

12

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 07.09.01.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 14.03.03 Bulletin 03/11.

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

60 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

71 Demandeur(s) : GENFIT S.A. — FR.

72 Inventeur(s) : NAJIB JAMILA et MAJD ZOUHER.

73 Titulaire(s) :

74 Mandataire(s) : CABINET BECKER ET ASSOCIES.

54 METHODES DE CRIBLAGE DE MOLECULES UTILES POUR LA PREVENTION OU LE TRAITEMENT DU
SYNDROME METABOLIQUE, DES MALADIES CARDIOVASCULAIRES ET DE L'ATHEROSCLEROSE.

57 La présente invention concerne des compositions et
méthodes de criblage de molécules utiles pour la prévention
ou le traitement du syndrome métabolique, des maladies
cardiovasculaires et/ ou de l'athérosclérose. L'invention
concerne notamment des méthodes et des kits de criblage
de composés basées sur la détermination de l'effet de com-
posés tests sur l'activité d'une nouvelle protéine apparentée
à l'apolipoprotéine AIV. L'invention concerne également
des compositions et méthodes pour diminuer la concentra-
tion de triglycérides et/ ou pour diminuer la concentration ou
l'expression de l'apolipoprotéine CIII (apo CIII) et/ ou pour
diminuer la concentration de VLDL.

FR 2 829 581 - A1



**METHODES DE CRIBLAGE DE MOLECULES UTILES POUR LA PREVENTION
OU LE TRAITEMENT DU SYNDROME METABOLIQUE, DES MALADIES
CARDIOVASCULAIRES ET DE L'ATHEROSCLEROSE**

5

La présente invention concerne des compositions et méthodes de criblage de molécules utiles pour la prévention ou le traitement du syndrome métabolique, des maladies cardiovasculaires et/ou de l'athérosclérose. L'invention concerne notamment des méthodes de criblage de composés basées sur la détermination de l'effet de composés tests sur l'activité d'une nouvelle protéine apparentée à l'apolipoprotéine AIV (AA4RP). L'invention concerne également des compositions et méthodes pour diminuer la concentration de triglycérides et/ou pour diminuer la concentration ou l'expression de l'apolipoprotéine CIII (apo CIII) et/ou pour diminuer la concentration de VLDL.

15

Le syndrome métabolique et les maladies cardiovasculaires sont devenues les maladies les plus préoccupantes au niveau mondial. L'athérosclérose qui les accompagne et qui est à l'origine de nombreux décès (infarctus du myocarde, embolie cérébrale, etc.) est une maladie multifactorielle.

20

En raison de la découverte des statines et de la mise en œuvre de nombreux essais d'intervention avec ces molécules, tous positifs, l'attention a été focalisée ces dix dernières années sur les LDL (Low Density Lipoproteins), le LDL cholestérol étant choisi comme le paramètre majeur des autorités puisqu'il a été démontré une relation directe entre la concentration des LDL et le risque de maladies cardiovasculaires.

25

Aujourd'hui, la publication de nombreuses études épidémiologiques et d'un essai (VAHIT) démontre qu'à côté des LDL, les triglycérides et les HDL (High Density Lipoproteins,) jouent un rôle clef dans l'athérogénèse. Les HDL sont des lipoprotéines anti-athérogènes, leur concentration est corrélée de façon inverse au risque. Le rôle des triglycérides, et en particulier des lipoprotéines riches en triglycérides et/ou contenant l'apolipoprotéine CIII (apo CIII), en tant que facteur de risque indépendant pour l'athérosclérose n'est plus discuté.

35

L'apo CIII est une protéine de 79 acides aminés synthétisée par le foie et l'intestin [1]. C'est un composant des chylomicrons, des VLDL (very low density lipoproteins) et des HDL (high density lipoproteins) [2].

5 La concentration de d'apo CIII joue un rôle important dans le contrôle du métabolisme des triglycérides du plasma et dans la détermination de la concentration plasmatique de lipoprotéines riches en triglycérides potentiellement athérogéniques [3].

10 La concentration en apo CIII peut être corrélée avec de multiples état pathophysiologiques impliqués dans la prédisposition à l'athérosclérose et aux maladies cardiovasculaires.

15 Il a été également démontré que la concentration en apo CIII dans les particules VLDL et LDL est une mesure plus spécifique des risque de maladies cardiovasculaires que la concentration en triglycérides plasmatiques [4].

20 La découverte ou la mise au point de molécules, de méthodes ou de kits pour moduler, et notamment pour réduire la quantité d'apo CIII est donc une avancée majeure dans le domaine thérapeutique, diagnostic et/ou expérimental.

25 La découverte ou la mise au point de molécules, de méthodes ou de kits pour moduler, et notamment pour réduire la quantité de triglycérides ou de VLDL ou pour réguler le transport inverse du cholestérol est donc également une avancée majeure dans le domaine thérapeutique, diagnostic et/ou expérimental.

30 La présente invention propose une solution alternative aux stratégies thérapeutiques de l'art antérieur pour la prise en charge du syndrome métabolique et des pathologies cardiovasculaires. La présente invention décrit en effet la caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle protéine qui représente une cible particulièrement avantageuse pour la recherche et le développement de molécules actives. En outre, cette cible présente l'avantage important d'être
35 spécifique des voies métaboliques considérées.

Plus particulièrement, la présente demande résulte de l'identification d'une nouvelle protéine régulant le métabolisme des lipides et des lipoprotéines, notamment des lipoprotéines riches en triglycérides et en apolipoprotéine CIII
5 (Apo CIII).

Cette protéine présente la structure primaire représentée ci-dessous, comprenant 366 acides aminés (SEQ ID NO 1).

10 MASMAAVLTWALALLSAFSATQARKGFWDYFSQTS GDKGRVEQIHQQKMAREPAT
LKDSLEQDLNNMNKFLKLRPLSGSEAPRLPQDPVGMRRQLQEELEE VKARLQPY
MAEAHEL VGWNLEGLRQQLKPYTMDLMEQVALRVQELQEQLRVVGEDTKAQLLG
GVDEAWALLQGLQSRVVHHTGRFKELFHPYAESLVSGIGRHVQELHRSVAPHAPA
SPARLSRCVQVLSRKLTLKAKALHARIQQNLDQLREELSRAFAGTGTEEGAGPDPQ
15 MLSEEVQRQLQAFRQDTYLQIAAFTRAIDQETEEVQQQLAPPPPGHSAFAPEFQQT
DSGKVL SKLQARLDDLWEDITHSLHDQGHSHLGDP.

Cette protéine correspond à la séquence de la protéine RAP3 mentionnée antérieurement comme potentiellement impliquée dans la régénération
20 hépatique (numéro d'accès Genbank : AF202889.1 : Van der Vliet H.N., Groenink M., Leegwater A.C.J. and Chamuleau R.A.F.M. Submitted (09-NOV-1999) Experimental Hepatology, Academic Medical Center, Meibergdreef 9, Amsterdam 1105 AZ, Netherlands).

25 Elle correspond également à la protéine AA4RP (« Apolipoprotein AIV-Related Protein ») de la demande de brevet WO01/00803 A2 (SEQ ID NO 3 de cette demande) déposée au nom de la société Genset. Cette protéine AA4RP est un membre de la famille des apolipoprotéines impliquée dans le métabolisme des lipides.

