

(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  
12 novembre 2009 (12.11.2009)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2009/136112 A1**

(51) Classification internationale des brevets :  
G01N 33/68 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2009/050661

(22) Date de dépôt international :  
10 avril 2009 (10.04.2009)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
08 52459 11 avril 2008 (11.04.2008) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE PARIS  
[FR/FR]; 3 avenue Victoria, F-75004 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :  
MOUTHON, Luc [FR/FR]; 17 avenue Robert André  
Vivien, F-94160 Saint Mandé (FR). HUBERT, Marc  
[FR/FR]; 15 bis rue de l'égalité, F-92130 Issy les  
Moulineaux (FR). TAMBY, Mathieu [FR/FR]; 7  
impasse du Docteur Broussais, F-93600 Aulnay sous Bois  
(FR).

(74) Mandataires : CHAJMOWICZ, Marion et al.; Becker  
& Associés, 25 rue Louis Le Grand, F-75002 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,  
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,

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

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

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

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

Publiée :

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

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

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

(54) Title : METHOD FOR DIAGNOSING PULMONARY ARTERY HYPERTENSION

(54) Titre : PROCEDE DE DIAGNOSTIC D'UNE HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE

(57) Abstract : The invention relates to an in vitro method for detecting pulmonary arterial hypertension (PAHT), or the risk of developing PAHT, which includes determining the presence and/or amount of anti-tenascin C antibodies in a biological sample from a patient.

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé in vitro de détection d'une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), ou d'un risque de développer une HTAP, comprenant la détermination de la présence et/ou de la quantité d'anticorps anti-Ténascine C dans un échantillon biologique provenant d'un patient.



WO 2009/136112 A1

Procédé de diagnostic d'une hypertension artérielle pulmonaire

L'invention concerne le diagnostic et le suivi d'une hypertension artérielle pulmonaire.

5 **Etat de la technique :**

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une pathologie rare responsable de la survenue d'une décompensation cardiaque droite pouvant aboutir au décès. L'HTAP est définie par la mise en évidence par cathétérisme droit d'une pression artérielle pulmonaire moyenne supérieure ou égale à 25mmHg au repos ou à 30mmHg à l'effort en l'absence  
10 d'élévation de la pression capillaire pulmonaire (Rubin, 1997). La survenue d'une HTAP est la conséquence d'une obstruction chronique des petites artères pulmonaires secondaire à la prolifération de cellules endothéliales, de cellules musculaires lisses vasculaires et de fibroblastes (Dorfmuller et al, 2003). En particulier, au cours de l'HTAP sévère, il se forme une couche de myofibroblastes et de matrice extra-cellulaire qui se localise entre  
15 l'endothélium et la limitante élastique interne, appelée neo-intima, qui est caractéristique de cette affection.

L'HTAP peut survenir dans l'évolution de pathologies à composante auto-immune que sont les connectivites, en particulier la sclérodermie systémique (Hachulla et al, 2005), le syndrome de Sharp et le lupus érythémateux systémique. De plus, au cours de l'HTAP  
20 idiopathique, on trouve de temps à autres des stigmates d'auto-immunité, à savoir des anticorps anti-nucléaires ou des anticorps anti-thyroglobuline.

La présence d'anticorps anti-cellules endothéliales (Tamby et al, 2005) et d'anticorps anti-fibroblastes (Tamby et al, 2006) a été rapportée au cours de l'HTAP idiopathique ou associée à la sclérodermie systémique. Cependant la valeur prédictive de ces anticorps  
25 dans la survenue de l'HTAP n'a pas été étudiée et le rôle potentiel des phénomènes auto-immuns dans la pathogénie de l'HTAP idiopathique reste incertain (Mouthon et al, 2005).

Dans la plupart des cas, l'HTAP est dépistée lorsque le patient présente une dyspnée de stade III ou IV. Lorsque le patient est suivi pour une maladie chronique comme la sclérodermie systémique, l'HTAP est dépistée par une échographie cardiaque annuelle.

30 Cependant, un test simple et fiable de dépistage d'une HTAP fait toujours défaut, et serait précieux pour un diagnostic le plus précoce possible, qui permettrait de mettre en place rapidement des stratégies thérapeutiques pour améliorer l'état du patient et ses chances de survie.

**Résumé de l'invention :**

L'invention fournit maintenant un procédé *in vitro* de détection d'une HTAP, ou d'un risque de développer une HTAP, comprenant la détermination de la présence et/ou de la  
5 quantité d'anticorps anti-Ténascine C (TN-C) dans un échantillon biologique provenant d'un patient, la présence d'anticorps anti-TN-C étant indicatrice d'une HTAP ou d'un risque de développer une HTAP.

