(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

COURBEVOIE

(11) **N° de publication :** ***3 135 892***

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

(21) **N° d'enregistrement national :** **22 05148**

(51) Int Cl[8] : ***A 61 K 38/17*** *(2022.01), A 61 P 11/00*

(12) **BREVET D'INVENTION** **B1**

(54) traitement d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) chez un patient.

(22) **Date de dépôt :** 30.05.22.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 01.12.23 Bulletin 23/48.

(45) **Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention :** 14.06.24 Bulletin 24/24.

(56) **Liste des documents cités dans le rapport de recherche :**

Se reporter à la fin du présent fascicule

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

◯ **Demande(s) d'extension :**

(71) **Demandeur(s) :** *BIOTHELIS Société par actions simplifiée* —FR, *INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) Etablissement public à caractère administratif* FR, *INSTITUT PASTEUR DE LILLE Fondation* FR, *UNIVERSITÉ DE LILLE Etablissement public national à caractère scientifique culturel et professionnel* FR, *CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) Etablissement public national à caractère administratif* FR et *CENTRE HOSPITALIER REGIONAL UNIVERSITAIRE DE LILLE Etablissement d'hospitalisation* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** DE FREITAS CAIRES Nathalie, LASSALLE Philippe, HUREAU Maxence et GAUDET Alexandre.

(73) **Titulaire(s) :** BIOTHELIS (SAS), INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (EPA), INSTITUT PASTEUR DE LILLE Fondation, UNIVERSITÉ DE LILLE (EPSCP), CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) (EPA), CENTRE HOSPITALIER REGIONAL UNIVERSITAIRE DE LILLE Etablissement d'hospitalisation.

(74) **Mandataire(s) :** CABINET BEAU DE LOMENIE.

FR 3 135 892 - B1

Description

Titre de l'invention : traitement d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) chez un patient

Domaine technique

[0001] L'invention concerne une méthode de traitement ou de prévention d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) chez un patient avec ESM-1 (Endothelial cell Specific Molecule) ou une composition pharmaceutique en contenant.

Technique antérieure

[0002] Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) est un œdème pulmonaire dit « lésionnel », c'est à dire entraîné par une hausse de la perméabilité capillaire pulmonaire survenant à la suite d'une agression directe ou indirecte de la membrane alvéolo-capillaire, associé à une inflammation pulmonaire intense et une hypoxémie sévère.

[0003] Le SDRA est défini par l'association de quatre critères : détresse respiratoire depuis moins d'une semaine, opacités pulmonaires bilatérales sur la radiographie thoracique ou la tomodensitométrie (TDM), pas d'argument pour une cause cardiaque d'œdème pulmonaire, et hypoxémie avec rapport $PaO_2/FIO_2 < 300$ mmHg pour une pression télé-expiratoire positive réglée à 5 cmH_2O ou plus avec 3 stades de gravité définis en fonction de l'hypoxémie.

[0004] Le SDRA est causé par une atteinte de la membrane alvéolo-capillaire, dont la capacité d'échanges gazeux chute radicalement. Ceci entraîne également un défaut de compliance pulmonaire. Cette manifestation peut apparaître dans un grand nombre de situations pathologiques avec des mécanismes différents. Il est caractérisé par une inflammation du parenchyme pulmonaire qui mène à des anomalies d'échanges de gaz avec une libération en parallèle de médiateurs inflammatoires du parenchyme pulmonaire qui causent une inflammation et une hypoxémie. Souvent une défaillance multiviscérale résulte rapidement de cet état.

[0005] Son traitement, à la fois étiologique et symptomatique, ne permet une survie que dans la moitié des cas pour les SDRA dits « sévères ». Son pronostic reste donc encore très sombre et il peut laisser des séquelles importantes.

[0006] Les causes peuvent être pulmonaires ou extra-pulmonaires. Les causes pulmonaires comprennent les pneumopathies bactérienne, virale, fongique, les embolies, les infiltrations, les traumatismes thoraciques, les aspirations trachéo-bronchiques ou gastriques, la ventilation mécanique, les inhalations, les noyades, les phénomènes d'ischémie-reperfusion.

[0007] Les causes extra-pulmonaire comprennent les chocs, le sepsis (ou septicémie), les po-

lytraumatismes, l'exposition à des agents toxiques, les transfusions, les shunts cardio-pulmonaires, la pancréatite, les intoxications médicamenteuses, les brulures graves, les éclampsies, l'exposition à des produits de contraste et l'acidocétose.

[0008] L'éthylisme chronique, le tabagisme actif et passif, constituent des facteurs environnementaux augmentant le risque de développer un SDRA en cas d'agression pulmonaire, via des effets sensibilisateurs de l'épithélium, de l'endothélium et des autres cellules immunitaires de la membrane alvéolocapillaire. La présence d'un sepsis, d'une maladie pulmonaire chronique et d'un pH plasmatique abaissé ont également été montrés comme des facteurs précipitants la survenue de SDRA.

[0009] Le 31 décembre 2019, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a été informée d'un groupe de cas de pneumonie de cause inconnue détectés dans la ville de Wuhan, province du Hubei, Chine. Le 12 janvier 2020, il a été annoncé qu'un nouveau coronavirus avait été identifié Ce virus a été appelé SARS-CoV-2 et la maladie associée « COronaVIrus Disease 2019 » (COVID-19). Depuis, l'agent étiologique SARS-CoV-2 s'est répandu dans le monde entier.

[0010] L'infection par le SARS-CoV-2 présente un large spectre clinique allant d'une maladie inapparente, à des formes respiratoires qui vont d'un simple essoufflement jusqu'au SDRA. Les formes respiratoires symptomatiques présentent une fièvre, une toux nouvelle et continue, un essoufflement, une fatigue, une perte d'appétit, une anosmie et une agueusie. Le délai d'apparition du SDRA lié au COVID-19 se situe entre 8 et 12 jours après l'apparition des symptômes.

[0011] L'aggravation respiratoire observée lors de la deuxième semaine d'évolution de la maladie est la principale cause d'hospitalisation et de mortalité. Sur le plan thérapeutique, l'arme principale demeure l'assistance respiratoire. Cependant ce SDRA est plus lié à une réponse inflammatoire très intense secondaire à l'agression virale qu'au virus lui-même. Il existe donc un rationnel fort à tenter de moduler cette réponse afin de limiter les dommages induits au niveau pulmonaire. L'effet positif de la dexamethasone prouve la pertinence de cette approche, mais l'effet reste modeste.

[0012] La Demanderesse a mis en évidence une solution thérapeutique anti-inflammatoire spécifique du SDRA, éventuellement guidée par des biomarqueurs périphériques compagnons, qui permet de changer le pronostic des patients atteints de SDRA, notamment chez les patients atteints de la COVID-19.

Résumé de l'invention

[0013] Ainsi, la présente invention, qui trouve application dans le domaine du traitement des insuffisances respiratoires, concerne ESM-1 (Endothelial cell Specific Molecule) ou une composition pharmaceutique en contenant pour son utilisation dans une méthode de traitement ou de prévention d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA)

chez un patient.

Description détaillée

[0014] Définitions

[0015] L'ESM-1 (Endothelial cell Specific Molecule), également connu sous la dénomination « endocan », est une glycoprotéine codée par un gène unique non polymorphe appelé esm1. Ce gène s'exprime spécifiquement au niveau des cellules endothéliales, et aboutit à la sécrétion d'un protéoglycane de 50 kDa, circulant librement dans le sang. L'ESM-1 est tout particulièrement surexprimé par les cellules endothéliales qui forment le bourgeon vasculaire ou « endothelial tip cells » dans la néoangiogenèse. L'ESM-1 circulante baisse par le biais d'un processus proteolytique induit par le neutrophile activé, générant une forme clivée circulante de 14 kDa. La séquence en acides aminés de l'ESM-1 humain est SEQ ID NO : 1.

[0016] Le terme « composition pharmaceutique » désigne une composition comprenant un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Le terme « pharmaceutiquement acceptable » signifie approuvé par une agence règlementaire fédérale ou d'État ou énuméré dans la pharmacopée américaine ou européenne, ou dans une autre pharmacopée généralement reconnue, destinée à être utilisé chez les animaux et chez l'homme. Par exemple, un véhicule pharmaceutiquement acceptable peut être un diluant, un adjuvant, un excipient ou un véhicule avec lequel l'agent thérapeutique est administré. Ces véhicules peuvent être des liquides stériles, tels que l'eau et des huiles, y compris ceux d'origine pétrolière, animale, végétale ou synthétique, tels que l'huile d'arachide, l'huile de soja, l'huile minérale, l'huile de sésame, etc. L'eau est un véhicule préféré lorsque la composition pharmaceutique est administrée par voie intraveineuse. Des solutions salines et des solutions aqueuses de dextrose et de glycérol peuvent également être utilisées comme véhicules liquides, en particulier pour les solutions injectables. Les excipients pharmaceutiquement acceptables comprennent l'amidon, le glucose, le lactose, le saccharose, le stéarate de sodium, le monostéarate de glycérol, le talc, le chlorure de sodium, le lait écrémé en poudre, le glycérol, le propylène glycol, l'eau, l'éthanol et similaires. Lorsque la composition pharmaceutique est adaptée à une administration orale, les comprimés ou les gélules peuvent être préparés par des moyens classiques avec des excipients pharmaceutiquement acceptables tels que des agents liants (par exemple de l'amidon de maïs prégélatinisé, de la polyvinylpyrrolidone ou de l'hydroxypropyl méthylcellulose); des charges (par exemple du lactose, de la cellulose microcristalline ou de l'hydrogénophosphate de calcium); des lubrifiants (par exemple, stéarate de magnésium, talc ou silice); des délitants (par exemple l'amidon de pomme de terre ou le glycolate d'amidon sodique); ou des agents mouillants (par exemple, le laurylsulfate de sodium). Les comprimés peuvent être

enrobés par des procédés bien connus dans l'état de la technique. Les préparations liquides pour administration orale peuvent prendre la forme, par exemple, de solutions, de sirops ou de suspensions, ou peuvent être présentées sous forme de produit sec à reconstituer avec de l'eau ou un autre véhicule approprié avant utilisation. De telles préparations liquides peuvent être préparées par des moyens classiques avec des véhicules pharmaceutiquement acceptables tels que des agents de suspension (par exemple un sirop de sorbitol, des dérivés de la cellulose ou des graisses comestibles hydrogénées); des agents émulsifiants (par exemple, la lécithine ou l'acacia); véhicules non aqueux (par exemple huile d'amande, esters huileux, alcool éthylique ou huiles végétales fractionnées); et des conservateurs (par exemple des p-hydroxybenzoates de méthyle ou de propyle ou de l'acide sorbique). Les compositions pharmaceutiques peuvent également contenir des sels tampons, des aromatisants, des colorants et des édulcorants, selon le cas. La composition selon l'invention est de préférence une composition pharmaceutique.

[0017] Le terme « traiter » ou « traitement » englobe tout effet bénéfique ou souhaitable sur les symptômes d'une pathologie ou d'un état pathologique, et peut même inclure une réduction minimale d'un ou plusieurs marqueurs mesurables de la pathologie ou de l'état pathologique. Le traitement peut par exemple impliquer soit la réduction ou l'amélioration des symptômes de la pathologie ou de l'état pathologique, soit le retardement de la progression de la maladie ou de l'état pathologique.

[0018] Le terme « prévenir » ou « prévention » englobe tout effet bénéfique ou souhaitable permettant d'empêcher la survenue, de diminuer la survenue ou de retarder la survenue des symptômes d'une pathologie ou d'un état pathologique.

[0019] Le terme « patient » désigne un mammifère humain ou non humain (tel qu'un chat, un chien, un cheval ou un primate). De préférence, le patient est un être humain, homme ou femme.

