



Office de la Propriété
Intellectuelle
du Canada

Un organisme
d'Industrie Canada

Canadian
Intellectual Property
Office

An agency of
Industry Canada

CA 2377957 C 2012/05/29

(11)(21) **2 377 957**

(12) **BREVET CANADIEN
CANADIAN PATENT**

(13) **C**

(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2000/06/30
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2001/01/11
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2012/05/29
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2001/12/21
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2000/001857
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2001/002437
(30) Priorité/Priority: 1999/07/01 (FR99/08470)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C07K 14/75* (2006.01),
A61K 38/36 (2006.01), *A61P 19/02* (2006.01),
G01N 33/53 (2006.01), *A61K 38/00* (2006.01)

(72) Inventeurs/Inventors:
SERRE, GUY, FR;
SEBBAG, MIREILLE, FR

(73) Propriétaire/Owner:
BIOMERIEUX S.A., FR

(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : DERIVES CITRULLINES DE LA FIBRINE ET LEUR UTILISATION POUR LE DIAGNOSTIC OU LE
TRAITEMENT DE LA POLYARTHRITE RHUMATOIDE

(54) Title: FIBRIN CITRULLINE DERIVATIVES AND THEIR USE FOR DIAGNOSING OR TREATING RHEUMATOID
ARTHRITIS

(57) **Abrégé/Abstract:**

L'invention concerne des polypeptides citrullinés dérivés de la fibrine utilisables notamment pour le diagnostic ou le traitement de la polyarthrite rhumatoïde.



(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
11 janvier 2001 (11.01.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/02437 A1(51) Classification internationale des brevets⁷:
C07K 14/75, A61K 38/36, A61P 19/02, G01N 33/53Guy [FR/FR]; Résidence du Lac, Appartement 46, 10,
avenue Winston Churchill, F-31100 Toulouse (FR). SEB-
BAG, Mireille [FR/FR]; 3, rue A. Frédeau, F-31500
Toulouse (FR).(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/01857

(22) Date de dépôt international: 30 juin 2000 (30.06.2000)

(74) Mandataires: VIALLE-PRESLES, Marie-José etc.;
Cabinet Ores, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).

(25) Langue de dépôt: français

(81) États désignés (*national*): CA, JP, US.

(26) Langue de publication: français

(84) États désignés (*régional*): brevet européen (AT, BE, CH,
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE).(30) Données relatives à la priorité:
99/08470 1 juillet 1999 (01.07.1999) FR(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*): UNI-
VERSITE PAUL SABATIER - TOULOUSE III
[FR/FR]; 118, route de Narbonne, F-31062 Toulouse
Cedex 4 (FR).

Publiée:

— Avec rapport de recherche internationale.

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

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): SERRE,(54) Title: FIBRIN CITRULLINE DERIVATIVES AND THEIR USE FOR DIAGNOSING OR TREATING RHEUMATOID
ARTHRITIS(54) Titre: DERIVES CITRULLINES DE LA FIBRINE ET LEUR UTILISATION POUR LE DIAGNOSTIC OU LE TRAITE-
MENT DE LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE(57) Abstract: The invention concerns citrulline polypeptide derived from fibrin useful for diagnosing or treating rheumatoid arthri-
tis.(57) Abrégé: L'invention concerne des polypeptides citrullinés dérivés de la fibrine utilisables notamment pour le diagnostic ou le
traitement de la polyarthrite rhumatoïde.

WO 01/02437 A1

**DERIVES CITRULLINES DE LA FIBRINE ET LEUR UTILISATION
POUR LE DIAGNOSTIC OU LE TRAITEMENT DE LA POLYARTHRITE
RHUMATOÏDE**

La présente invention est relative à des
5 dérivés citrullinés de fibrine, et à leurs utilisations
dans le diagnostic et le traitement de la polyarthrite
rhumatoïde.

La polyarthrite rhumatoïde (ci après abrégée
en " PR ") est le plus fréquent des rhumatismes
10 inflammatoires chroniques. Il s'agit d'une maladie auto-
immune ; le sérum des patients atteints contient des
auto-anticorps dont certains sont spécifiques, et peuvent
constituer un marqueur de cette maladie, permettant son
diagnostic même à des stades précoces.

15 Des travaux antérieurs de l'équipe des
Inventeurs ont montré que ces anticorps reconnaissaient
différentes formes moléculaires de la famille des
(pro)filaggrines (pour revue, cf. par exemple SERRE et
VINCENT, In : Autoantibodies, PETER and SHOENFELD Eds,
20 Elsevier Science Publishers, 271-276, 1996). Ces
anticorps ont pour cette raison été dénommés : « auto-
anticorps anti-filaggrine (AAF) » ;. La Demande EP
0 511 116 décrit la purification et la caractérisation
d'antigènes de la famille des filaggrines reconnus par
25 ces anticorps, et leur utilisation pour le diagnostic de
la polyarthrite rhumatoïde.

Les Inventeurs ont montré que les épitopes
reconnus par les AAF étaient portés par des régions de la
molécule de filaggrine dans lesquelles au moins une
30 partie des arginines étaient déiminées, et transformées
de la sorte en citrulline ; des peptides citrullinés
spécifiquement reconnus par les AAF ont ainsi été obtenus
à partir des principales régions immunoréactives de la
filaggrine. Ces peptides, et leur utilisation pour le
35 diagnostic de la PR font l'objet de la Demande
PCT/FR97/01541, et de la Demande PCT/FR98/02899 au nom de

BIOMERIEUX. Les observations des Inventeurs concernant le rôle de résidus citrulline dans la réactivité de la filaggrine avec les auto-anticorps spécifiques de la PR ont été ultérieurement confirmées par d'autres chercheurs [SCHELLEKENS et al., Arthritis Rheum., 40, n° 9 supplément, p. S276, résumé 1471 (1997); VISSER et al., Arthritis Rheum., 40, n° 9 supplément, p. S289, résumé 1551 (1997)].

10 Les Inventeurs ont en outre montré que les AAF représentaient une proportion importante des immunoglobulines interstitielles des tissus rhumatoïdes synoviaux et qu'ils étaient synthétisés localement par des plasmocytes spécifiques présents dans ces tissus, ce qui confirme l'hypothèse de leur implication dans la réponse auto-immune associée à la PR. L'utilisation de la filaggrine ou de peptides citrullinés dérivés de celle-ci pour neutraliser cette réponse auto-immune fait l'objet de la Demande PCT/FR98/02900 au nom de l'UNIVERSITÉ PAUL SABATIER (TOULOUSE III).

20 Toutefois, l'implication de la filaggrine comme immunogène ou comme antigène-cible dans la réponse auto-immune associée à la PR n'a jamais été constatée. Le véritable antigène impliqué dans cette réponse restait à identifier.

Les Inventeurs sont maintenant parvenus à caractériser cet antigène, et ont ainsi montré qu'il se composait de dérivés citrullinés des chaînes α et/ou β de la fibrine.

La présente invention a pour objet un polypeptide citrulliné dérivé de tout ou partie de la séquence de la chaîne α ou de la chaîne β d'une fibrine de vertébré, par substitution d'au moins un résidu arginine par un résidu citrulline.