30

La présente demande montre à présent que la protéine ci-dessus désignée AA4RP est capable de diminuer in vivo la concentration en triglycérides et en VLDL. La demande montre que cette protéine permet aussi de diminuer in vivo la concentration en apo CIII, marqueur des lipoprotéines athérogènes.

35

La présente demande résulte donc de la découverte du rôle fonctionnel d'une nouvelle protéine, désignée AA4RP dans la régulation du métabolisme des lipoprotéines, notamment celles contenant les triglycérides et l'apo CIII.

- 5 La présente demande décrit également la production de peptides dérivés de la structure primaire de l'AA4RP, comprenant un ou des domaines immunogènes de l'AA4RP.

10 La présente demande décrit encore la fabrication, à partir de peptides immunogènes, d'anticorps reconnaissant l'AA4RP dans les lipoprotéines humaines, ou éventuellement sous forme libre, et permettant ainsi son dosage. Le développement de cet anticorps anti-AA4RP a permis de localiser cette apolipoprotéine au niveau des HDL, confirmant son rôle très probable dans le transport inverse du cholestérol.

15

L'invention décrit ainsi une nouvelle cible et des outils utilisables pour la mise au point de nouvelles molécules actives pour prévenir ou traiter le syndrome métabolique, les maladies cardiovasculaire, et en particulier l'athérosclérose. L'invention est également utilisable pour la détection d'une prédisposition ou
20 d'un risque de développement du syndrome métabolique, de pathologies cardiovasculaires et en particulier de l'athérosclérose.

Un premier objet de l'invention réside donc dans l'utilisation de l'AA4RP pour le développement de composés actifs sur les pathologies cardiovasculaires ou
25 métaboliques.

Protéine apparentée à l'apolipoprotéine AIV (AA4RP)

30 Dans le contexte de l'invention, le terme AA4RP (ou protéine AA4RP) désigne un polypeptide comprenant la séquence SEQ ID NO 1 ou tous variants, dérivés ou homologues. Il s'agit plus particulièrement de tout variant naturel de la séquence SEQ ID NO 1, résultant de polymorphisme, épissage, mutations, etc.. De tels variants naturels peuvent donc comprendre une ou plusieurs mutations ou substitutions, une délétion d'un ou plusieurs résidus, etc.. Le terme

homologue désigne par ailleurs les polypeptides AA4RP d'autres espèces, par exemple de rongeurs, bovins, etc..

De manière générale, le terme AA4RP désigne un polypeptide de séquence SEQ
5 ID NO 1 ou tout dérivé comprenant une ou plusieurs mutations, délétions,
substitutions ou additions d'un ou plusieurs acides aminés. De préférence, il
s'agit de polypeptides reconnus par un anticorps polyclonal produit à partir de
l'AA4RP de séquence SEQ ID NO 1. Encore plus préférentiellement, des
analogues sont des polypeptides conservant au moins une propriété
10 immunologique ou biologique de l'AA4RP. Les propriétés biologiques sont
notamment la régulation de la concentration des triglycérides ou de l'apo CIII,
par exemple. Des variants préférés comportent au moins 80% de la séquence
SEQ ID NO 1, plus préférentiellement au moins 90% d'identité avec la séquence
SEQ ID NO 1. Le degré d'identité peut être déterminé par exemple selon la
15 méthode CLUSTAL. Des variants particuliers possèdent une mutation ou une
substitution affectant 5 acides aminés au plus de la séquence SEQ ID NO 1.

Des dérivés particuliers selon l'invention sont des fragments de l'AA4RP ci-
dessus, notamment des polypeptides comprenant une partie de la séquence
20 SEQ ID NO 1. A cet égard, un objet de l'invention réside dans un polypeptide
caractérisé en ce qu'il comprend un fragment de la séquence SEQ ID NO 1 et en
ce qu'il comporte au moins un domaine immunogène de l'AA4RP humaine.

La présente demande décrit en effet la production de polypeptides fragments de
25 l'AA4RP, comportant de préférence une portion immunogène de l'AA4RP, qui
sont utilisables pour la production d'anticorps, de tests de dosages, comme
compétiteurs, etc..

Ces polypeptides ont été élaborés en utilisant notamment des algorithmes
30 permettant d'évaluer la flexibilité [5, 6], l'hydrophilicité [7, 8], l'antigénicité [9]
et les structures secondaires [10, 11].

De cette manière, les demandeurs ont identifié des régions intéressantes sur le
plan immunogène ou biologique de la molécule. A titre d'exemple particulier, on

peut citer un polypeptide correspondant aux (ou comprenant les) résidus 20-114 de la séquence SEQ ID NO 1.

5 Les polypeptides fragments de l'invention contiennent de préférence moins de 200 acides aminés, plus préférentiellement moins de 150 acides aminés. Ils contiennent de préférence au moins un épitope de l'AA4RP. Des polypeptides préférés de l'invention comprennent moins de 200 acides aminés de la séquence SEQ ID NO 1 et comportent au moins les résidus 50-80 de la séquence SEQ ID NO 1.

10

Au sens de l'invention, le terme "fragment immunogène" désigne toute portion du polypeptide comprenant un épitope, de préférence un épitope T ou B. Un tel fragment comprend donc avantageusement au moins 7 acides aminés consécutifs de la séquence SEQ ID NO 1, plus préférentiellement au moins 10
15 acides aminés consécutifs de la séquence SEQ ID NO 1, encore plus préférentiellement au moins 15 acides aminés consécutifs de la séquence SEQ ID NO 1.

20 Les polypeptides de l'invention peuvent comprendre des résidus hétérologues ajoutés à la séquence d'acides aminés indiquée. Ainsi, un objet de l'invention réside dans un polypeptide comprenant tout ou partie de la séquence SEQ ID NO 1, ou d'un variant naturel de celle-ci, et une partie hétérologue.

25 La partie hétérologue peut correspondre à des acides aminés, lipides, sucres, etc.. Il peut également s'agir de groupe(s) chimique(s), enzymatique(s), radioactif(s), etc.. L'élément hétérologue peut en particulier constituer un marqueur, un agent de ciblage, un agent stabilisateur, un agent améliorant l'immunogénicité ou facilitant la production, un agent protecteur, un agent facilitant la pénétration du peptide dans les cellules, une toxine, ou composé
30 actif, un anticorps, etc..

35 Les polypeptides de l'invention peuvent se présenter sous forme soluble, purifiée ou complexée avec une molécule porteuse telle que KLH ou la sérum-albumine, ou toute autre molécule inerte (par exemple synthétique), telle qu'une bille par exemple. Les polypeptides selon l'invention sont

préférentiellement dépourvus de contamination par des protéines naturellement présentes dans le sang, notamment par une autre apolipoprotéine. Dans un mode de mise en œuvre particulier, les polypeptides sont couplés à une molécule porteuse notamment pour la fabrication
5 d'anticorps. Le couplage peut être réalisé selon des techniques conventionnelles [12, 13]. Les polypeptides peuvent également être conjugués ou fusionnés à toute autre molécule polypeptidique ou peptidique telle que par exemple un peptide, polypeptide ou une protéine biologiquement active.