[0020] Indication thérapeutique

[0021] La présente demande concerne l'ESM-1 (Endothelial cell Specific Molecule) ou une composition pharmaceutique en contenant pour utilisation dans une méthode de traitement ou de prévention d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) chez un patient.

[0022] Le SDRA peut être d'origine pulmonaire (agression directe de la membrane alvéolo-capillaire) ou extra-pulmonaire (agression indirecte de la membrane alvéolo-capillaire).

[0023] Le SDRA d'origine pulmonaire peut être associé à une pneumopathie, une embolie, une infiltration et/ou un traumatisme. En particulier, le SDRA d'origine pulmonaire peut être associé à :

- une pneumonie (bactérienne, virale ou fongale),
- une aspiration gastrique,

- une noyade,
- un traumatisme thoracique sévère,
- une contusion pulmonaire,
- un œdème pulmonaire de reperfusion, par exemple après une transplantation de poumon,
- une embolie graisseuse, et/ou
- une inhalation de gaz et/ou de fumée toxique.

[0024] Le SDRA est d'origine non-pulmonaire peut être associé à un choc, un sepsis (ou septicémie), un polytraumatisme, un agent toxique, une éclampsie, une exposition à un produit de contraste et/ou une acidocétose. En particulier, le SDRA d'origine non-pulmonaire peut être associé à :

- un sepsis sévère,
- une secousse,
- des transfusions multiples, incluant le syndrome respiratoire aigu post-transfusionnel (TRALI),
- un traumatisme sévère non-thoracique,
- une pancréatite,
- une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), et/ou
- une overdose de drogue, par exemple une overdose aux opiacés, une overdose au paraldehyde.

[0025] Dans un mode de réalisation particulier, le SDRA est associé à une pathologie choisie parmi (i) une infection respiratoire d'origine bactérienne ou virale, telle que la COVID-19, (ii) une dysplasie bronchopulmonaire, (iii) une septicémie, et (iv) un poly-traumatisme.

[0026] Dans un mode de réalisation particulier, le SDRA est associé à un sepsis.

[0027] Il découle de ce qui précède que, dans un mode de réalisation particulier, le patient traité présente une pneumopathie, une embolie, une infiltration et/ou un traumatisme. En particulier, le patient traité présente:

- une pneumonie (bactérienne, virale ou fongale),
- une aspiration gastrique,
- une noyade,
- un traumatisme thoracique sévère,
- une contusion pulmonaire,
- un œdème pulmonaire de reperfusion, par exemple après avoir subi une trans-plantation de poumon,
- une embolie graisseuse, et/ou
- une inhalation de gaz et/ou de fumée toxique.

[0028] Dans un autre mode de réalisation particulier, le patient présente un choc, un sepsis

(ou septicémie), un polytraumatisme, une exposition à un agent toxique, une éclampsie, une exposition à un produit de contraste et/ou une acidocétose. En particulier, le patient présente :

- un sepsis sévère,
- une secousse,
- des transfusions multiples, incluant le syndrome respiratoire aigu post-transfusionnel (TRALI),
- un traumatisme sévère non-thoracique,
- une pancréatite,
- une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), et/ou
- une overdose de drogue, par exemple une overdose aux opiacés, une overdose au paraldehyde.

[0029] Dans un mode de réalisation particulier, le patient présente un sepsis.

[0030] Dans un autre mode de réalisation particulier, le patient est atteint d'une pathologie choisie parmi (i) une infection respiratoire d'origine bactérienne ou virale, telle que la COVID-19, (ii) une dysplasie bronchopulmonaire, (iii) une septicémie, et (iv) un polytraumatisme nécessitant une prise en charge du patient en réanimation.

[0031] Le traitement selon l'invention offre l'avantage de limiter la réaction inflammatoire pulmonaire sans impacter la réponse anti-virale ou anti-bactérienne qui se produit au niveau du ganglion lymphatique afférent, contrairement aux corticostéroïdes qui ont une action immunomodulatrice et profibrosante en particulier la dexaméthasone. Ceci est particulièrement avantageux lorsque le SDRA est associé à une infection virale ou bactérienne. En particulier, dans le cas de la COVID-19, l'ESM-1 permet de limiter la réaction inflammatoire induite par SARS-CoV-2 tout en laissant le temps à l'immunité anti-virale de s'installer, ce qui constitue une approche thérapeutique particulièrement avantageuse. Ainsi, le mode d'action anti-inflammatoire de l'ESM-1 permet d'éviter deux écueils inhérents aux corticoïdes : l'immunosuppression et la fibrose pulmonaire interstitielle.

[0032] Dans le cadre de la présente invention, l'ESM-1 est sous forme de protéoglycane, c'est-à-dire que l'ESM-1 comprend une chaine de glycosaminoglycane (GAG) au niveau de la serine 137 [1]. La chaine GAG de l'ESM-1 se caractérise par une succession de sucres [2].

[0033] L'ESM-1 peut être d'origine plasmatique, c'est-à-dire un ESM-1 purifié à partir du sang d'un ou de plusieurs individu(s), par exemple purifié à partir de sang humain. On parlera alors d'ESM plasmatique.

[0034] L'ESM-1 peut être d'origine recombinante, c'est-à-dire un ESM-1 produit de façon recombinante dans une cellule capable de produire l'ESM-1 sous forme glycosylée. On parlera alors d'ESM recombinant. Etant donné que l'ESM-1 doit être utilisé sous

forme glycosylée dans le cadre de la présente invention, on privilégiera une cellule eucaryote à une cellule procaryote, car cette dernière n'est généralement pas capable de produire des protéines eucaryotes glycosylées. Des lignées cellulaires capables de produire des glycoprotéines sont largement décrites dans la littérature. On peut citer par exemple les cellules HEK, telle que la lignée cellulaire HEK-293, et CHO. HEK et CHO sont largement utilisée pour produire des glycoprotéines utilisées en thérapie et peuvent être utilisées pour produire l'ESM-1 recombinant.

[0035] L'ESM-1 est de préférence formulé pour une administration parentérale. Le terme « administré par voie parentérale », tel qu'utilisé ici, désigne des modes d'administration autres que l'administration entérale, généralement par injection, et comprend, sans limitation, l'administration intravasculaire, intraveineuse, intramusculaire, intra-artérielle, intrathapsale, intracapsulaire, intraorbitaire, intratumorale, intracardiaque, intradermique, intra-péritonéale, par injection, perfusion transtrachéale, sous-cutanée, intra-articulaire, sous-capsulaire, sous-arachnoïdienne, intraspinale et intrasternale. L'administration intravasculaire (intraveineuse ou intra-artérielle), intrapéritonéale, sous-cutanée ou intramusculaire est préférée dans le cadre de la présente invention. L'administration par voie intraveineuse est particulièrement préférée dans le cadre de la présente invention, par exemple par perfusion intraveineuse. Par exemple, l'ESM-1 ou la composition en contenant peut être administré par voie intraveineuse en perfusion continue.

[0036] De préférence, l'ESM-1 est administrée au patient par voie parentérale, telle que par voie intraveineuse, par voie intramusculaire ou par voie sous-cutanée.

[0037] L'ESM-1 ou la composition pharmaceutique en contenant peut être utilisé en monothérapie ou en association avec un médicament dont l'intérêt thérapeutique est reconnu dans la pathologie considérée. Par exemple l'ESM-1 peut être administré au patient en association avec une corticothérapie, par exemple en association avec de la dexamethasone, un anticorps monoclonal anti-cytokine et/ou anti-récepteur à cytokine.

[0038] L'ESM-1 ou la composition en contenant est administré au patient à une dose efficace permettant le traitement ou la prévention du SDRA. La dose d'ESM-1 administrée au patient variera en fonction de plusieurs facteurs, y compris, sans limitation, la voie d'administration, le type et la gravité de la pathologie traitée, l'état du patient, la corpulence du patient, l'âge du patient, etc. La personne du métier peut facilement déterminer, sur la base de ses connaissances dans ce domaine, la plage posologique requise en fonction de ces facteurs et d'autres. La dose appropriée peut également être déterminée avec des modèles animaux ou avec des essais cliniques.

[0039] Dans le cadre de l'invention, l'ESM-1 peut être administrée au patient à une dose allant de 250 µg/jour à 2000 µg/jour, par exemple à une dose allant de 500 µg/jour à 1000 µg/jour, de préférence à une dose d'environ 600 µg/jour. L'ESM-1 peut être ad-

ministrée en 1 seule fois, en continue (ex. en perfusion continue) ou avec des doses répétées. Par exemple, l'ESM-1 peut être administrée au patient avec une dose de charge allant de 50 µg à 500 µg, de préférence une dose d'environ 150 µg, puis une dose allant de 50 µg à 250 µg, de préférence une dose d'environ 75 µg, toutes les 4 heures.

[0040] La durée du traitement peut varier en fonction des besoins, de quelques heures à plusieurs jours, par exemple jusqu'à ce que le SDRA disparaisse ou jusqu'à ce que le risque de développer un SDRA disparaisse. Dans un mode de réalisation particulier, l'ESM-1 est administrée au patient pendant une durée allant de 5 jours à 10 jours.

[0041] Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, l'ESM-1 ou la composition en contenant est administré, par exemple par voie intraveineuse, de préférence en perfusion continue, à une dose adaptée pour maintenir chez le patient une concentration plasmatique en ESM-1 supérieure à 5 ng/mL de plasma, par exemple supérieure à 6 ng/mL de plasma, par exemple supérieure à 7 ng/mL de plasma, par exemple supérieure à 8 ng/mL de plasma, par exemple supérieure à 9 ng/mL de plasma, par exemple supérieure à 10 ng/mL de plasma, par exemple supérieure à 11 ng/mL de plasma, supérieure à 12 ng/mL de plasma, supérieure à 13 ng/mL de plasma, supérieure à 14 ng/mL de plasma, par exemple supérieure à 15 ng/mL de plasma, supérieure à 20 ng/mL de plasma, supérieure à 25 ng/mL de plasma, supérieure à 30 ng/mL de plasma, supérieure à 35 ng/mL de plasma, supérieure à 40 ng/mL de plasma, supérieure à 45 ng/mL de plasma, supérieure à 50 ng/mL de plasma.

[0042] Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, l'ESM-1 ou la composition en contenant est administré, par exemple par voie intraveineuse, de préférence en perfusion continue, à une dose adaptée pour maintenir chez le patient une concentration plasmatique en ESM-1 comprise entre 5 ng/mL de plasma et 50 ng/mL de plasma, tel que comprise entre 6 ng/mL de plasma et 50 ng/mL de plasma, tel que comprise entre 7 ng/mL de plasma et 50 ng/mL de plasma, tel que comprise entre 8 ng/mL de plasma et 50 ng/mL de plasma, tel que comprise entre 9 ng/mL de plasma et 50 ng/mL de plasma, tel que comprise entre 10 ng/mL de plasma et 50 ng/mL de plasma, tel que comprise entre 11 ng/mL de plasma et 50 ng/mL de plasma, comprise entre 12 ng/mL de plasma et 50 ng/mL de plasma, comprise entre 12 ng/mL de plasma et 50 ng/mL de plasma, comprise entre 13 ng/mL de plasma et 50 ng/mL de plasma, comprise entre 14 ng/mL de plasma et 50 ng/mL de plasma, comprise entre 15 ng/mL de plasma et 50 ng/mL de plasma, comprise entre 20 ng/mL de plasma et 50 ng/mL de plasma, comprise entre 25 ng/mL de plasma et 50 ng/mL de plasma, comprise entre 30 ng/mL de plasma et 50 ng/mL de plasma, comprise entre 35 ng/mL de plasma et 50 ng/mL de plasma, comprise entre 40 ng/mL de plasma et 50 ng/mL de plasma.