La présente invention a pour objet un polypeptide citrulliné reconnu par des auto-anticorps anti-filaggrine spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde (PR) et dérivé de tout ou partie de la séquence de la chaîne α ou de la chaîne β d'une fibrine de vertébré, par substitution d'au moins un résidu arginine par un résidu citrulline.

De préférence, un polypeptide conforme à l'invention comprend au moins 5 acides aminés consécutifs, et avantageusement au moins 10 acides aminés consécutifs, dont au moins une citrulline, de la séquence de la chaîne α ou de la chaîne β d'une fibrine de mammifère. Avantageusement ladite fibrine de vertébré est une fibrine de mammifère, de préférence humaine.

Des polypeptides citrullinés conformes à l'invention peuvent par exemple être obtenus à partir de fibrine ou de fibrinogène naturels, recombinants, ou de synthèse, ou de fragments de ceux-ci comprenant au moins un résidu arginine, par l'action de la peptidyl arginine déiminase (PAD) ; ils peuvent également être obtenus par synthèse peptidique, en incorporant directement un ou plusieurs résidus citrulline, dans le peptide synthétisé.

Des polypeptides citrullinés conformes à l'invention peuvent également être des pseudopeptides, possédant la même structure tridimensionnelle, et donc la même réactivité immunologique que les polypeptides citrullinés dérivés des chaînes α ou β de fibrine ou de leurs fragments, mentionnés ci-dessus. Il peut s'agir par exemple de pseudopeptides de type rétro, dans lesquels des acides L-aminés sont enchaînés selon une séquence

inverse de celle du peptide à reproduire, ou bien de pseudopeptides de type rétro-inverso, constitués par des acides aminés de la série D (au lieu des acides aminés de la série L des peptides naturels) enchaînés selon une séquence inverse de celle du peptide à reproduire, ou bien encore de pseudopeptides contenant une liaison $\text{CH}_2\text{-NH}$ à la place d'une liaison peptidique CO-NH . Des pseudopeptides de ces différents types sont par exemple décrits par BENKIRANE et al. [J. Biol. Chem., 270, p. 11921-11926, (1995) ; J. Biol. Chem., 271, p. 33218-33224, (1996)] ; BRIAND et al. [J. Biol. Chem., 270, p. 20686-20691, (1995) ; GUICHARD et al. [J. Biol. Chem., 270, p. 26057-26059, (1995)]].

La présente invention a également pour objet l'utilisation des polypeptides conformes à l'invention, tels que définis ci-dessus, pour le diagnostic *in vitro*

de la PR.

La présente invention englobe en particulier des compositions antigéniques pour le diagnostic de la présence d'auto-anticorps spécifiques de la PR dans un échantillon biologique, lesquelles compositions sont caractérisées en ce qu'elles contiennent au moins un polypeptide conforme à l'invention, éventuellement marqué et/ou conjugué avec une molécule porteuse.

La présente invention englobe également une composition antigénique pour le diagnostic de la présence d'auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde dans un échantillon biologique, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un polypeptide citrulliné tel que défini précédemment et un moyen de marquage et/ou une molécule porteuse.

4a

La présente invention englobe également une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient en tant que principe actif, au moins un polypeptide citrulliné tel que défini précédemment et un excipient pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection des auto-anticorps de classe G spécifiques de la PR dans un échantillon biologique, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :

10 - la mise en contact dudit échantillon biologique avec au moins un polypeptide conforme à l'invention, tel que défini ci-dessus, dans des conditions permettant la formation d'un complexe antigène/anticorps avec les auto-anticorps spécifiques de la PR éventuellement présents ;

 - la détection, par tous moyens appropriés, du complexe antigène/anticorps éventuellement formé.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection des auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde dans un échantillon biologique, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend:

20 - la mise en contact dudit échantillon biologique avec au moins un polypeptide selon l'invention, dans des conditions permettant la formation d'un complexe antigène/anticorps avec les auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde présents;

 - la détection, par tous moyens appropriés, du complexe antigène/anticorps formé.

Ce procédé de détection peut être mis en œuvre grâce à un nécessaire comprenant au moins un polypeptide selon l'invention, tel qu'un antigène, ainsi que des tampons et réactifs appropriés pour la constitution d'un milieu réactionnel

4b

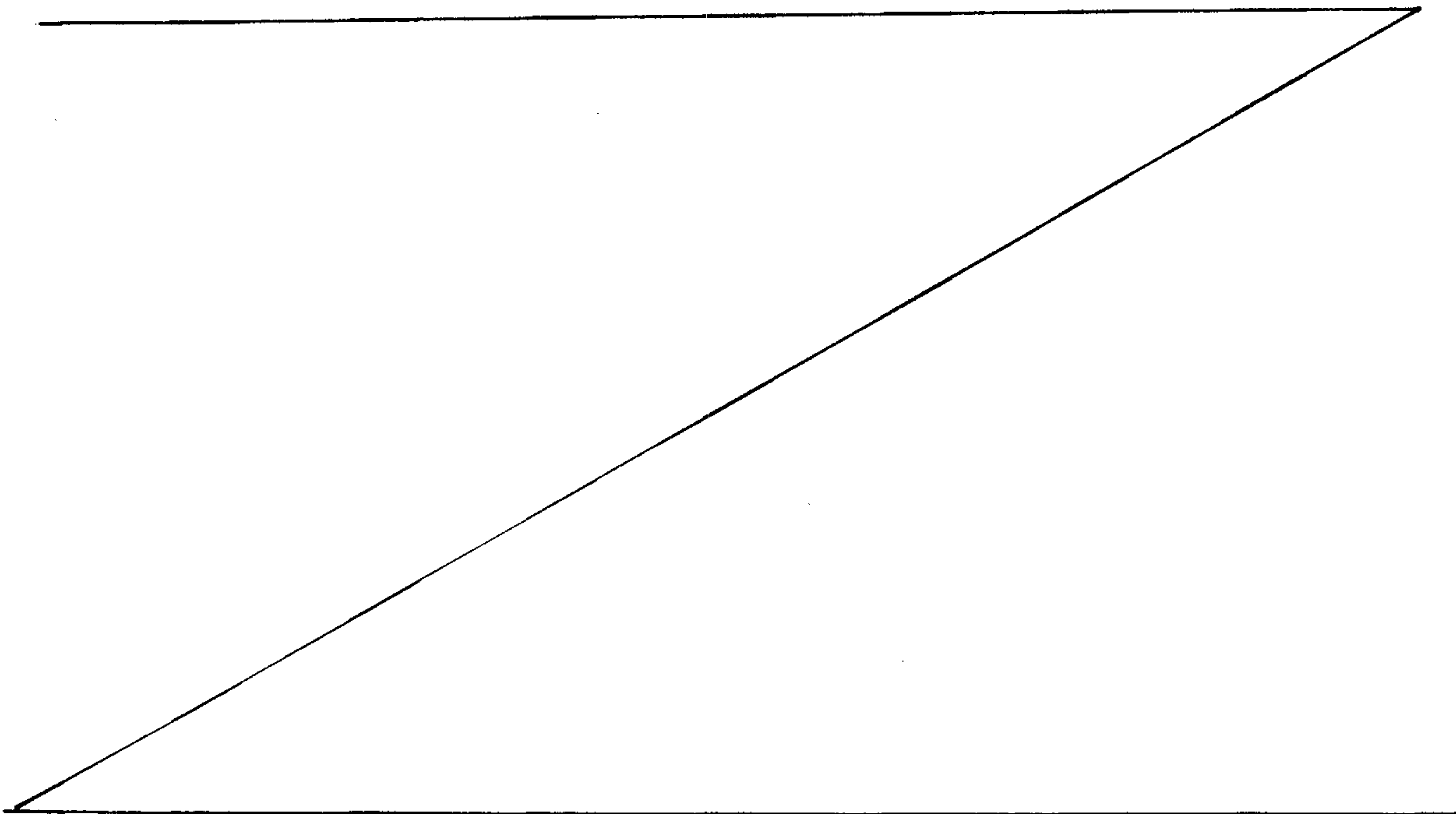
permettant la formation d'un complexe antigène/anticorps, et/ou des moyens de détection dudit complexe antigène/anticorps.