10 Les polypeptides peuvent être préparés par synthèse artificielle selon des techniques conventionnelles telles que la synthèse en phase solide décrite par [14] ainsi que dans les exemples. La synthèse artificielle est avantageuse dans la mesure où les polypeptides produits sont dépourvus de toute contamination par des produits d'origine naturelle notamment par des dérivés sanguins. Il est
15 entendu que les polypeptides de l'invention peuvent être fabriqués par toute technique biologique, génétique ou enzymatique, et notamment par expression dans un hôte cellulaire approprié d'un acide nucléique correspondant. A cet égard, un autre objet de la présente invention réside dans une molécule d'acide nucléique codant un polypeptide tel que défini ci-dessus. Cet acide nucléique
20 peut être un ADN ou un ARN, de préférence un ADNc, et peut éventuellement comprendre une région promoteur. L'acide nucléique peut en outre être inséré dans un vecteur (par exemple un plasmide, un cosmide, un phage, un virus, un chromosome artificiel, etc.). De tels acides nucléiques peuvent être utilisés pour produire des polypeptides selon l'invention in vitro ou directement in vivo.

25 Les polypeptides selon l'invention peuvent être utilisés dans des tests de screening ou de criblage, dans des tests de titration ou comme standard par exemple pour calibrer les essais. Ils peuvent également être utilisés pour réguler l'activité de l'AA4RP in vitro ou in vivo. Ils sont particulièrement
30 intéressants pour la production d'anticorps anti-AA4RP.

Un objet de l'invention réside dans une composition comprenant un polypeptide tel que défini ci-avant. Une composition particulière comprend un polypeptide comprenant tout ou partie de l'AA4RP et un véhicule acceptable sur le plan

pharmaceutique. Le véhicule peut être une solution saline, isotonique, tamponnée, éventuellement combinée à un agent stabilisant, émulsifiant, etc..

Anticorps

5

Un autre objet de l'invention réside dans un anticorps reconnaissant un polypeptide tel que défini ci-dessus. Il s'agit avantagement d'un anticorps spécifique d'un tel polypeptide, c'est-à-dire préparé par immunisation avec un tel polypeptide.

10

L'anticorps peut être polyclonal ou monoclonal. D'autre part, le terme anticorps désigne également tous fragments ou dérivés d'anticorps en particulier des fragments ou dérivés d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux conservant la même spécificité antigénique. De tels fragments ou dérivés d'anticorps comprennent par exemple les fragments Fab, Fab'2, CDRs, etc., des anticorps humanisés, des anticorps polyfonctionnels, des anticorps simple chaîne (ScFv), etc.. Ces anticorps peuvent être produits selon des techniques conventionnelles comprenant l'immunisation d'un animal et la récupération du sérum (polyclonal) ou des cellules de la rate (pour produire des hybridomes par fusion avec des lignées cellulaires appropriées).

20

Des méthodes de production d'anticorps polyclonaux à partir d'espèces diverses telles que souris, rongeurs, primates, chevaux, cochons, lapins, volailles, etc. peuvent être trouvées dans [12]. De manière brève, l'antigène est combiné à un adjuvant, par exemple l'adjuvant de Freud, et est administré à un animal, classiquement par injection sous cutanée. Des injections répétées peuvent être réalisées. Des échantillons de sang sont récoltés et les immunoglobulines ou le sérum sont séparés.

25

Des méthodes pour la production d'anticorps monoclonaux peuvent être trouvées notamment dans Harlow et al. [15] ou dans [16]. De manière brève, ces méthodes comprennent l'immunisation d'un animal avec un antigène suivi de la récupération des cellules de la rate qui sont ensuite fusionnées avec des cellules immortalisées telles que des cellules de myélome. Les hybridomes ainsi

30

obtenus produisent les anticorps monoclonaux et peuvent être sélectionnés par dilution limite pour isoler les clones individuels. Les anticorps peuvent aussi être produits par sélection de banques combinatoires d'immunoglobulines, tel que décrit par exemple dans [17].

5

Des fragments Fab ou Fab'2 peuvent être produits par digestion avec des protéases selon des techniques conventionnelles. Des anticorps humanisés peuvent être préparés tels que décrits par exemple par [18, 19].

10 Selon un mode préféré, la présente invention concerne un anticorps dirigé contre un épitope compris dans les résidus 20-114 de la séquence SEQ ID NO 1.

Selon un autre mode particulier, l'invention concerne tout anticorps anti-
15 AA4RP, caractérisé en ce qu'il est obtenu par immunisation d'un mammifère non-humain avec un peptide immunogène comprenant une partie de la séquence SEQ ID NO 1. Un tel anticorps polyclonal a été généré chez le lapin contre un peptide de synthèse de 95 acides aminés. Cet anticorps a permis de montrer, par western blot, que l'AA4RP est localisée essentiellement au niveau
20 des HDL. Chez la souris contrôle, la sous fraction reconnue après immunoélectrophorèse bidimensionnelle se trouve au niveau des pré- β HDL qui sont les premiers accepteurs du cholestérol tissulaire au cours du transport inverse du cholestérol.

25 Cette invention concerne également une méthode de production d'un anticorps anti-AA4RP comprenant l'injection d'un polypeptide tel que défini ci-dessus, notamment d'un polypeptide comprenant toute ou partie de la séquence SEQ ID NO 1, notamment les résidus 50 à 80, à un mammifère non-humain, puis la récupération des anticorps ou des cellules productrices d'anticorps.

30

Les anticorps selon l'invention peuvent être couplés à des parties hétérologues telles que des toxines, des marqueurs, des drogues ou d'autres agents thérapeutiques. Le couplage peut être covalent ou non, direct ou par l'intermédiaire d'un agent de couplage ou d'un espaceur. Les marqueurs
35 peuvent être par exemple des marqueurs radioactifs, des enzymes, des agents

fluorescents, des particules magnétiques, etc.. Les toxines sont par exemple la toxine diphtérique, botulique, ricine, etc.. Les drogues ou agents thérapeutiques sont par exemple des lymphokines, des antibiotiques, des antisens, des facteurs de croissance, etc.. Des méthodes pour réaliser le
5 couplage de telles régions hétérologues sont décrites par exemple dans le brevet américain US 4,277,149.

Les anticorps de l'invention présentent des applications multiples notamment des applications thérapeutiques, diagnostiques, prophylactiques, ainsi que
10 dans le domaine expérimental, par exemple pour la purification d'antigènes. In vitro, ils peuvent être utilisés notamment comme agent de screening ou pour purifier l'antigène à partir d'échantillons biologiques variés (échantillons de sang tel que le plasma, ou le sérum, ou un autre fluide biologique tel que les urines, le liquide interstitiel, etc.). Ils peuvent également être utilisés pour
15 détecter ou quantifier la présence (ou la quantité) d'AA4RP dans un échantillon prélevé à partir d'un sujet ou sur une culture cellulaire, typiquement un échantillon de sang prélevé à partir d'un mammifère, notamment d'un sujet humain, comme il sera décrit dans la suite du texte.

20 Tests de Criblage

Un autre objet particulier de l'invention réside dans un procédé pour la sélection, l'identification ou la caractérisation de composés, caractérisé en ce qu'il comprend la détermination de la capacité d'un composé test à augmenter
25 l'activité de l'AA4RP.

Les composés particulièrement préférés sont ceux capables d'augmenter de manière sélective l'activité de l'AA4RP, c'est-à-dire essentiellement sans affecter de manière directe l'activité d'une autre apolipoprotéine. Les procédés de
30 l'invention sont particulièrement destinés à la sélection, l'identification ou la caractérisation de composés actifs sur le métabolisme des lipides ou des lipoprotéines.