[0043] Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, l'ESM-1 ou la composition en

contenant est administré, par exemple par voie intraveineuse, de préférence en perfusion continue, à une dose adaptée pour maintenir chez le patient une concentration plasmatique en ESM-1 comprise entre 10 ng/mL de plasma et 20 ng/mL de plasma

[0044] En effet, il a été démontré de façon surprenante que le traitement de SDRA selon l'invention était sensiblement plus efficace lorsque la concentration plasmatique en ESM-1 chez le patient traité dépasse les taux physiologiques.

[0045] Avantageusement, le traitement selon l'invention a une ou plusieurs des propriétés suivantes :

- il permet de diminuer le nombre de leucocytes, le nombre de neutrophiles et/ou le nombre de macrophages recrutés au niveau alvéolaire
- il entraine une amélioration des paramètres de l'oxygénation sanguine
- il limite les altérations histologiques pulmonaires.

[0046] En traitant le SDRA ou en prévenant sa survenue, le traitement selon l'invention permet notamment de réduire la durée du séjour du patient à l'hôpital, par exemple en réanimation, et/ou la mortalité.

[0047] Test compagnon

[0048] La Demanderesse a montré que l'ESM-1 est un excellent biomarqueur capable d'informer sur l'état inflammatoire du poumon profond. Le profil pulmonaire associé à ESM-1 a été largement étudié dans le cadre des pneumonies nosocomiales et du sepsis sur près de 2500 patients de réanimation de par le monde [3]. Il a été montré qu'une élévation précoce des taux sanguins d'ESM-1 prédit la survenue quelques jours plus tard d'une pneumonie post-opératoire ou acquise sous ventilation mécanique. Mais un retard d'élévation d'ESM-1 dans le cadre des états septiques graves prédit aussi la survenue d'un SDRA 1-3 jours plus tard [4-8]. Plus les taux sont bas, plus la valeur prédictive positive (PPV) est élevée, au point que des taux sanguins d'ESM-1 inférieurs à 2,5 ng/mL de sang sont associés à une PPV de 100%, c'est-à-dire qu'à ce niveau d'ESM-1, on est sûr qu'un SDRA surviendra chez le patient [6]. Ces données cliniques montrent qu'à la fois des valeurs seuils diagnostiques et le profil cinétique d'ESM-1 contribuent à préciser l'état inflammatoire du poumon profond.

[0049] Ainsi, dans un mode de réalisation tout particulier, la méthode selon l'invention comprend les étapes consistant à :

(a) mesurer la quantité d'ESM-1 dans un échantillon de sang du patient,

(b) administrer au patient l'ESM-1 ou la composition en contenant lorsque la quantité d'ESM-1 mesurée à l'étape (a) est inférieure à une valeur de référence.

[0050] L'échantillon de sang dans lequel la quantité d'ESM-1 est mesurée peut être le sang total, le sérum ou le plasma.

[0051] L'étape a) ne se limite pas à une méthode particulière pour mesurer la quantité

d'ESM-1 dans l'échantillon de sang. La quantité d'ESM-1 dans un échantillon de sang peut être mesurée par n'importe quelle méthode permettant de mesurer la quantité d'une protéine dans un échantillon de sang. Il peut par exemple s'agir d'une méthode de détection directe ou indirecte.

[0052] Une fois que l'échantillon sanguin du patient est préparé, la concentration d'ESM-1 peut être mesurée par n'importe quel procédé connu dans l'art. Par exemple, la concentration d'ESM-1 peut être mesurée en utilisant des techniques électrophorétiques et immunodiagnostiques standard, y compris des dosages immunologiques tels que des dosages de type compétition, réaction directe ou sandwich. De tels tests comprennent, mais sans s'y limiter, les Western Blot, les tests d'agglutination, les dosages immunoenzymatiques, tel que l'ELISA, les dosages de type biotine/avidine, les radio-immunoessais, l'immunoélectrophorèse, l'immunoprécipitation, la chromatographie liquide haute performance (FIPLC), la chromatographie d'exclusion stérique, l'affinité en phase solide, etc.

[0053] Dans un mode de réalisation particulier, de tels procédés comprennent la mise en contact de l'échantillon de sang avec un partenaire de liaison capable d'interagir sélectivement avec l'ESM-1 présent dans l'échantillon de sang. Le partenaire de liaison peut être généralement un anticorps qui peut être polyclonal ou monoclonal, de préférence monoclonal. Des anticorps polyclonaux dirigés contre l'ESM-1 peuvent être produits selon des procédés connus en administrant l'antigène ou l'épitope approprié à un animal hôte choisi, par exemple, parmi les porcs, les vaches, les chevaux, les lapins, les chèvres, les moutons et les souris, entre autres. Divers adjuvants connus dans l'art peuvent être utilisés pour augmenter la production d'anticorps. Bien que les anticorps utiles dans la mise en pratique de l'invention puissent être polyclonaux, les anticorps monoclonaux sont préférés. Les anticorps monoclonaux contre l'ESM-1 peuvent être préparés et isolés en utilisant toute technique qui permet la production d'anticorps par des lignées cellulaires continues en culture. Les techniques de production et d'isolement comprennent, mais sans s'y limiter, la technique d'hybridome. En variante, les techniques décrites pour la production d'anticorps monocaténaires (voir par exemple le brevet US n°4 946 778) peuvent être adaptées pour produire des anticorps monocaténaires anti-ESM-1. Les anticorps utiles dans la mise en pratique de la présente invention comprennent également des fragments anti-ESM-1 comprenant, mais sans s'y limiter, des fragments F(ab') 2, qui peuvent être générés par digestion à la pepsine d'une molécule d'anticorps intacte, et des fragments Fab, qui peuvent être générés par réduction des ponts disulfure des fragments F(ab') 2. En variante, des bibliothèques d'expression Fab et/ou scFv peuvent être construites pour permettre une identification rapide de fragments ayant la spécificité souhaitée pour l'ESM-1. Par exemple, la présentation sur phage d'anticorps peut être utilisée.

[0054] Plusieurs techniques permettant de mesurer la quantité d'ESM-1 sont décrites dans la littérature. Par exemple, l'utilisation d'anticorps monoclonaux pour détecter la protéine ESM-1 est décrite dans la demande de brevet français publiée sous le n°2775691 et dans la référence [1]. Ces anticorps monoclonaux ont été préparés par immunisation de souris avec un antigène constitué de la séquence allant de l'acide aminé en position 79 jusqu'à l'acide aminé en position 184 de la protéine ESM-1 qui a été fusionnée à la protéine GST (glutathione-S-transferase). Trois familles d'anticorps monoclonaux avaient été caractérisées, ces familles d'anticorps se fixant respectivement sur les déterminants antigéniques AgD1 79P-99C (anticorps MEP 01, MEP 06 et MEP 21), AgD2 119 S139V (anticorps MEP 08 et MEP13) et AgD3 159G-184R (anticorps MEP 04, MEP 14 et MEP19).

[0055] La référence [1] décrit la mise au point d'un test immunoenzymatique du type sandwich mettant en œuvre les anticorps monoclonaux MEP 19 et MEP 21 pour mesurer la quantité d'ESM-1 dans un échantillon. Ce test a permis aux auteurs de montrer une forte production de protéine ESM-1 dans le sérum de patients hospitalisés pour un choc septique. Le test de détection utilisant les anticorps MEP 19 et MEP 21 permet de détecter une concentration de protéine ESM-1 supérieure à 4 nanogrammes (ng) par millilitre de plasma.

[0056] Un autre test permettant de mesurer la quantité d'ESM-1 dans un échantillon est décrit dans la demande de brevet internationale publiée sous le numéro WO0239123. Cette demande de brevet décrit notamment une trousse de détection comprenant un premier anticorps se fixant spécifiquement sur la région N-terminale comprise entre l'acide aminé en position 1 et l'acide aminé en position 78 de la séquence en acides aminés de la protéine ESM-1, et un second anticorps se fixant spécifiquement sur la région C terminale comprise entre l'acide aminé en position 79 et l'acide aminé en position 184 de la séquence en acides aminés de la protéine ESM-1.

[0057] Un test permettant de mesurer la quantité d'ESM-1 dans un échantillon est également commercialisé par la société Biothélis sous la référence EndoMark® H1A (EMH1A). Ce test est un immunoessai de type sandwich qui permet de mesurer la quantité d'ESM-1 dans le plasma humain.

[0058] Dans le cadre de la présente invention, la quantité d'ESM-1 mesurée est généralement exprimée en ng/mL de plasma. Cette valeur peut alors être comparée à une valeur de référence.

[0059] La comparaison de la quantité d'ESM-1 avec une valeur de référence indique si ledit patient présente un risque de développer un SDRA. Typiquement, une quantité inférieure à la valeur de référence prédit la survenue d'une SDRA chez le patient. Dans le cadre de la présente invention, de préférence, la valeur de référence va de 2,5 ng/mL de sang à 5 ng/mL de sang, de préférence la valeur de référence est égale à 5 ng/mL de

sang.

[0060] La mesure de la quantité d'ESM-1 dans un échantillon de sang du patient et la comparaison à la valeur de référence permet également de déterminer la quantité d'ESM-1 administrée au patient, par exemple une quantité suffisante pour restaurer une quantité d'ESM-1 supérieure à la valeur de référence.

[0061] Ainsi, les étapes (a) et (b) peuvent être répétées plusieurs fois si nécessaire jusqu'à ce que la quantité d'ESM-1 mesurée à l'étape a) soit supérieure à la valeur de référence. Les étapes (a) et (b) peuvent également être répétées plusieurs fois jusqu'à ce que la quantité d'ESM-1 mesurée à l'étape a) se maintienne à un niveau supérieur à la valeur de référence.

[0062] Dans un mode de réalisation particulier, les étapes (a) et (b) sont répétées pendant 5 jours à 10 jours, par exemple tous les jours pendant 5 jours à 10 jours. Cela permet de suivre la quantité d'ESM-1 chez le patient au cours du temps et d'ajuster la quantité d'ESM-1 qui est administrée au patient pendant la période considérée.

Brève description des dessins

[0063] [Fig.1] illustre les protocoles expérimentaux mis en œuvre dans les exemples. Le premier protocole (A) a été réalisé pour étudier les différences des paramètres inflammatoires entre des souris WT et des souris Esm1$^{-/-}$, en réponse à une inflammation aigue pulmonaire induite par LPS. Une instillation intra-trachéale de LPS a été réalisée à J0, des évaluations cliniques avec mesures non-invasives de l'oxymétrie ont été réalisées quotidiennement, et les souris ont été sacrifiées à différents temps pour déterminer l'évolution des paramètres inflammatoires en fonction du temps. Le second protocole (B) a été réalisé pour étudier l'effet d'une administration continue d'endocan murin par des osmopompes chez des souris Esm1$^{-/-}$. Les osmopompes ont administré en continu soit de l'endocan soit du PBS et ont été implantées en sous-cutanée un jour avant l'instillation intra trachéale de LPS. Des évaluations cliniques et des mesures non-invasives de l'oxymétrie ont été réalisées quotidiennement, les souris ont été sacrifiées à J5 pour évaluer les paramètres de l'inflammation pulmonaire. LPS : Lipopolysaccharides, i.t. : instillation intra trachéale..

[0064] [Fig.2] représente les résultats qui montrent que la présence d'endocan endogène module la réponse inflammatoire et améliore la dysfonction physiologique pulmonaire. Réponse inflammatoire, à différents temps, au décours d'une instillation trachéale de LPS, chez les souris WT (hachuré noir et blanc) et Esm1-/- (blanc). L'évolution des concentrations sériques au cours du temps d'endocan endogène est présentée en (A). Les résultats des analyses des LBA sont présentés en nombres absolus de cellules (cellules.mL^{-1}) pour les leucocytes en (B), pour les polynucléaires neutrophiles en (C) et pour les macrophages en (D). Les concentrations de mMPO des LBA sont

présentées en (E), les concentrations de $_{m}$TNFα des LBA en (F), et celle des protéines dans le LBA en (G). L'évolution de l'oxymétrie transcutanée à différents temps est représentée en (H). Les données sont présentées avec leurs médianes, et leurs 25^{e} et 75^{e} percentiles. Δ représente le résultat du test de l'effet du groupe par le modèle linéaire mixte. Φ est le résultat du test de Kruskal-Wallis test. * représente un $p < 0.05$ comme résultat du test de Mann Whitney entre les variables de chaque groupe à un temps spécifique.