La présente invention a pour objet un nécessaire pour la détection des auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un polypeptide selon l'invention, ainsi que des tampons et réactifs appropriés pour la constitution d'un milieu réactionnel permettant la formation d'un complexe antigène/anticorps, et/ou des moyens de détection dudit complexe antigène/anticorps.

10

Ledit nécessaire peut également comprendre, le cas échéant, des échantillons de référence, tels qu'un ou plusieurs sérum(s) négatif(s) et un ou plusieurs sérum(s) positif(s).

La présente invention a aussi pour objet l'utilisation de polypeptides citrullinés conformes à l'invention pour l'obtention d'un médicament, et notamment d'un médicament destiné à neutraliser la réponse auto-immune associée à la PR, et en particulier à



inhiber la fixation des effecteurs humoraux ou cellulaires de cette réponse auto-immune avec les dérivés citrullinés de chaînes α ou β de fibrine présents dans les tissus rhumatoïdes.

5 Cette neutralisation *in vivo* de la réponse auto-immune, peut participer au traitement de la PR, ou d'autres maladies dans lesquelles interviendraient des lésions induites par une réponse auto-immune dirigée contre des épitopes présentant des réactions croisées
10 avec les dérivés citrullinés de chaînes α ou β de fibrine.

Avantageusement, pour l'administration *in vivo*, on choisira des polypeptides modifiés de manière à prolonger leur durée de vie dans l'organisme, en
15 particulier en augmentant leur résistance aux protéases ; il peut s'agir en particulier de pseudopeptides, tels que ceux mentionnés ci-dessus.

La présente invention englobe également des compositions pharmaceutiques, notamment pour le
20 traitement de la polyarthrite rhumatoïde, caractérisées en ce qu'elles contiennent en tant que principe actif, au moins un polypeptide conforme à l'invention.

Des compositions pharmaceutiques conformes à l'invention peuvent être administrées par tous moyens
25 appropriés, connus en eux-mêmes. Elles peuvent par exemple être administrées de manière systémique, par voie orale, ou par voie parentérale, en injection sous-cutanée, intraveineuse ou intramusculaire ; elles peuvent également être administrées localement, par exemple par
30 injections intra-articulaires, ou par micro-injections sous arthroscopie dans le tissu synovial inflammatoire.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à l'identification de formes déiminées de la
35 chaîne α et de la chaîne β de la fibrine humaine dans les tissus rhumatoïdes, et à l'utilisation de fibrinogène

déiminé pour la détection de la présence d'AAF dans des échantillons de sérum.

EXEMPLE 1 : PURIFICATION ET CARACTERISATION DE PROTEINES ANTIGENIQUES RECONNUES PAR LES AAF DANS LES TISSUS
5 **SYNOVIAUX RHUMATOÏDES**

1) Analyse des tissus synoviaux rhumatoïdes

Matériel et méthodes :

Les échantillons de tissu synovial utilisés pour les extractions protéiques ont été prélevés chez des
10 patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, au moment d'une synovectomie ou d'une arthroplastie du poignet ou du genou et correspondent tous à des fragments tissulaires qui sont le siège de lésions histologiques classiques de synovite rhumatoïde. Ils sont conservés par
15 congélation dans de l'isopentane refroidi par de l'azote liquide.

Des fragments de tissu synovial provenant de quatre patients ont été extraits de manière séquentielle, successivement dans un tampon de faible force ionique, un
20 tampon urée, puis un tampon urée/DTT.

Préparation des extraits synoviaux

L'extraction a été effectuée à l'aide d'un homogénéiseur Ultra-Turrax (T25 basic, IKA Labortechnik, Staufen, Germany) avec un volume de 6 ml de tampon par
25 gramme de tissu.

Les tampons suivants ont été utilisés à température de 0° C: Tris 40 mM- HCl, pH 7,4, contenant 150 mM de NaCl [tampon de faible force ionique]; Tris 40 mM- HCl, pH 7,4, contenant de l'urée 8M désionisée sur
30 une résine échangeuse d'ions (AG 501-X8, Biorad, Hercules, CA) [tampon urée]; Tris 40 mM- HCl, pH 7,4, contenant de l'urée 8M désionisée et du dithiothréitol (DTT) 50 mM, (Sigma) [tampon urée/DTT]. Tous les tampons ont été supplémentés par de l'EDTA 20 mM, de l'azide de
35 sodium à 0,02%, de l'aprotinine à 2 µg/ml, du

Néthylmaléimide 10 mM et du phénylméthylsulfonyl fluorure 1 mM (Sigma, Saint Louis, MI). Après chaque extraction, les homogénats ont été centrifugés pendant 20 minutes à 15000 g, à la température de 4°C. Les extraits en tampon urée et en tampon urée/DTT ont été dialysés contre de l'eau avant d'être analysés par électrophorèse et par immunotransfert.

Electrophorèse et immunodétection

Les protéines synoviales des différents extraits ont été séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide 10 % en tampon SDS dénaturant (PAGE-SDS) puis ont été électrotransférées sur des membranes de nitrocellulose renforcée (Hybond-TMC extra, Amersham, Little Chalfont, UK).

Les membranes ont été immunodétectées avec les préparations d'anticorps suivantes : sérums humains rhumatoïdes AAF-positifs ou AAF-négatifs ; sérums humains contrôles non-rhumatoïdes issus de patients atteints d'autres rhumatismes inflammatoires ou d'individus sains (1/100) ; fractions d'AAF purifiées (10 µg/ml) ; anticorps monoclonal de souris dirigé contre la fibrine et le fibrinogène humain (5 µg/ml) ; deux antisérums de mouton respectivement dirigés contre les chaînes α et γ recombinantes du fibrinogène humain (1/1000) (Cambio, Cambridge, UK) ; un antisérum de lapin dirigé contre la chaîne β recombinante du fibrinogène humain (1/200000) (Cambio).