De préférence, la présence d'anticorps anti-Ténascine C dans l'échantillon biologique est comparée à une valeur contrôle, la présence d'anticorps anti-Ténascine C en une quantité  
10 supérieure à la valeur contrôle étant indicatrice d'une HTAP ou d'un risque de développer une HTAP.

Un autre objet de l'invention est un procédé *in vitro* de pronostic ou de suivi d'une HTAP, comprenant la détermination de la présence et/ou de la quantité d'anticorps anti-TN-C dans  
15 un échantillon biologique provenant d'un patient, à différents temps, l'augmentation de la quantité d'anticorps anti-TN-C au cours du temps étant indicatif d'une aggravation de l'HTAP.

Un autre objet de l'invention est un procédé *in vitro* d'évaluation de l'efficacité d'un traitement envers une HTAP, comprenant la détermination de la présence et/ou de la  
20 quantité d'anticorps anti-TN-C dans un échantillon biologique provenant d'un patient, à différents temps avant, au cours ou après le traitement, la diminution de la quantité d'anticorps anti-TN-C au cours du temps étant indicatif d'une amélioration de l'HTAP.

**Description détaillée de l'invention :**

La TN-C est exprimée à l'intérieur et autour des vaisseaux sanguins dans le poumon fœtal (Rettig et al, 1994), mais elle n'est plus exprimée ensuite dans les artères pulmonaires adultes normales (Jones et al, 1996). Par ailleurs, la perte de signalisation via BMPRII, à l'origine d'un défaut de cellules T régulatrices pouvant prédisposer à la survenue d'une  
30 HTAP (Nicolls et al, 2005), peut également induire l'expression de la TN-C *in vivo* et sur des cellules vasculaires en culture (Ihida-Stansbury et al, 2006). Sur cette base, les inventeurs ont émis l'hypothèse que des patients ayant une HTAP pourraient développer

une réponse immune dirigée contre la TN-C. Aussi ont-ils décidé de rechercher des anticorps anti-TN-C dans le sérum de patients atteints d'HTAP.

Les inventeurs ont ainsi pu mettre en évidence une corrélation entre la survenue d'une HTAP et la production d'anticorps anti-TN-C. Sur cette base, ils proposent un procédé *in vitro* de diagnostic ou de pronostic d'une HTAP, ou d'un risque de développer une HTAP, comprenant la détermination de la présence et/ou de la quantité d'anticorps anti-TN-C dans un échantillon biologique provenant d'un patient. Les anticorps anti-TN-C détectés sont de préférence des immunoglobulines G (IgG).

10

#### *Définitions*

La Ténascine C (ou TN-C) est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire. Elle est également connue sous le nom de hexabrachion ou cytotactine. Une séquence de la TN-C humaine est rapportée en annexe (SEQ ID n°1).

15 Le terme "échantillon biologique" se réfère à tout échantillon biologique provenant d'un patient. Des exemples d'échantillons incluent des liquides biologiques, des biopsies tissulaires. De manière préférentielle, l'échantillon peut être du sang, du sérum, de la salive, de l'urine, du sperme. De manière davantage préférée, l'échantillon biologique est un échantillon de sang ou de sérum.

20 Le terme "patient" se réfère à tout sujet susceptible d'être testé. De préférence il s'agit d'un humain, mais le terme inclut tout autre mammifère, tel que des chiens, chats, rongeurs, bétail, chevaux, singes etc. Le patient peut être testé quel que soit son sexe ou son âge. Le patient peut être un sujet à risque, être asymptomatique ou présenter des signes précoces ou avancés d'une HTAP. Par exemple le patient peut être un sujet prédisposé à développer une HTAP, en particulier un sujet portant une ou plusieurs mutations dans le gène codant pour BMPRII.

25

Le terme "diagnostic" signifie l'identification de la pathologie ou l'évaluation de l'état de sévérité de la pathologie.

Le terme « pronostic » signifie l'évaluation du risque d'aggravation, et de ses conséquences.

30

Le terme « valeur contrôle » se réfère à une valeur basale correspondant à la moyenne des valeurs obtenues avec l'échantillon biologique de sujets sains, non affectés par une HTAP

ou une maladie susceptible d'entraîner une HTAP. Il peut s'agir d'une valeur statistique de référence.

Pour évaluer l'évolution de la pathologie, il peut être utile de tester un patient et de contrôler l'effet d'un traitement ou l'évolution de la pathologie, en testant de nouveau le patient, par exemple à plusieurs mois d'intervalle. Dans ce cas, les résultats du second test sont comparés aux résultats du premier test, ainsi que souvent à la valeur dite « contrôle ».