[0065] [Fig.3] représente les résultats qui montrent que l'administration continue d'endocan chez les souris Esm1$^{-/-}$ réduit la réponse inflammatoire et améliore la dysfonction physiologique pulmonaire**.** Paramètres de la réponse inflammatoire pulmonaire estimés à J5 d'une instillation intra-trachéale de LPS, chez des souris Esm1$^{-/-}$ traitées par une administration continue sur 3 jours soit d'endocan (hachuré gris) soit de PBS (hachuré noir). Les résultats des examens des LBA sont présentés en nombres absolus avec les leucocytes en (A), les polynucléaires neutrophiles en (B) et les macrophages en (C). Les concentrations de $_{m}$MPO des LBA sont présentées en (D), les concentrations de $_{m}$ TNFα des LBA en (E) et celle des protéines dans le LBA en (F). L'évolution de l'oxymétrie transcutanée à différents temps est représentée en (G). Les données sont présentées avec leurs médianes, et leurs 25^{e} et 75^{e} percentiles. Δ représente le résultat du test de l'effet du groupe par le modèle linéaire mixte. Φ est le résultat du test de Kruskal-Wallis test. * représente un $p < 0.05$ comme résultat du test de Mann Whitney entre les variables de chaque groupe à un temps spécifique.

[0066] [Fig.4] représente des évaluations histologiques des poumons réalisées à J5 au décours d'une instillation intra-trachéale de LPS chez des souris Esm1$^{-/-}$ traitées par une administration continue sur 3 jours soit par du PBS soit par de l'endocan murin (A, 200x; B, 200x). Les figures qui montrent que l'administration continue d'endocan chez des souris Esm1$^{-/-}$diminue l'atteinte histologique de l'infection aigue pulmonaire. En A, est présenté une photographie d'une lame histologique d'une souris Esm1$^{-/-}$ traitée par une administration continue de PBS. On retrouve de nombreux infiltrats neutrophiles alvéolaires et interstitiels, des membranes hyalines et des dépôts de fibrine. En B, est présentée une photographie d'une lame histologique d'une souris Esm1$^{-/-}$ traitée par une administration continue d'endocan murin glycosylé.

[0067] [Fig.5] représente des valeurs du Lung Injury Severity Score (LISS) réalisées à J5 au décours d'une instillation intra-trachéale de LPS chez des souris Esm1$^{-/-}$ traitées par une administration continue sur 3 jours soit par du PBS soit par de l'endocan murin (A, 200x; B, 200x). Les résultats montrent que l'administration continue d'endocan chez des souris Esm1$^{-/-}$diminue l'atteinte histologique de l'infection aigue pulmonaire. L'ensemble des valeurs du LISS des deux protocoles sont présentés conjointement avec, de gauche à droite sur la figure, les souris WT, les souris Esm1$^{-/-}$, les souris Esm1

$^{-/-}$ traitées par PBS et les souris Esm1$^{-/-}$ traitées par endocan. Les données sont présentées avec leurs médianes, et leurs 25^{e} et 75^{e} percentiles. * représente un $p < 0.05$ comme résultat du test de Mann Whitney entre les variables de chaque groupe.

Exemples

[0068] **Exemple 1 : effet de l'ESM-1 murin glycosylé dans un modèle de SDRA chez la souris déficiente en ESM-1 (endocan)**

[0069] L'objectif de ce travail était d'étudier spécifiquement l'effet anti-inflammatoire de l'endocan, en s'affranchissant des interférences causées par l'endocan endogène. Par ailleurs, l'effet préemptif et/ou thérapeutique propre de l'endocan sur l'hypoxémie secondaire à un tableau de SDRA, n'ont encore jamais été investigués. Dans ce but, nous avons comparé d'une part les caractéristiques de l'atteinte inflammatoire pulmonaire et d'autre part la sévérité de l'hypoxémie et de la dysfonction pulmonaire dans un modèle d'agression pulmonaire aigue chez la souris déficiente en endocan (Esm1$^{-/-}$) et la souris sauvage (WT). Secondairement, nous avons validé ces résultats en évaluant l'effet d'une administration continue d'endocan dans un même modèle identique d'agression pulmonaire chez la souris déficiente (Esm1$^{-/-}$).

[0070] 1. **Matériels et méthodes**

[0071] *1.1 Production et purification de l'endocan murin*

[0072] L'endocan recombinant murin glycosylé a été produit, puis purifié, dans des cellules CHO transfectées comme précédemment décrit [9]. Les cellules CHO ont été mises en cultures en suspension dans un milieu sans sérum (serum-free CHO media (Gibco, Waltham, Massachusetts, USA)) et placées dans des bioréacteurs (réf. CL1000 bioreactors (réf. Z688029, Integra Biosciences, Cergy, France)) afin d'obtenir un surnageant cellulaire riche en endocan murin glycosylé. Après recueil du surnageant, l'endocan recombinant a été purifié sur une colonne échangeuse d'ions (HiTrap Q FF (réf. 17-5156-01, GE healthcare, USA)), puis sur une colonne d'affinité coatée par l'anticorps anti endocan murin MEP14, comme précédemment décrit [9]. L'endocan murin a ensuite été concentré par centrifugation en utilisant une membrane semi-perméable (Amicon® Ultra Centrifugal Filters). Une détermination de la concentration finale en endocan a été réalisée avec un kit ELISA spécifique de dosage d'endocan (réf. LIK-1101, DIYEK EndoMark M1, Biothelis, France). Chaque lot d'endocan produit a finalement été contrôlé par la technique de Western Blot pour s'assurer de la présence exclusive de la forme glycosylée, et un dosage de LPS par un test spécifique (LAL test (réf. 50-650U, Lonza, Switzerland)) a été réalisé sur chaque lot pour garantir de l'absence de LPS.

[0073] *1.2 Animaux et aspect éthiques*

[0074] Nous avons eu recours à des souris mâles C57Bl/6 Esm1-/- et WT littermate, âgées de 7 – 11 semaines et en reproductions dans notre animalerie. Le protocole de l'étude a

été approuvé par la commission d'éthique locale et toutes les expérimentations animales ont suivi les règles de bonnes pratiques éthiques (n° APAFIS#6059).

[0075] *1.3 Obtention des souris Esm1-/-*

[0076] Pour obtenir les lignées C57Bl/6 Esm1-/-, nous avons inséré des loci de reconnaissance loxP autours des exons 1 et 2 du gène murin Esm1 (Ensembl ID ENSMUSG00000042379), puis, en collaboration avec l'Institut Clinique de la Souris (Strasbourg, France), nous avons transfecté par électroporation un fragment d'ADNc porteur d'une cassette de résistance à la néomycine encadrée par des loci loxP dans des cellules souches embryoniques murines. Nous avons alors obtenu par recombinaison homologue un remplacement des exons 1 et 2 du gène Esm1 par le fragment porteur du gène de résistance à la néomycine. Nous avons ensuite sélectionné les cellules souches embryonnaires transfectée par culture dans du milieu contenant du G418, puis nous avons vérifié la délétion par technique Southern blot. Pour finir, nous avons injecté les cellules embryonnaires déficientes Esm1-/- dans des blastocystes secondairement placés dans l'utérus de souris femelles pseudo gestantes. Nous avons ensuite croisé la progéniture obtenue pour obtenir des lignées de souris déficientes homozygote en exon 1 et 2 du gène Esm1. Enfin, nous avons croisé ces souris avec d'autres souris porteuses d'une délétion Cre pour éliminer le gène de résistance à la néomycine. Pour vérifier la délétion Esm1-/-, un génotypage a été réalisé après extraction d'ADN à partir d'un prélèvement biologique, et une PCR a été réalisée avec le kit REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR kit (réf. 254-457-8, Sigma-Aldrich, USA avec les amorces suivantes : 1f (SEQ ID NO : 2 : ATGTCTATGTCAGTCTCCTC) et 1r (SEQ ID NO : 3 : CTCTTGCCAGCCTCTCTTGT) pour générer un fragment de 310 paires de bases pour l'allèle sauvage et 1f et 2r (SEQ ID NO : 4 : CTCCAAAATCCAGAAACCC) pour générer un fragment de 442 paires de bases pour l'allèles KO. Les échantillons ont ensuite été analysés sur gel d'agarose.

[0077] *1.4 Protocoles expérimentaux*

[0078] Les deux protocoles expérimentaux utilisés pour cette étude sont décrits [Fig.1]. Dans le premier protocole (Figure 1A), nous avons eu recours à des souris C57Bl/6 Esm1-/- et WT littermate obtenues comme précédemment décrit. Après avoir réalisé une instillation intratrachéale de LPS comme précisé plus loin, des évaluations cliniques et de la fonction physiologique pulmonaire ont été réalisées quotidiennement. Les souris ont été sacrifiées à différents moments spécifiquement déterminés pour obtenir une cinétique des variations des paramètres étudiés allant de J0 à J10. Dans le second protocole (Figure 1B), nous avons spécifiquement eu recourt à des souris C57Bl/6 Esm1-/-. Des osmopompes sous cutanée (réf. 1003D, Alzet, USA) préalablement remplies soit par de l'endocan recombinant murin soit par du PBS, ont été implantée en sous cutanée comme décrit ultérieurement. A J0, un prélèvement sanguin

non létal par ponction rétro orbitaire a été réalisé sur souris anesthésiée, puis, une injection intratrachéale de LPS a été réalisée selon la même méthodologie que pour le premier protocole. Un suivi identique au premier protocole a été réalisé excepté le fait que les souris ont été sacrifiées à J5 par injection intra péritonéale de pentobarbital (100 mg/kg).

[0079] *1.5 Préparation des osmopompes et implantation sous cutanée*

[0080] Nous avons eu recours à des osmopompes permettant une administration continue de la solution chargée durant 3 jours, à un débit fixe de 1 $\mu L.h^{-1}$. Chaque osmopompe de 100 µL a été remplie soit avec 200 µg d'endocan recombinant murin glycosylé (100 µl de solution d'endocan à une concentration finale de 2 $mg.mL^{-1}$), soit par 100 µL de PBS. Les osmopompes ont ensuite été immergées dans du PBS pour une durée maximale de 4 heures avant leur implantation en sous cutanée. Après avoir anesthésié les souris conformément au protocole défini plus loin, nous avons réalisé une dés-infection cutanée puis nous avons implanté les osmopompes en sous cutané. L'anesthésie générale a alors été antagonisée par injection intrapéritonéale de 5 $mg.kg^{-1}$ d'atipamezole.

[0081] *1.6 Préparation et administration du LPS pour le modèle d'agression pulmonaire*

[0082] Le LPS utilisé dans notre protocole (E. Coli O111 : B4, Sigma-Aldrich, USA) a été préparé en conditions stériles. Pour chaque souris, 10 $mg.kg^{-1}$ de LPS ont été dilués dans du PBS pour obtenir un volume final de 50 µL. Pour le protocole d'agression aigue pulmonaire induite par le LPS, les souris ont été placées sous anesthésie générale par injection intrapéritonéale de 75 $mg.kg^{-1}$ de kétamine et de 0,5 $mg.kg^{-1}$ demede-tomidine, puis, la solution contenant le LPS a été administrée par instillation intra-trachéale. L'anesthésie générale a ensuite été antagonisée comme précédemment décrit.

