

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :

2 908 413

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

②1 N° d'enregistrement national :

06 09983

⑤1 Int Cl⁸ : **C 07 K 7/06** (2006.01), C 07 K 14/78, 16/18, G 01 N 33/68

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 15.11.06.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 16.05.08 Bulletin 08/20.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *SYNARC Société par actions simplifiée — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : GARNERO PATRICK et CHARNI BEN TABASSI NADINE.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : CABINET PLASSERAUD.

⑤4 **MARQUEUR SPECIFIQUE D'UNE DEGRADATION OXYDATIVE DE TISSUS CONTENANT DU COLLAGENE DE TYPE III, MOYENS ET METHODES, KITS DE DIAGNOSTIC DE SUIVI OU DE PRONOSTIC DES PATHOLOGIES CIBLEES PAR CE MARQUEUR.**

⑤7 L'invention concerne un nouveau marqueur peptidique, spécifique d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III et de préférence de la nitrosylation du collagène de type III. L'objectif essentiel est de fournir un marqueur spécifique et précoce ou pré-symptomatique de maladies qui s'accompagnent d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III, en particulier les affections inflammatoires telles que les maladies ostéo-articulaires. Le marqueur selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence peptidique de 5 à 25 acides aminés, de préférence de 5 à 20 AA, et, plus préférentiellement encore, de 4 à 15 AA, dont la sous-séquence QYDSYD dans laquelle au moins l'un des Y est nitrosylé et où Q correspond non seulement à la glutamine mais aussi à l'acide pyroglutamique.

L'invention concerne également des moyens et méthodes et kits de diagnostic de suivi ou de pronostic des pathologies ciblées par ce marqueur, notamment pour les affections inflammatoires telles que les maladies ostéo-articulaires.

FR 2 908 413 - A1



**MARQUEUR SPECIFIQUE D'UNE DEGRADATION OXYDATIVE DE TISSUS
CONTENANT DU COLLAGENE DE TYPE III, MOYENS ET METHODES, KITS
DE DIAGNOSTIC DE SUIVI OU DE PRONOSTIC DES PATHOLOGIES CIBLEES
PAR CE MARQUEUR**

5

DOMAINE TECHNIQUE

Le domaine de l'invention est celui des outils et des méthodes de diagnostic, suivi et pronostic de maladies qui s'accompagnent d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III. Il peut s'agir notamment de maladies ostéo-articulaires telles que
10 sont notamment l'arthrose, la polyarthrite rhumatoïde, l'arthrite psoriasique, la goutte, la chondrocalcinose, l'arthrite induite par Yersenia, l'arthrite pyrophosphate, l'arthrite septique ou les désordres liés aux disques intervertébraux comme les spondylarthrites.

Plus précisément, l'invention concerne les moyens et les procédés d'évaluation de la dégradation du tissu synovial, en particulier du collagène de type III synovial, sous l'effet
15 d'un stress oxydatif propre à ces maladies, notamment les maladies ostéo-articulaires.

Plus précisément encore, l'invention vise en tant que produits *per se*, des marqueurs biologiques peptidiques, les éléments de reconnaissance de ces marqueurs (anticorps), les procédés et les kits de détection desdits marqueurs à l'aide desdits éléments, en vue d'applications du type diagnostic, suivi et pronostic des maladies susvisées, notamment les
20 maladies ostéo-articulaires.

L'invention est également relative au moyen d'obtention des marqueurs peptidiques et des anticorps de reconnaissance desdits marqueurs, ces moyens étant par exemple des séquences nucléiques.

25 ART ANTERIEUR- POSITION DU PROBLEME

Le diagnostic, le traitement, le suivi et le pronostic de maladies qui s'accompagnent d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III, est un enjeu majeur de santé publique.

30 Comme exemples de ces maladies, on peut citer les cancers, les maladies neurodégénératives tels que la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer....

Le collagène de type III est un homotrimère de chaînes de collagène identique alpha 1 (III), bordées par des régions linéaires télopeptidiques. Le collagène de type III est localisé avec le collagène de type I dans la peau et les tissus vasculaires. Le collagène de type III est le
35 collagène fibrillaire majeur de la peau et du tissu vasculaire. Au niveau de l'articulation, le collagène de type III est le collagène majoritaire de la synoviale.

Les affections inflammatoires telles que les maladies ostéo-articulaires, représentent une part significative de ce type de maladies qui s'accompagnent d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III.

5 L'arthrose et la polyarthrite rhumatoïde (arthrite) sont deux maladies ostéo-articulaires parmi les plus communes.

L'arthrose peut être due à l'âge ou à un traumatisme. L'arthrose provoque des lésions sévères au niveau du cartilage, une immobilité et des excroissances osseuses au niveau de l'articulation (ostéophytes). Cette maladie touche l'articulation entière, ce qui englobe le cartilage, la synoviale et les os reliés l'un à l'autre par cette articulation. La dégradation du
10 cartilage dans l'arthrose est caractérisée par deux phases : une phase de biosynthèse pendant laquelle les chondrocytes tentent de réparer la matrice extracellulaire endommagée et une phase de dégradation où les enzymes produites par les chondrocytes digèrent la matrice. L'activité de biosynthèse est alors incapable de faire face à l'activité catabolique, ce qui conduit à une inhibition de la synthèse de la matrice et à une accélération de
15 l'érosion du cartilage. L'arthrose est donc une exagération du processus de remodelage osseux dans l'articulation. Dans le cartilage normal adulte, les chondrocytes synthétisent les constituants de la matrice lentement. Le renouvellement de la matrice est strictement régulé : il y a un équilibre entre la synthèse et la dégradation.

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune provoquant une inflammation
20 chronique au niveau des articulations et une destruction du cartilage, des os, des tendons et des ligaments. L'inflammation a pour origine une défaillance du système immunitaire qui ne reconnaît pas les cellules du soi et les détruit. Dans la polyarthrite rhumatoïde, l'inflammation de la synoviale provoque une production excessive de liquide synovial et d'enzymes par les synoviocytes. Celles-ci sont à l'origine de la dégradation du cartilage et
25 de l'os. Lorsque cette situation devient chronique, il en résulte une inflammation, une douleur, et, éventuellement, un problème de mobilité.

Il est difficile de diagnostiquer ces maladies rapidement. En effet, la douleur et la raideur de l'articulation n'apparaissent que tardivement et la radiographie ne permet de détecter la maladie qu'à un stade avancé de celle-ci. Il existe donc un intérêt majeur à trouver des
30 marqueurs spécifiques (par exemple sérique ou urinaire) du renouvellement des constituants de l'articulation. L'utilisation de ces marqueurs biologiques spécifiques est d'autant plus intéressante qu'elle constitue une technique non invasive qui permet de détecter précocement la maladie, de suivre son évolution et d'établir un pronostic à son égard.

35 Les marqueurs biologiques ou biochimiques du renouvellement articulaire peuvent être des marqueurs osseux spécifiques de la formation osseuse ou de la résorption osseuse, des marqueurs cartilagineux spécifiques de la formation du cartilage ou de la dégradation du

cartilage, ou bien encore des marqueurs de la synoviale spécifique de la synthèse ou de la dégradation de cette dernière.

Dans le cadre de la présente invention, on s'intéresse plus particulièrement aux marqueurs biologiques ou biochimiques de la synoviale.

- 5 Par ailleurs, il est connu que l'oxydation des protéines par des espèces hyper-oxydantes, est un phénomène impliqué dans la pathogenèse de nombreuses maladies telles que les maladies neurodégénératives, les cancers, l'artériosclérose, la cataracte, la dysplasie, la dystrophie et les maladies inflammatoires dont notamment les maladies ostéo-articulaires ainsi que dans le vieillissement.
- 10 Parmi les espèces hyper-oxydantes, figure le monoxyde d'azote (NO). NO a une fonction de régulation mais exerce également, lorsqu'il est surexprimé dans des conditions inflammatoires, un effet cytotoxique induisant un stress oxydatif. Dans sa fonction de régulation, il agit comme un agent protecteur qui supprime la prolifération des cellules et la synthèse protéique. Il permet ainsi d'atténuer la réaction inflammatoire. Mais, NO peut
- 15 également jouer le rôle d'agent de stress oxydatif en inhibant la régénération des tissus et la synthèse de nouvelles protéines matricielles.

Le pouvoir hyper-oxydant de NO et de ses sous-produits de réaction avec l'anion super oxyde O_2^- , est à l'origine de sa cytotoxicité.

- 20 Dans le cas de maladies ostéo-articulaires du type polyarthrite rhumatoïde ou arthrose, la surexpression de NO par les chondrocytes, les macrophages et le tissu synovial en inflammation, est significative mais n'est pas spécifique des pathologies articulaires.

- On sait en outre que le stress oxydatif induit par NO et ses sous-produits peroxydants, a notamment pour effet une nitrolylation (ou nitration), des composés aromatiques tels que les acides aminés aromatiques que sont la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane, qui
- 25 sont présents dans de nombreux peptides et protéines, en particulier au niveau des articulations. Une protéine articulaire bien connue est le collagène de type, I, II, III, VI, IX ou XI.

Il a donc été imaginé de choisir la nitrotyrosine comme marqueur d'un stress oxydatif associé aux maladies entraînant des dommages dus à l'oxydation.

- 30 La demande de brevet PCT WO-A-96/04311 décrit ainsi des anticorps anti-nitrotyrosine aptes à reconnaître et à se lier à la nitrotyrosine et à des résidus de nitrotyrosine au sein de protéines. Ces anticorps anti-nitrotyrosine sont décrits comme utiles dans des méthodes pour détecter diverses conditions pathologiques et, en particulier, des inflammations et des tumeurs. Ces anticorps anti-nitrotyrosine sont également utiles comme moyen de ciblage
- 35 d'agent thérapeutique dans des sites tissulaires sujets à des dommages résultant de l'oxydation. Ces anticorps anti-nitrotyrosine ne sont pas des moyens de détection spécifiques de pathologies ostéo-articulaires et permettent seulement de mettre en évidence, voire de traiter, sans discernement les cancers, les maladies d'Alzheimer, la

maladie de Parkinson, les maladies inflammatoires intestinales, le lupus érythémateux, l'arthrose ou la polyarthrite rhumatoïde. Ces anticorps anti-nitrotyrosine ciblent indifféremment toutes les protéines comportant des acides aminés de type nitrotyrosine, de sorte qu'il n'est pas possible d'identifier le tissu ou la protéine détectée.

- 5 De la même façon, la demande PCT WO-A-98/29452 divulgue un anticorps reconnaissant spécifiquement une protéine nitrosylée, en particulier l'albumine nitrosylée.

Dans ces deux demandes PCT, le marqueur biologique ou biochimique est la nitrotyrosine indépendamment de la séquence d'acides aminés avoisinante.

- 10 La demande de brevet PCT WO-A-03/076946 divulgue un marqueur biologique ou biochimique constitué, par exemple, par une séquence peptidique du type HRGYPGLDG [SEQ ID N°13] dans laquelle les résidus tyrosine Y sont nitrosylés ou nitrates, ou par une séquence LQYMRA [SEQ ID N°14]. Ces deux séquences peptidiques porteuses de nitrotyrosine sont spécifiques de collagène de type II, qui est le composant majoritaire de la matrice extracellulaire du cartilage synthétisée par les chondrocytes.

- 15 Cependant, la dégradation du tissu cartilagineux n'est pas le signe le plus précoce des pathologies articulaires.

Il existe pourtant un besoin important pour des applications diagnostic, suivi, pronostic et thérapeutique, d'un marqueur précoce ou pré-symptomatique de pathologie articulaire, tant il est difficile, comme cela a été souligné ci-avant, de diagnostiquer rapidement de telles

20 maladies, la douleur, la raideur de l'articulation et la radiographie, utilisées à ce jour étant des signes tardifs de telles maladies articulaires.