Les sérums humains utilisés sont issus de 95 patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR) parfaitement caractérisés sur les plans clinique et biologique selon les critères de l'American College of Rheumatology, de 24 patients atteints de rhumatismes inflammatoires non rhumatoïdes ou de pathologies non inflammatoires (sérums contrôles) et de 10 individus sains. La titration semi-quantitative des anticorps anti-filaggrine (AAF) dans les sérums a été réalisée par

immunofluorescence indirecte sur cryocoupes d'épithélium d'œsophage de rat et par immunotransfert sur extraits épidermiques enrichis en variant acide de la filaggrine, selon des protocoles précédemment publiés [VINCENT et
5 al., Ann. Rheum. Dis., 48, 712-722, (1989) ; VINCENT et al., J. Rheumatol., 25, 838-846, (1998)]. Les sérums dits «AAF-positifs» sont ceux qui présentent des AAF à des titres significatifs après détection par les deux méthodes, et les sérums dits «AAF-négatifs» sont ceux qui
10 ne présentent d'AAF détectables par aucune des deux méthodes.

Les AAF ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur le variant acide de la filaggrine épidermique selon le protocole décrit par GIRBAL-
15 NEUHAUSER et al. (J. Immunol., 162, 585-594, (1999), à partir de 45 sérums rhumatoïdes de haut titre en AAF. Les fractions d'anticorps purifiés ont été réunies.

Des sondes moléculaires secondaires conjuguées à la peroxydase ont été utilisées pour la détection de
20 tous les anticorps primaires: protein-A (Sigma), anticorps de mouton dirigés contre les IgG de souris, (Biosys, Compiègne, France), fragments Fab de chèvre dirigés contre les IgG de lapin (Biosys) et fragments F(ab')₂ de lapin dirigés contre les IgG de mouton
25 (Southern Biotech. Inc), pour la détection respective des IgG humaines, murines, de lapin, et de mouton. L'activité peroxydase a été visualisée par le système de détection ECL™ (Amersham International, Aylesbury, UK), suivant le protocole proposé par le fabricant.

30 Résultats

Une réactivité spécifique avec les AAF purifiés et les sérums rhumatoïdes AAF-positifs a été observée uniquement dans l'extrait réalisé en tampon urée/DTT.

35 Les résultats sont illustrés par la Figure 1.
Légende de la Figure 1 :

- AFAp = AAF purifiés ;
- sérums PR = sérums rhumatoïdes :
 - * AFA+ = AFA-positifs ;
 - * AFA- = AFA-négatifs ;

5 - sérums contrôles = sérums issus de patients atteints d'autres rhumatismes inflammatoires que la PR ou de donneurs sains.

Ces résultats montrent que la réactivité spécifique avec les AAF purifiés et les sérums rhumatoïdes AAF-positifs concerne deux bandes protéiques de poids moléculaire apparent d'environ 64 kD à environ 78 kD (p64-78) et d'environ 55 kD à environ 61 kD (p55-61), respectivement. Ces bandes protéiques n'ont pas été détectées par les sérums AAF-négatifs, qu'ils proviennent de patients atteints de PR ou d'autres rhumatismes inflammatoires, ou bien qu'ils soient issus de donneurs sains.

La présence de ces protéines spécifiquement reconnues par les AAF purifiés et les sérums rhumatoïdes AAF-positifs, a été observée dans les extraits urée/DTT de tissus synoviaux issus des 4 patients rhumatoïdes étudiés.

Au total 48 sérums rhumatoïdes AAF-positifs ont été testés en immunotransfert sur au moins un extrait synovial urée/DTT. Parmi ces sérums, 40 ont reconnu p64-78, 39 ont reconnu p55-61, 37 ont reconnu à la fois p64-78 et p55-61, 3 n'ont reconnu que p64-78 et 2 n'ont reconnu que p55-61.

Treize sérums rhumatoïdes AAF-négatifs ont été testés en immunotransfert sur au moins un extrait urée/DTT de tissu synovial ; aucun de ces sérums n'a reconnu p64-78 ou p55-61.

Dix sérums issus de donneurs sains et 5 sérums issus de patients atteints d'autres rhumatismes inflammatoires ont aussi été testés en immunotransfert

sur au moins un extrait synovial urée/DTT ; aucun de ces sérums n'a reconnu p64-78 ou p55-61.

2) Caractérisation des protéines antigéniques p64-78 et p55-61.

5 Les protéines de l'extrait en tampon urée/DTT du tissu synovial de l'un des patients atteint de PR, ont été précipitées par 4 volumes d'acétone glaciale, puis redissoutes dans le tampon urée/DTT à une concentration 15 fois supérieure à leur concentration initiale.

10 Les protéines de l'extrait concentré ont été séparées en électrophorèse bidimensionnelle par isoélectrofocalisation suivie de SDS-PAGE.

Une séparation électrophorétique bidimensionnelle a été réalisée dans le système
15 PhastSystem™ (Pharmacia). La première séparation électrophorétique a eu lieu sur des gels d'isoélectrofocalisation (IEF) PhastGels™ préalablement lavés, séchés et réhydratés dans un tampon désionisé contenant de l'urée 8 M, du Nonidet P-40 à 0,5% et des
20 ampholytes créant un gradient de pH de 3 à 10 (Pharmacia). La deuxième dimension a été réalisée en SDS-PAGE sur des gels à 7,5% de polyacrylamide.

Les protéines ont ensuite été électrotransferrées sur des membranes de
25 polyvinylidifluorure (PVDF) (membranes ProBlott™, Applied Biosystems, Foster City, CA), en Tris 50 mM et acide borique 50 mM. Les membranes ont enfin été colorées par une solution aqueuse d'amido black à 0,1 %, d'acide acétique à 1 % et de méthanol à 45 %, ou bien
30 immunodétectées par des sérums rhumatoïdes selon le protocole décrit en 1) ci-dessus.

La Figure 2 illustre les profils obtenus après électrotransfert sur membrane de PVDF et :

- 35 a) coloration à l'amido-black ; ou bien
b) immunodétection par un sérum rhumatoïde AAF-positif ; ou bien

c) immunodétection par un sérum rhumatoïde AAF-négatif.

Légende de la Figure 2 :

- Amido Black = coloration à l'amido-black ;
- 5 - AFA+ = immunodétection avec un sérum rhumatoïde AAF-positif ;
- AFA- = immunodétection avec un sérum rhumatoïde AAF-négatif.

Après coloration à l'amido-black, on observe
10 la présence de deux protéines majoritaires, de poids moléculaire apparent 64-78 kD et 55-61 kD et de pI d'environ 5,85 à environ 8,45.

Ces protéines sont immunodétectées par les sérums rhumatoïdes AAF-positifs, mais pas par les sérums
15 rhumatoïdes AAF-négatifs.

À partir de transferts identiques sur membrane de PVDF après électrophorèse bidimensionnelle, des fragments de membrane correspondant au centre de chaque zone immunoréactive ont été excisés puis soumis à un
20 séquençage amino-terminal dans un séquenceur Applied Biosystems (494A ou 473A) selon le procédé conseillé par le fabricant.

