répllication dans un organisme hôte.

7) Organisme hôte transformé à l'aide d'un vecteur selon l'une des revendications 4 à 6.

8) Organisme hôte dans lequel un polynucléotide selon la revendication 3 est introduit dans ledit organisme hôte pour la production d'un peptide selon la

revendication 1 ou d'un polypeptide selon la revendication 2.

5 9) Organisme hôte selon l'une quelconque des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les microorganismes, les cellules animales, les cellules végétales et les plantes.

10 10) Cellule végétale résistante aux maladies antimicrobiennes comprenant un polynucléotide selon la revendication 3 et exprimant un peptide selon la revendication 1 ou un polypeptide selon la revendication 2.

15 11) Plante caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une cellule végétale selon la revendication 10.

20 12) Utilisation d'un peptide selon la revendication 1 ou d'un polypeptide selon la revendication 2 pour la préparation d'une composition antimicrobienne et, plus particulièrement, antibactérienne destinée à lutter contre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif.

25 13) Composition antimicrobienne comprenant à titre d'agent actif un peptide selon la revendication 1 ou un polypeptide selon la revendication 2 avantageusement associé dans ladite composition à un véhicule acceptable.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/000535

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 A61K38/17 C07K14/435 A01H4/00 A61P31/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K C12N

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, MEDLINE, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, 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	<p>TOSSI A ET AL: "Molecular diversity in gene-encoded, cationic antimicrobial polypeptides." CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN. NETHERLANDS 2002, vol. 8, no. 9, 2002, pages 743-761, XP008024137 ISSN: 1381-6128 page 745, right-hand column, paragraph 2</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	1-13

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

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

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

Date of the actual completion of the international search

12 August 2004

Date of mailing of the international search report

20/08/2004

Name and mailing address of the ISA

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

Authorized officer

Piret, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/000535

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEE A I H ET AL: "Dicynthaurin: an antimicrobial peptide from hemocytes of the solitary tunicate, Halocynthia aurantium" BBA - GENERAL SUBJECTS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 1527, no. 3, 15 August 2001 (2001-08-15), pages 141-148, XP004296801 ISSN: 0304-4165 the whole document	1-13
X	JANG W S ET AL: "Halocidin: a new antimicrobial peptide from hemocytes of the solitary tunicate, Halocynthia aurantium" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 521, no. 1-3, 19 June 2002 (2002-06-19), pages 81-86, XP004362143 ISSN: 0014-5793 the whole document	1-13
X	WO 98/20028 A (UNIV CALIFORNIA) 14 May 1998 (1998-05-14) the whole document	1-13
X	WO 98/38309 A (UNIV CALIFORNIA) 3 September 1998 (1998-09-03) the whole document	1-13
X	BATISTA C V ET AL: "Antimicrobial peptides from the Brazilian frog Phyllomedusa distincta." PEPTIDES. UNITED STATES 1999, vol. 20, no. 6, 1999, pages 679-686, XP002260594 ISSN: 0196-9781 the whole document	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/000535

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9820028	A	14-05-1998	US	6010876 A	04-01-2000
			US	6040293 A	21-03-2000
			WO	9820028 A2	14-05-1998

WO 9838309	A	03-09-1998	US	5998374 A	07-12-1999
			AU	6185898 A	18-09-1998
			WO	9838309 A1	03-09-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2004/000535

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12N15/12 A61K38/17 C07K14/435 A01H4/00 A61P31/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C07K C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, MEDLINE, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, 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	TOSSI A ET AL: "Molecular diversity in gene-encoded, cationic antimicrobial polypeptides." CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN. NETHERLANDS 2002, vol. 8, no. 9, 2002, pages 743-761, XP008024137 ISSN: 1381-6128 page 745, colonne de droite, alinéa 2 ----- -/--	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		
<input checked="" type="checkbox"/> 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 août 2004		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 20/08/2004
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Piret, B

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2004/000535

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>LEE A I H ET AL: "Dicynthaurin: an antimicrobial peptide from hemocytes of the solitary tunicate, Halocynthia aurantium" BBA - GENERAL SUBJECTS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 1527, no. 3, 15 août 2001 (2001-08-15), pages 141-148, XP004296801 ISSN: 0304-4165 le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13
X	<p>JANG W S ET AL: "Halocidin: a new antimicrobial peptide from hemocytes of the solitary tunicate, Halocynthia aurantium" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 521, no. 1-3, 19 juin 2002 (2002-06-19), pages 81-86, XP004362143 ISSN: 0014-5793 le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13
X	<p>WO 98/20028 A (UNIV CALIFORNIA) 14 mai 1998 (1998-05-14) le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13
X	<p>WO 98/38309 A (UNIV CALIFORNIA) 3 septembre 1998 (1998-09-03) le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13
X	<p>BATISTA C V ET AL: "Antimicrobial peptides from the Brazilian frog Phyllomedusa distincta." PEPTIDES. UNITED STATES 1999, vol. 20, no. 6, 1999, pages 679-686, XP002260594 ISSN: 0196-9781 le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR2004/000535

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication		Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9820028	A	14-05-1998	US	6010876 A	04-01-2000
			US	6040293 A	21-03-2000
			WO	9820028 A2	14-05-1998
<hr/>					
WO 9838309	A	03-09-1998	US	5998374 A	07-12-1999
			AU	6185898 A	18-09-1998
			WO	9838309 A1	03-09-1998
<hr/>					