- Et à ce jour, à la connaissance de la demanderesse, le seul marqueur spécifique de tissu synovial indicateur précoce pré-symptomatique de pathologie ostéo-articulaire, est la pyridinoline glycosylée et plus particulièrement la pyridinoline diglycosylée (Pyr-Gal-Glc), appelée glusosyl-galactosyl-pyridinoline ou pyridinoline disaccharidique. Ce
- 25 marqueur précoce spécifique de pathologie synoviale ainsi que les méthodes et les kits faisant application dudit marqueur sont décrits dans la demande de brevet français FR-A-2 795 823. La pyridinoline disaccharidique (Pyr-Gal-Glc) est spécifique du collagène synovial, c'est-à-dire d'un collagène de type I, III, IV, V ou VI ou d'un mélange de ceux-ci, de préférence majoritairement de collagènes de types I et III.
- 30

- Les documents US-A-2003/119058, US-B-6 355 442, US-B-6 342 361, US-B-6 323 314, US-B-6 110 689 divulguent des méthodes de dosage de produits de dégradation de collagène du type III, à des fins de diagnostic de désordres liés au métabolisme du collagène et, plus particulièrement, à la maladie osseuse dénommée ostéoporose. Les
- 35 collagènes concernés sont notamment les collagènes de types I, II et III. Parmi les séquences peptidiques utilisées comme marqueurs et divulguées dans ces documents, figure la séquence peptidique localisée à l'extrémité N-terminale d'un télépeptide d'un collagène de type III : DVKSGV [SEQ ID N°12] La pathologie osseuse visée dans ces

brevets, à savoir l'ostéoporose, diffère clairement des pathologies articulaires inflammatoires assorties de dégradations oxydatives. La SEQ ID N°12 ne comprend pas de tyrosine nitrosylée.

5 Dans le même registre, l'EP-B-0 362 235 décrit un procédé d'analyse de produits de décomposition du collagène de type III, procédé dans lequel on fait intervenir un anticorps spécifique du télopeptide aminoterminal du collagène de type III. Cet anticorps est apte à reconnaître et à se lier avec la séquence peptidique constitutive de tout le télopeptide aminoterminal. La détection du télopeptide aminoterminal de collagène de type III selon l'EP-B-0 362 235 n'est pas reliée à la mise en évidence de pathologies ostéo-articulaires inflammatoires oxydatives.

PROBLEME A RESOUDRE - OBJECTIFS

Sur un plan général, l'un des objectifs majeurs de l'invention est de fournir des outils et des méthodes permettant d'améliorer le diagnostic, le traitement, le suivi et le pronostic de maladies qui s'accompagnent d'une Dégradation Oxydative de Tissus contenant du Collagène de type III (lesdites maladies étant ci-après qualifiées de D.O.T.Coll.III), en particulier les affections inflammatoires telles que les maladies ostéo-articulaires.

Sur un plan plus spécifique et compte tenu de l'intérêt médical dont est porteur un marqueur spécifique et précoce ou pré-symptomatique de pathologies ostéo-articulaires, l'un des objectifs essentiels de la présente invention est de fournir un nouveau marqueur de ce type susceptible d'être une alternative à la pyridinoline disaccharique (Pyr-Gal-Glc) divulguée à cette fin dans la demande de brevet FR-A-2 795 823.

On rappellera en effet que dans certaines pathologies ostéo-articulaires (en particulier la polyarthrite rhumatoïde), les tissus non minéralisés (synoviale, cartilage) sont dégradés avant la matrice osseuse.

Pour améliorer encore la spécificité des marqueurs spécifiques et précoces ou pré-symptomatiques de pathologies ostéo-articulaires (notamment synoviale), il serait intéressant de disposer d'un marqueur encore plus spécifique de ce type d'affections articulaires inflammatoires. C'est un autre objectif essentiel de la présente invention.

30 Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir un marqueur spécifique et précoce ou pré symptomatique du métabolisme oxydatif du tissu synovial et plus particulièrement de la nitrosylation du collagène synovial.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir un marqueur spécifique et précoce ou pré-symptomatique du métabolisme oxydatif de tissus contenant du collagène de type III, tel que le tissu synovial et plus particulièrement de la nitrosylation d'un collagène de type III.

Un autre objectif essentiel de la présente invention est de fournir un nouveau marqueur peptidique, d'une part, simple, sensible et fiable et, d'autre part, spécifique des pathologies

D.O.T.Coll.III, dont les pathologies ostéo-articulaires, plus précisément du métabolisme oxydatif des tissus contenant du collagène, tel que le tissu synovial et, encore plus précisément, de la nitrolysatation du collagène III e.g. synovial, en vue d'améliorer la précocité des informations cliniques susceptibles d'être obtenues pour des pathologies

5 D.O.T.Coll.III, notamment ostéo-articulaires, de façon à permettre in fine, un meilleur diagnostic, un meilleur suivi, un meilleur pronostic et un meilleur traitement desdites pathologies.

Un autre objectif de l'invention est d'améliorer les méthodes de diagnostic des maladies D.O.T.Coll.III, notamment ostéo-articulaires, en particulier des maladies synoviales.

10 Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir de nouvelles méthodes de diagnostic économiques, performantes, fiables et réalisables simplement in vitro à partir d'un échantillon biologique susceptible de contenir des résidus protéiques dégradés, en particulier des résidus collagéniques, topiques des affections D.O.T.Coll.III, notamment ostéo-articulaires.

15 Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir les moyens utiles pour ces méthodes de diagnostic, en particulier les marqueurs spécifiques (séquences peptidiques, de préférence collagéniques) et les éléments de détection (anticorps) desdits marqueurs.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir des méthodes améliorées pour le suivi, le pronostic de pathologies D.O.T.Coll.III, notamment ostéo-articulaires [ostéo-articulaires, en particulier synoviales] qui soient précoces fiables, performantes, économiques, et qui soient réalisables simplement in vitro, à partir d'un échantillon biologique d'un individu susceptible de contenir des résidus protéiques, en particulier collagéniques, de dégradation rendant compte de l'état pathologique.

20 Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir des méthodes améliorées pour la détermination de l'efficacité ou la toxicité d'un médicament adapté au traitement d'une pathologie D.O.T.Coll.III, notamment ostéo-articulaire (e.g. synovial).

Un autre objectif essentiel de la présente invention est de fournir des kits pour la mise en œuvre des méthodes visées dans les objectifs ci-dessus.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir des éléments de détection, en particulier des anticorps spécifiques du marqueur susvisé et susceptible d'être contenu dans les moyens de diagnostic de suivi, de pronostic ou de détermination de la toxicité ou de l'efficacité d'un remède contre ces pathologies D.O.T.Coll.III, notamment synoviales ou ostéo-articulaires.

30 Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir des séquences peptidiques spécifiques des maladies où interviennent des modifications post-traductionnelles, dégradation de protéines, par exemple de collagène, en particulier de collagène de type III sous l'effet d'une espèce hyper-oxydante, notamment du monoxyde d'azote NO et de ses

dérivés (maladies D.O.T.Coll.III telles que les arthrites, cancers, maladies neuro-dégénératives).

- Un autre objectif essentiel de l'invention est de proposer l'utilisation de ces séquences peptidiques pour des déterminations rapides et précoces in vitro de l'existence de pathologies donnant lieu à un stress oxydatif du tissu synovial.
- Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir des séquences nucléiques pour les marqueurs peptidiques susvisés de dégradation oxydative.

BREVE DESCRIPTION DE L'INVENTION

- Pour atteindre ces objectifs, parmi d'autres, les inventeurs ont eu le mérite de mettre en évidence, un nouveau marqueur peptidique (IINys) localisé au niveau du télopeptide N-terminal du collagène du type III. Ce nouveau marqueur est spécifique du métabolisme oxydatif de tissus contenant du collagène de type III tels que le tissu synovial et plus particulièrement de la nitrolylation du collagène III, en particulier synovial.
- Sachant que les tissus contenant du collagène de type III tels que le tissu synovial est le premier à être dégradé dans les pathologies D.O.T.Coll.III notamment les maladies ostéo-articulaires, ce nouveau marqueur est un marqueur précoce ou encore un marqueur pré-symptomatique desdites pathologies.
- Ce nouveau marqueur est d'autant plus intéressant qu'il peut être détecté qualitativement et quantitativement dans des échantillons biologiques (sang, urine) in vitro, provenant d'individus atteints de pathologies qui s'accompagnent de dégradation oxydative du type nitrolylation de télopeptides amino-terminaux de collagène de type III, telles que les maladies ostéo-articulaires, en particulier synoviales. Cette détection in vitro peut être réalisée de façon simple, rapide et économique, à l'aide d'éléments de détection du type anticorps, en mettant en œuvre des moyens de révélation du complexe anticorps/antigène, porteurs d'au moins un épitope constitué par le marqueur.
- Le nouveau marqueur selon l'invention peut donc être avantageusement associé à des kits de détection, à des moyens de détection de type anticorps et à des moyens de production desdits anticorps (cellules -hybridomes- séquences nucléiques).
- D'où il s'ensuit que dans le premier de ses aspects, la présente invention concerne un nouveau marqueur spécifique d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III, de préférence de la nitrosylation du collagène de type III, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence peptidique SP* de 5 à 25 acides aminés (AA), de préférence de 5 à 20 AA, et, plus préférentiellement encore, de 4 à 15 AA, dont la sous-séquence QYDSYD [SEQ ID N°1] dans laquelle au moins l'un des Y est nitrosylé* et où Q correspond non seulement à la glutamine conformément au code international mais aussi à l'acide pyroglutamique.

La présence, voire la concentration d'un tel marqueur dans un échantillon biologique d'un individu, donne des informations précoces et fiables sur des dommages oxydatifs dans un tissu de cet individu, dommages le plus souvent liés à une inflammation. En d'autres termes, cette séquence peptidique SP* marqueuse sous forme nitrosylée, constitue un index de l'état pathologique d'un individu atteint ou susceptible d'être atteint par des maladies D.O.T.Coll.III, notamment inflammatoires, telles que les maladies ostéo-articulaires, le cancer, les maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer).

De préférence, dans le cas où les tissus contenant du collagène de type III et ayant subis ou subissant des dégradations oxydatives, sont des tissus synoviaux, le collagène ciblé par le marqueur renvoie à des pathologies synoviales, c'est-à-dire des pathologies correspondant à une augmentation du turnover, à une prolifération, une dégradation, une inflammation, une destruction, une décomposition, un remodelage pathologique ou une dégradation de la synoviale ou du collagène synovial.

Le collagène synovial signifie, par exemple, au sens du présent exposé, un collagène de types, I, III, IV, V ou VI, ou un mélange de ces collagènes. De préférence, il s'agit d'un collagène de type III.

Le marqueur selon l'invention est un marqueur spécifique de pathologie synoviale permettant de distinguer cette dernière parmi d'autres pathologies et notamment les pathologies atteignant l'os et/ou le cartilage.

Outre les pathologies synoviales, l'invention concerne également d'autres pathologies ostéo-articulaires, dont celles qui entraînent une prolifération de la synoviale et une atteinte du cartilage. Ces pathologies ostéo-articulaires peuvent être des rhumatismes inflammatoires, des arthropathies métaboliques, les rhumatismes dégénératifs, des polyarthrites rhumatoïdes, des spondylarthropathies, la goutte, la chondrocalcinose ou l'arthrose, entre autres.

DESCRIPTION DETAILLE DE L'INVENTION

Suivant une caractéristique préférée de l'invention, la séquence peptidique SP* du marqueur est choisie dans le groupe de séquences suivantes:

- QY*DSY*DVKSG [SEQ ID N°2];
- QY*DSYDVKSG [SEQ ID N°3];
- QYDSY*DVKSG [SEQ ID N°4];

les séquences homologues ayant un degré d'homologie avec les SEQ ID N°2 à 4 supérieur ou égal à 95% de préférence à 98%, et, plus préférentiellement encore à 99%; séquences dans lesquelles Y* correspond à un Y nitrosylé.

Au sens de l'invention, le terme "nitrosylé" correspond, par exemple, à la modification post-traductionnelle que subit la tyrosine pour devenir la 3-nitrotyrosine. Cet exemple de nitrosylation est illustré par la figure 2 annexée.