Au sens de la présente demande, le terme « activité de l'AA4RP » désigne
35 notamment la synthèse de cette protéine (transcription, traduction, etc.), sa

maturation, son export ou sa sécrétion extracellulaire, son interaction avec un récepteur, son incorporation dans des particules (notamment des HDL et les VLDL), sa dégradation, etc.. Le composé augmentant l'activité de l'AA4RP peut donc être un agent augmentant la synthèse de l'AA4RP, un agent augmentant
5 le transport ou la sécrétion de l'AA4RP, un compétiteur de l'AA4RP, un agent mimant l'activité de l'AA4RP, etc..

Selon un premier mode préféré de mise en œuvre, le procédé de l'invention comprend la détermination de la capacité d'un composé test à augmenter la
10 synthèse de l'AA4RP, c'est-à-dire notamment la transcription ou la traduction de son gène ou ARN.

Selon un autre mode préféré de mise en œuvre, le procédé de l'invention comprend la détermination de la capacité d'un composé test à augmenter la
15 concentration de l'AA4RP dans les particules HDL.

Selon un autre mode préféré de mise en œuvre, le procédé de l'invention comprend la détermination de la capacité d'un composé test à augmenter la
20 concentration de l'AA4RP dans les particules VLDL.

Selon un autre mode préféré de mise en œuvre, le procédé de l'invention comprend la détermination de la capacité d'un composé test à mimer l'action
biologique de l'AA4RP. Comme illustré dans les exemples, cette action
biologique comprend notamment la réduction des concentrations de
25 triglycérides ou d'apo CIII.

Le procédé de l'invention peut être mis en œuvre de différentes façons, en tests *in vitro*, cellulaires ou acellulaires, ou *in vivo*. Il peut s'agir de tests de liaison, de tests fonctionnels, etc..

30 Un premier test est basé sur la mesure d'une interaction entre un composé et l'AA4RP. Dans ce mode de réalisation, le procédé comprend la mise en contact du composé test avec l'AA4RP ou un fragment de celle-ci et la détermination de la liaison du composé test à l'AA4RP ou au fragment.

35

Cet test peut être réalisé *in vitro*, dans tout dispositif approprié (tube, boîte, flasque, etc.). Il peut éventuellement être réalisé avec l'un des partenaires immobilisé, par exemple l'AA4RP (colonne, bille, support, verre, filtre, membrane, etc.). La liaison du composé test peut être mise en évidence par
5 toute technique connue, notamment par électrophorèse, migration sur gel, immunochimie, etc.. La liaison peut notamment être mise en évidence en effectuant la réaction en présence d'un ligand marqué de l'AA4RP et en mesurant le déplacement de la liaison du ligand marqué par le composé test. Le ligand marqué peut être par exemple un anticorps anti-AA4RP ou un fragment
10 ou dérivé d'un tel anticorps.

Un autre type de test selon l'invention est basé sur l'activité transcriptionnelle de l'AA4RP. Ce procédé comprend la mise en contact du composé test avec un
15 acide nucléique comprenant tout ou une partie de la séquence du promoteur du gène de l'AA4RP et la détermination de la liaison du composé test à l'acide nucléique ou de la modulation de l'activité de l'acide nucléique par le composé test.

Pour la mise en œuvre du test de liaison, il est possible d'utiliser un acide
20 nucléique comprenant tout ou partie de la séquence du promoteur, et de déterminer *in vitro* la capacité d'un composé test de lier celle-ci. La partie de la séquence comporte de préférence au moins 10 nucléotides consécutifs de la séquence du promoteur, encore plus préférentiellement au moins 20 nucléotides consécutifs de la séquence du promoteur. Par ailleurs, il est
25 possible de tester en parallèle plusieurs fragments de la séquence du promoteur.

Pour la mise en œuvre du test transcriptionnel, on utilise avantageusement un système rapporteur comprenant tout ou partie du promoteur du gène AA4RP
30 liée de manière opérationnelle à un gène rapporteur. A cet égard, un mode préféré de mise en œuvre du procédé comprend la mise en contact du composé test avec une cellule comprenant un gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur transcriptionnel comprenant tout ou une partie de la séquence du promoteur du gène de l'AA4RP, et la détermination de l'effet du composé test
35 sur l'expression du gène rapporteur.

Un autre mode de mise en œuvre du procédé selon l'invention comprend la mise en contact du composé test avec une cellule exprimant l'AA4RP ou un fragment de celle-ci et la détermination de l'effet du composé test sur l'expression ou la sécrétion de l'AA4RP ou du fragment par la cellule.

Les procédés de l'invention peuvent être mis en œuvre avec différents types de cellules, de promoteur, de gènes rapporteurs, et dans différentes conditions, comme il est décrit ci-après.

10

a) Cellule hôte

Certaines méthodes de criblage, décrites par l'invention, prévoient une étape de mise en contact du composé test avec des cellules hôtes, dans des conditions particulières qui permettent de déterminer l'expression dans lesdites cellules d'un gène rapporteur, ou l'expression de l'AA4RP, ou d'autres étapes de la synthèse de l'AA4RP, et d'obtenir ainsi une information concernant l'effet du composé test. Classiquement, l'effet du composé test est comparé au niveau d'expression (du gène rapporteur) ou à l'activité déterminée en l'absence dudit composé.

20

Les cellules utilisées peuvent être toute cellule cultivable en laboratoire. Dans un mode préféré de l'invention, il s'agit de cellules de mammifères (hépatocytes, fibroblastes, cellules endothéliales, musculaires, etc.). De manière encore plus préférée, ces cellules sont d'origine humaine. Il peut s'agir de cultures primaires ou de lignées établies. Dans un autre mode de mise en œuvre, il est possible également d'utiliser des cellules procaryotes (bactéries), des cellules de levure (*Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, etc.), des cellules végétales, etc..

30 b) Système rapporteur

Selon certains modes de réalisation, l'invention met en œuvre un système rapporteur comprenant un gène rapporteur placé sous le contrôle d'un promoteur particulier. Cette construction, ou toute cassette ou vecteur la contenant, est introduite dans des cellules hôtes, utilisables pour des tests

35

cellulaires.

Ledit gène rapporteur peut être notamment tout gène dont le produit de transcription ou d'expression peut être détecté ou dosé dans des extraits
5 biologiques. Il peut s'agir, par exemple, du gène codant pour l'AA4RP humaine lui-même, ou encore du gène codant pour la luciférase et plus particulièrement pour la luciférase de luciole ou pour celle de Renilla, pour la phosphatase alcaline sécrétée, la galactosidase, la lactamase, la Chloramphenicol acetyl transférase (CAT), l'hormone de croissance humaine (hGH), la β -glucuronidase
10 (Gluc) et la Green fluorescent protein (GFP) etc.. Il est entendu que le terme « gène » désigne, au sens large, tout acide nucléique, notamment un ADNc, un ADNg, un ADN synthétique, un ARN, etc..

Le gène rapporteur, quel qu'il soit, est placé sous le contrôle d'un promoteur
15 comprenant au moins une partie de la séquence du promoteur du gène AA4RP tel que défini ci-avant ou d'un variant fonctionnel de celle-ci. Cette séquence particulière peut être présente à raison d'une ou de plusieurs copies dans le promoteur (préférentiellement 1 à 10 et encore plus préférentiellement 1 à 6), en amont ou en aval ou en interne, dans la même orientation ou dans
20 l'orientation opposée. Dans un mode préféré de mise en oeuvre de l'invention, le gène rapporteur est placé sous le contrôle d'un promoteur qui comprend la séquence complète du promoteur du gène AA4RP, notamment humain.