Une quantité d'anticorps anti-TN-C « supérieure à la valeur contrôle » signifie généralement une augmentation statistiquement significative, par exemple d'au moins deux déviations standards au dessus de la moyenne des densités optiques des réactivités IgG de l'ensemble des sujets sains.

Par "antigène de capture", on entend un antigène, de préférence fixé sur une phase solide, qui est capable de retenir l'anticorps anti-TN-C présent dans un échantillon biologique, par liaison affine. L'antigène de capture peut être marqué.

Le terme "marqué" se réfère aussi bien à un marquage direct (par le biais d'enzymes, radioisotopes, fluorochromes, composés luminescents, etc...) qu'à un marquage indirect (par exemple, par le biais d'anticorps eux-mêmes marqués de manière directe ou à l'aide de réactifs d'une "paire d'affinité " marquée, telle que, mais non exclusivement, la paire avidine marquée-biotine, etc..).

#### 20 *Dosage des anticorps :*

L'échantillon biologique est de préférence un échantillon de sérum, dilué au 1/100<sup>ème</sup>, ou plus, par exemple au 1/200<sup>ème</sup> ou 1/400<sup>ème</sup>.

De manière avantageuse, la quantité d'anticorps anti-TN-C peut être déterminée par un immunoessai.

L'échantillon biologique peut être éventuellement traité dans une étape préalable, ou mis directement en présence d'au moins un antigène de capture.

30 Le procédé selon l'invention peut être réalisé selon divers formats bien connus de l'homme du métier: en phase solide ou en phase homogène; en un temps ou en deux temps; en méthode compétitive, à titre d'exemples non limitatifs.

Selon un mode de réalisation préféré, l'antigène de capture est immobilisé sur une phase solide. On peut utiliser, à titre d'exemples non limitatifs de phase solide, des microplaques, en particulier des microplaques de polystyrène, telles que celles commercialisées par la société Nunc, Danemark. On peut également utiliser des particules ou des billes solides, des billes paramagnétiques, telles que celles fournies par Dynal ou Merck-Eurolab (France) (sous la marque Estapor™), ou encore des tubes à essai en polystyrène ou polypropylène, etc.

Un format d'immunoessai de détection des anticorps par compétition est également possible. D'autres modalités d'immunoessai sont encore envisageables et bien connues de l'homme du métier.

Dosages ELISA, radioimmunoessais, ou toute autre technique de détection peuvent être mis en oeuvre pour révéler la présence des complexes antigènes-anticorps formés.

Selon un mode de réalisation préféré, le procédé de l'invention comprend la mise en contact d'un échantillon biologique avec une protéine comprenant le fragment d'acides aminés 181 à 290 de la séquence TN-C humaine telle que représentée en SEQ ID NO :1.

Dans un exemple particulier, l'antigène de capture, qui peut être une protéine comprenant le fragment d'acides aminés 181 à 290 de la séquence TN-C humaine, peut être couplé à une glutathion S transférase (GST), avant d'être déposé sur une microplaque.

Des échantillons de sérum à tester, préalablement dilués au 1/100ème, sont mis à incuber sur la microplaque. Après lavage, des anticorps anti-Fc  $\gamma$  humain marqués (par exemple avec une phosphatase alcaline) sont ajoutés, les complexes étant révélés (par exemple par ajout d'un substrat de la phosphatase dont le clivage peut être détecté par lecture de l'absorbance).

*Patients visés :*

Les patients visés sont ceux susceptibles de développer une HTAP.

Il peut s'agir d'un patient qui souffre d'une connectivite, telle qu'une sclérodermie systémique, d'un syndrome de Sharp (qui est une connectivite mixte), d'un lupus érythémateux systémique.

Le patient peut également souffrir d'une HTAP idiopathique ou familiale.

Plus généralement, tout patient atteint d'une maladie vasculaire pulmonaire peut être avantageusement soumis au procédé de détection d'une HTAP tel que défini dans l'invention.

- 5 Par ailleurs, l'HTAP détectée peut être aussi une hypertension porto-pulmonaire (c'est-à-dire une HTAP associée à une hypertension portale), ou être associée à une cardiopathie congénitale, ou à une infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), ou encore être une hypertension pulmonaire post-embolique, compliquant l'évolution d'une bronchite chronique obstructive ou d'une cardiopathie cyanogène.
- 10 D'autres patients visés sont ceux exposés à certains médicaments coupe-faim comme la fenfluramine dont la prescription peut contribuer à la survenue d'une HTAP.
- D'autres personnes susceptibles de bénéficier de ce type de test sont celles porteuses d'une mutation dans le gène codant pour BMPRII et qui éventuellement ne présentent pas HTAP détectable à l'échographie, de façon à dépister les individus susceptibles de développer
- 15 ultérieurement une HTAP.