Selon une variante, la séquence peptidique SP* est choisie dans le groupe de séquences suivantes:

5

- QY*DSY*DVKS [SEQ ID N°5];
- QY*DSYDVKS [SEQ ID N°6];
- QYDSY*DVKS [SEQ ID N°7];

les séquences homologues ayant un degré d'homologie avec les SEQ ID N°5 à 7 supérieur ou égal à 95%, de préférence à 98%, et, plus préférentiellement encore à 99%;

10

séquences dans lesquelles Y* correspond à un Y nitrosylé.

Le marqueur selon l'invention peut comprendre plusieurs séquences peptidiques SP* de nature différente, par exemple un mélange constitué d'au moins deux des séquences SEQ ID N°2 à SEQ ID N°7.

15

Il est également envisageable, conformément à l'invention, que le marqueur comprenne en sus de la ou des séquences peptidiques SP*, une séquence peptidique SP non nitrosylée, de préférence la séquence peptidique suivante: QYDSYDVKSG [SEQ ID N°8].

20 Il est à noter que les séquences peptidiques SP*, en particulier SEQ ID N°2, 3, 4, 5, 6 et 7 comportent un reste de lysine apte à former un pontage avec d'autres restes de lysine appartenant à une chaîne peptidique de la même molécule protéique ou à une autre molécule protéique.

En outre, le pontage peut impliquer deux protéines, par exemple collagéniques, identiques

25

Dans le cas où ces deux protéines sont identiques, la séquence peptidique SP* ou SP (contenue dans une protéine P) est reliée par au moins un pontage à au moins une autre séquence peptidique SP* ou SP (contenue dans la même molécule de protéine P) ou à une autre séquence peptidique SP' (contenue dans une autre molécule de protéine P), ledit pontage reliant de préférence un reste de lysine d'une séquence à un reste de lysine de

30

l'autre séquence, et, plus préférentiellement encore, ledit pontage comprenant une liaison covalente directe ou au moins un reste pyrocinoline.

Dans le cas où ces deux protéines sont différentes, la séquence peptidique SP* ou SP (contenue dans une protéine P) est reliée par au moins un pontage à au moins une autre

35

séquence peptidique SP^x (contenue dans une protéine P^x différente de P), ledit pontage reliant de préférence un reste de lysine d'une séquence à un reste de lysine de l'autre séquence, et, plus préférentiellement encore, ledit pontage comprenant une liaison covalente directe ou au moins un reste pyrocinoline.

Dans un mode préféré de réalisation de l'invention, la séquence peptidique SP*, voire la séquence peptidique SP est (sont) contenu(s) dans une protéine P constituée par du collagène de type III, de préférence dans un télépeptide (avantageusement amino-terminal) dudit collagène de type III.

- 5 En revanche, comme indiqué ci-dessus, la protéine P^x, éventuellement reliée par un pontage à la protéine P porteuse de la séquence SP* et éventuellement SP, est de préférence un collagène de type différent du type III, et, plus préférentiellement encore, un collagène de type I, SP^x étant de préférence contenu dans un télépeptide (avantageusement aminoterminal).
- 10 La séquence peptidique SP' différente de SP* et de SP, peut être localisée n'importe où dans la protéine P, c'est-à-dire dans le type triple hélice ou dans les télépeptides lorsqu'il s'agit de collagène. La localisation de SP peut, par exemple, être dans la partie C-terminale de la triple hélice de collagène de type III.
- Par "protéine", on entend au sens de l'invention, la protéine entière, par exemple le
- 15 collagène ou des fragments de celle-ci résultant de la dégradation oxydative liée à une pathologie D.O.T.Coll.III, par exemple une pathologie inflammatoire articulaire.

- Selon un deuxième de ses aspects, la présente invention concerne une séquence peptidique isolée du corps humain ou autrement produite par un procédé technique, caractérisée en ce
- 20 qu'elle comprend de 5 à 25 acides aminés (AA), de préférence de 5 à 20 AA, et, plus préférentiellement encore, de 4 à 15 AA, dont la sous-séquence QYDSYD [SEQ ID N°1] dans laquelle au moins l'un des Y est nitrosylé* et où le Q peut être l'acide pyroglutamique.

- De préférence, cette séquence peptidique est caractérisée en ce qu'elle est choisie dans le
- 25 groupe de séquences suivantes:

- SP* telle que définie ci-dessus,
 - SP telle que définie ci-dessus,
 - SP^x telle que définie ci-dessus,
 - les séquences homologues ayant un degré d'homologie avec les SEQ SP, SP*, SP^x
- 30 supérieur ou égal à 95% de préférence à 98%, et, plus préférentiellement encore à 99%; dans lesquelles Y* correspond à un Y nitrosylé.

- Dans ce deuxième aspect de l'invention, on vise les séquences peptidiques prises en tant que telles, à titre de produits nouveaux, et utilisables notamment comme marqueur spécifique d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène III, par exemple le
- 35 tissu synovial.

Suivant un troisième aspect, l'invention vise les outils génétiques de synthèse des séquences peptidiques visées ci-dessus, et en particulier les séquences SP* ou SP, plus

particulièrement encore les séquences N°2, 3, 4, 5, 6 et 7. Dans ce troisième aspect, l'invention vise donc toute séquence nucléique codant pour le marqueur défini ou la séquence définie ci-dessus.

- 5 Dans le quatrième de ses aspects, la présente invention concerne l'utilisation d'au moins une séquence peptidique SP* ou SP telles que définies ci-dessus dans la présentation du marqueur selon le premier aspect de l'invention, ou d'une séquence peptidique prise en tant que telle conformément au troisième aspect de l'invention (par exemple SEQ ID N°1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7), pour une application technique choisie dans le groupe comprenant:
- 10 • le diagnostic d'une pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III;
- le suivi d'une pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III;
- la détermination de l'efficacité d'un médicament adapté au traitement d'une
- 15 pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III;
- ou la détermination de la toxicité d'un médicament adapté au traitement d'une pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III.
- 20 De préférence, la pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III (pathologie D.O.T.Coll.III), est une pathologie synoviale ou une autre pathologie ostéo-articulaire.

L'utilisation selon le quatrième aspect de l'invention est à relier directement au cinquième aspect de la présente invention, à savoir :

- 25 → d'une part, une méthode de diagnostic, de suivi ou de pronostic d'une pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III , caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes essentielles suivantes:
- a. analyse quantitative et/ou qualitative in vitro d'un échantillon biologique
- 30 d'un individu, afin de détecter un marqueur spécifique d'une dégradation oxydative du tissu synovial selon l'une quelconque des revendications 1 à 8;
- b. comparaison de la concentration en marqueur éventuellement détecté dans l'échantillon avec une concentration de référence correspondant à l'existence (à un stade déterminé) ou à l'absence chez l'individu, d'une pathologie synoviale
- 35 ou d'une autre pathologie ostéo-articulaire ;
- et, d'autre part, une méthode pour la détermination de l'efficacité ou de la toxicité d'un médicament adapté au traitement d'une pathologie qui s'accompagne d'une

dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes essentielles suivantes:

- a. analyse quantitative et/ou qualitative in vitro d'un échantillon biologique d'un individu, afin de détecter un marqueur spécifique d'une dégradation oxydative du tissu synovial selon l'une quelconque des revendications 1 à 8;
- b. comparaison de la concentration en marqueur éventuellement détecté dans l'échantillon avec une concentration de référence correspondant à l'existence (à un stade déterminé) ou à l'absence chez l'individu, d'une pathologie synoviale ou d'une autre pathologie ostéo-articulaire.

10

De préférence, la pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III (pathologie D.O.T.Coll.III), est une pathologie synoviale ou une autre pathologie ostéo-articulaire.

- 15 Les méthodes selon l'invention sont des méthodes médicales de prévention et de traitement de pathologies qui s'accompagnent d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III (pathologie D.O.T.Coll.III), de préférence des pathologies synoviales ou des pathologies ostéo-articulaires.

- 20 Elles consistent à détecter dans des échantillons biologiques, le marqueur spécifique selon l'invention tel que défini ci-avant. Un échantillon biologique peut comprendre notamment un fluide biologique, en particulier ceux qui sont habituellement testés en tant qu'échantillon clinique. Cela inclut tous les liquides corporels tels que le sang (sous toutes les formes analysables, en particulier le sérum et le plasma), l'urine, la salive, la sueur, les extraits ou les surnageants de culture ou de cellule ou le liquide synovial. Le liquide synovial est avantageux pour la détection de pathologies synoviales dans la mesure où il est spécifique du tissu synovial ou de la synoviale. Un échantillon biologique peut être également un tissu extrait de l'individu, ce tissu pouvant éventuellement être mis en culture avant que l'on effectue la détection du marqueur sur ce tissu. Ce tissu peut être par exemple la synoviale.

- 25 Dans les méthodes selon l'invention, la détection du marqueur dans l'échantillon biologique est qualitative et/ou quantitative. Cette détection peut être effectuée par exemple par une technique de chromatographie liquide à haute performance (HPLC), par fluorescence, par spectroscopie aux ultraviolets, par détection électrochimique ou par les techniques d'analyse protéomique ou "microarray".

- 30 De préférence, la détection sera plutôt fondée sur une technique immunologique (e.g. ELISA, technique immuno-enzymatique, technique d'immuno-fluorescence, technique radio-immunologique, technique chémo-immunologique).

Ces différentes techniques de détection sont bien connues de l'homme de l'art. S'agissant des techniques immunologiques, on pourra se référer à Diamantis et Cristopoulos,

Immunoassay, Academic Press, San Diego 1996, notamment les pages 579 et suivantes. Pour les techniques d'analyse protéomique, on pourra notamment se référer à Urbanowska et al. Development of protein microarray technology to monitor biomarkers of rheumatoid arthritis disease. Cell Biol. Toxicol., 2003 19(3): 189-202 à Glokler and Angenendt.

- 5 Protein and antibody microarray technology. Journal of chromatography B, 2003 797(1-2): 229-240.

Concernant la "concentration de référence" qui sert de base de comparaison dans les méthodes selon l'invention, les précisions suivantes peuvent être apportées.

- 10 Le choix de la concentration de référence correspondant soit à une absence de pathologie, soit à l'existence d'une pathologie à un stade déterminé, peut être fait par l'homme du métier en fonction du marqueur sélectionné ainsi que de la technique utilisée.

A titre d'exemple, la concentration de référence qui délimite l'état pathologique de l'état non pathologique pour différentes techniques, correspond à la moyenne des malades au dessus du 95^{ème} percentile des valeurs des contrôles.

15

Puisque l'invention concerne dans son cinquième aspect, des méthodes faisant intervenir la détection du marqueur, il est clair qu'un sixième aspect de l'invention porte sur les moyens permettant la mise en œuvre de ces méthodes.

- 20 Ainsi, l'invention concerne un moyen pour le diagnostic, le suivi ou le pronostic d'une pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un élément de détection du marqueur tel que défini ci-dessus.

- 25 Un autre moyen selon l'invention est un moyen pour la détermination de l'efficacité d'un médicament adapté au traitement d'une pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un élément de détection du marqueur tel que défini ci-dessus.

- 30 Un autre moyen selon l'invention est un moyen pour la détermination de la toxicité d'un médicament adapté au traitement d'une pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un élément de détection du marqueur tel que défini ci-dessus.

- 35 Comme indiqué ci-dessus dans le cadre de l'évocation des méthodes, la détection préférée suivant l'invention est une détection de type immunologique. Ainsi, conformément à l'invention, les moyens susvisés ont pour caractéristique que l'élément de détection tel que défini ci-dessus est caractérisé en ce que l'élément de détection comporte au moins un anticorps (purifié) apte à reconnaître l'épitope compris dans la séquence peptidique SP* du

marqueur tel que défini ci-dessus et à s'associer de manière spécifique avec la protéine porteuse dudit marqueur ou de ladite séquence.

5 Les moyens de l'invention s'appliquent pour des pathologies qui s'accompagnent d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III (pathologie D.O.T.Coll.III), et, de préférence, pour des pathologies synoviales ou d'autres pathologies ostéo-articulaires.