À partir du fragment de membrane correspondant à l'antigène p64-78, la séquence gly-pro-arg-val-val-glu-
25 arg-his-gln-ser-ala a été obtenue. Cette séquence est strictement identique à la séquence 36-46 du produit du gène du précurseur de la chaîne α du fibrinogène humain. Lorsque des fragments de membrane correspondant aux extrémités droite ou gauche de la zone immunoréactive
30 p64-78 ont été excisés puis soumis chacun à trois cycles de séquençage amino-terminal, les séquences gly-pro-arg ont été retrouvées à chaque fois, indiquant que la totalité de la zone immunoréactive p64-78 possède la même extrémité amino-terminale.

35 À partir du fragment de membrane correspondant au centre de la zone immunoréactive correspondant à

l'antigène p55-61, la séquence gly-his-arg-pro-leu-asp-lys-lys-arg a été obtenue. Cette séquence est strictement identique à la séquence 45-54 du produit du gène précurseur de la chaîne β du fibrinogène humain.

5 Lorsqu'un fragment de membrane correspondant à l'extrémité gauche de la zone immunoréactive p55-61 a été excisé puis soumis à deux cycles de séquençage amino-terminal, la séquence gly-his a été retrouvée. Lorsqu'un fragment de membrane correspondant à l'extrémité droite

10 de la zone immunoréactive p55-61 a été excisé puis soumis à six cycles de séquençage amino-terminal, la séquence gly-his-arg-pro-leu-asp et la séquence gly-pro-arg-val-glu ont été retrouvées. Ceci indique que la totalité de la zone immunoréactive p55-61 possède la même

15 extrémité amino-terminale et qu'elle comigre partiellement avec l'antigène p64-78.

Les extrémités aminoterminales des protéines antigéniques p64-78 et p55-61 correspondent respectivement aux extrémités aminoterminales des chaînes

20 α et β du fibrinogène humain après clivage respectif par la thrombine des fibrinopeptides A et B. Les extrémités aminoterminales des protéines antigéniques p64-78 et p55-61 sont donc respectivement identiques à celle de la chaîne α et à celle de la chaîne β de la fibrine humaine.

25 Les poids moléculaires apparents des antigènes p64-78 et p55-61 sont compatibles avec les valeurs respectives de poids moléculaires théoriques de la chaîne α et de la chaîne β de la fibrine humaine.

L'identité de l'antigène p64-78 et de la

30 chaîne α de la fibrine d'une part, et celle de l'antigène p55-61 et de la chaîne β de la fibrine d'autre part, ont été confirmées par analyse de la réactivité d'anticorps antifibrin(ogène) vis-à-vis de ces antigènes. En immunotransfert, à partir d'un extrait de tissu synovial

35 réalisé en urée/DTT, l'anticorps monoclonal de souris "311" qui reconnaît les trois chaînes α , β et,

faiblement, γ du fibrinogène et de la fibrine humaine, est majoritairement réactif vis-à-vis des antigènes p64-78 et p55-61. De même, deux antisérums, l'un de mouton et l'autre de lapin, dirigés respectivement contre les chaînes α et β recombinantes du fibrinogène, ont principalement reconnu, respectivement, une protéine qui comigrerait avec l'antigène p64-78 et une protéine qui comigrerait avec l'antigène p55-61.

EXEMPLE 2 : REACTIVITE DE SERUMS RHUMATOÏDES ET D'AAF PURIFIES AVEC DU FIBRINOGENE DEIMINE IN VITRO.

La réactivité vis-à-vis du fibrinogène déiminé et non déiminé a été étudiée par immunotransfert. Ont été utilisés : les fractions d'AAF purifiées, 37 sérums rhumatoïdes AAF-positifs de titre décroissant, 10 sérums rhumatoïdes AAF-négatifs et 19 sérums AAF-négatifs issus de patients atteints de rhumatismes inflammatoires ou non inflammatoires (titres en AAF déterminés par immunotransfert sur extraits épidermiques enrichis en variant acide de la filaggrine).

Les résultats sont illustrés par la Figure 3A dans le cas du fibrinogène non-déiminé, et par la Figure 3B dans le cas du fibrinogène déiminé.

Légende de la Figure 3 :

Figure 3 A : fibrinogène humain purifié non déiminé ;

- 311 = anticorps monoclonal anti-fibrinogène 311 ;
- sérums contrôles = sérums issus de patients atteints d'autres rhumatismes inflammatoires que la PR ou de donneurs sains ;
- sérums PR = sérums rhumatoïdes ;

* AFA+ = AFA-positifs ;

* AFA- = AFA-négatifs ;

Figure 3 B : fibrinogène humain purifié déiminé par une PAD ;

- 311 = anticorps monoclonal anti-fibrinogène 311 ;
- C1 = anticorps de mouton dirigés contre les IgG de souris ;

- C2 = anticorps de mouton dirigés contre la protéine-A ;
 - sérums contrôles = sérums issus de patients atteints d'autres rhumatismes inflammatoires que la PR ou de donneurs sains ;
- 5 - sérums PR = sérums rhumatoïdes :
- * AFA+ = AFA-positifs ;
 - * AFA- = AFA-négatifs.

Fibrinogène non-déiminé

Après séparation en PAGE-SDS, dans les conditions décrites dans l'exemple 1 ci-dessus, le fibrinogène non déiminé est composé de 3 polypeptides de poids moléculaires apparents respectifs de 48 kDa, 58 kDa et 69 kDa, correspondant aux masses moléculaires apparentes attendues des chaînes polypeptidiques α , β et γ composant la protéine (résultats non présentés). L'anticorps monoclonal anti-fibrinogène "311" reconnaît fortement les chaînes polypeptidiques α et β et très faiblement la chaîne polypeptidique γ (Figure 3A).

Des antisérums spécifiques de chacune des chaînes α , β and γ du fibrinogène ont aussi montré une réactivité vis-à-vis de la chaîne contre laquelle ils étaient respectivement dirigés (résultats non illustrés).

Déimination du fibrinogène

Une peptidyl-arginine déiminase (PAD) purifiée à partir de muscle squelettique de lapin (Sigma, St Louis, MO) a été utilisée. Le fibrinogène humain (Calbiochem, San Diego, CA) a été incubé à la concentration de 0,86 mg/ml, en présence ou en absence de PAD (7 U/mg de protéine) pendant 2h à 50°C, en tampon Tris 0,1 M, HCl pH 7,4, contenant 10 mM de CaCl₂, et 5 mM de DTT. Ces conditions sont celles qui ont préalablement permis de générer les épitopes reconnus par les AAF sur une filaggrine recombinante humaine [GIRBAL-NEUHAUSER et al., J. Immunol., 162, 585-594, (1999)]. La déimination a

ensuite été arrêtée par addition de SDS à 2 % et chauffage à 100°C pendant 3 mn.