#### *Evaluation de l'efficacité d'un traitement*

- Un autre objet de l'invention est un procédé *in vitro* d'évaluation de l'efficacité d'un traitement envers une HTAP, comprenant la détermination de la présence et/ou de la
- 20 quantité d'anticorps anti-TN-C dans un échantillon biologique provenant d'un patient, à différents temps avant, au cours ou après le traitement, la diminution de la quantité d'anticorps anti-TN-C au cours du temps étant indicatif d'une amélioration de l'HTAP.

- Le traitement classique actuel de l'HTAP associe un traitement symptomatique et un traitement vasodilatateur. Le traitement symptomatique associe des anti-coagulants, une
- 25 oxygénothérapie et des diurétiques. Le traitement vasodilatateur repose sur les molécules suivantes : bloqueurs de canaux calcium, époprosténol (prostacycline) prescrit par voie intraveineuse en perfusion continue, les inhibiteurs des récepteurs de l'endothéline, sélectifs ou non, en particulier le bosentan, le syntaxentan et l'ambrysentan, les inhibiteurs
- 30 des phosphodiésterases de type 5 en particulier le sildénafil, l'ensemble de ces médicaments étant administrés par voie orale, et l'iloprost inhalé, analogue de la prostacycline administré par voie inhalée. Ces traitements peuvent être éventuellement combinés. En cas d'échec de ces thérapeutiques, une transplantation pulmonaire ou cœur-poumons peut être proposée.

Les figures et exemples suivants illustrent l'invention sans en limiter la portée.

## 5 **Légende des figures :**

La figure 1 est un graphe montrant la détection des anticorps anti-TN-C par dosage ELISA. Les IgG sériques des patients atteints d'HTAP idiopathique, des patients atteints de sclérodémie systémique et des sujets sains appariés pour le sexe et l'âge, ont été testées vis à vis d'un fragment de TN-C recombinante, à une dilution de 1/100ème. Les limites inférieure et supérieure de la zone en pointillé représentent les seuils définis par deux et trois fois l'écart-type au dessus de la moyenne des densités optiques obtenues chez les sujets sains. Les différences significatives entre les groupes de malades et les sujets sains sont estimées à l'aide d'un test de rang de Mann Whitney et sont indiquées par :

15 \*:  $p < 0,01$

\*\* :  $p < 0,001$ .

La figure 2 représente des courbes de survie selon Kaplan et Meier en fonction de la présence ou de l'absence d'anticorps anti-TN-C. En abscisse, le temps en mois ; en ordonnée, la survie cumulée en pourcentage.

## **Exemple : Détection d'anticorps anti-Ténascine C chez des patients atteints d'hypertension artérielle pulmonaire.**

## 25 **Matériels et méthodes :**

### *Patients*

L'HTAP a été dépistée par la mise en évidence par échographie cardiaque trans-thoracique d'une pression artérielle pulmonaire systolique supérieure à 40mmHg. Dans tous les cas, l'HTAP a été confirmée par la réalisation d'un cathétérisme droit et la mise en évidence d'une pression artérielle pulmonaire moyenne supérieure ou égale à 25 mmHg au repos et à 30 mmHg à l'effort. Par convention, l'HTAP était qualifiée d'idiopathique si le patient ne montrait aucune pathologie associée, l'HTAP pouvant alors correspondre à une HTAP

sporadique, familiale ou associée à une exposition à la fenfluramine. 91 patients ont été inclus dans l'étude comprenant 66 (72,5%) patients ayant une HTAP idiopathique (IPAH) et 25 patients ayant une sclérodémie systémique répondant aux critères de l'American College of Rheumatology (ACR) et/ou aux critères de LeRoy et Medsger (Masi et al, 1980 ; LeRoy et al, 2001).

Tous les patients ayant une sclérodémie systémique diffuse sans HTAP avaient une atteinte interstitielle pulmonaire mise en évidence par un scanner thoracique haute résolution et une capacité vitale inférieure à 80% de la valeur prédite et/ou un coefficient de transfert du monoxyde de carbone (DLCO) inférieure à 75% de la valeur prédite. Aucun des patients ne recevait des corticoïdes ou d'immunosuppresseurs au moment des prélèvements, aucun d'entre eux n'avait de tumeur solide ou une autre connectivité associée. 46 sujets sains appariés pour le sexe et l'âge ont été utilisés comme contrôles.