10 Dans un septième aspect, l'invention concerne, à titre de produit nouveau *per se*, un anticorps (purifié) apte à reconnaître l'épitope compris dans la séquence peptidique SP* du marqueur tel que défini ci-dessus ou la séquence telle que définie ci-dessus et à s'associer de manière spécifique avec la protéine porteuse dudit marqueur ou de ladite séquence.

Par "anticorps" au sens de la présente invention, on entend, par exemple, les anticorps monoclonaux et polyclonaux ou tout autre fragment dérivé des anticorps, les anticorps humanisés, les fragments Fab, les anticorps chimères ou tout autre fragment de complexe antigène-anticorps spécifique, entre autres. Quand l'anticorps est utilisé dans le contexte de la méthode de détection de fragment de collagène (protéine P), l'expression "anticorps" comprend tout analyte produit spécifique du fragment de collagène contenant au moins la SEQ ID N°1.

20 Par "épitote", on désigne par exemple une séquence minimum d'acides aminés reconnus par l'anticorps dans la protéine P porteuse et/ou dans les séquences peptidiques SP*, voire SP. L'épitote détermine l'immunospecificité. Dans le contexte de l'invention, un épitote peut être une courte séquence de trois acides aminés contigus ou une séquence plus longue contenant au moins quatre acides aminés.

25 Dès lors que la protéine P au sens de la présente invention peut contenir des fragments protéiques, ceux-ci peuvent être des polypeptides, c'est-à-dire des molécules peptidiques contenant plus de 50 acides aminés.

Suivant une caractéristique préférée de l'invention, les anticorps utiles comme élément de détection dans les méthodes ou les moyens considérés, peuvent être monoclonaux ou polyclonaux. La production de ces anticorps se fait selon les méthodes standards bien connues de l'homme de l'art et décrites notamment par HARLOW et LANE en 1988, ainsi que par KÖHLER et MILSTEIN en 1975 dans "*Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*" Nature 1975, 256(5517):495-7. En particulier, on préparera par exemple selon les synthèses peptidiques classiques, les marqueurs à 30 détecter que l'on couplera à une protéine dite "carrier" qui est préférentiellement la KLH (Keyhole limpet hemocyanine) ou l'albumine bovine ou humaine sérique, l'ovalbumine, la tyroglobuline ou toute autre protéine "carrier" comme l'edestine, la toxine tétanique ou cholérique, les polyaminoacides comme la poly-D-Lysine-D-acide glutamique. Ce

couplage sera réalisé via une cystéine, une glutaraldéhyde, ou un carbodiimide par exemple. Cette séquence couplée permet alors l'immunisation de souris, rat, lapin, poulet, ou tout autre individu permettant la production d'anticorps.

- 5 Les anticorps selon l'invention sont spécifiques car ils reconnaissent les fragments de dégradation du collagène de type III contenant au moins quatre aminoacides consécutifs SEQ ID N°1, de préférence au moins cinq, présents dans le télépeptideaminoterminal du collagène de type III.

- 10 L'obtention d'un anticorps spécifique des marqueurs peptidiques SP*, voire SP selon l'invention, peut nécessiter que l'antigène soit, dans une première étape, extrait et purifié à partir d'urine, par exemple. Une telle extraction ou purification peut être réalisée de manière avantageuse par la technique décrite dans l'exemple et également par la synthèse de peptides synthétiques.

- 15 Il est à noter que, selon une particularité avantageuse de l'invention, les moyens utiles dans les méthodes selon l'invention, en particulier les éléments de détection que sont par exemple les anticorps spécifiques des marqueurs, ont pour propriété de détecter les pontages entre au moins deux séquences peptidiques SP ou entre au moins une séquence peptidique SP* et au moins une séquence peptidique SP, ou bien encore au moins une
20 séquence peptidique SP* et au moins une autre protéine P^x. Ces pontages s'effectuent de préférence entre des restes lysyls des différentes séquences peptidiques en cause.

Pour le moins, la protéine P est de préférence le collagène de type III et la protéine P^x est de préférence un collagène de type I.

- 25 Dans son huitième aspect, l'invention vise d'une part un kit de diagnostic de suivi ou de pronostic d'une pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III, et d'autre part, un kit pour la détermination de l'efficacité ou de la toxicité d'un médicament adapté au traitement d'une pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III.

- 30 Ces deux types de kit ont pour caractéristique de comprendre au moins un moyen tel que défini ci-dessus.

- Ces kits comprennent des éléments de détection ou réactif (par exemple anticorps anti-marqueur tels que définis ci-dessus) destinés à être mis en contact avec l'échantillon biologique à analyser. Ces kits comportent également des moyens de révélation de la
35 formation des complexes antigènes/anticorps (par exemple anticorps secondaires, indicateurs colorés, indicateurs fluorescents, indicateurs radioactifs, etc. Classiquement, est également prévu dans ces kits, un protocole opératoire permettant de réaliser l'analyse, la

lecture des résultats révélés par les moyens révélateurs s'opère à l'œil nu pour une analyse qualitative et à l'aide d'instruments de mesure plus élaborés pour les dosages quantitatifs.

De préférence, ces kits visent des pathologies synoviales ou d'autres pathologies ostéo-articulaires.

L'invention sera mieux comprise et ses avantages ressortiront des exemples qui suivent, qui décrivent la préparation d'un exemple de marqueur selon l'invention, la préparation d'éléments de détection constitués par des anticorps polyclonaux spécifiques dudit marqueur et une méthode de détection par une technique immunologique de type ELISA de compétition du marqueur selon l'invention, et enfin la mise en évidence de la détection de malades atteints de polyarthrite rhumatoïde sur des échantillons sériques provenant de ces malades au moyen du marqueur et de la méthode selon l'invention. Les figures 1, 2, 3, 4, 5, 6A ET 6B annexées complètent l'information donnée par les exemples qui suivent.

DESCRIPTION DES FIGURES 1, 2, 3, 4, 5, 6A et 6B

- La figure 1 représente la structure du télopeptide aminoterminal du collagène de type III pontée avec deux autres molécules de collagène de type III par la pyridinoline ou un de ses dérivés. La séquence encadrée est la SEQ ID N°2 qui correspond à un mode préféré de réalisation du marqueur selon l'invention, ci-après dénommé IIINys. Les astérisques indiquent les deux résidus de tyrosine qui sont nitrosylés

- La figure 2 représente la formation de la 3-nitrotyrosine par action du peroxy-nitrite sur la tyrosine.

- La figure 3 représente la courbe standard type de l'ELISA dosant le peptide IIINys de séquence SEQ ID N°2

La figure 4 illustre la spécificité des anticorps polyclonaux préparés vis-à-vis du IIINys, par rapport à d'autres peptides synthétiques. B/B0 représente le ratio entre la quantité d'anticorps anti-IIINys fixé sur l'antigène fixé ("coaté") sur la plaque en présence du composé compétiteur (B) et en l'absence du composé compétiteur (B0).

- QY*DSY*DVKSG SEQ ID N°2
- ▲ QYDSYDVKSG SEQ ID N°8
- 3-nitro tyrosine SEQ ID N°12
- ✕ nitrated BSA SEQ ID N°11
- ◆ PQY*DSY*DVKSG SEQ ID N°9
- ▣ QY*DSYDVKSG SEQ ID N°3
- QYDSY*DVKSG SEQ ID N°4

- La figure 5 montre la concentration sérique C en IIINys ($\mu\text{g/L}$) chez des adultes sains ($n=29$) [CTRL] et des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ($n=30$) [RA].
- La figure 6A représente une analyse immunohistochimique de sections de tissus synoviaux de patients atteints d'arthrose du genou marquées avec le sérum pré-immun du lapin ayant produit l'antisérum IIINys (sérum prélevé avant l'immunisation et servant de contrôle négatif).
- La figure 6B représente une analyse immunohistochimique de sections de tissus synoviaux de patients atteints d'arthrose du genou marquées avec l'anticorps IIINys. Les flèches notées sur la figure montrent le marquage par l'anticorps IIINys.

EXEMPLES

A titre d'illustration non limitative de l'invention, la figure 1 représente les séquences peptidiques de deux télépeptides aminotermiaux d'un collagène de type III, dont l'un comporte une séquence peptidique SP* SEQ ID N° 2 constituant un mode préféré de réalisation du marqueur IIINys selon l'invention, ces deux télépeptides étant en outre reliés par pontage avec la partie en triple hélice d'une autre molécule de collagène de type III. Le domaine télépeptidique non hélicoïdal est souligné. Les flèches représentent les sites de clivage de la trypsine et de la N-protéinase. Les astérisques surmontant les codes Y indiquent les résidus tyrosine ou les restes tyrosine nitrosylés. Le pontage est un pontage de type pyridinoline reliant les deux télépeptides d'une molécule de collagène de type III avec la région C-terminale de l'hélice d'une autre molécule de collagène de type III.

25 A - METHODES

1. Préparation du peptide synthétique

La préparation des peptides synthétiques peut être réalisée selon les techniques largement décrites dans la littérature scientifique. Le peptide IIINys de séquence SEQ ID N° 2 dérivé de la séquence du télépeptide N-terminal du collagène de type III (numéro d'accès dans GenBank : P02461 : SEQ ID N°10) a été produit par la technique de synthèse peptidique sur phase solide en utilisant un blocage réversible de l'amine de l'acide aminé par le Fmoc (9-Fluorenylmethyloxycarbonyl). La pureté du peptide a été vérifiée par HPLC et par spectrométrie de masse.

Le peptide servant d'immunogène, synthétisé avec une cystéine supplémentaire du côté C-terminal, a été couplé du côté C-terminal à une protéine porteuse qui est la KLH (keyhole limpet hemocyanine) ce qui va permettre une meilleure réponse immunologique vis-à-vis

de ce peptide. Le peptide synthétique qui est adsorbé sur les microplaques a été couplé à la biotine (Harlow et Lane, 1988).

2. Préparation des anticorps polyclonaux

- 5 Les lapins ont subi une injection par voie intra-péritonéale du peptide conjugué à la KLH émulsifié avec de l'adjuvant complet de Freud. Cette opération a été répétée 3 fois pendant trois mois en utilisant le même peptide avec de l'adjuvant incomplet de Freud. Après chaque injection un échantillon de sang de lapin a été prélevé. On a laissé coaguler ce sang pendant 30 min et le tout a été centrifugé pendant 10 min à 2500 rpm pendant 10 min afin de récupérer le sérum. Dix jours après la dernière injection, les lapins ont été sacrifiés et tout le sang a été récupéré. Chaque prélèvement sérique a été titré par technique ELISA en présence du peptide synthétique. L'antisérum avec le meilleur titre a été sélectionné pour la mise au point de l'ELISA de compétition (Harlow et Lane, 1988a).

15 3. Titration des antisérums

- Les titres des antisérums ont été réalisés en adsorbant le peptide conjugué à la biotine dilué avec du tampon de revêtement ("coating") sur des plaques streptavidine (Nunc, Danemark) 2h à température ambiante. Après lavage, 50 µl d'antisérums dilué du 1/100 au 1/1.000.000 sont ajoutés à 50 µl de tampon de dilutions dans les puits et sont mis à incuber pendant une nuit à 4°C. Après lavage, 100 µl d'anticorps secondaire couplés à la peroxydase dirigé contre les immunoglobulines de lapins sont ajoutés pendant une heure à température ambiante. Les puits sont lavés et 100 µl de substrat (TMB) sont ajoutés. La réaction est stoppée avec 100 µl d'H₂SO₄.

25 4. ELISA de compétition pour le peptide IIINys de la chaîne alpha 1 télopeptidique aminoterminal du collagène de type III

- Le peptide conjugué à la biotine dilué avec du tampon de revêtement ("coating") est adsorbé sur des plaques avidinées 2h à température ambiante. Après lavage, 50 µl d'antisérums dilués au titre optimal sont ajoutés à 50 µl de standard (peptide synthétique dilué dans du tampon) ou à 50 µl d'échantillons à doser et sont laissés à incuber pendant une nuit à 4°C. Après lavage, 100 µl d'anticorps secondaire couplés à la peroxydase dirigés contre les immunoglobulines de lapins sont ajoutés pendant une heure à température ambiante. Les puits sont lavés et 100 µl de substrat (TMB) sont ajoutés. La réaction est stoppée avec 100 µl d'H₂SO₄.