Après une déimination de 2 heures, la mobilité électrophorétique en SDS-PAGE des deux polypeptides α et β s'est modifiée, celle du polypeptide γ est restée inchangée. En effet, la protéine correspondant à la chaîne α est alors apparue sous la forme d'une bande diffuse de 82 à 95 kDa et a été immunodétectée à la fois par l'anticorps monoclonal anti-fibrinogène "311" (Figure 3B) et par l'antisérum dirigé contre la chaîne α du fibrinogène (résultats non illustrés).

La protéine correspondant à la chaîne β est apparue sous la forme d'un doublet bien défini de poids moléculaire 58 kD pour la bande inférieure et 60 kD pour la bande supérieure, qui n'a pas été reconnu par l'anticorps monoclonal anti-fibrinogène "311" (Figure 3B) mais a été immunodétecté par l'antisérum de lapin dirigé contre la chaîne β recombinante du fibrinogène humain (résultats non illustrés).

Aucune réactivité de la chaîne α ou de la chaîne β n'est observée avec les anticorps C1 et C2.

Réactivité des sérums

La réactivité des sérums vis-à-vis des chaînes α et β du fibrinogène non déiminé s'est avérée nulle ou très faible et ne concernait que quelques rares sérums n'appartenant à aucun sous-groupe particulier.

En revanche, après déimination, les polypeptides correspondant aux chaînes α et β déiminées sont fortement réactifs avec les AAF purifiés (résultats non-illustrés) et avec la totalité des 37 sérums rhumatoïdes AAF-positifs (à l'exception de celui qui possède le titre le plus faible en AAF). Par ailleurs, 6 sérums rhumatoïdes AAF-négatifs sur 10 ont aussi clairement reconnu les polypeptides α ou β déiminés : 2 ont immunodétecté le polypeptide α et le doublet polypeptidique β , 3 autres ont seulement immunodétecté le

douplet polypeptidique β et 1 seul a immunodéecté
exclusivement le polypeptide α . Par contre, à l'exception
d'un sérum issu d'un patient atteint d'un syndrome de
Sjögren réactif sur le doublet polypeptidique β , aucun
5 des sérums contrôles n'a immunodéecté le fibrinogène
déiminé.

L'affinité des sérums rhumatoïdes AAF-positifs
vis-à-vis des deux polypeptides déiminés α et β s'est
révélée légèrement variable d'un sérum à l'autre. Ainsi,
10 6 sérums, alors qu'ils détectaient fortement le
polypeptide β , n'ont que très faiblement reconnu le
polypeptide α . De même, 3 sérums fortement réactifs vis-
à-vis du polypeptide α n'ont pas détecté le polypeptide
déiminé β . Par ailleurs, l'intensité de marquage des deux
15 polypeptides paraît globalement proportionnelle au titre
en AAF des sérums. Il est à noter que les sérums réactifs
sur les polypeptides α et β du fibrinogène déiminés ont
également été réactifs vis-à-vis de polypeptides de haut
poids moléculaire (supérieur à 200 kD) générés lors de la
20 déimination du fibrinogène. Ces polypeptides clairement
réactifs avec les anticorps anti-fibrinogène sont très
probablement des agrégats de chaînes de fibrinogène.

En conclusion, la reconnaissance des
polypeptides α et β du fibrinogène par les sérums
25 rhumatoïdes est non seulement entièrement dépendante de
leur déimination, puisque les polypeptides non-déiminés
ne sont jamais reconnus, mais elle est également
clairement liée à la réactivité antifilaggrine de ces
sérums. Il est à noter que ces polypeptides déiminés
30 permettent de détecter avec une grande sensibilité les
AAF présents dans les sérums rhumatoïdes.

Ces résultats démontrent clairement que les
cibles antigéniques des AAF dans les articulations
synoviales rhumatoïdes sont des formes déiminées de la
35 chaîne α et de la chaîne β de la fibrine humaine.

REVENDICATIONS

1. Polypeptide citrulliné reconnu par des auto-anticorps anti-filaggrine spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde (PR) et dérivé de tout ou partie de la séquence de la chaîne α ou de la chaîne β d'une fibrine de vertébré, par substitution d'au moins un résidu arginine par un résidu citrulline.
2. Polypeptide citrulliné selon la revendication 1, dérivé d'une séquence d'au moins 5 acides aminés consécutifs de la chaîne α ou de la chaîne β d'une fibrine de vertébré.
3. Polypeptide citrulliné selon une quelconque des revendications 1 ou 2,
10 caractérisé en ce que ladite fibrine de vertébré est une fibrine de mammifère.
4. Polypeptide citrulliné selon la revendication 3, caractérisé en ce que la dite fibrine de vertébré est une fibrine humaine.
5. Utilisation d'un polypeptide selon une quelconque des revendications 1 à 4 pour le diagnostic *in vitro* de la polyarthrite rhumatoïde.
6. Composition antigénique pour le diagnostic de la présence d'auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde dans un échantillon biologique, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un polypeptide citrulliné selon une quelconque des revendications 1 à 4 et un moyen de marquage et/ou une molécule porteuse.
- 20 7. Composition antigénique selon la revendication 6, caractérisée en ce que le polypeptide citrulliné est marqué et/ou conjugué avec une molécule porteuse.

8. Procédé de détection des auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde dans un échantillon biologique, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend:

- la mise en contact dudit échantillon biologique avec au moins un polypeptide selon une quelconque des revendications 1 à 4, dans des conditions permettant la formation d'un complexe antigène/anticorps avec les auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde présents;

- la détection, par tous moyens appropriés, du complexe antigène/anticorps formé.

10 9. Nécessaire pour la détection des auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un polypeptide selon une quelconque des revendications 1 à 4, ainsi que des tampons et réactifs appropriés pour la constitution d'un milieu réactionnel permettant la formation d'un complexe antigène/anticorps, et/ou des moyens de détection dudit complexe antigène/anticorps.

10. Utilisation d'un polypeptide citrulliné selon une quelconque des revendications 1 à 4 pour l'obtention d'un médicament.

11. Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné à neutraliser la réponse auto-immune associée à la PR.

20 12. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient en tant que principe actif, au moins un polypeptide citrulliné selon une quelconque des revendications 1 à 4 et un excipient pharmaceutiquement acceptable.