[0083] *1.7 Évaluation clinique quotidienne et mesure non invasive de l'oxymétrie*

[0084] Dans chaque protocole, un examen clinique quotidien des souris a été réalisé afin d'évaluer la viabilité de la souris et de mesurer son poids. Un enregistrement continu non invasif de l'oxymétrie transcutanée, du rythme cardiaque ainsi que de la fréquence respiratoire a été réalisé sur souris vigile quotidiennement par le dispositif MouseOx® Plus device (Starr Life Sciences Corp, USA). Toutes les données obtenues ont été moyennées sur une durée d'enregistrement continue durant entre 5 et 10 minutes.

[0085] *1.8 Prélèvement biologiques et bio-conservation*

[0086] Immédiatement après le sacrifice de la souris, des prélèvements sanguins et des lavages broncho-alvéolaires (LBA) ont été réalisés et les poumons ont été prélevées. Les prélèvements sanguins ont été réalisés par section des gros vaisseaux thoraciques et stockés dans des aliquotes placés à température ambiante jusqu'à coagulation complète. Au décours, les aliquotes de sang coagulés ont été centrifugés à 1500g pendant 5 minutes à température ambiante. Le sérum et le culot de centrifugation ont

alors été séparés et le sérum a été conservé à -20°C. Les LBA ont été réalisés uniquement sur le poumon droit après ligature soigneuse de la bronche souche du poumon gauche, par deux lavages successifs de 500 µL de PBS stérile, puis stockés immédiatement dans des aliquots placés dans de la glace. Les LBA ont alors été centrifugés à 1500g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant et le culot de centrifugation ont été séparés et le surnageant conservé à -20°C. Le culot de centrifugation a été suspendu à nouveau dans 1 mL de PBS et homogénéisé. Les cellules re-suspendues ont été comptées manuellement sur cellule de Thoma. 100 000 cellules ont alors été étalées sur une lame de verre grâce à un Shandon Cytospin 4 (Thermo electron corporation, USA), puis colorées par une coloration de May-Grünwald Giemsa. Le poumon gauche a été placé dans une solution d'Antigenfix® (réf. 2545826, MM FRANCE, France) pendant 4 heures, rincé par deux bains successifs de PBS, puis progressivement déshydraté par immersion successive dans des bains d'alcool ayant une concentration croissante. Les pièces de poumons ont ensuite été placées dans un bain de Diasolv® (réf. 2545839, MM FRANCE, France) pendant 30 minutes puis inclues en paraffine pendant toute une nuit.

[0087] *1.9 Comptage des cellules inflammatoire et examen histologique*

[0088] Pour chaque spot cellulaire de LBA préparé par Cytospin, un minimum de 200 cellules ont été manuellement comptées par un opérateur en aveugle du groupe expérimental de la souris étudiée. Chaque leucocyte visualisé a été catégorisé en tant que polynucléaire neutrophile, macrophage/monocyte, ou lymphocyte. Les proportions respectives et les nombres absolus de chaque type cellulaire ont été calculés. Les poumons inclus en paraffine ont été préparés pour l'analyse histologique à l'aide d'un microtome de façon à obtenir des coupes de 5 µm d'épaisseur. Les lames ont ensuite été colorées et examinées par un anatomopathologiste entrainé et en aveugle du groupe expérimental de la souris, de manière à déterminer le score Lung Injury Scoring System (LISS) comme décrit par [10].

[0089] *1.10 Détermination de la concentration en protéines totale, en mMPO, en mTNFα et en endocan dans les échantillons*

[0090] Les échantillons de sérum et de LBA ont été décongelés puis homogénéisés par agitation. La concentration en protéines des LBA a été déterminée par le kit Pierce™ BCA Protein Assay (réf. 23227, Thermo Fisher Scientific, USA). La concentration des LBA en mMPO a été déterminée par le kit mMPO DuoSet ELISA kit (réf. DY3667, R&D Systems, USA). La concentration des LBA en mTNFα a été déterminée par le kit mTNFα DuoSet ELISA (réf. DY410, R&D Systems, USA). Le dosage des taux sériques en endocan a été réalisé par le kit DIYEK M1 ELISA kit (réf. LIK-1101, Biothelis, France).

[0091] *1.11 Statistiques*

[0092] Toutes les analyses statistiques ont été réalisé avec le logiciel SPPS® 26 software (IBM, USA) pour Windows et tous les graphiques présentés avec le logiciel GraphPad Prism 6.0 software. La normalité des variables quantitatives n'a pas été retenue du fait des faibles effectifs. Un test de Mann–Whitney a été utilisé pour comparer la distribution des variables quantitatives non appariées. Pour le premier protocole, l'évaluation de l'effet du groupe expérimental de chaque souris sur les paramètres inflammatoires et l'évolution de l'oxymétrie, a été testé à l'aide d'un modèle mixe linéaire sur l'ensemble de la période étudiée de J0 à J10 en utilisant une approximation de Satterwaite. La variable « Groupe » a été considérée comme un effet fixe et la variable « Temps » comme un effet variable. Nous avons évalué l'effet du groupe expérimental de la même manière pour l'évolution de l'oxymétrie dans le second protocole. Les distributions des évaluations répétées dans le temps d'une même variable quantitative ont été testées par un test de Kruskal-Wallis. Tous les tests ont été réalisés en bilatéral avec un risque alpha fixé à 0.05.

[0093] **2. Résultats**

[0094] *2.1 L'endocan endogène murin diminue la sévérité de l'inflammation aigue pulmonaire et améliore la dysfonction physiologique pulmonaire.*

[0095] Dans notre premier modèle d'inflammation aigue pulmonaire induite par le LPS, nous avons mis en évidence que le taux sérique d'endocan variait en fonction du temps ($p < 0.001$) (Figure 2A). Les taux sériques médian d'endocan murin étaient de 2.59 $ng.mL^{-1}$ [2.39; 2.78] à J0, 0.42 [0.35; 0.68] à H12 et 2.28 [1.94; 2.57] à J10.

[0096] Nous avons observé sur l'ensemble de la période allant de J0 à J10, que les phénomènes de diapédèse leucocytaire étaient moins importants chez les souris WT que chez les souris $Esm1^{-/-}$ ($p < 0.001$) (Figure 2B). Le recrutement leucocytaire était moins important chez les souris WT à J1, J2, J4 et J5 que chez les souris $Esm1^{-/-}$ (respectivement à J1: $450x10^3$ cellules [340; 465] vs $775\ x10^3$ cellules [700; 1500] $p < 0.001$, à J2: $940\ x10^3$ cellules [870; 1140] vs $1440x10^3$ cellules [1130; 1850] $p = 0.011$, à J4: $1365x10^3$ cellules [985; 2180] vs $2280x10^3$ cellules [1520; 3010] $p = 0.03$ et à J5: $945x10^3$ cellules [690; 1160] vs $2270x10^3$ cellules [2090; 3300] $p = 0.004$) (Figure 2B). Le taux maximal de recrutement de leucocytes se situait à J3 pour les souris WT et J4 pour les souris $Esm1^{-/-}$.

[0097] Sur la même période, des résultats comparables étaient trouvés pour les polynucléaires neutrophiles avec une diminution du nombre de neutrophiles retrouvés chez les souris WT versus les souris $Esm1^{-/-}$ ($p < 0.001$) (Figure 2C). Le recrutement alvéolaire en neutrophile était moins important chez les souris WT versus $Esm1^{-/-}$ à J1, J2, J4 et J5 (respectivement à J1: $335x10^3$ cellules [278; 406] vs $696\ x10^3$ cellules [602; 1425] $p = 0.003$, à J2: $853x10^3$ cellules [689; 950] vs $1117x10^3$ cellules [1029; 1756] $p = 0.007$, à J4: $577x10^3$ cellules [195; 1765] vs $1932x10^3$ cellules [1251; 2153]

p = 0.02 et à J5: 365x10^3 cellules [198; 646] vs 1636x10^3 cellules [1407; 1698] p = 0.01) (Figure 2C). Le recrutement maximal des neutrophiles était observé à J3 pour les souris WT contre J4 pour les souris Esm1$^{-/-}$.

[0098] Sur l'ensemble de la période, nous n'avons pas mis en évidence de différence entre les groupes concernant le recrutement de macrophage (p = 0.57) (Figure 2D). Le recrutement maximal en macrophage était observé à J5 chez les souris WT (687x10^3 cellules.mL^{-1} [620; 940]) contre J6 chez les souris Esm1$^{-/-}$ (536x10^3 cellules.mL^{-1} [358; 753]).

[0099] Sur la période allant de J0 à J10, les concentrations de mMPO dans les LBA étaient moins importante chez les souris WT que chez les souris Esm1$^{-/-}$ (p < 0.001) (Figure 2E). A J5 et J6, les concentrations de mMPO dans les LBA étaient plus faible chez les souris WT comparées aux souris Esm1$^{-/-}$ (respectivement 547 µg.mL^{-1} [441; 1110] vs 1437 µg.mL^{-1} [1200; 1657] p = 0.015, et 211 µg.mL^{-1} [191; 417] vs 796 µg.mL^{-1} [512; 1070] p < 0.001). Les concentrations maximales de mMPO étaient observées à J4 pour les souris WT (1153 µg.mL^{-1} [772; 1815]) versus J5 pour les souris Esm1-/- (1437 µg.mL^{-1} [1200; 1657]).

[0100] Nous n'avons pas mis en évidence de différence entre les groupes concernant les concentrations alvéolaire en mTNFα, ou les concentrations de protéine dans le LBA (Figure 2F and 2G).

[0101] A l'aide du dispositif de mesure non invasif de l'oxymétrie et en considérant l'ensemble de la période entre J0 à J10, nous avons mis en évidence une amélioration significative de la fonction physiologique pulmonaire en faveur des souris WT (p < 0.001) (Figure 2H). Nous avons également observé des chiffres plus élevés de SpO_2 chez les souris WT à J4 et J5, comparés aux souris Esm1$^{-/-}$ (respectivement pour le groupe WT et Esm1$^{-/-}$: 84% [63; 92] vs 74% [71; 78], p = 0.035 et 81% [61; 85] vs 69% [64; 70], p = 0.017) (Figure 2H). Nous n'avons pas mis en évidence de différence concernant les fréquences cardiaque et respiratoire sur la période entre J0 et J10 (respectivement p = 0.539 and p = 0.075).

[0102] *2.2 L'administration d'endocan chez des souris Esm1$^{-/-}$ au décours d'un stimulus inflammatoire diminue l'inflammation pulmonaire et améliore la dysfonction physiologique pulmonaire*

[0103] Le second protocole a examiné les effets biologiques d'une administration continue et sous cutanée d'endocan recombinant murin, 5 jours après l'administration intratrachéale de LPS. Au moment de l'administration intratrachéale de LPS (D0), les taux sériques d'endocan observés chez les souris Esm1$^{-/-}$ traitées par endocan murin, étaient de 67.8 ng.mL^{-1} [45.9; 85.3].

[0104] A J5, on observait chez les souris Esm1$^{-/-}$ traitées par endocan une diminution significative du recrutement leucocytaire total, du recrutement en polynucléaires neu-

trophiles, ainsi que du recrutement en macrophages comparées aux souris $Esm1^{-/-}$ traitées par PBS (respectivement, $865x10^3$ cellules.mL^{-1} [640; 1130] vs $2130x10^3$ cellules [1540; 2550], p = 0.012 pour les leucocytes totaux, $638x10^3$ cellules.mL^{-1} [476; 855] vs $1489x10^3$ cellules [1285; 2146] p = 0.012 pour les neutrophiles, et $164x10^3$ cellules.mL^{-1} [141; 255] vs $404x10^3$ cellules [354; 610] p = 0.018 pour les macrophages) (Figure 3A, 3B, and 3C). Les concentrations en protéines dans les LBA étaient moins importantes dans le groupe traité par endocan (965 µg.mL^{-1} [690; 1040] vs 1417µg.mL^{-1} [1306; 1655], p = 0.05) (Figure 3F).