#### *Dosage ELISA*

La Ténascine C (TN-C) a été obtenue auprès de la société Abnova (Abnova Corporation, Taipei city, Taïwan). L'antigène utilisé était constitué du fragment 181 à 290 de la TN-C (SEQ ID n°1), couplé à un motif GST. La TN-C a été diluée dans un tampon de bicarbonate et déposée sur des plaques 96 puits (Maxisorb, NalgeNunc Int. Rochester, NY, USA) à une concentration finale de 4µg/mL à 4°C. Les sérums de patients et de sujets sains ont été dilués au 1/100<sup>ème</sup> dans un tampon phosphate (PBS) à 1% d'albumine et incubés une heure à 37°C. Après un lavage, des anticorps de lapin anti-Fcγ humain conjugués à de la phosphatase alcaline (Dakocytomation, Golstrup, Denmark), ont été ajoutés et incubés pendant une heure à température ambiante. Les réactivités ont été révélées par ajout de *p*-nitrophenylphosphate à 0,05M dans un tampon de carbonate de magnésium (pH 9,8) et l'absorbance à 405nm a été déterminée en utilisant un lecteur de plaques ELISA (Fusion, Packard BioScience, Meriden, CT, USA). Afin de tenir compte de la variabilité entre les puits, la densité optique d'un sérum de référence était arbitrairement définie comme 100% de l'activité anti-TN C. Les résultats des échantillons testés ont été calculés à partir de la moyenne de l'absorbance de puits dupliqués et exprimée comme un pourcentage de cette valeur de référence. Tous les échantillons ont été testés en double.

### *Analyses statistiques*

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel Systat (version 11.0 Systat Software Inc, Point Richmond, CA, USA). Un test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les densités optiques relatives des différents groupes. Des valeurs de  $P$  inférieures à 0,05 étaient considérées comme statistiquement significatives. La survie a été calculée par la méthode de Kaplan et Meier (Kaplan and Meier, 1958).

### **Résultats :**

Les réactivités des IgG des patients atteints d'HTAP idiopathique, des patients atteints de sclérodémie systémique avec ou sans HTAP et des sujets contrôles vis à vis de la TN-C ont été étudiés par ELISA. En utilisant un seuil défini par deux déviations standard au-dessus de la moyenne des densités optiques des réactivités IgG de l'ensemble des sujets sains, 36/66 (54,5%) patients ayant une HTAP idiopathique et 2/25 (8%) des patients sclérodermiques avaient des IgG anti-TN-C. Aucun des sujets sains n'avait d'IgG anti-TN-C (Figure 1). Lorsque le seuil était déplacé à trois déviations standard au dessus de la moyenne des réactivités IgG des individus sains, 12/66 (18,1%) des patients ayant une HTAP idiopathique avait des IgG anti-TN C et aucun patient sclérodermique n'avait d'IgG anti-TN C. Les réactivités des IgG sériques des anticorps anti-TN C de patients ayant une HTAP idiopathique étaient significativement plus élevées que celles des patients sclérodermiques ( $p < 0,001$ ), et que celles des sujets sains ( $p < 0,001$ ). De la même façon, les réactivités des IgG sériques des anticorps anti-TN C de patients sclérodermiques étaient significativement plus élevées que celles des individus sains ( $p = 0,021$ ) (Figure 1).

Il n'a pas été mis en évidence de différence significative dans la présentation clinique et les données de l'échographie cardiaque, du cathétérisme droit et du test de marche de 6 minutes entre les deux groupes de patients. La survie était diminuée dans le groupe des malades ayant des anticorps anti-TNC comparativement aux malades qui n'avaient pas d'anticorps anti-TN C sans toutefois que cette différence ne soit ici significative ( $p = 0,17$ ).

L'apparition d'une réponse immune dirigée contre la TN C pourrait résulter des mêmes mécanismes que ceux conduisant à l'induction de l'expression de la TN C et à la prolifération des cellules musculaires lisses. La présence d'anticorps anti-TN C serait donc corrélée à l'apparition d'un remodelage vasculaire, constituant un marqueur de la survenue d'une HTAP.