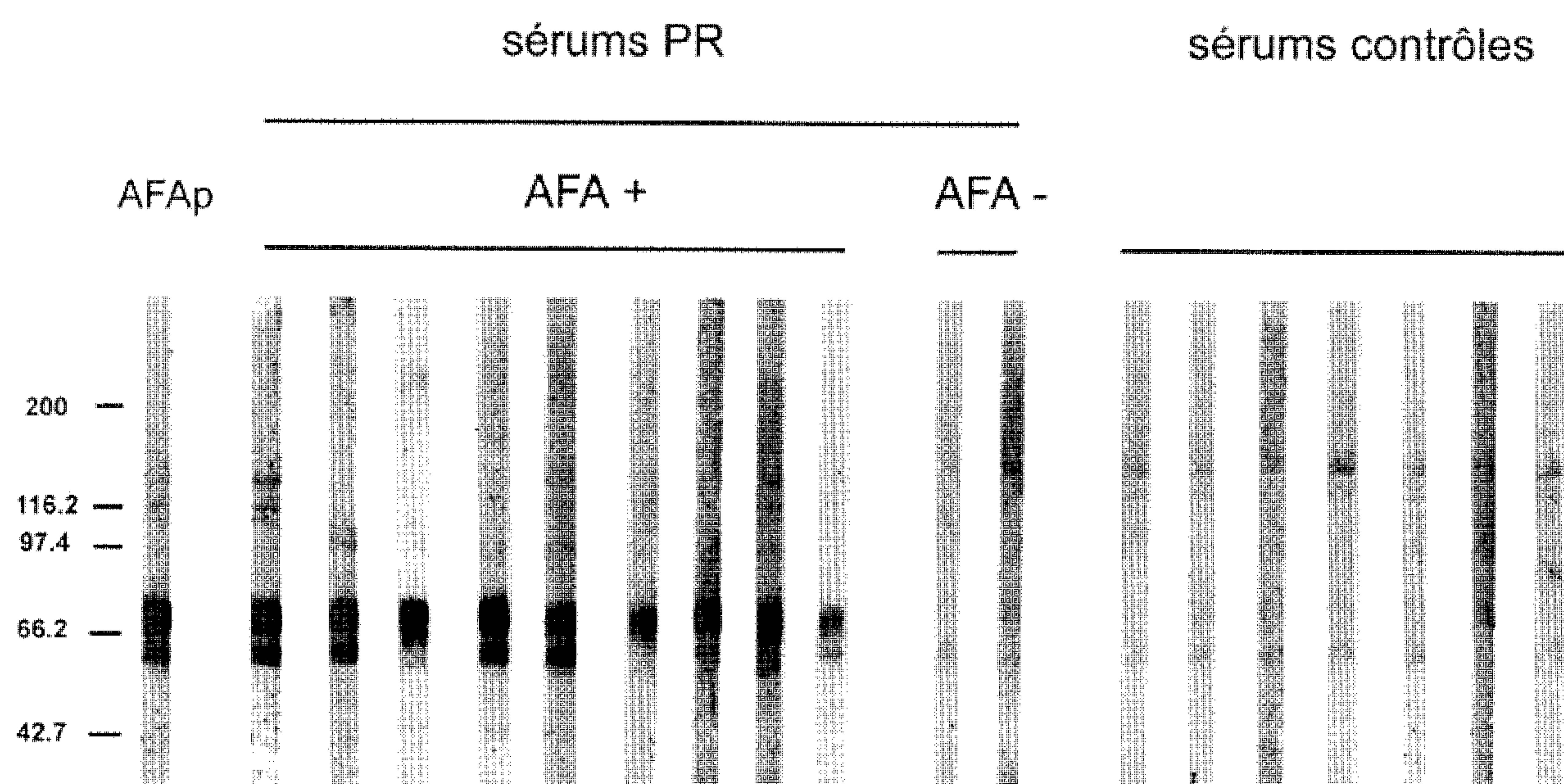


Figure 1

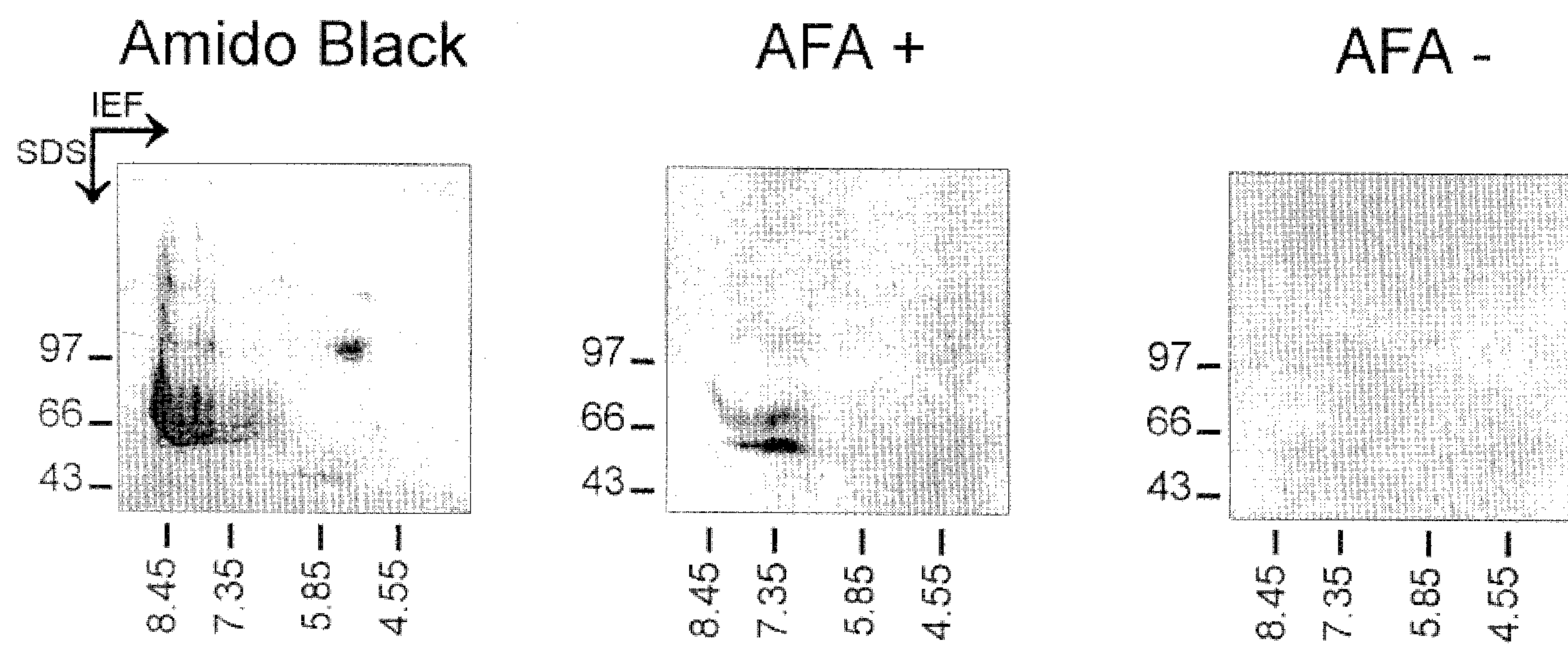


Figure 2