[0105] Nous n'avons pas mis en évidence de différence concernant les concentrations en mMPO et mTNFα entre les différents groupes (respectivement pour le groupe traité par endocan et le groupe traité par PBS 1275 µg.mL^{-1} [774; 1930] vs 1840 µg.mL^{-1} [1390; 2890] p = 0.145, et 207 pg.mL^{-1} [178; 373] vs 348 pg.mL^{-1} [183; 631] p = 0.388) (Figure 3D and 3E).

[0106] L'évaluation de la dysfonction physiologique pulmonaire est représentée sur la Figure 3G. Sur l'ensemble de la période s'étalant de J0 à J5, les souris traitées par endocan avaient des valeurs de SpO_2 plus élevées comparées aux souris traitées par PBS ($p < 0.001$). Concernant la SpO_2, nous avons observé une différence significative à J4 et J5 en faveur du groupe traité par endocan (84% [76; 89] vs 67% [65; 78], p = 0.023 à J4, et 78% [73; 90] vs 69% [63; 73], p = 0.02 à J5). Sur la même période, aucune différence n'était mise en évidence pour la fréquence cardiaque ou la fréquence respiratoire (respectivement p = 0.771 et p = 0.522).

[0107] *2.3 La supplémentation en endocan de souris $Esm1^{-/-}$ diminue les altérations histologiques induite par l'inflammation aigue pulmonaire*

[0108] Dans le premier protocole, nous n'avons pas mis en évidence de différence de valeur de LISS entre le WT et $Esm1^{-/-}$ (respectivement 0.578 [0.541; 0.680] vs 0.756 [0.530; 0.772], p = 0.699) ([Fig.5]). Dans le second protocole, une diminution significative des altérations histologiques était observée dans le groupe traité par endocan comparées au groupe traité par PBS (Figure 4A et Figure 4B), avec des valeurs de LISS moins importante dans le groupe endocan (0.571 [0.527; 0.732] vs 0.711 [0.644; 0.794] pour le groupe contrôle, p = 0.04) ([Fig.5]).

[0109] **3. Discussion**

[0110] Les tableaux de SDRA sont des entités syndromiques graves secondaires à une atteinte alvéolaire diffuse (DAD). Cette atteinte alvéolaire peut être la conséquence d'un recrutement non contrôlé des polynucléaires neutrophiles du compartiment sanguin vers le compartiment alvéolaire. (2) L'endocan, un protéoglycane excrété par l'endothélium pulmonaire surexprimé en condition inflammatoire, pourrait, en se liant à l'intégrine leucocytaire LFA-1 entrainant une limitation des mécanismes de diapédèse leucocytaire, avoir un rôle anti-migratoire sur les neutrophiles. [11]

[0111] Pour permettre de pouvoir comparer nos résultats avec les données déjà disponibles, nous avons recueilli tous les paramètres inflammatoires ainsi que réalisé les examens histologiques selon les recommandations internationales de l'American Thoracic Society traitant des mesures validées pour l'étude des inflammations aigues pulmonaires dans des modèle animaux [10]). Pour étudier spécifiquement les effets de l'endocan, toutes les souris C57Bl/6 utilisées dans cette étude étaient identiques en terme d'âge, de poids et de conditions d'élevage. La seule condition qui différait était la présence ou non d'endocan. Pour étudier de manière spécifique les effets d'une administration continue d'endocan, nous avons choisi d'avoir recours à des osmopompes sous cutanées permettant une administration de traitement continue et à débit constant sur une durée totale de 3 jours. Nous avons ensuite sacrifié les souris à J5, au regard des résultats acquis lors du premier protocole réalisé. Pour l'administration d'endocan, nous avons eu recours uniquement à la forme glycosylée de l'endocan murin. Pour s'assurer de la pureté de la forme glycosylée et de l'absence de contaminant, des étapes de qualification ont été réalisé de manière systématique comme décrit précédemment.

[0112] Les résultats du premier protocole ont mis en évidence que la présence d'endocan endogène (souris WT) diminue la sévérité de l'atteinte inflammatoire pulmonaire induite par le LPS, et améliore la dysfonction physiologique pulmonaire (SpO_2 supérieur dans le groupe WT) ([Fig.2]). Au décours de l'injection intra-trachéale de LPS, nous avons observé à J1 une importante diminution des taux sériques d'endocan endogène. Au-delà d'une diminution de l'ensemble des paramètres inflammatoires, la présence d'endocan endogène (souris WT) a aussi entrainé une résolution plus précoce de la réaction inflammatoire ([Fig.2]). Nous n'avons toutefois pas mis en évidence de différence concernant les valeurs du LISS entre les groupes WT et $Esm1^{-/-}$ ([Fig.4]).

[0113] Dans notre second protocole, l'administration continue d'endocan glycosylé murin chez des souris $Esm1^{-/-}$ au décours d'une instillation intra-trachéale de LPS, a d'une part diminué les paramètres de l'inflammation pulmonaire et d'autre part amélioré la dysfonction physiologique pulmonaire. Nous avons vérifié par des dosages sériques que lors de l'administration continue d'endocan il existait bien de l'endocan circulant. Les résultats montrent des taux circulants d'endocan murin glycosylé se situant entre 60 et 70 ng/ml. Sur l'ensemble de la période entre J0 et J5, le traitement par endocan a entrainé une diminution significative du nombre de leucocytes, du nombre de neutrophiles et de macrophages recrutés au niveau alvéolaire, mais aussi a entrainé une amélioration des paramètres de l'oxygénation sanguine ([Fig.3]). Enfin, l'administration continue d'endocan chez les souris $Esm1^{-/-}$ a limité les altérations histologiques pulmonaires représentées par les valeurs de LISS ([Fig.5]).

[0114] Au total, toutes ces valeurs confirment que la présence d'endocan (endogène ou exogène) peut, en réponse à un stimulus inflammatoire, non seulement diminuer

l'importance de l'inflammation aigue pulmonaire mais aussi améliorer la défaillance physiologique pulmonaire. Par ailleurs, nous avons observé un effet dose avec une réponse plus importante si la concentration sérique en endocan dépasse les taux physiologiques (second protocole).

[0115] Grâce à l'administration continue d'endocan, nous avons pu restaurer des taux circulant important d'endocan permettant d'étudier et de mettre en évidence son action physiologique propre.

[0116] Cette étude montre pour la première fois l'efficacité de l'endocan glycosylé dans un modèle d'inflammation aigue pulmonaire induite par LPS.

[0117] Nous avons étudié l'effet de la forme endogène de l'endocan ainsi que l'effet d'une administration continue d'endocan permettant d'obtenir des concentrations sériques supra physiologiques. Des expérimentations préliminaires avaient montré que des taux sériques élevés en endocan ne pouvaient être atteint et maintenus pendant plusieurs heures au décours d'une injection intra-péritonéale unique en endocan (données non publiées). De façon à mieux étudier l'effet de l'administration d'endocan, une administration par perfusion continue semble donc à privilégier.

[0118] En conclusion, les résultats ont montré qu'au décours d'un stimulus inflammatoire aigu pulmonaire par instillation intra-trachéale de LPS chez la souris C56Bl/6, la perfusion continue d'endocan chez des souris $Esm1^{-/-}$ permet de diminuer significativement l'inflammation pulmonaire et améliorer la dysfonction physiologique pulmonaire.

[0119] Ces résultats confirment que l'endocan glycosylé constitue une solution thérapeutique efficace pour traiter les SDRA.

Références

[0120] [1] Bechard D et al (2001), *Endocan is a novel chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan that promotes hepatocyte growth factor/scatter factor mitogenic activity*. J Biol Chem 276:48341–48349.

[0121] [2] Sarrazin et al (2010), *Characterization and binding activity of the chondroitin/dermatan sulfate chain from Endocan, a soluble endothelial proteoglycan*. Glycobiology vol. 20 no. 11 pp. 1380–1388.

[0122] [3] De Freitas Caires N et al (2018), *Endocan, sepsis, pneumonia, and acute respiratory distress syndrome*. Crit Care Lond Engl 22:280.

[0123] [4] Mikkelsen ME et al (2012), *Lower serum endocan levels are associated with the development of acute lung injury after major trauma*. J Crit Care 27:522.e11–17.

[0124] [5] Palud A et al (2015), *Evaluation of endothelial biomarkers as predictors of organ failures in septic shock patients*. Cytokine 73:213–218.

[0125] [6] Gaudet A et al (2018), *Low endocan levels are predictive of Acute Respiratory*

Distress Syndrome in severe sepsis and septic shock. J Crit Care 47:121–126.

[0126] [7] Ioakeimidou A et al (2017), *Increase of circulating endocan over sepsis follow-up is associated with progression into organ dysfunction*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.

[0127] [8] Gaudet A et al (2019), *The complex kinetics of blood endocan during the time course of sepsis and acute respiratory distress syndrome*. Crit Care Lond Engl 23:86.

[0128] [9] Depontieu F et al (2012), *Development of monoclonal antibodies and ELISA specific for the mouse vascular endocan*. J Immunol Methods. avr 2012;378(1 2):88 94.

[0129] [10] Matute-Bello G et al (2011), *An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals*. Am J Respir Cell Mol Biol. mai 2011;44(5):725 38.

[0130] [11] Gaudet A et al (2020), *Cleaved endocan acts as a biologic competitor of endocan in the control of ICAM-1-dependent leukocyte diapedesis*. J Leukoc Biol. mai 2020;107(5):833 41.

Revendications

[Revendication 1] ESM-1 (Endothelial cell Specific Molecule) ou composition pharmaceutique en contenant pour utilisation dans une méthode de prévention d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) chez un patient dont la quantité d'ESM-1 dans le plasma est inférieure à une valeur de référence, dans laquelle la valeur de référence va de 2,5 ng/mL de plasma à 5 ng/mL de plasma.