**Références bibliographiques**

- Dorfmueller et al, 2003, Eur Respir J, 22(2) :358-63
- 5 - Hachulla et al, 2005, Arthritis Rheum 52(12) :3792-3800
- Ihida-Stansbury et al, 2006, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 291(4):L694-702
- Jones et al, 1996, Circ Res 79(6) :1131-42
- Kaplan and Meier, 1958, J Am Stat Assoc 53:457-81
- LeRoy et al, 2001, J Rheumatol 28(7):1573-76
- 10 - Masi et al, 1980, Arthr Rheum 23 :581-90
- Mouthon et al, 2005, Eur Respir J 26(6) :986-8
- Nicolls et al, 2005, Eur Respir J 26(6) :1110-8
- Rettig et al, 1994, J Cell Sci;107 ( Pt 2):487-97
- Rubin, 1997, N Engl J Med, 336(2) :111-7
- 15 - Tamby et al, 2005, Thorax 60(9):765-72
- Tamby et al, 2006, Eur Respir J 28(4):799-807

## Revendications

- 5 1. Procédé *in vitro* de détection d'une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), ou d'un risque de développer une HTAP, comprenant la détermination de la présence et/ou de la quantité d'anticorps anti-Ténascine C dans un échantillon biologique provenant d'un patient, la présence d'anticorps anti-Ténascine C étant indicatrice d'une HTAP ou d'un risque de développer une HTAP.
- 10 2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel l'échantillon biologique est un échantillon de sang ou de sérum.
- 15 3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel la présence d'anticorps anti-Ténascine C dans l'échantillon biologique est comparée à une valeur contrôle, la présence d'anticorps anti-Ténascine C en une quantité supérieure à la valeur contrôle étant indicatrice d'une HTAP ou d'un risque de développer une HTAP.
- 20 4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel la quantité d'anticorps anti-Ténascine C est déterminée par un immunoessai.
- 25 5. Procédé selon la revendication 4, dans lequel l'immunoessai est un dosage ELISA.
6. Procédé selon la revendication 4 ou 5, comprenant la mise en contact d'un échantillon biologique avec une protéine comprenant le fragment d'acides aminés 181 à 290 de la séquence Ténascine C humaine telle que représentée en SEQ ID NO :1.
7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, dans lequel le patient est un humain.
- 30 8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel le patient souffre d'une sclérodémie systémique.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel le patient souffre d'un syndrome de Sharp.
10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel le patient souffre d'un  
5        lupus érythémateux systémique.
11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel le patient souffre d'une HTAP idiopathique.
- 10       12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel l'HTAP est associée à une hypertension portale, à une cardiopathie congénitale, ou à une infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), ou est une hypertension pulmonaire post-embolique.
- 15       13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel le patient est un sujet prédisposé à développer une HTAP.
14. Procédé selon la revendication 13, dans lequel le sujet est porteur d'une ou plusieurs mutation(s) dans le gène codant pour BMPRII.
- 20
15. Procédé *in vitro* de pronostic ou de suivi d'une HTAP, comprenant la détermination de la présence et/ou de la quantité d'anticorps anti-Ténascine C dans un échantillon biologique provenant d'un patient, à différents temps, l'augmentation de la quantité d'anticorps anti-Ténascine C au cours du temps étant indicatif d'une aggravation de  
25        l'HTAP.
16. Procédé *in vitro* d'évaluation de l'efficacité d'un traitement envers une HTAP, comprenant la détermination de la présence et/ou de la quantité d'anticorps anti-Ténascine C dans un échantillon biologique provenant d'un patient, à différents  
30        temps avant, au cours ou après le traitement, la diminution de la quantité d'anticorps anti-Ténascine C au cours du temps étant indicatif d'une amélioration de l'HTAP.