A cet égard, un objet de l'invention concerne également un acide nucléique
25 comprenant un gène rapporteur sous contrôle d'un promoteur comprenant tout ou partie de la séquence du promoteur du gène AA4RP, notamment humain. La partie de la séquence du promoteur comprend avantageusement au moins 10 nucléotides consécutifs de cette séquence, de préférence au moins 20, plus préférentiellement au moins 30, encore plus préférentiellement au moins 50. Le
30 promoteur peut comprendre en outre des régions hétérologues, provenant d'autres gènes ou promoteurs, comme par exemple des signaux silencieux ou enhanceurs, des séquences conférant un caractère régulable ou spécifique de tissu, etc.. Le promoteur peut être un promoteur hybride associant des régions
35 kinase (TK) du virus de l'herpès, du promoteur immédiat du CMV, du

promoteur PGK, du promoteur SV40, etc..

La construction peut être introduite dans tout vecteur approprié, tel qu'un plasmide, cosmide, phage, virus, etc.. La construction ou le vecteur peut être
5 introduit dans une cellule hôte par toute méthode classique, telle que électroporation, précipitation au phosphate de calcium, liposomes, agents transfectants, etc.. Les cellules ou leur descendance peuvent être cultivées dans tout milieu approprié (DMEM, RPMI, etc.).

10 c) Mise en contact

Les composés tests peuvent être mis au contact des cellules à différents moments, selon leur(s) effet(s), leur concentration, la nature des cellules et l'appréciation technique. Le contact peut être effectué sur tout support
15 approprié et notamment sur une plaque, une boîte, dans un tube ou une flasque. Généralement, la mise en contact est réalisée dans une plaque multi-puits ce qui permet de conduire, en parallèle, des essais nombreux et variés. Parmi les supports typiques on trouve des plaques de microtitration et plus particulièrement des plaques 96 ou 384 puits (ou plus), faciles à manipuler.

20 Selon le support et la nature du composé test, des quantités variables de cellules peuvent être utilisées lors de la mise en œuvre des méthodes décrites. De manière classique entre 10^3 et 10^6 cellules sont mises en contact avec un type de composé test, dans un milieu de culture approprié, et de manière
25 préférentielle entre 10^4 et 10^5 cellules. A titre d'exemples : dans une plaque de 96 puits, 10^5 cellules peuvent être incubées dans chaque puit avec une quantité voulue d'un composé test ; dans une plaque à 384 puits, moins de 10^5 cellules et typiquement entre 1×10^4 et 4×10^4 cellules sont généralement incubées dans chaque puit avec le composé test.

30 La quantité (ou la concentration) de composé test peut être ajustée par l'utilisateur selon le type de composé (sa toxicité, sa capacité de pénétration cellulaire, etc.), le nombre de cellules, la longueur de la période d'incubation, etc.. Généralement, les cellules sont exposées à des quantités de composés test
35 qui varient de 1nM à 1mM. Il est bien sûr possible de tester d'autres

concentrations sans dévier de la présente invention. Chaque composé peut de plus être testé en parallèle à différentes concentrations.

5 Différents adjuvants et/ou vecteurs et/ou produits facilitant la pénétration des composés dans les cellules tels que des liposomes, des lipides cationiques ou des polymères peuvent en outre être utilisés, si nécessaire.

10 Le contact est typiquement maintenu entre quelques minutes et plusieurs heures, généralement entre 1 et 48 heures. En particulier, lorsque le test comprend l'expression d'un gène rapporteur, les cellules et les divers réactifs doivent, de préférence, rester en contact suffisamment longtemps pour permettre la synthèse de novo du produit d'expression du gène rapporteur.

d) Mesure de l'effet

15

La mesure ou la mise en évidence d'un effet du composé test peut être réalisée de différentes façons, selon le test utilisé.

20 Des méthodes de détection de la liaison in vitro ont été mentionnées ci-avant. Pour des test cellulaires impliquant la détection ou la mesure de l'expression d'un système rapporteur, plusieurs solutions sont envisageables.

25 Il peut s'agir d'une détermination de l'activité transcriptionnelle. A cette fin, l'ARN total est extrait des cellules en culture dans des conditions expérimentales d'une part et dans une situation témoin d'autre part. Cet ARN est dosé (ou utilisé comme sonde) pour analyser les changements dans l'expression du ou des gène(s) rapporteur(s).

30 Il peut également s'agir d'une révélation ou d'un dosage du produit d'expression du gène rapporteur. Cette révélation (ou ce dosage) peut être obtenue à l'aide de techniques variées dont la nature dépend du type de gène rapporteur utilisé. La mesure peut, par exemple, correspondre à une densité optique ou à une émission fluorescente dans le cas d'une utilisation comme gène rapporteur du gène codant pour la β -galactosidase ou la luciférase.

35

Dans un mode particulier, l'expression du gène rapporteur est mesurée à travers le niveau d'hydrolyse d'un substrat du produit d'expression du gène rapporteur. Par exemple, de nombreux substrats peuvent être utilisés pour évaluer l'expression de la β -lactamase. Il peut notamment s'agir de tout produit
5 contenant un noyau β -lactame et dont l'hydrolyse peut être contrôlée. Les substrats préférés sont ceux spécifiques de la β -lactamase (i.e., ils ne sont généralement pas hydrolysés dans les cellules de mammifères en l'absence de β -lactamase), ceux qui ne sont pas toxiques à l'égard des cellules de mammifères et/ou dont le produit d'hydrolyse peut être contrôlé facilement, par
10 exemple par des méthodes basées sur la fluorescence, la radioactivité, une activité enzymatique ou toute autre méthode de détection.

Le produit d'expression peut également être dosé par des techniques immunologiques ou immunoenzymatiques, comme par exemple au moyen d'un
15 anticorps spécifique. Ce système est particulièrement adapté pour doser par exemple l'AA4RP synthétisée par une cellule traitée ou non traitée par un composé test.

D'une manière générale, la présence du produit du gène rapporteur (ou du produit d'hydrolyse du substrat) peut être déterminée par des méthodes
20 classiques connues de l'homme du métier (fluorescence, radioactivité, D.O., luminescence, FRET (voir WO 0037077), SPA, biopuces, méthodes immunologiques, etc.). Généralement, on détermine l'activité d'un composé test dans une cellule et cet effet est comparé au niveau d'activité en l'absence de
25 composé test ou à une valeur moyenne déterminée en l'absence de tout composé test.

Un test secondaire permettant de valider, chez l'animal, la sélection des composés, peut aussi être réalisé grâce à la détermination de la quantité d'HDL
30 exprimées ou grâce à la détermination d'une variation significative du transport inverse du cholestérol au niveau de cellules traitées avec lesdits composés par comparaison avec des cellules non traitées. Il est également possible de mesurer le taux plasmatique de triglycérides et/ou d'apo CIII.

Les composés susceptibles d'être identifiés par le procédé de l'invention peuvent être des composés de nature, structure et origine variées, notamment des composés biologiques, des facteurs nucléaires, des cofacteurs, etc., des composés chimiques, synthétiques, etc.. Il peut s'agir également de banques, 5 notamment de chimiothèques ou de banques de protéines, de peptides ou d'acides nucléiques, etc..