35

5. Analyse immunohistochimique de sections tissus synoviaux de patients atteints d'ostéoarthrite

La membrane synoviale de patients atteints d'arthrose a été prélevée lors d'une chirurgie de remplacement de genou. Les échantillons de la membrane synoviale ont été fixés et inclus dans de la paraffine selon les techniques usuelles de laboratoire. L'immunohistochimie a été réalisé sur des sections de 7 µm avec le diaminobenzidine (standard EnvisionTM+HRP protocol). Brièvement, les sections sont déparaffinée, les peroxydases endogènes sont bloquées et l'antigène est démasqué par une incubation de 2 heures à 60°C dans du tampon tris-EDTA (pH 9). Les sites non spécifiques sont bloqués avec de la caséine dans du TBS. Les sections sont par la suite mises à incuber durant une nuit à 4°C avec l'anticorps dirigés contre la séquence SEQ ID N°3 et l'anticorps non immun comme contrôle négatif (provenant du même lapin avant l'immunisation). Après des lavages soigneux, un anticorps anti-lapin EnvisionTM couplé à la HRP (DAKO) est ajouté aux sections et laissé à incubé durant 30 min à température ambiante. L'anticorps EnvisionTM en excès est éliminé par des lavages et la solution de substrat composé de diaminobenzidine (DAB+, DAKO) est ajoutée pour la réaction avec la peroxydase donnant une couleur brune. Le marquage au DAB est activé par le sulfate de cuivre (CuSO₄) et le double marquage a été réalisé avec l'acide Haematoxyline de Mayers qui colore les noyaux des cellules.

20 B - RESULTATS

Exemple 1 : ELISA de compétition pour le peptide IIINys du N-télopeptide du collagène de type III.

25 Les méthodes de production des peptides, antisérums ainsi que la méthode ELISA de compétition sont décrites précédemment.

Une courbe standard ou de calibration a été obtenue sur un graphe semi log en dosant les 8 standards (de 0,2 ng/ml à 25 ng/ml) avec l'antisérum dirigé contre la séquence **SEQ ID N°2** sélectionné pour son titre (**Fig. 3**). La concentration en peptide de séquence **SEQ ID N°2** dans les échantillons est obtenue par extrapolation de la courbe de calibration (Densité Optique DO des 8 standards dosés en fonction du Log de leurs concentrations en ng/mL : "Logscale of ng/mL").

La détection limite de cet essai a été déterminée par le calcul de la moyenne de 32 déterminations du standard 0 auquel on retranche trois fois la déviation standard. La détection limite est de 0,16 ng/mL.

Exemple 2 : Caractérisation de la spécificité de l'antisérum anti-IIINys

L'antisérum sélectionné a été testé vis-à-vis de différents peptides selon la méthode ELISA décrite précédemment afin de vérifier sa spécificité (**Fig.4**). Les peptides testés sont : le peptide IIINys de séquence SEQ ID N°2 (le peptide immunogène), le peptide de séquence
 5 SEQ ID N°3 (le peptide IIINys avec seulement la première tyrosine nitrosylée), le peptide de séquence SEQ ID N°4 (le peptide IIINys avec seulement la deuxième tyrosine nitrosylée), le peptide de séquence SEQ ID N°9 (le peptide IIINys avec un acide aminé supplémentaire du côté N-terminal), le peptide de séquence SEQ ID N°8 (le peptide IIINys avec ses tyrosines non nitrosylées), la 3-nitrotyrosine (**Fig.2**), avec la BSA nitrosylée de
 10 séquence SEQ ID N°11. Les peptides de séquence SEQ ID N°8 et 9 ainsi que la BSA nitrosylée et la 3-nitrotyrosine ne sont pas capables de rentrer en compétition avec le peptide IIINys (SEQ ID N°2) adsorbé sur la plaque. Par contre, l'antisérum reconnaît les peptides de séquence SEQ ID N°3 et 4 mais avec moins d'affinité que pour le peptide IIINys. Donc l'antisérum anti-IIINys est spécifique du site de coupure par la N-protéinase
 15 du côté N-terminal du N-télopeptide du collagène de type III et est plus spécifique également de la première nitrosylation.

Exemple 3 : le niveau de IIINys sérique est augmenté chez les patients atteints de polyarthrites rhumatoïde en comparés à des patients sains.

20 Des sérums de patients sains (n=29) et de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (n=30) ont été collectés et dosés en IIINys comme décrit dans le protocole. La concentration en IIINys (ng/ml) pour les différentes populations est présentée dans la **Fig. 5**. Les lignes horizontales représentent la médiane de IIINys (ng/ml) dans chaque groupe. Les valeurs de significativité de différence entre les groupes (P) sont représentées sur le
 25 graphe.

Exemple 4 : Immunohistochimie sur tissus synoviaux de patients atteints d'arthrose.

L'immunohistochimie de tissus synoviaux de patients atteints d'arthrose du genou montre un marquage intense avec l'anticorps anti-IIINys dans la matrice extracellulaire,
 30 plus précisément autour des synoviocytes et à l'intérieur des macrophages (**Fig 6B**) et aucun marquage avec le sérum pré-immun (**Fig. 6A**), les flèches représentent l'espace pericellulaire des synoviocytes marqué par l'anticorps anti-IIINys.

REVENDICATIONS

- 1- Marqueur spécifique d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III, de préférence de la nitrosylation du collagène de type III, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence peptidique SP* de 5 à 25 acides aminés (AA), de préférence de 5 à 20 AA, dont la sous-séquence QYDSYD [SEQ ID N°1] dans laquelle au moins l'un des Y est nitrosylé* et où Q correspond non seulement à la glutamine conformément au code international mais aussi à l'acide pyroglutamique.
- 10 -2- Marqueur selon la revendication 1, caractérisé en ce que les tissus visés comprennent le tissu synovial.
- 3- Marqueur selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la séquence peptidique SP* est choisie :
- 15 → dans le groupe de séquences suivantes:
- QY*DSY*DVKSG [SEQ ID N°2];
 - QY*DSYDVKSG [SEQ ID N°3];
 - QYDSY*DVKSG [SEQ ID N°4];
- séquences dans lesquelles Y* correspond à un Y nitrosylé;
- 20 → et, de préférence, dans le groupe de séquences suivantes:
- QY*DSY*DVKS [SEQ ID N°5];
 - QY*DSYDVKS [SEQ ID N°6];
 - QYDSY*DVKS [SEQ ID N°7];
 - les séquences homologues
- 25 séquences dans lesquelles Y* correspond à un Y nitrosylé.
- 4- Marqueur selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence peptidique SP non nitrosylée, de préférence la séquence peptidique suivante: QYDSYDVKSG [SEQ ID N°8].
- 30 -5- Marqueur selon la revendication 4, caractérisé en ce que la séquence peptidique SP* ou SP (contenue dans une protéine P) est reliée par au moins un pontage à au moins une autre séquence peptidique SP* ou SP (contenue dans la même molécule de protéine P) ou à une autre séquence peptidique SP' (contenue dans une autre molécule de protéine P), ledit pontage reliant de préférence un reste de lysine d'une séquence à un reste de lysine de l'autre séquence, et, plus préférentiellement encore, ledit pontage comprenant une liaison covalente directe ou au moins un reste pyroglutamine ou l'un de ses dérivés.
- 35

- 6- Marqueur selon la revendication 5, caractérisé en ce que la séquence peptidique SP* ou SP (contenue dans une protéine P) est reliée par au moins un pontage à au moins une autre séquence peptidique SP^x (contenue dans une protéine P^x différente de P), ledit pontage reliant de préférence un reste de lysine d'une séquence à un reste de lysine de l'autre séquence, et, plus préférentiellement encore, ledit pontage comprenant une liaison covalente directe ou au moins un reste pyrocinoline ou l'un de ses dérivés.
- 7- Marqueur selon la revendication 5 ou 6, caractérisé en ce que la protéine P est du collagène de type III, SP* ou SP étant de préférence contenue dans un télépeptide (avantageusement aminoterminal).
- 8- Marqueur selon la revendication 6, caractérisé en ce que la protéine P^x est du collagène de type différent du type III, de préférence un collagène de type I.
- 9- Séquence peptidique isolée du corps humain ou autrement produite par un procédé technique, caractérisée en ce qu'elle comprend de 5 à 25 acides aminés (AA), de préférence de 5 à 20 AA, dont la sous-séquence QYDSYD [SEQ ID N°1] dans laquelle au moins l'un des Y est nitrosylé* et où Q correspond non seulement à la glutamine conformément au code international mais aussi à l'acide pyroglutamique.
- 10- Séquence peptidique selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'elle est choisie dans le groupe de séquences suivantes:
- SP* telle que définie dans au moins l'une des revendications 1, 3, 5, 6 et 7;
 - SP telle que définie dans au moins l'une des revendications 4, 5, 6 et 7;
 - SP^x telle que définie dans la revendication 6 et 8;
 - les séquences homologues.
- dans lesquelles Y* correspond à un Y nitrosylé.
- 11- Séquence nucléique codant le marqueur selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 ou la séquence selon la revendication 9 ou 10.
- 12- Utilisation d'au moins une séquence peptidique selon la revendication 9 ou 10, pour une application technique choisie dans le groupe comprenant:
- le diagnostic d'une pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III;
 - le suivi d'une pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III;

- la détermination de l'efficacité d'un médicament adapté au traitement d'une pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III;
- ou la détermination de la toxicité d'un médicament adapté au traitement d'une pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III;

-13- Utilisation selon la revendication 12 caractérisée en ce que la pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III, est une pathologie synoviale ou une autre pathologie ostéo-articulaire.

-14- Méthode de diagnostic, de suivi ou de pronostic d'une pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes essentielles suivantes:

- a. analyse quantitative et/ou qualitative in vitro d'un échantillon biologique d'un individu, afin de détecter un marqueur spécifique d'une dégradation oxydative du tissu synovial selon l'une quelconque des revendications 1 à 8;
- b. comparaison de la concentration en marqueur éventuellement détecté dans l'échantillon avec une concentration de référence correspondant à l'existence (à un stade déterminé) ou à l'absence chez l'individu, de la pathologie considérée.

-15- Méthode pour la détermination de l'efficacité ou de la toxicité d'un médicament adapté au traitement d'une pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes essentielles suivantes:

- a. analyse quantitative et/ou qualitative in vitro d'un échantillon biologique d'un individu, afin de détecter un marqueur spécifique d'une dégradation oxydative du tissu synovial selon l'une quelconque des revendications 1 à 8;
- b. comparaison de la concentration en marqueur éventuellement détecté dans l'échantillon avec une concentration de référence correspondant à l'existence (à un stade déterminé) ou à l'absence chez l'individu, de la pathologie considérée.

-16- Méthode selon la revendication 14 ou 15 caractérisée en ce que la pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III est une pathologie synoviale ou une autre pathologie ostéo-articulaire.

-17- Moyen pour le diagnostic, le suivi ou le pronostic d'une pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III caractérisé en ce

qu'il comprend au moins un élément de détection du marqueur selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

5 -18- Moyen pour la détermination de l'efficacité d'un médicament adapté au traitement d'une pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III , caractérisé en ce qu'il comprend au moins un élément de détection du marqueur selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

10 -19- Moyen pour la détermination de la toxicité d'un médicament adapté au traitement d'une pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un élément de détection du marqueur selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

15 -20- Moyen selon l'une quelconque des revendications 17 à 19, caractérisé en ce que l'élément de détection comporte au moins un anticorps (purifié) apte à reconnaître l'épitope compris dans la séquence peptidique SP* du marqueur selon l'une quelconque des revendications 1, 3, 5, 6, et 7 et à s'associer de manière spécifique avec la protéine porteuse dudit marqueur ou de ladite séquence.

20 -21- Moyen selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, caractérisé en ce que la pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III est une pathologie synoviale ou une autre pathologie ostéo-articulaire.