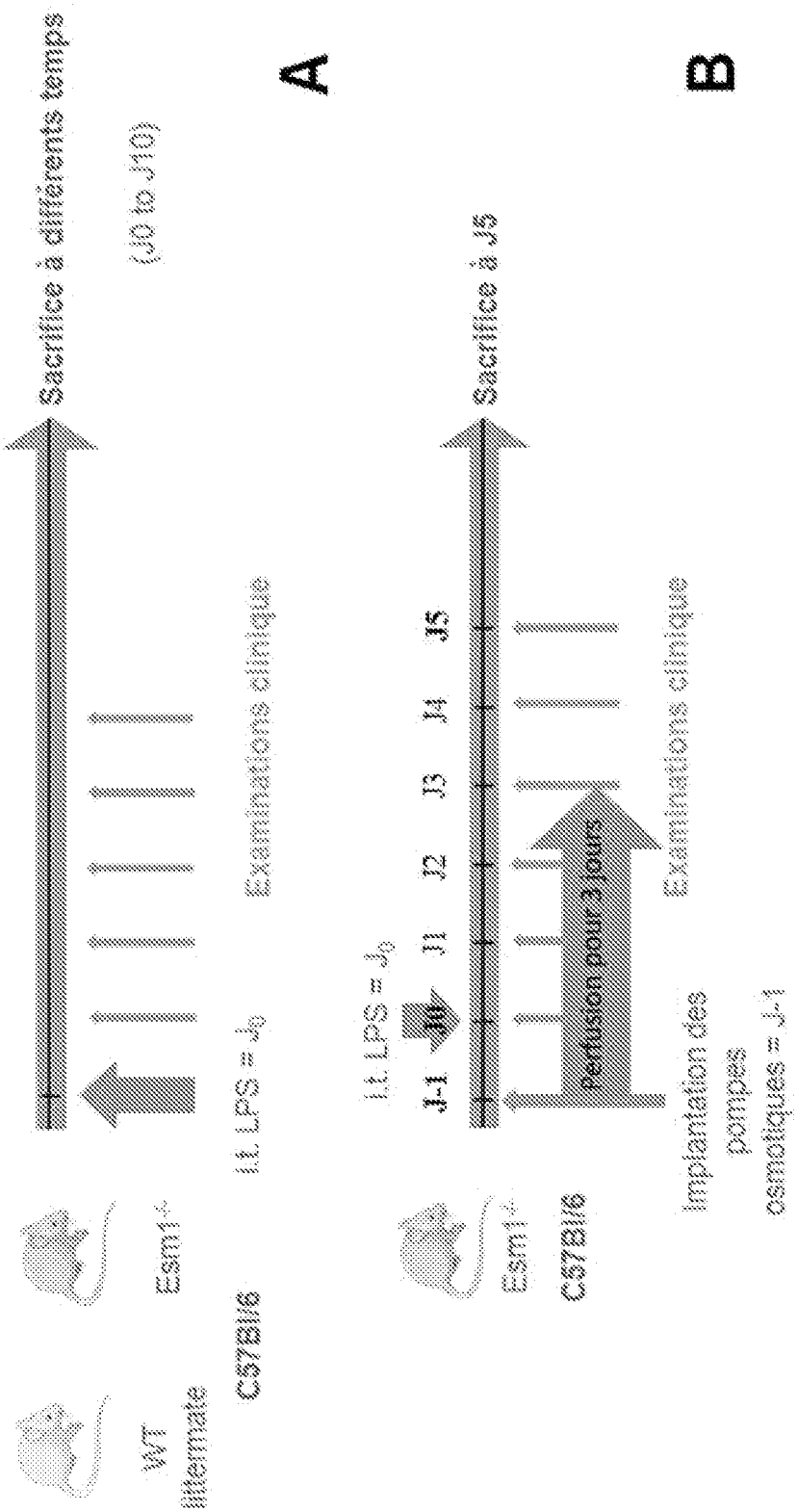
[Revendication 2] ESM-1 ou composition pharmaceutique en contenant pour utilisation dans une méthode selon la revendication 1, dans laquelle le patient est atteint d'une pathologie choisie parmi (i) une infection respiratoire d'origine bactérienne ou virale, telle que la COVID-19, (ii) une dysplasie bronchopulmonaire, (iii) une septicémie, et (iv) un polytraumatisme nécessitant une prise en charge du patient en réanimation.

[Revendication 3] ESM-1 ou composition pharmaceutique en contenant pour utilisation dans une méthode selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, dans laquelle le patient est atteint d'une infection respiratoire d'origine bactérienne ou virale.

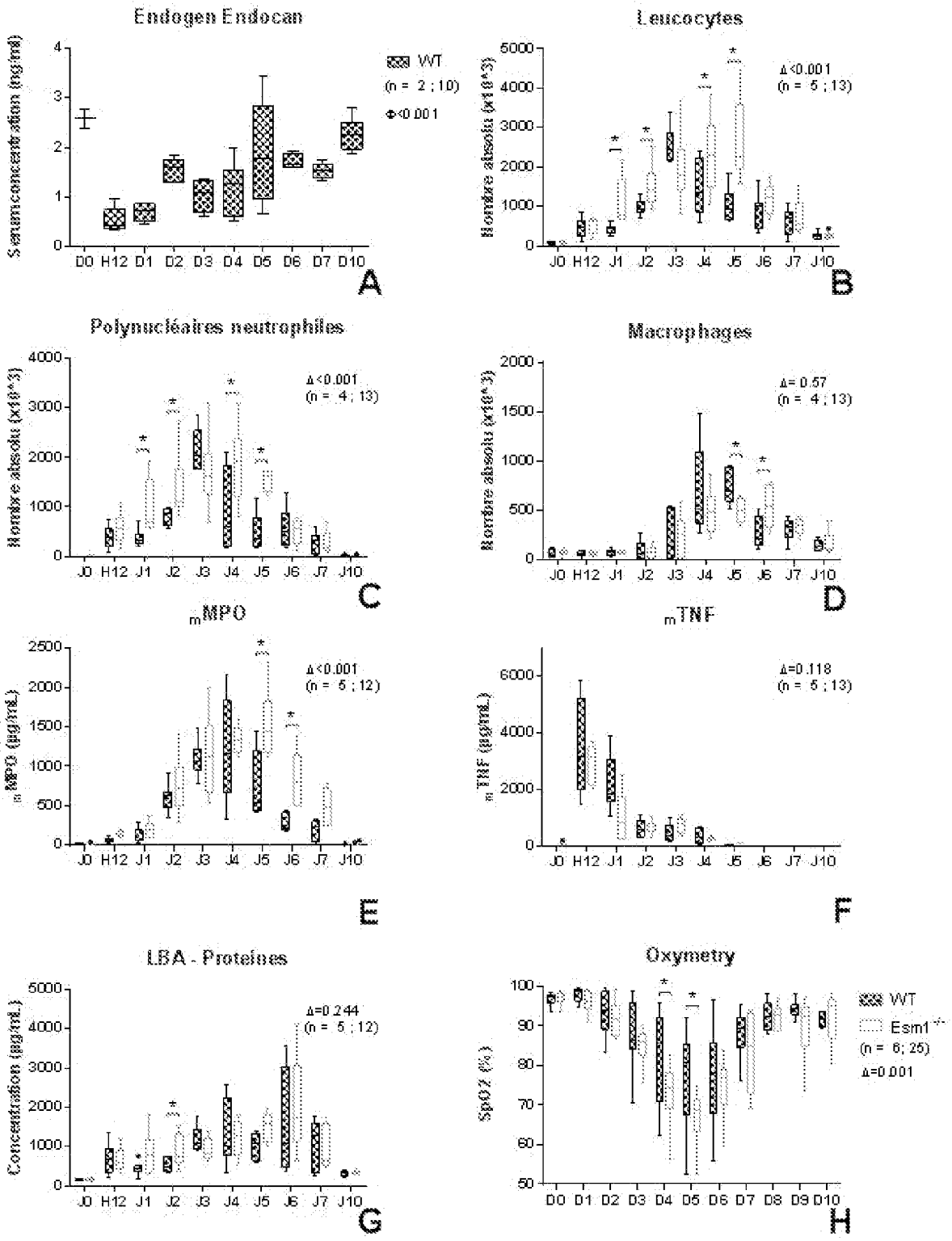
[Revendication 4] ESM-1 ou composition pharmaceutique en contenant pour utilisation dans une méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans laquelle le patient est atteint de la COVID-19.

[Revendication 5] ESM-1 ou composition pharmaceutique en contenant pour utilisation dans une méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans laquelle l'ESM-1 formulé pour une administration par voie parentérale, telle que par voie intraveineuse, par voie intramusculaire ou par voie sous-cutanée.

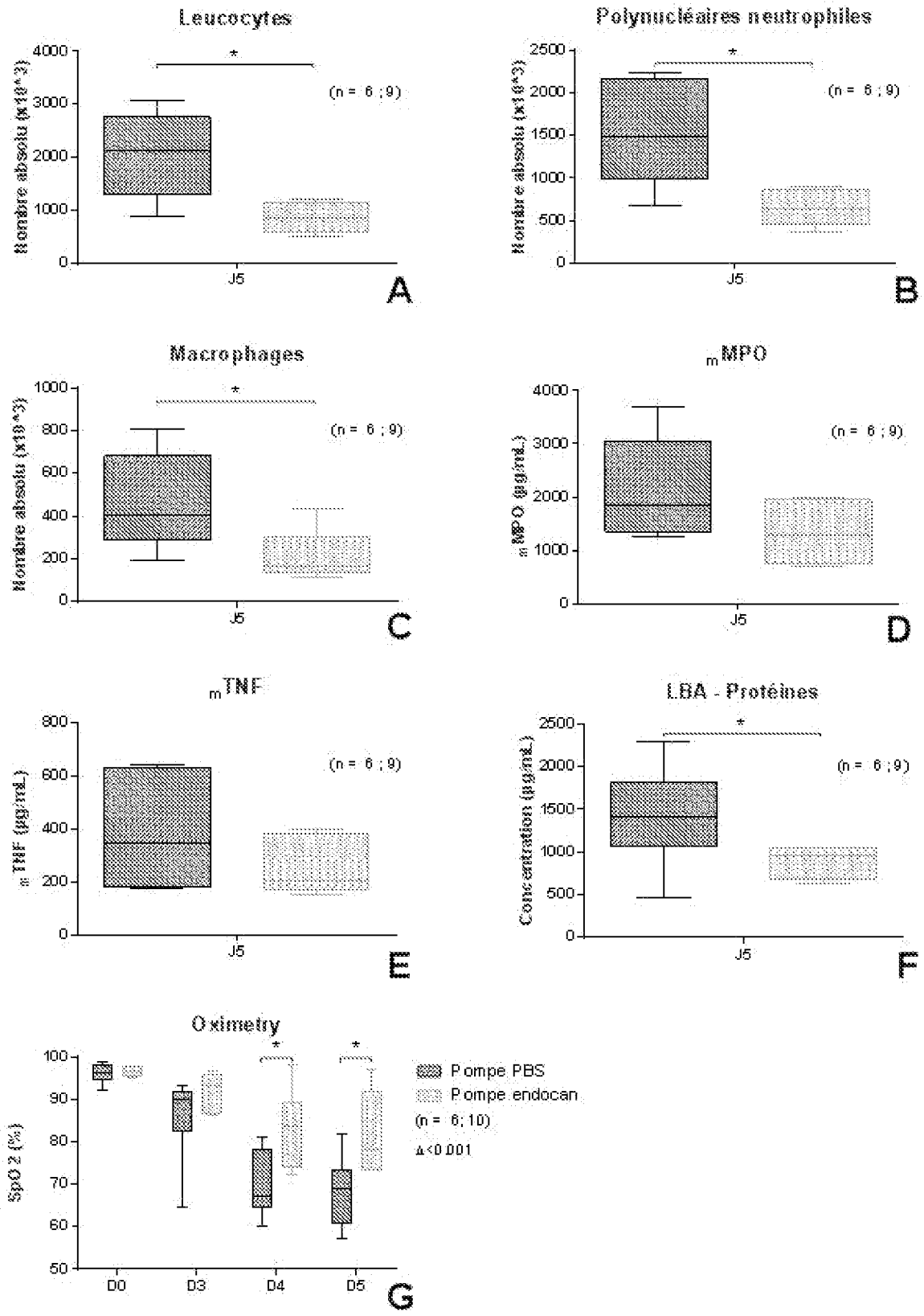
[Fig. 1]


A
Sacrifice à différents temps
(J0 to J10)
WT
littermate
Esm1-/-
C57Bl/6
i.t. LPS = J0
Examinations clinique
B
i.t. LPS = J0
J-1
J0
J1
J2
J3
J4
J5
Sacrifice à J5
Esm1-/-
C57Bl/6
Perfusion pour 3 jours
Implantation des pompes osmotiques = J-1
Examinations clinique