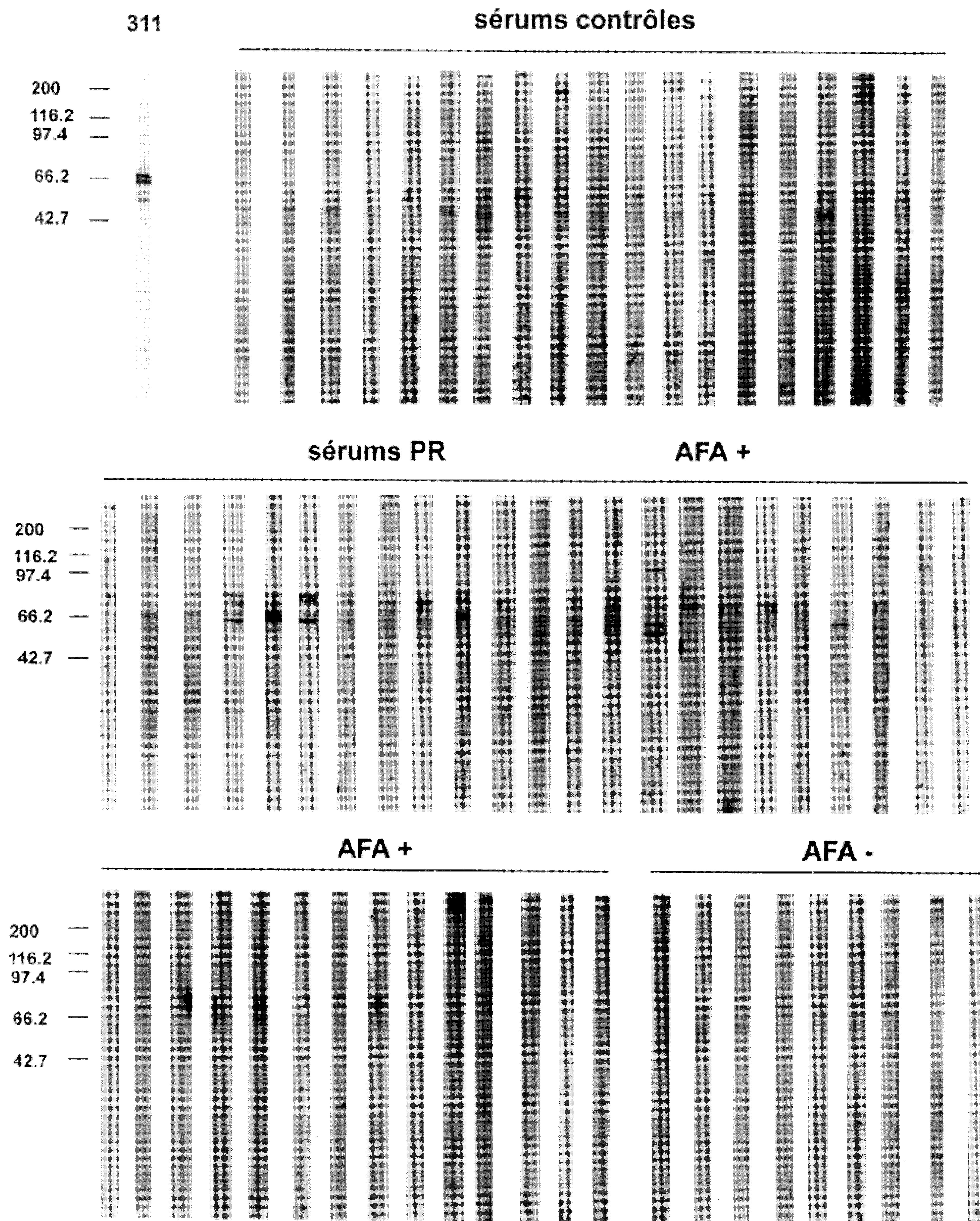


Figure 3A

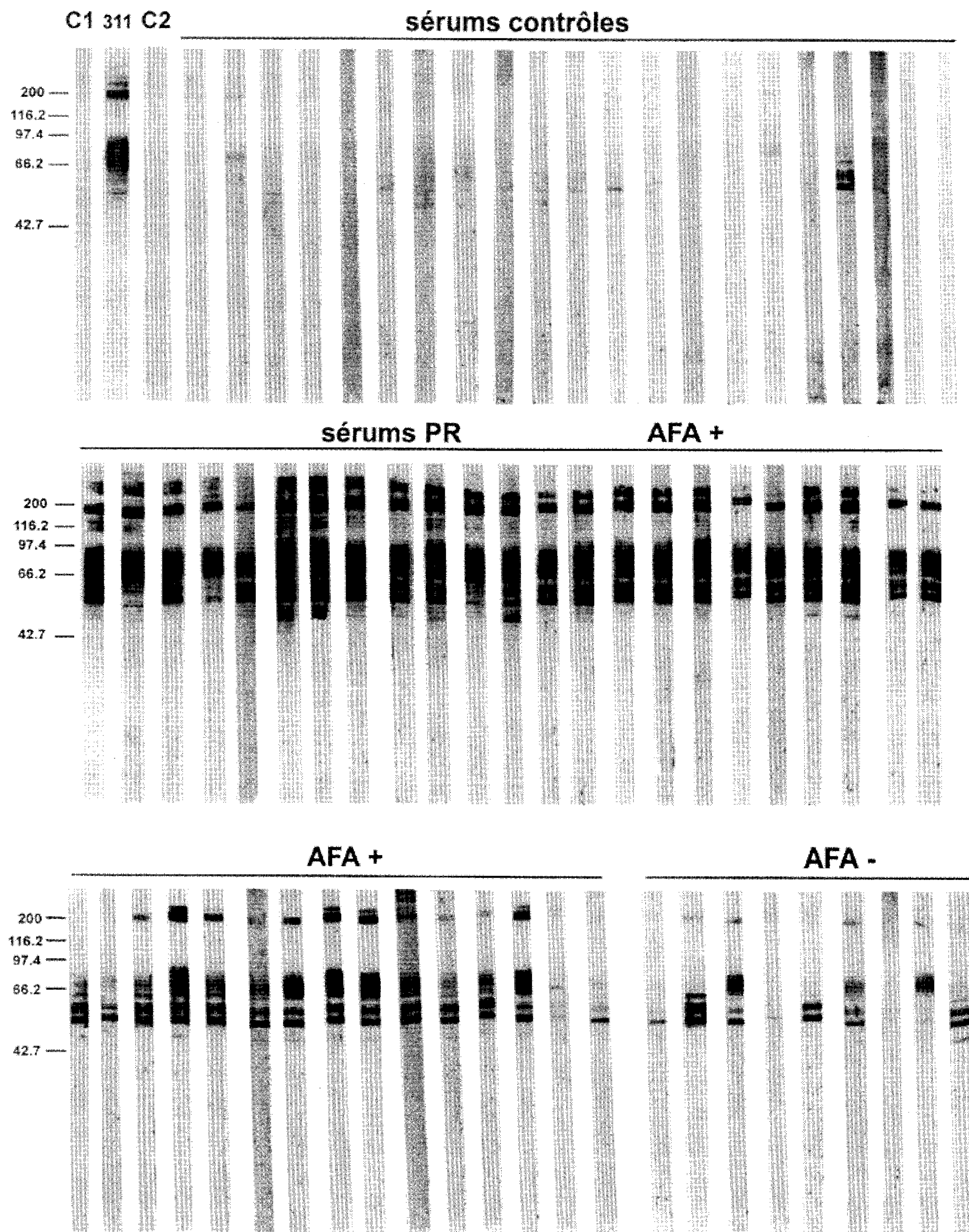


Figure 3B