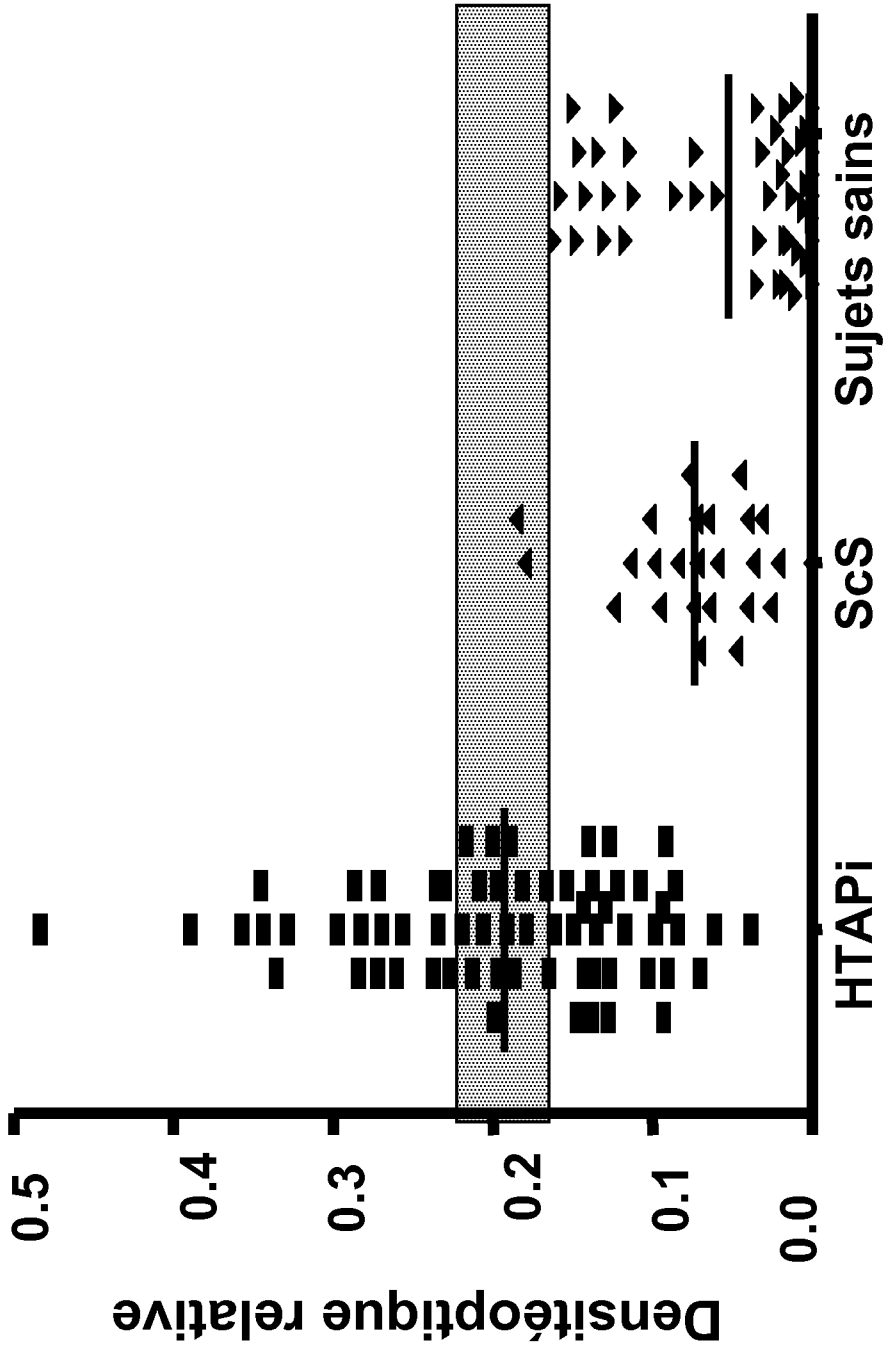


Figure 1

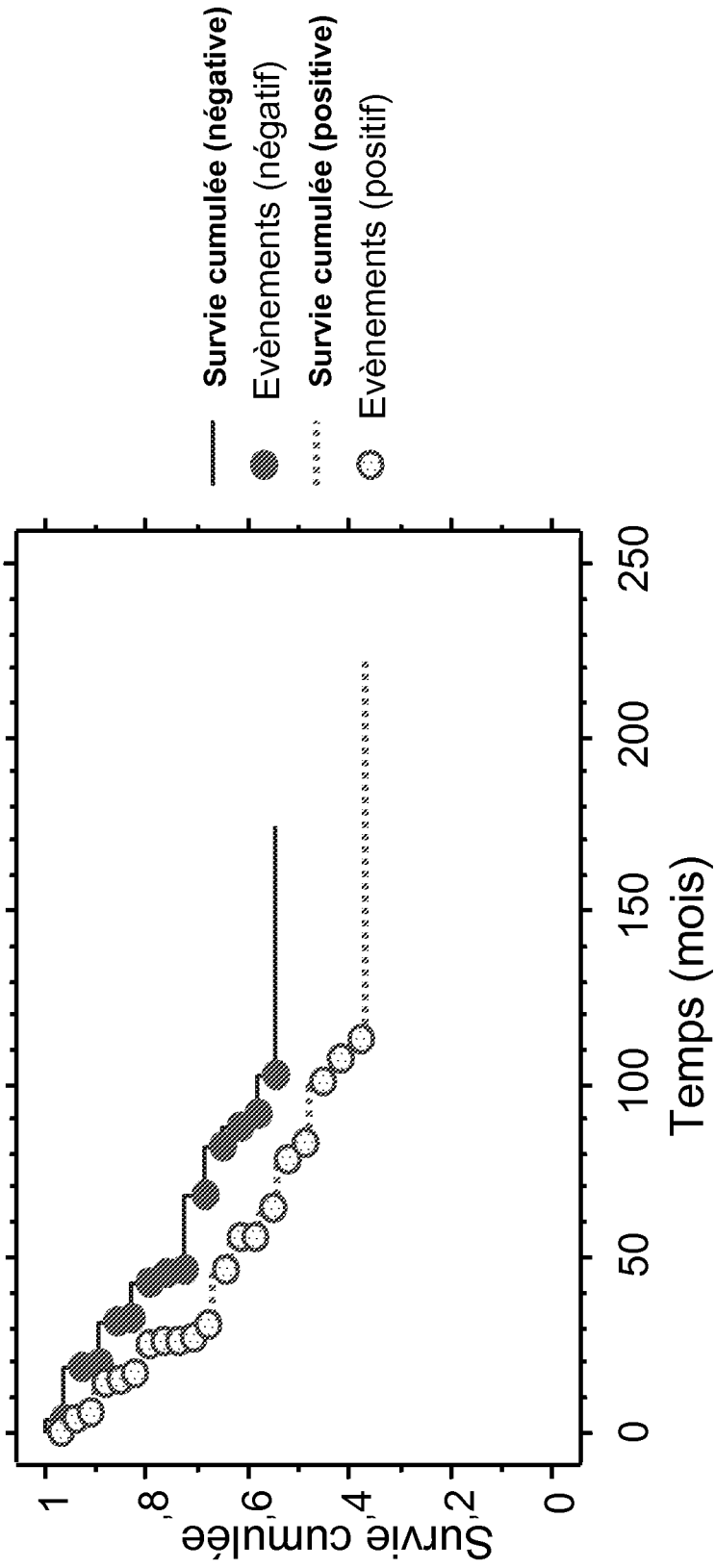


Figure 2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2009/050661

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
INV. G01N33/68

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)  
G01N

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JÉFFERY ET AL: "Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension" PROGRESS IN CARDIOVASCULAR DISEASES, SAUNDERS, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 45, no. 3, 1 November 2002 (2002-11-01), pages 173-202, XP005128803 ISSN: 0033-0620 page 186, right-hand column - page 187, left-hand column, paragraph 1	1-16
A	WO 99/43308 A (RABINOVITCH MARLENE [CA]) 2 September 1999 (1999-09-02) the whole document  ----- -/--	1-16

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

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

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

Date of the actual completion of the international search

5 octobre 2009

Date of mailing of the international search report

26/10/2009

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Hoff, Céline

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2009/050661

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/009366 A (CORNELL RES FOUNDATION INC [US]; EDELBERG JAY [US]; BALLARD VICTORIA []) 3 February 2005 (2005-02-03) claims 1-53	1-16
A	----- IHIDA-STANSBURY KAORI ET AL: "Tenascin-C is induced by mutated BMP type II receptors in familial forms of pulmonary arterial hypertension" AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY - LUNG CELLULAR AND MOLECULAR PHYSIOLOGY, vol. 291, no. 4, October 2006 (2006-10), pages L694-L702, XP002502458 ISSN: 1040-0605 the whole document -----	1-16

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2009/050661

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9943308	A	02-09-1999	NONE	
WO 2005009366	A	03-02-2005	US 2006172943 A1	03-08-2006

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2009/050661

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

INV. G01N33/68