Utilisation des composés

10 Compte tenu des propriétés fonctionnelles physiologiques de la cible utilisée, les composés capables d'augmenter ou de mimer l'activité de l'AA4RP (éventuellement identifiés par les méthodes décrites ci-avant) peuvent être utilisés pour le traitement de pathologies variées, notamment pour le traitement curatif ou préventif de pathologies cardiovasculaires, du syndrome 15 métabolique et l'athérosclérose.

A cet égard, l'invention concerne généralement l'utilisation d'un composé augmentant ou mimant l'activité de l'AA4RP pour la préparation d'un médicament destiné au traitement curatif ou préventif de pathologies 20 métaboliques ou cardiovasculaires. Il s'agit plus particulièrement de pathologies telles que l'athérosclérose (due à une dyslipoprotéinémie ou non), l'insulino-résistance, le diabète de type II, etc..

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un composé augmentant 25 ou mimant l'activité de l'AA4RP pour la préparation d'un médicament destiné à réduire le taux de triglycérides et/ou d'apo CIII dans le sang, en particulier pour réduire le taux de lipoparticules riches en triglycérides ou en apo CIII.

Un autre objet de l'invention porte sur l'utilisation d'un composé augmentant 30 ou mimant l'activité de l'AA4RP pour la préparation d'un médicament destiné à réguler le transport inverse du cholestérol.

Dans le contexte de l'invention, le terme « traitement » désigne le traitement 35 préventif, curatif, palliatif, ainsi que la prise en charge des patients (réduction de la souffrance, amélioration de la durée de vie, amélioration de la qualité de

vie, ralentissement de la progression de la maladie), etc.. Le traitement peut en outre être réalisé en combinaison avec d'autres agents ou traitements, notamment adressant les événements tardifs de la pathologie ou d'autres principes actifs. Comme indiqué ci-dessus, les composés utilisés sont
5 préférentiellement des activateurs sélectifs de l'activité de l'AA4RP.

Comme indiqué ci-avant, le composé utilisé est préférentiellement un composé qui mime l'activité de l'AA4RP, stimule l'expression ou la sécrétion de l'AA4RP et/ou augmente la concentration de l'AA4RP dans les particules HDL qui sont
10 réputées pour avoir un rôle protecteur contre l'athérosclérose, principalement du fait de leur capacité à extraire le cholestérol des cellules périphériques et à promouvoir son retour vers le foie où il est éliminé [20].

L'invention concerne également des méthodes de traitement de pathologies
15 cardiovasculaires comprenant l'administration à un sujet d'un activateur (sélectif) de l'AA4RP, notamment d'un composé qui mime l'activité de l'AA4RP, stimule l'expression ou la sécrétion de l'AA4RP et/ou augmente la concentration de l'AA4RP dans les particules HDL. L'administration peut être réalisée par toute voie classique pour ce type d'approche thérapeutique, comme
20 notamment par voie systémique ou orale, en particulier, par injection, notamment intraveineuse, intradermique, sous-cutanée, intra-péritonéale, intramusculaire, intra-artérielle, etc..

Applications diagnostiques/dosages

25 L'invention peut également être utilisée pour le diagnostique, le dépistage ou la détection de désordres métaboliques.

A cet égard, l'invention concerne aussi une méthode pour la détection d'un
30 désordre métabolique ou cardiovasculaire chez un sujet, ou d'une prédisposition à un tel désordre, comprenant une étape de détermination, dans un échantillon provenant du sujet, de la présence ou de la quantité d'AA4RP ou de l'ARN correspondant.

L'invention concerne également une méthode pour la détection d'un désordre métabolique ou cardiovasculaire chez un sujet, ou d'une prédisposition à un tel désordre, comprenant une étape de détermination, dans un échantillon provenant du sujet, de la présence d'une altération dans la séquence de
5 l'AA4RP ou de son gène ou ARN.

L'invention est également applicable au suivi de l'efficacité d'un traitement thérapeutique, vaccinal, diététique, etc., comprenant le dosage de l'AA4RP dans un échantillon d'un sujet. Le dosage peut être effectué à différents intervalles
10 de temps au cours du traitement.

Le dosage ou la détection de l'AA4RP peut être effectué avantageusement au moyen d'un anticorps tel que décrit ci-avant. Dans ce contexte, un essai quantitatif chez l'homme peut être développé avantageusement sur le système
15 d'immunochimie IMAGE® ou ARRAY® (Beckman Coulter, Villepinte, France) qui permet de doser par immuno-néphélométrie cinétique compétitive ou non, avec une grande précision, les protéines plasmatiques. Il est entendu que toute autre technique de dosage, immunologique ou non, par exemple RIA, ELISA, chromatographie, Dot Blot, immuno-turbidimétrie etc., peut être utilisée. En
20 outre, le dosage peut porter également sur les ARNs codant l'AA4RP. Dans ce cas, le dosage peut se faire par exemple par hybridation avec une sonde nucléique complémentaire de tout ou partie de la séquence de l'ARNm.

Dans ce contexte, l'invention concerne également une sonde nucléique
25 comprenant tout ou une partie de la séquence codant l'AA4RP et marquée. La sonde est préférentiellement un acide nucléique simple-brin. Elle peut être marquée par tout système connu, tel que radioactivité, fluorescence, luminescence, enzyme, etc.. La sonde comprend de préférence moins de 500 nucléotides, plus préférentiellement moins de 400 nucléotides. Elle peut être
30 immobilisée sur un support, par exemple une lame de verre, de silice, une membrane de nylon, une bille, une colonne, etc..

L'invention concerne également des kits pour la mise en œuvre de méthodes de diagnostique, dépistage ou de détection de désordres métaboliques, ou pour le
35 criblage ou la sélection de molécules actives. Ces kits comprennent

avantageusement un anticorps ou une sonde ou une amorce spécifiques de l'AA4RP ou d'un variant de celle-ci et, avantageusement, des réactifs pour la réalisation de réactions de détection ou d'amplification ou d'hybridation. Les kits pour la sélection de composés peuvent comprendre, avantageusement, un système rapporteur tel que décrit ci-avant et des réactifs pour la révélation de l'expression du gène rapporteur, ou un acide nucléique comprenant une partie du gène ou du promoteur AA4RP, par exemple.

La présente demande sera décrite en détails à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

LEGENDE DES FIGURES

Figure 1 : Contrôle en SDS PAGE de la spécificité des anticorps anti-AA4RP et mise en évidence de la distribution de l'AA4RP dans les VLDL et les HDL.

Figure 2 : Détection de l'AA4RP plasmatique par électrophorèse bidimensionnelle et blotting.

Figure 3 : Effet de la sur-expression de l'AA4RP sur le taux de triglycérides.

Figure 4 : Effet de la sur-expression de l'AA4RP sur le taux d'apo CIII dans des animaux transgéniques AA4RP et contrôles.

Figure 5 : Effet de la surexpression de l'AA4RP sur le taux d'apo CIII dans des animaux « Knock-Out » AA4RP homozygotes et hétérozygotes.

Figure 6 : Distribution des triglycérides au niveau des différentes lipoparticules chez des souris transgéniques AA4RP et contrôles.

EXEMPLES

Exemple 1 Séquence peptidique

1. Choix de la séquence peptidique appropriée

Le fragment peptidique suivant a été synthétisé. Ce fragment a été déterminé en utilisant différents algorithmes permettant de prédire la flexibilité,

l'hydrophilicité, l'antigénicité, et les structures secondaires. Ce fragment de 95 acides aminés correspond aux résidus 20 à 114 de la séquence SEQ ID NO 1.