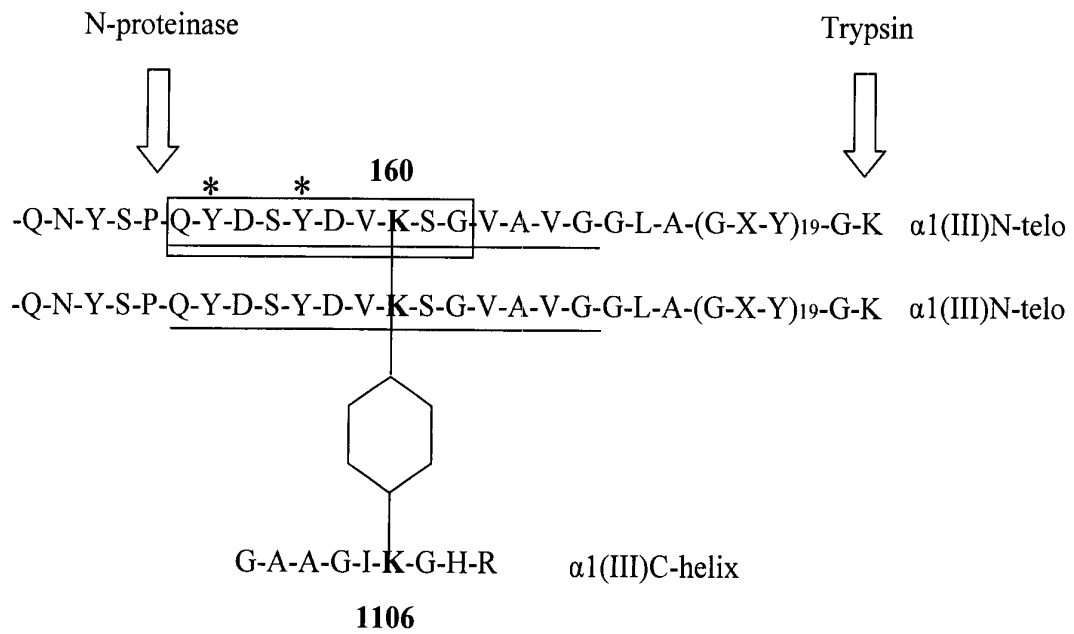
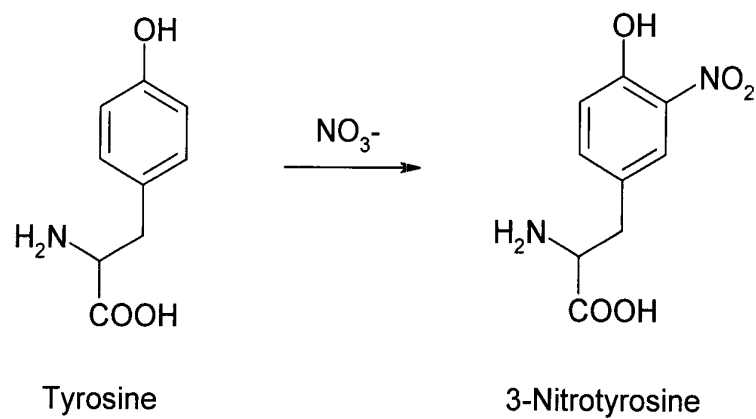
25 -22- Anticorps (purifié) apte à reconnaître l'épitope compris dans la séquence peptidique SP* du marqueur selon l'une quelconque des revendications 1, 3, 5, 6, et 7 ou la séquence selon la revendication 9 ou 10 et à s'associer de manière spécifique avec la protéine porteuse dudit marqueur ou de ladite séquence.

30 -23- Kit de diagnostic, de suivi ou de pronostic d'une pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III, caractérisée en ce qu'il comprend au moins un moyen selon la revendication 17.

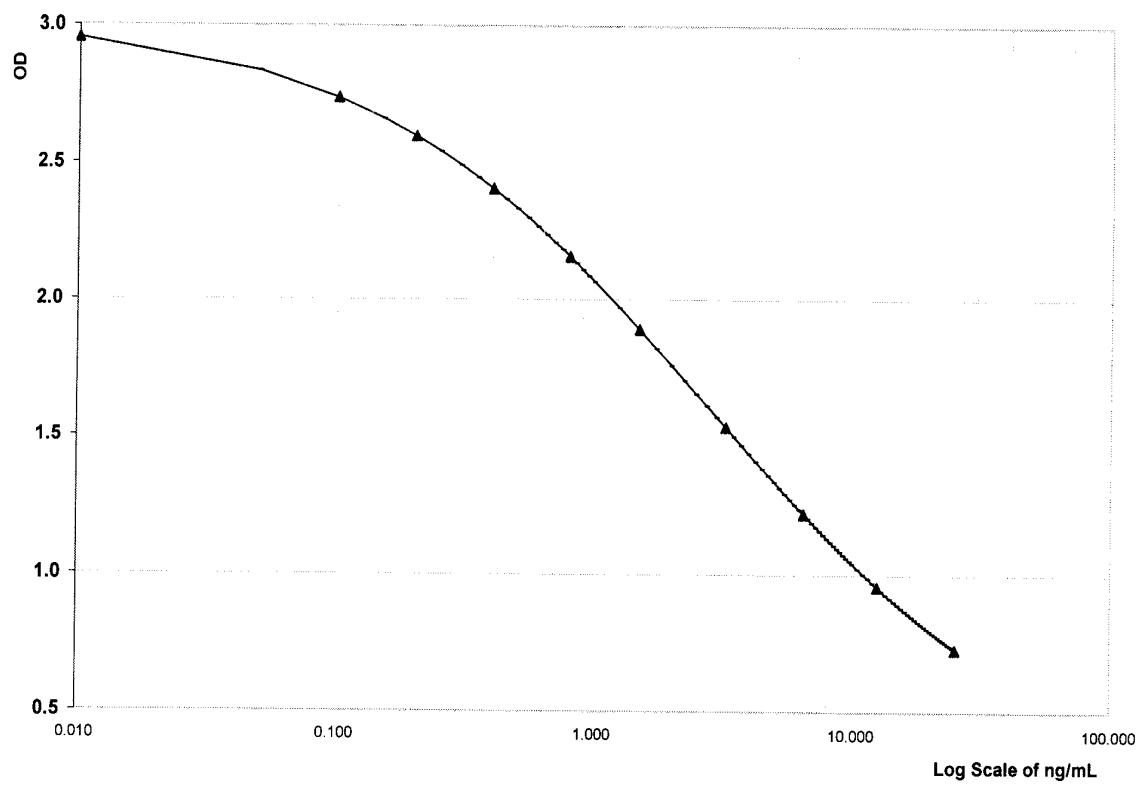
35 -24- Kit pour la détermination de l'efficacité ou de la toxicité d'un médicament adapté au traitement d'une pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III, caractérisée en ce qu'il comprend au moins un moyen selon la revendication 18 ou 19.

-25- Kit selon la revendication 23 ou 24 caractérisé en ce que la pathologie qui s'accompagne d'une dégradation oxydative de tissus contenant du collagène de type III est une pathologie synoviale ou une autre pathologie ostéo-articulaire.