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)

G01N

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	JEFFERY ET AL: "Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension" PROGRESS IN CARDIOVASCULAR DISEASES, SAUNDERS, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 45, no. 3, 1 novembre 2002 (2002-11-01), pages 173-202, XP005128803 ISSN: 0033-0620 page 186, colonne de droite - page 187, colonne de gauche, alinéa 1	1-16
A	WO 99/43308 A (RABINOVITCH MARLENE [CA]) 2 septembre 1999 (1999-09-02) le document en entier ----- -/--	1-16

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

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

\*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

\*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

\*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

\*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

\*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

5 octobre 2009

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

26/10/2009

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

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

Fonctionnaire autorisé

Hoff, Céline

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2009/050661

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>WO 2005/009366 A (CORNELL RES FOUNDATION INC [US]; EDELBERG JAY [US]; BALLARD VICTORIA []) 3 février 2005 (2005-02-03) revendications 1-53</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-16
A	<p>IHIDA-STANSBURY KAORI ET AL: "Tenascin-C is induced by mutated BMP type II receptors in familial forms of pulmonary arterial hypertension"                      AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY - LUNG CELLULAR AND MOLECULAR PHYSIOLOGY, vol. 291, no. 4, octobre 2006 (2006-10), pages L694-L702, XP002502458                      ISSN: 1040-0605                      le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-16

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2009/050661

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9943308	A	02-09-1999	AUCUN	
WO 2005009366	A	03-02-2005	US 2006172943 A1	03-08-2006