ATQARKGFWDYFSQTSGDKGRVEQIHQQKMAREPATLKDSLEQDLNNMNKFLEK
5 LRPLSGSEAPRLPQDPVGMRRQLQEELEEVKARLQPYMAEA

2. Synthèse peptidique.

Le peptide a été synthétisé par la méthode de synthèse en phase solide [14] sur
10 un synthétiseur automatique modèle ABI 431 A (Applied Biosystems Inc.,
Californie, USA) en utilisant une stratégie Boc/Bzl sur une résine MBHA 0,5
mmol (0,57 mmol/g). Chaque acide aminé a été couplé deux fois en présence de
dicyclohexylcarbodiimide/hydroxybenzotriazole sans capping. Les groupes
protecteurs de chaîne latérale sont les suivants : Arg(Ts), Asp(Ochex),
15 Glu(Ochex), Lys(2-Cl-Z), His(Dnp), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Met(O), Trp(formy) et
Tyr(Br-Z).

Le groupe Dnp sur le résidu Histidine a été éliminé du peptide avant clivage à
partir du support par traitement en présence de β -mercaptoéthanol 10%,
20 diisopropyléthylamine 5% dans un milieu DCM pendant 2 heures puis dans un
milieu NMP pendant 2 heures. La résine peptidyle a été traitée avec du TFA
50% dans un milieu DCM pendant 20 minutes pour éliminer l'acide aminé
terminal Boc. Le peptide a été clivé de la résine et déprotégé simultanément
selon une procédure à HF lente et rapide : la résine (1 g) a été traitée avec du
25 HF anhydre (2,5 ml) en présence de p-crésol (0,75 g), p-thiocrésol (0,25 g) et de
diméthylsulfure (0,5 ml) à 0°C.

3 heures après, le fluorure d'hydrogène et le diméthylsulfure ont été éliminés
par évaporation sous vide et les scavengers résiduels et les produits
30 secondaires ont été extraits avec de l'éther diéthylique. Les appareils de la
réaction ont été rechargés avec du p-crésol (0,75 g), du p-thiocrésol (0,25 g) et
10 ml de HF anhydre puis le mélange a été laissé en incubation à 0°C pendant
1 heure et demie. Le fluorure d'hydrogène a été éliminé par évaporation et le
résidu a été mélangé en présence d'éther diéthylique. Le résidu a été filtré, lavé

avec de l'éther diéthylique et extrait avec 200 ml d'une solution d'acide acétique aqueuse à 10% puis lyophilisé.

3. Spectrométrie de masse

5

La masse moléculaire a été déterminée en utilisant un spectromètre de masse à électrospray d'ions. Le spectre de l'électrospray a été obtenu en utilisant un appareil API (Perkin-Elmer-Sciex) sur un spectromètre de masse par électrospray d'ions à quadrupole simple, équipé avec un spray d'ions
10 (électrospray assisté d'un nébuliseur) (Sciex, Toronto, Canada).

4. Immunisation

Le peptide a été émulsifié dans l'adjuvant complet de Freud et injecté par voie
15 sous-cutanée à des lapins en utilisant 0,5 mg de peptide par injection pour les deux premières injections, suivi à 15 jours d'intervalle d'injections de rappel dans le même adjuvant mais en utilisant 0,25 mg de peptide seulement.

Exemple 2 : Isolement d'anticorps de lapin anti-AA4RP spécifiques.

20

Les anticorps polyclonaux ont été isolés par précipitation avec 27% de sulfate de sodium puis purifiés par chromatographie d'affinité sur gel de sépharose 4B activé (pharmacia, Uppsala, Suède), couplé avec le peptide de l'AA4RP résidu 20 à 114 AA [21]. Les protéines non retenues sur le gel antigénique ont été
25 éliminées par lavage avec une solution saline tamponnée phosphate (PBS : Phosphate 50 mmol/L, pH 7,2, NaCl 150 mmol/L). Les fractions non liées de manière spécifique sur le gel AA4RP ont été éliminées par 25 mmol/L de PBS. L'éluion des IgG polyclonales spécifiques de l'AA4RP a été accomplie en utilisant la glycine 0,2 M à pH 2,8. Les anticorps purifiés ont été dialysés
30 immédiatement contre 10 mmol/L de PBS puis concentrés par ultrafiltration en utilisant un système Amicon (seuil de coupure 100 kD) (Amicon, Beverly, USA), testés en terme de contenu en protéine [22], puis conservés par aliquotes de 1 ml (1 mg) à - 30°C.

1. Analyse en Western Blot

1.1- Protocole :

5 La pureté et la spécificité de l'anticorps ont été testées en Western Blot [23].

Des particules VLDL, LDL et HDL humaines ont été soumises à une électrophorèse dénaturante sur gel SDS-PAGE (5 à 24%) puis transférées sur une membrane de nitrocellulose et mises à réagir avec l'anticorps anti-AA4RP
10 humaine purifié. Les protéines immunoréactives ont été visualisées avec un anticorps polyclonal anti-IgG conjugué à la peroxydase de raifort (Sanofi-Diagnostics Pasteur, Mares-la-Coquette, France). Le développement de la réaction est effectué par chemiluminescence (Amersham, Pharmacia, Biotec).

1.2- Résultats :

Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 1. Il apparaît sur cette figure que la bande spécifique qui est révélée par l'anticorps anti-AA4RP est située entre les marqueurs de poids moléculaire 32,5 et 47,5 kDa.

1.3- Interprétation :

Le résultat de l'immunoblot sur les différentes lipoprotéines humaines, montrent une localisation de l'AA4RP au niveau des VLDL et des HDL, avec une distribution très majoritaire au niveau des HDL.

25 La présence de l'AA4RP au niveau des VLDL expliquerait le rôle de cette apolipoprotéine dans la régulation du métabolisme de ces lipoprotéines riche en triglycérides, et donc la modulation de la concentration de ces lipides athérogènes.

30 La localisation de l'AA4RP au niveau des HDL est certainement en relation avec le rôle de ces particules dans le transport inverse du cholestérol. En effet la plupart des apolipoprotéines localisées au niveau des HDL sont des promoteurs de la captation du cholestérol des cellules périphériques par les HDL et de son
35 retour vers le foie où il est éliminé.

2. Electrophorèse bidimensionnelle et blotting

2.1- Protocole :

5

Les échantillons étudiés sont :

- un plasma de souris contrôle,
- un plasma de souris transgénique AA4RP humaine.

10 20 µl de chaque échantillon ont été appliqués dans des puits d'échantillons de 1,5 cm dans un gel d'agarose à 0,75% dans un tampon barbital 50 mmol à pH 8,6 sur Gelbond (FMC Bio-Products, New Jersey, USA). L'électrophorèse a été réalisée dans la première dimension jusqu'à ce que le marqueur albumine coloré par le bleu de bromophénol ait migré de 7,5 cm. L'électrophorèse dans la

15 seconde dimension a été réalisée dans un gradient de gel de polyacrylamide de 2 à 15% (15 x 15 cm). Des échantillons (0,5 x 7 cm) ont été découpés du gel d'agarose, placés de manière horizontale les uns à la suite des autres dans le gel de polyacrylamide et recouverts par de l'agarose à 1%. L'électrophorèse a été

20 réalisée à 4°C dans 25 mM de tris-(hydroxyméthyl) aminomethane (Tris)-glycine (pH 8,3) à 100 V pendant 19 heures. Les gels ont été immunoblottés sur des membranes de nitrocellulose (Sartorius 0,45 µm) dans un tampon de 25 mM tris-(hydroxyméthyl) aminomethane (Tris)-glycine (pH 8,3) en utilisant un système de blotting semi-sec (Pharmacia, umeå, Suède). Les membranes ont été

25 incubées avec les anticorps polyclonaux anti- et ceux liés spécifiquement à l'AA4RP sont révélés par un anti IgG de lapin marqué à la peroxydase. Le développement de la réaction enzymatique est effectué par chemiluminescence (Amersham, Pharmacia, Biotec).