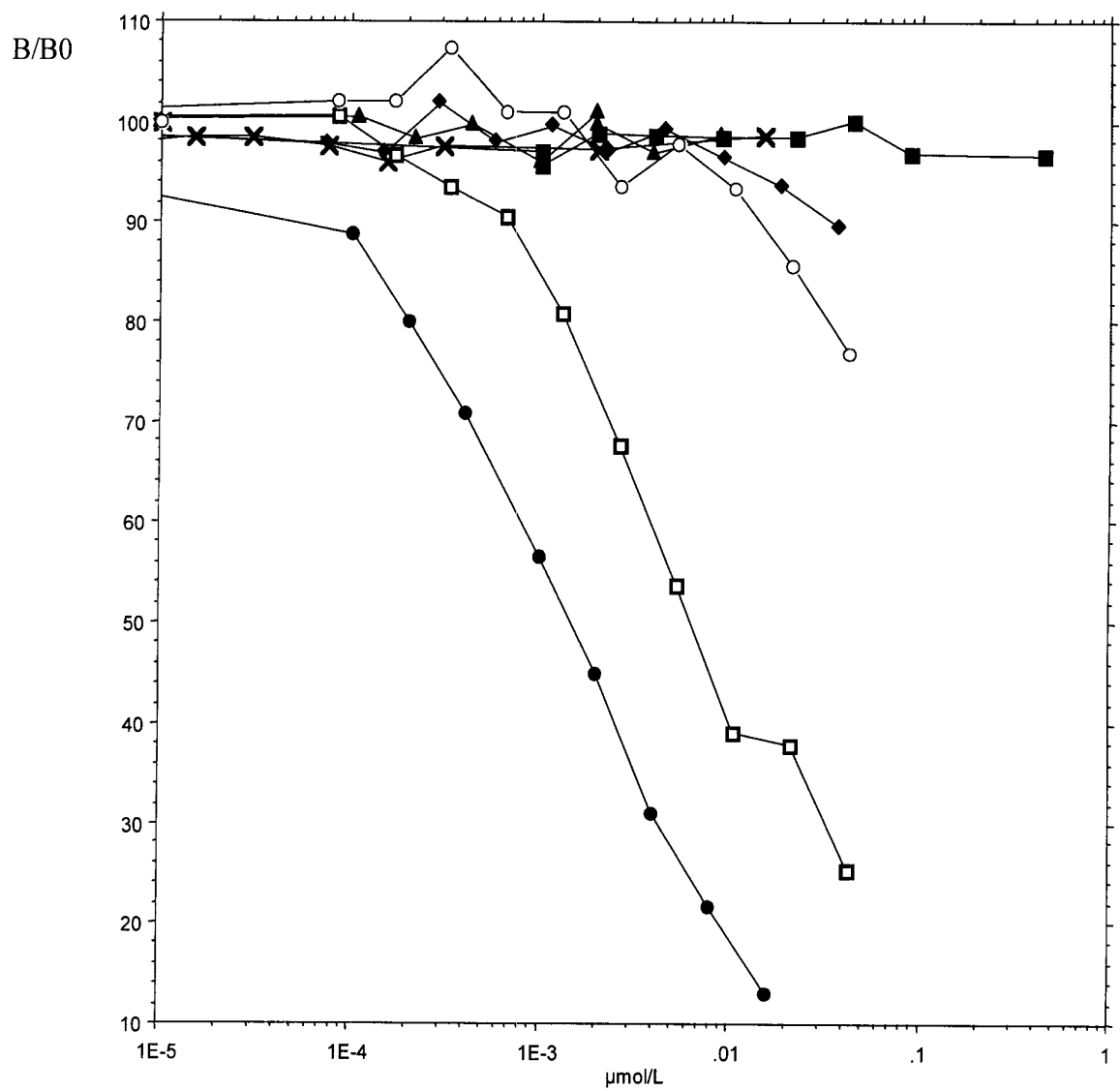
1/4

**FIG.1****FIG.2**

2/4

**FIG.3**

3/4

**FIG. 4**

4/4

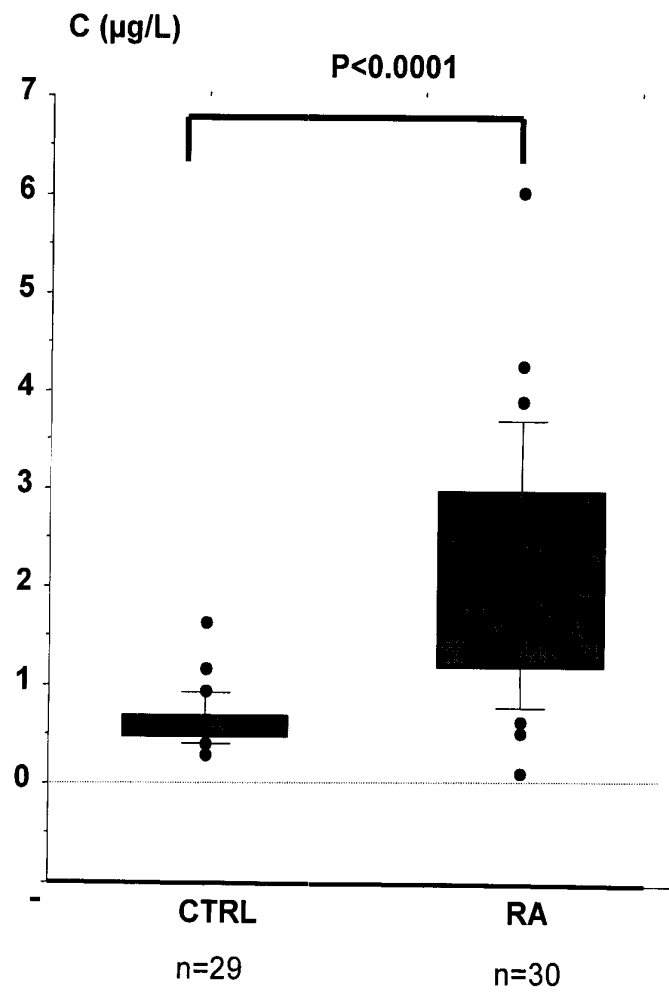


FIG.5

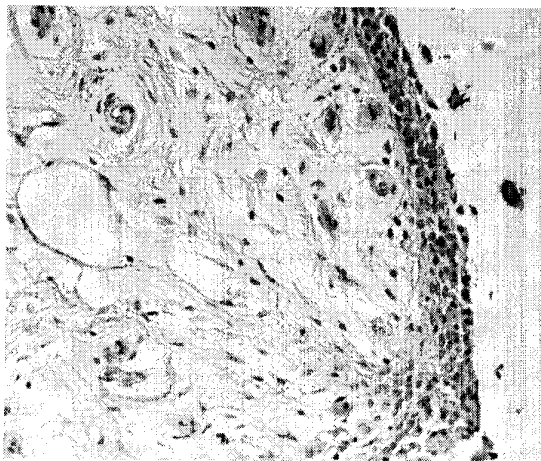


FIG.6A

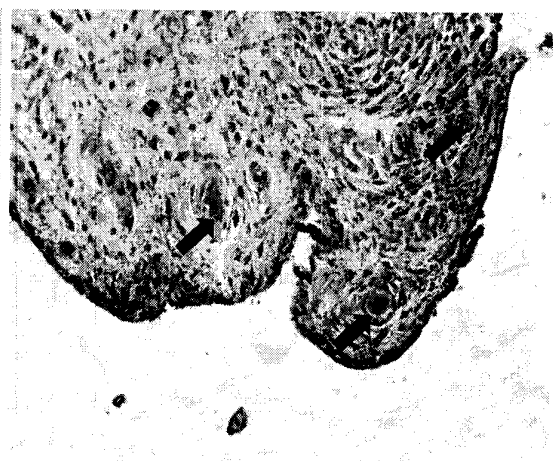


FIG.6B

PatentIn_project_P02461_workfile_03.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> SYNARC

<120> MARQUEUR SPECIFIQUE D'UNE DEGRADATION OXYDATIVE DE TISSUS
CONTENANT DU COLLAGENE DE TYPE III, MOYENS ET METHODES, KITS DE
DIAGNOSTIC DE SUIVI OU DE PRONOSTIC DES PATHOLOGIES CIBLEES PAR CE
MARQUEUR

<130> BFF060303

<160> 14

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Nitrosylation

<222> (1)..(6)

<223> Au moins l'un des Tyr est nitrosylé et où Gln correspond non
seulement à la glutamine conformément au code international mais
aussi à l'acide pyroglutamique

<400> 1

Gln Tyr Asp Ser Tyr Asp
1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Nitrosylation

<222> (1)..(10)

<223> Xaa correspond à un Tyr Nitrosylé

<400> 2

Gln Xaa Asp Ser Xaa Asp Val Lys Ser Gly
1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Nitrosylation

<222> (1)..(10)

<223> Xaa correspond à un Tyr Nitrosylé

<400> 3

Gln Xaa Asp Ser Tyr Asp Val Lys Ser Gly
1 5 10

PatentIn_project_P02461_workfile_03.ST25

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Nitrosylation
 <222> (1)..(10)
 <223> Xaa correspond à un Tyr Nitrosylé

<400> 4

Gln Tyr Asp Ser Xaa Asp Val Lys Ser Gly
 1 5 10

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Nitrosylation
 <222> (1)..(9)
 <223> Xaa correspond à un Tyr Nitrosylé

<400> 5

Gln Xaa Asp Ser Xaa Asp Val Lys Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Nitrosylation
 <222> (1)..(9)
 <223> Xaa correspond à un Tyr Nitrosylé

<400> 6

Gln Xaa Asp Ser Tyr Asp Val Lys Ser
 1 5

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Nitrosylation
 <222> (1)..(9)
 <223> Xaa correspond à un Tyr Nitrosylé

<400> 7

Gln Tyr Asp Ser Xaa Asp Val Lys Ser
 1 5

PatentIn_project_P02461_workfile_03.ST25

<210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Nitrosylation
 <222> (1)..(9)
 <223> Xaa correspond à un Tyr Nitrosylé

<400> 8

Gln Tyr Asp Ser Tyr Asp Val Lys Ser Gly
 1 5 10

<210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Pro Gln Tyr Asp Ser Tyr Asp Val Lys Ser Gly
 1 5 10

<210> 10
 <211> 1466
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Met Met Ser Phe Val Gln Lys Gly Ser Trp Leu Leu Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15

His Pro Thr Ile Ile Leu Ala Gln Gln Glu Ala Val Glu Gly Gly Cys
 20 25 30

Ser His Leu Gly Gln Ser Tyr Ala Asp Arg Asp Val Trp Lys Pro Glu
 35 40 45

Pro Cys Gln Ile Cys Val Cys Asp Ser Gly Ser Val Leu Cys Asp Asp
 50 55 60

Ile Ile Cys Asp Asp Gln Glu Leu Asp Cys Pro Asn Pro Glu Ile Pro
 65 70 75 80

Phe Gly Glu Cys Cys Ala Val Cys Pro Gln Pro Pro Thr Ala Pro Thr
 85 90 95

Arg Pro Pro Asn Gly Gln Gly Pro Gln Gly Pro Lys Gly Asp Pro Gly
 100 105 110

Pro Pro Gly Ile Pro Gly Arg Asn Gly Asp Pro Gly Ile Pro Gly Gln
 115 120 125

Pro Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Pro Pro Gly Ile Cys Glu Ser Cys

PatentIn_project_P02461_workfile_03.ST25

130

135

140

Pro Thr Gly Pro Gln Asn Tyr Ser Pro Gln Tyr Asp Ser Tyr Asp Val
 145 150 155 160

Lys Ser Gly Val Ala Val Gly Gly Leu Ala Gly Tyr Pro Gly Pro Ala
 165 170 175

Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Thr Ser Gly His Pro Gly
 180 185 190

Ser Pro Gly Ser Pro Gly Tyr Gln Gly Pro Pro Gly Glu Pro Gly Gln
 195 200 205

Ala Gly Pro Ser Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ala Ile Gly Pro Ser
 210 215 220

Gly Pro Ala Gly Lys Asp Gly Glu Ser Gly Arg Pro Gly Arg Pro Gly
 225 230 235 240

Glu Arg Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly Ile Lys Gly Pro Ala Gly Ile
 245 250 255

Pro Gly Phe Pro Gly Met Lys Gly His Arg Gly Phe Asp Gly Arg Asn
 260 265 270

Gly Glu Lys Gly Glu Thr Gly Ala Pro Gly Leu Lys Gly Glu Asn Gly
 275 280 285

Leu Pro Gly Glu Asn Gly Ala Pro Gly Pro Met Gly Pro Arg Gly Ala
 290 295 300

Pro Gly Glu Arg Gly Arg Pro Gly Leu Pro Gly Ala Ala Gly Ala Arg
 305 310 315 320

Gly Asn Asp Gly Ala Arg Gly Ser Asp Gly Gln Pro Gly Pro Pro Gly
 325 330 335

Pro Pro Gly Thr Ala Gly Phe Pro Gly Ser Pro Gly Ala Lys Gly Glu
 340 345 350

Val Gly Pro Ala Gly Ser Pro Gly Ser Asn Gly Ala Pro Gly Gln Arg
 355 360 365

Gly Glu Pro Gly Pro Gln Gly His Ala Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly
 370 375 380

Pro Pro Gly Ile Asn Gly Ser Pro Gly Gly Lys Gly Glu Met Gly Pro
 385 390 395 400

Ala Gly Ile Pro Gly Ala Pro Gly Leu Met Gly Ala Arg Gly Pro Pro

PatentIn_project_P02461_workfile_03.ST25
 405 410 415

Gly Pro Ala Gly Ala Asn Gly Ala Pro Gly Leu Arg Gly Gly Ala Gly
 420 425 430

Glu Pro Gly Lys Asn Gly Ala Lys Gly Glu Pro Gly Pro Arg Gly Glu
 435 440 445

Arg Gly Glu Ala Gly Ile Pro Gly Val Pro Gly Ala Lys Gly Glu Asp
 450 455 460

Gly Lys Asp Gly Ser Pro Gly Glu Pro Gly Ala Asn Gly Leu Pro Gly
 465 470 475 480

Ala Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro
 485 490 495

Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro
 500 505 510

Gly Pro Ala Gly Pro Arg Gly Ala Ala Gly Glu Pro Gly Arg Asp Gly
 515 520 525

Val Pro Gly Gly Pro Gly Met Arg Gly Met Pro Gly Ser Pro Gly Gly
 530 535 540

Pro Gly Ser Asp Gly Lys Pro Gly Pro Pro Gly Ser Gln Gly Glu Ser
 545 550 555 560

Gly Arg Pro Gly Pro Gly Pro Ser Gly Pro Arg Gly Gln Pro Gly
 565 570 575

Val Met Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Asn Asp Gly Ala Pro Gly Lys
 580 585 590

Asn Gly Glu Arg Gly Gly Pro Gly Gly Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro
 595 600 605

Gly Lys Asn Gly Glu Thr Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Pro Thr Gly
 610 615 620

Pro Gly Gly Asp Lys Gly Asp Thr Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Leu
 625 630 635 640

Gln Gly Leu Pro Gly Thr Gly Gly Pro Pro Gly Glu Asn Gly Lys Pro
 645 650 655

Gly Glu Pro Gly Pro Lys Gly Asp Ala Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly
 660 665 670

Gly Lys Gly Asp Ala Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly Leu

PatentIn_project_P02461_workfile_03.ST25

675 Ala Gly Ala Pro Gly Leu Arg Gly Gly Ala Gly Pro Pro Gly Pro Glu
 680 695 700
 Gly Gly Lys Gly Ala Ala Gly Pro Pro Gly Pro Gly Ala Ala Gly
 705 710 715 720
 Thr Pro Gly Leu Gln Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly Gly Leu Gly Ser
 725 730 735
 Pro Gly Pro Lys Gly Asp Lys Gly Glu Pro Gly Gly Pro Gly Ala Asp
 740 745 750
 Gly Val Pro Gly Lys Asp Gly Pro Arg Gly Pro Thr Gly Pro Ile Gly
 755 760 765
 Pro Pro Gly Pro Ala Gly Gln Pro Gly Asp Lys Gly Glu Gly Gly Ala
 770 775 780
 Pro Gly Leu Pro Gly Ile Ala Gly Pro Arg Gly Ser Pro Gly Glu Arg
 785 790 795 800
 Gly Glu Thr Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Phe Pro Gly Ala Pro Gly
 805 810 815
 Gln Asn Gly Glu Pro Gly Gly Lys Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu
 820 825 830
 Lys Gly Glu Gly Gly Pro Pro Gly Val Ala Gly Pro Pro Gly Gly Ser
 835 840 845
 Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Val Lys Gly Glu Arg Gly
 850 855 860
 Ser Pro Gly Gly Pro Gly Ala Ala Gly Phe Pro Gly Ala Arg Gly Leu
 865 870 875 880
 Pro Gly Pro Pro Gly Ser Asn Gly Asn Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ser
 885 890 895
 Gly Ser Pro Gly Lys Asp Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Asn Thr Gly
 900 905 910
 Ala Pro Gly Ser Pro Gly Val Ser Gly Pro Lys Gly Asp Ala Gly Gln
 915 920 925
 Pro Gly Glu Lys Gly Ser Pro Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Ala Pro
 930 935 940
 Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Ile Thr Gly Ala Arg Gly Leu Ala Gly