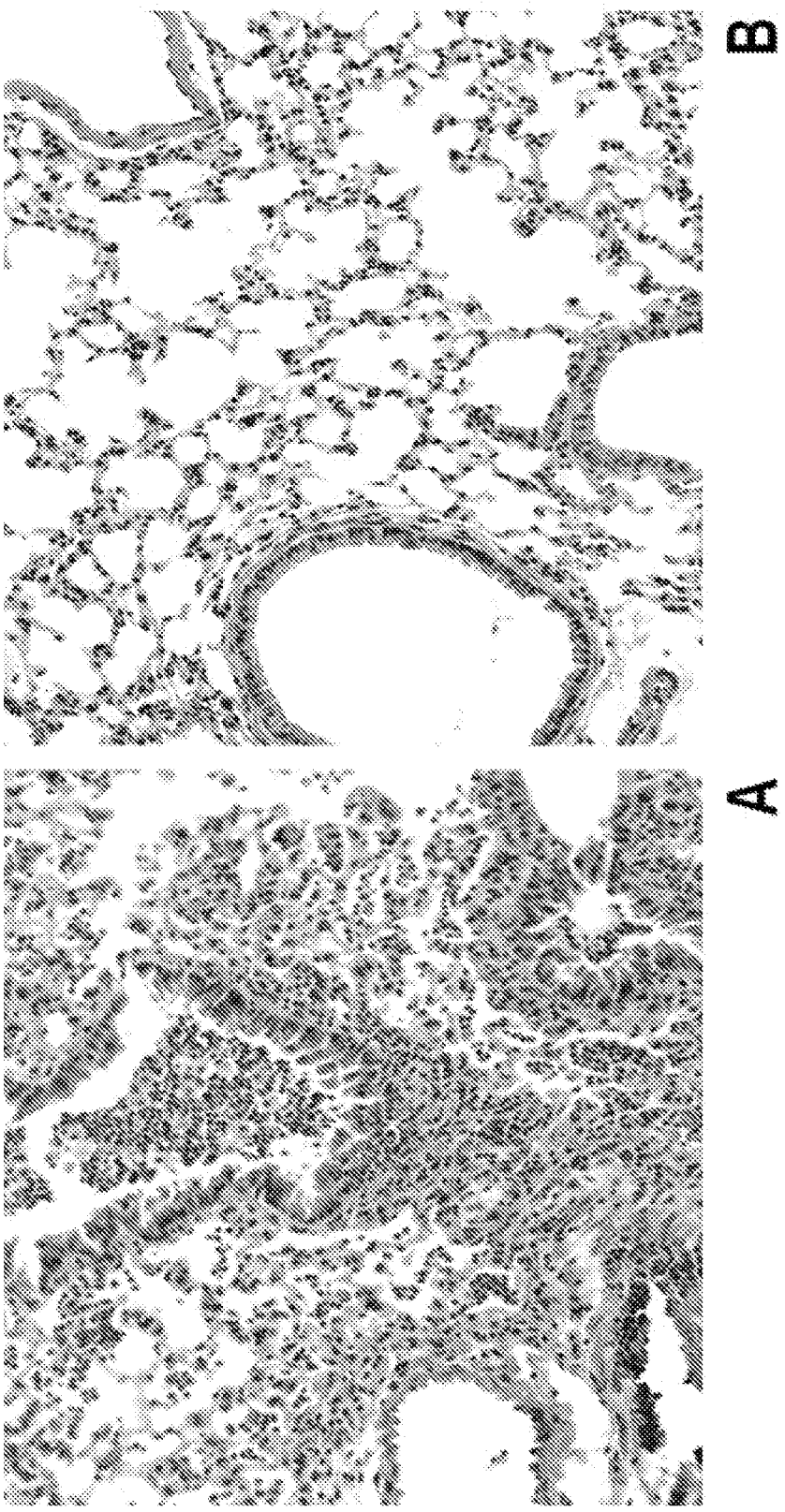
[Fig. 2]


Endogen Endocan
Semiconcentration (ng/ml)
WT
(n = 2 ; 10)
Φ<0.001
D0 H12 D1 D2 D3 D4 D5 D6 D7 D10
A
Leucocytes
Nombre absolu (x10^3)
Δ<0.001
(n = 5 ; 13)
J0 H12 J1 J2 J3 J4 J5 J6 J7 J10
B
Polynucléaires neutrophiles
Nombre absolu (x10^3)
Δ<0.001
(n = 4 ; 13)
C
Macrophages
Nombre absolu (x10^3)
Δ= 0.57
(n = 4 ; 13)
D
mMPO
mMPO (pg/mL)
Δ<0.001
(n = 5 ; 12)
E
mTNF
mTNF (pg/mL)
Δ=0.118
(n = 5 ; 13)
F
LBA - Protéines
Concentration (pg/mL)
Δ=0.244
(n = 5 ; 12)
G
Oxymetry
SpO2 (%)
WT
Esm1-/-
(n = 6; 25)
Δ=0.001
D0 D1 D2 D3 D4 D5 D6 D7 D8 D9 D10
H

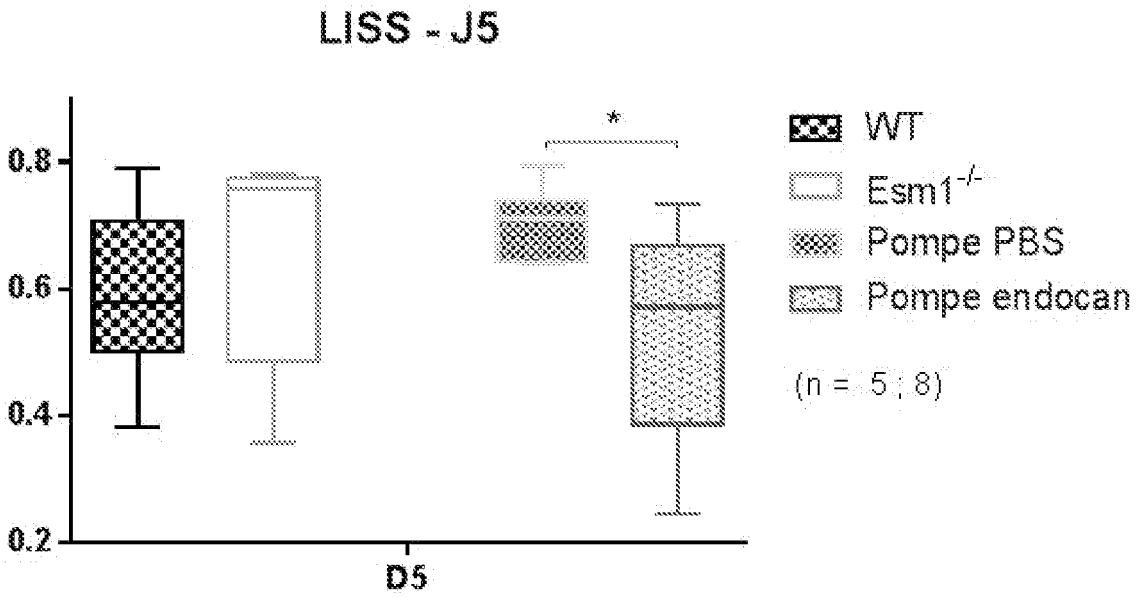
[Fig. 3]


Leucocytes
Nombre absolu (x10^3)
(n = 6 ; 9)
J5
A
Polynucléaires neutrophiles
Nombre absolu (x10^3)
(n = 6 ; 9)
J5
B
Macrophages
Nombre absolu (x10^3)
(n = 6 ; 9)
J5
C
mMPO
mMPO (pg/mL)
(n = 6 ; 9)
J5
D
mTNF
mTNF (pg/mL)
(n = 6 ; 9)
J5
E
LBA - Protéines
Concentration (pg/mL)
(n = 6 ; 9)
J5
F
Oximetry
SpO 2 (%)
D0
D3
D4
D5
Pompe PBS
Pompe endocan
(n = 6; 10)
Δ<0.001
G

[Fig. 4]



[Fig. 5]



Sequence de nucléotide

SEQUENCE LISTING

<110> BIOTHELIS
INSERM

<120> Traitement dâun syndrome de dÃ©tresse respiratoire aiguÃ« (SDRA) chez un patient

<130> 1H327200 0001 FR BN

<160> 4

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1
<211> 184
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1
Met Lys Ser Val Leu Leu Leu Thr Thr Leu Leu Val Pro Ala His Leu
1 5 10 15
Val Ala Ala Trp Ser Asn Asn Tyr Ala Val Asp Cys Pro Gln His Cys
20 25 30
Asp Ser Ser Glu Cys Lys Ser Ser Pro Arg Cys Lys Arg Thr Val Leu
35 40 45
Asp Asp Cys Gly Cys Cys Arg Val Cys Ala Ala Gly Arg Gly Glu Thr
50 55 60
Cys Tyr Arg Thr Val Ser Gly Met Asp Gly Met Lys Cys Gly Pro Gly
65 70 75 80
Leu Arg Cys Gln Pro Ser Asn Gly Glu Asp Pro Phe Gly Glu Glu Phe
85 90 95
Gly Ile Cys Lys Asp Cys Pro Tyr Gly Thr Phe Gly Met Asp Cys Arg
100 105 110
Glu Thr Cys Asn Cys Gln Ser Gly Ile Cys Asp Arg Gly Thr Gly Lys
115 120 125
Cys Leu Lys Phe Pro Phe Phe Gln Tyr Ser Val Thr Lys Ser Ser Asn
130 135 140
Arg Phe Val Ser Leu Thr Glu His Asp Met Ala Ser Gly Asp Gly Asn
145 150 155 160
Ile Val Arg Glu Glu Val Val Lys Glu Asn Ala Ala Gly Ser Pro Val
165 170 175
Met Arg Lys Trp Leu Asn Pro Arg
180

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce PCR 1f

<400> 2
atgtctatgt cagtctcctc 20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce PCR 1r

<400> 3
ctcttgccag cctctcttgt 20

<210> 4
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce PCR 2r

<400> 4
ctccaaaatc cagaaaccc 19

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveauté) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.
Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

[x] Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

☐ Le demandeur a maintenu les revendications.

[x] Le demandeur a modifié les revendications.

☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

[x] Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

☐ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

ZHANG XIAOLONG ET AL: "A novel role of endocan in alleviating LPS-induced acute lung injury",
LIFE SCIENCE, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB,
vol. 202, 5 avril 2018 (2018-04-05), pages 89-97, XP085396597,
ISSN: 0024-3205, DOI: 10.1016/J.LFS.2018.04.005

GAUDET ALEXANDRE ET AL: "Endocan regulates acute lung inflammation through control of leukocyte diapedesis",
JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY,
vol. 127, no. 3,
1 septembre 2019 (2019-09-01), pages 668-678, XP093012214,
US
ISSN: 8750-7587, DOI: 10.1152/japplphysiol.00337.2019

DE FREITAS CAIRES NATHALIE ET AL: "Endocan, sepsis, pneumonia, and acute respiratory distress syndrome",
CRITICAL CARE,
vol. 22, no. 1,
1 décembre 2018 (2018-12-01), XP093012184,
DOI: 10.1186/s13054-018-2222-7
Extrait de l'Internet:
URL:https://link.springer.com/content/pdf/10.1186/s13054-018-2222-7.pdf?pdf=button>

LASSALLE P ET AL: "ESM-1 IS A NOVEL HUMAN ENDOTHELIAL CELL-SPECIFIC MOLECULE EXPRESSEDIN LUNG AND REGULATED BY CYTOKINES",
JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US,
vol. 271, no. 34, 1 août 1996 (1996-08-01), pages 20458-20464, XP000828449,
ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.271.34.20458

MIKKELSEN MARK E ET AL: "Lower serum endocan levels are associated with the development of acute lung injury after major trauma",
JOURNAL OF CRITICAL CARE,
vol. 27, no. 5,
1 janvier 2012 (2012-01-01), XP028974284,
ISSN: 0883-9441, DOI: 10.1016/J.JCRC.2011.07.077

GAUDET ALEXANDRE ET AL: "The complex kinetics of blood endocan during the time course of sepsis and acute respiratory distress syndrome",
CRITICAL CARE,
vol. 23, no. 1,
1 décembre 2019 (2019-12-01), XP093012206,
DOI: 10.1186/s13054-019-2383-z
Extrait de l'Internet:
URL:https://ccforum.biomedcentral.com/counter/pdf/10.1186/s13054-019-2383-z.pdf>

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

NEANT

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES

NEANT