PatentIn_project_P02461_workfile_03.ST25
 945 950 955 960
 Pro Pro Gly Met Pro Gly Pro Arg Gly Ser Pro Gly Pro Gln Gly Val
 965 970 975
 Lys Gly Glu Ser Gly Lys Pro Gly Ala Asn Gly Leu Ser Gly Glu Arg
 980 985 990
 Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Leu Pro Gly Leu Ala Gly Thr Ala Gly
 995 1000 1005
 Glu Pro Gly Arg Asp Gly Asn Pro Gly Ser Asp Gly Leu Pro Gly
 1010 1015 1020
 Arg Asp Gly Ser Pro Gly Gly Lys Gly Asp Arg Gly Glu Asn Gly
 1025 1030 1035
 Ser Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly His Pro Gly Pro Pro Gly
 1040 1045 1050
 Pro Val Gly Pro Ala Gly Lys Ser Gly Asp Arg Gly Glu Ser Gly
 1055 1060 1065
 Pro Ala Gly Pro Ala Gly Ala Pro Gly Pro Ala Gly Ser Arg Gly
 1070 1075 1080
 Ala Pro Gly Pro Gln Gly Pro Arg Gly Asp Lys Gly Glu Thr Gly
 1085 1090 1095
 Glu Arg Gly Ala Ala Gly Ile Lys Gly His Arg Gly Phe Pro Gly
 1100 1105 1110
 Asn Pro Gly Ala Pro Gly Ser Pro Gly Pro Ala Gly Gln Gln Gly
 1115 1120 1125
 Ala Ile Gly Ser Pro Gly Pro Ala Gly Pro Arg Gly Pro Val Gly
 1130 1135 1140
 Pro Ser Gly Pro Pro Gly Lys Asp Gly Thr Ser Gly His Pro Gly
 1145 1150 1155
 Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Asn Arg Gly Glu Arg Gly
 1160 1165 1170
 Ser Glu Gly Ser Pro Gly His Pro Gly Gln Pro Gly Pro Pro Gly
 1175 1180 1185
 Pro Pro Gly Ala Pro Gly Pro Cys Cys Gly Gly Val Gly Ala Ala
 1190 1195 1200
 Ala Ile Ala Gly Ile Gly Gly Glu Lys Ala Gly Gly Phe Ala Pro

PatentIn_project_P02461_workfile_03.ST25

1205						1210						1215		
Tyr	Tyr	Gly	Asp	Glu	Pro	Met	Asp	Phe	Lys	Ile	Asn	Thr	Asp	Glu
1220						1225					1230			
Ile	Met	Thr	Ser	Leu	Lys	Ser	Val	Asn	Gly	Gln	Ile	Glu	Ser	Leu
1235						1240					1245			
Ile	Ser	Pro	Asp	Gly	Ser	Arg	Lys	Asn	Pro	Ala	Arg	Asn	Cys	Arg
1250						1255					1260			
Asp	Leu	Lys	Phe	Cys	His	Pro	Glu	Leu	Lys	Ser	Gly	Glu	Tyr	Trp
1265						1270					1275			
Val	Asp	Pro	Asn	Gln	Gly	Cys	Lys	Leu	Asp	Ala	Ile	Lys	Val	Phe
1280						1285					1290			
Cys	Asn	Met	Glu	Thr	Gly	Glu	Thr	Cys	Ile	Ser	Ala	Asn	Pro	Leu
1295						1300					1305			
Asn	Val	Pro	Arg	Lys	His	Trp	Trp	Thr	Asp	Ser	Ser	Ala	Glu	Lys
1310						1315					1320			
Lys	His	Val	Trp	Phe	Gly	Glu	Ser	Met	Asp	Gly	Gly	Phe	Gln	Phe
1325						1330					1335			
Ser	Tyr	Gly	Asn	Pro	Glu	Leu	Pro	Glu	Asp	Val	Leu	Asp	Val	Gln
1340						1345					1350			
Leu	Ala	Phe	Leu	Arg	Leu	Leu	Ser	Ser	Arg	Ala	Ser	Gln	Asn	Ile
1355						1360					1365			
Thr	Tyr	His	Cys	Lys	Asn	Ser	Ile	Ala	Tyr	Met	Asp	Gln	Ala	Ser
1370						1375					1380			
Gly	Asn	Val	Lys	Lys	Ala	Leu	Lys	Leu	Met	Gly	Ser	Asn	Glu	Gly
1385						1390					1395			
Glu	Phe	Lys	Ala	Glu	Gly	Asn	Ser	Lys	Phe	Thr	Tyr	Thr	Val	Leu
1400						1405					1410			
Glu	Asp	Gly	Cys	Thr	Lys	His	Thr	Gly	Glu	Trp	Ser	Lys	Thr	Val
1415						1420					1425			
Phe	Glu	Tyr	Arg	Thr	Arg	Lys	Ala	Val	Arg	Leu	Pro	Ile	Val	Asp
1430						1435					1440			
Ile	Ala	Pro	Tyr	Asp	Ile	Gly	Gly	Pro	Asp	Gln	Glu	Phe	Gly	Val
1445						1450					1455			
Asp	Val	Gly	Pro	Val	Cys	Phe	Leu							

1460 PatentIn_project_P02461_workfile_03.ST25
1465

<210> 11
<211> 607
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SIGNAL
<222> (1)..(18)

<220>
<221> PROPEP
<222> (19)..(24)

<220>
<221> Nitrosylation
<222> (24)..(607)
<223> Xaa est la 3-Nitrotyrosine

<400> 11

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Thr His Lys Ser Glu Ile Ala
20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu His Phe Lys Gly Leu Val Leu
35 40 45

Ile Ala Phe Ser Gln Xaa Leu Gln Gln Cys Pro Phe Asp Glu His Val
50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Leu Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
65 70 75 80

Glu Ser His Ala Gly Cys Glu Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
85 90 95

Glu Leu Cys Lys Val Ala Ser Leu Arg Glu Thr Xaa Gly Asp Met Ala
100 105 110

Asp Cys Cys Glu Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Ser
115 120 125

His Lys Asp Asp Ser Pro Asp Leu Pro Lys Leu Lys Pro Asp Pro Asn
130 135 140

Thr Leu Cys Asp Glu Phe Lys Ala Asp Glu Lys Lys Phe Trp Gly Lys
145 150 155 160

Xaa Leu Xaa Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Xaa Phe Xaa Ala Pro Glu
165 170 175

PatentIn_project_P02461_workfile_03.ST25

Leu Leu Xaa Xaa Ala Asn Lys Xaa Asn Gly Val Phe Gln Glu Cys Cys
 180 185 190
 Gln Ala Glu Asp Lys Gly Ala Cys Leu Leu Pro Lys Ile Glu Thr Met
 195 200 205
 Arg Glu Lys Val Leu Ala Ser Ser Ala Arg Gln Arg Leu Arg Cys Ala
 210 215 220
 Ser Ile Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Leu Lys Ala Trp Ser Val Ala
 225 230 235 240
 Arg Leu Ser Gln Lys Phe Pro Lys Ala Glu Phe Val Glu Val Thr Lys
 245 250 255
 Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Lys Glu Cys Cys His Gly Asp
 260 265 270
 Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Xaa Ile Cys
 275 280 285
 Asp Asn Gln Asp Thr Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Asp Lys
 290 295 300
 Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Lys Asp Ala
 305 310 315 320
 Ile Pro Glu Asn Leu Pro Pro Leu Thr Ala Asp Phe Ala Glu Asp Lys
 325 330 335
 Asp Val Cys Lys Asn Xaa Gln Glu Ala Lys Asp Ala Phe Leu Gly Ser
 340 345 350
 Phe Leu Xaa Glu Xaa Ser Arg Arg His Pro Glu Xaa Ala Val Ser Val
 355 360 365
 Leu Leu Arg Leu Ala Lys Glu Xaa Glu Ala Thr Leu Glu Glu Cys Cys
 370 375 380
 Ala Lys Asp Asp Pro His Ala Cys Xaa Ser Thr Val Phe Asp Lys Leu
 385 390 395 400
 Lys His Leu Val Asp Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Asp
 405 410 415
 Gln Phe Glu Lys Leu Gly Glu Xaa Gly Phe Gln Asn Ala Leu Ile Val
 420 425 430
 Arg Xaa Thr Arg Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu
 435 440 445

PatentIn_project_P02461_workfile_03.ST25

Val Ser Arg Ser Leu Gly Lys Val Gly Thr Arg Cys Cys Thr Lys Pro
 450 455 460

Glu Ser Glu Arg Met Pro Cys Thr Glu Asp Xaa Leu Ser Leu Ile Leu
 465 470 475 480

Asn Arg Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu Lys Val
 485 490 495

Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser
 500 505 510

Ala Leu Thr Pro Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Ala Phe Asp Glu Lys
 515 520 525

Leu Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Pro Asp Thr Glu Lys
 530 535 540

Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Leu Lys His Lys Pro
 545 550 555 560

Lys Ala Thr Glu Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Glu Asn Phe Val Ala
 565 570 575

Phe Val Asp Lys Cys Cys Ala Ala Asp Asp Lys Glu Ala Cys Phe Ala
 580 585 590

Val Glu Gly Pro Lys Leu Val Val Ser Thr Gln Thr Ala Leu Ala
 595 600 605

<210> 12
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Asp Val Lys Ser Gly Val
 1 5

<210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Nitrosylation
 <222> (1)..(9)
 <223> Xaa correspond à un Tyr Nitrosylé

<400> 13

His Arg Gly Xaa Pro Gly Leu Asp Gly
 1 5

PatentIn_project_P02461_workfile_03.ST25

<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Nitrosylation
<222> (1)..(6)
<223> Xaa correspond à un Tyr Nitrosylé

<400> 14

Leu Gln Xaa Met Arg Ala
1 5



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE PARTIEL

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

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

N° d'enregistrement
national

FA 690599
FR 0609983

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	WO 00/79284 A (WASHINGTON RES FOUNDATION [US]; EYRE DAVID R [US]) 28 décembre 2000 (2000-12-28) * page 13, ligne 21 - page 14, ligne 23; séquences 32,37,38 * -----	1-25	C07K7/06 C07K14/78 C07K16/18 G01N33/68
D,A	WO 03/076946 A (NORDIC BIOSCIENCE AS [DK]; REGINSTER JEAN-YVES [BE]; DEBERG MICHELLE []) 18 septembre 2003 (2003-09-18) * revendications 1,7,8,23 * * page 12, ligne 24 - page 13, ligne 3 * -----	1-25	
A	MEZO A R ET AL.: "Oligomerization of uniquely folded mini-protein motifs: development of a homotrimeric betabetaalpha peptide." JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 123, no. 17, 2 mai 2001 (2001-05-02), pages 3885-3891, XP009086100 ISSN: 0002-7863 * tableaux 1-3 * -----	1-10	
A	YE Y Z ET AL.: "Antibodies that recognize nitrotyrosine." METHODS IN ENZYMOLOGY, vol. 269, 1996, pages 201-209, XP002041254 ISSN: 0076-6879 * page 202, alinéa 3 * * page 203, alinéa 4 * -----	22	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) C07K G01N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
6 juillet 2007		Jenn, Thierry	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE**RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0609983 FA 690599**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **06-07-2007**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0079284 A	28-12-2000	AT 278965 T	15-10-2004
		AU 3118300 A	09-01-2001
		DE 69920981 D1	11-11-2004
		DE 69920981 T2	21-07-2005
		EP 1210606 A1	05-06-2002
		JP 2003502672 T	21-01-2003

WO 03076946 A	18-09-2003	AU 2003218743 A1	22-09-2003
		EP 1488240 A2	22-12-2004

RECHERCHE INCOMPLÈTE
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE C

Numéro de la demande

FA 690599
FR 0609983

Bien que la revendication 12 concerne une méthode de diagnostic appliquée au corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit à la composition.