1.2- Résultats :

30

Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 2. Ils montrent que, chez les souris transgéniques ou contrôle, on observe que l'AA4RP est située au niveau des préβ-HDL, alors que la présence de l'apolipoprotéine au niveau des α-HDL n'est observée que dans le cas des souris transgéniques AA4RP humaine.

35

1.3- Interprétation :

La présence de l'AA4RP au niveau des pré β -HDL est un deuxième argument en faveur de l'implication de cette apolipoprotéine dans l'efflux du cholestérol des cellules périphériques vers le foie. La présence de façon importante de l'AA4RP au niveau des α -HDL après transgénèse, alors qu'elle est totalement absente dans cette sous fraction d'HDL chez les contrôles, est un élément très intéressant. Cette redistribution différente serait en liaison avec la maturation des HDL, où l'AA4RP modulerait les différents facteurs impliqués dans le métabolisme des HDL, tel que la CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein), la LCAT (Lecithin: Cholesterol AcylTransferase) ou la PLTP (Phospholipide Transfer Protein).

Exemple 3 : Effet de la sur-expression d'AA4RP sur le taux de triglycérides

15

1.- Protocole :

Des échantillons provenant de souris transgéniques AA4RP ou de souris contrôles, ayant subi un régime hyperlipidique, ont été dilués au 1/3 ou au 1/5 dans du sérum physiologique, puis dosés en triglycérides contre une gamme standard, préparée grâce au calibrateur des lipides CFAS Réf. N° 759350 (Boehringer Mannheim GmbH, Allemagne). La gamme standard a été construite de 16 à 500 $\mu\text{g/ml}$. 100 μl de chaque dilution d'échantillon ou de gamme étalon sont déposés par puits d'une plaque de titration (96 puits). Ensuite 200 μl de réactifs triglycérides Réf. 701912 (Boehringer Mannheim GmbH, Allemagne) sont rajoutés dans chaque puits, et l'ensemble de la plaque est incubé pendant 30 min. à 37°C. La lecture des Densités Optiques (DO) est effectuée à 492 nm sur le spectrophotomètre. Les concentrations en triglycérides de chaque échantillon sont calculées après construction de la courbe étalon selon une fonction linéaire $y=ax+b$, où y représente les DO et x les concentrations en triglycérides.

2- Résultats :

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau I ci-dessous ainsi que dans la Figure 3.

Tableau I

	Souris Contrôles	Souris transgéniques AA4RP
Nombre de sujets	13	21
Triglycérides (mg/ml)	1,039	0,361
Ecart type (mg/ml)	0,249	0,101

5

Les résultats obtenus montrent que la diminution des triglycérides est très significative (test de student $p < 0,001$) chez les souris transgéniques AA4RP.

3- Interprétation :

10

L'augmentation des triglycérides chez les souris contrôle après un régime riche en lipides est fortement atténuée après transgénèse. Cette baisse est probablement due à une accélération du catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides tel que les chylomicrons et les VLDL, suite à une augmentation de l'activité des différents acteurs de ce catabolisme, comme par exemple une augmentation de l'activité de la lipoprotéine lipase (LpL), une augmentation des cofacteurs de l'activation de la LpL ou une baisse de facteur inhibant cette activité comme l'apo CIII.

15

20 Exemple 4 : Effet de la sur-expression d'AA4RP sur le taux d'Apo CIII

1- Protocole :

L'apo CIII des souris sur-exprimant l'AA4RP humaine a été dosée par la méthode immuno-néphélométrique sur le système d'immunochimie ARRAY® (Beckman Coulter, Villepinte, France). Un pool de sérum de souris normolipidiques a été utilisé comme standard dont la valeur en apo CIII est de 25 µg/ml. Une gamme étalon allant de 4 µg/ml à 25 µg/ml, est construite par dilution du standard dans du phosphate potassique 0,01 M pH 7,2.

30

Les échantillons de plasma de souris sur-exprimant l'AA4RP humaine ou non, ayant obtenues un régime hyperlipidique, et des échantillons de plasma de souris homozygotes knock out (-/-), hétérozygotes (+/-) ou de type sauvage (+/+) sont dilués au 1/6 ou au 1/12 dans les mêmes conditions que le standard.

5 42 µl de chaque point de la gamme étalon ainsi que chaque dilution d'échantillon des différentes souris impliquées dans l'étude, sont mis en contact avec 42 µl d'anti-apo CIII de souris (dans une cuve réactionnelle contenant du polyéthylène glycol (PEG)). La concentration en apo CIII de l'échantillon est directement proportionnelle au taux de lumière réfléchi par le précipité formé

10 lors de la réaction anticorps-antigène

2- Résultats :

15 a-) Apo CIII des souris transgéniques AA4RP et des souris contrôles (régime riche en lipides)

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau II ci-dessous ainsi que dans la Figure 4.

20

Tableau II :

	Souris contrôles	Souris Transgéniques AA4RP
Nombre de sujets	9	20
Apo CIII (µg/ml)	69,29	30,70
Ecart type (µg/ml)	20,90	10,88

Les résultats obtenus montrent que l'apo CIII est diminuée d'environ trois fois chez les souris transgéniques AA4RP.

25 b-) Apo CIII des souris knock out AA4RP homozygotes (-/-), hétérozygotes (+/-) et de type sauvage (+/+):

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau III ci-dessous ainsi que dans la Figure 5.

30

Tableau III :

	Type sauvage (+/+)	Souris KO (+/-)	Souris KO (-/-)
Nombre	6	11	6
Apo CIII ($\mu\text{g/ml}$)	102,58	115,83	231,75
Ecart type ($\mu\text{g/ml}$)	11,94	38,24	66,33

Les résultats obtenus montrent que les souris knock out AA4RP présentent les concentrations les plus élevées de l'apo CIII.

5

3- Interprétation :

Les résultats de la baisse de l'apo CIII chez les souris transgéniques AA4RP humaine après un régime riche en lipides ou les résultats de l'augmentation de l'apo CIII chez les souris knock out AA4RP, vont en parallèle avec les résultats observées lors de la détermination des concentrations des triglycérides, confirmant ainsi le rôle positif de l'AA4RP dans l'élimination des particules remnants (résiduelles) riche en triglycérides.

15 Exemple 5 : Distribution des triglycérides au niveau des différentes lipoprotéines

1- Protocole :

20 La distribution des triglycérides au niveau des VLDL, LDL et HDL est étudiée par fractionnement de 200 μl de plasma de souris transgénique AA4RP ou souris contrôle après un régime hyperlipidique.

25 Le fractionnement des différentes particules est effectué sur une colonne superose 6 de Pharmacia intégrée dans un système AKTA FPLC (Pharmacia Biotech, Umeå, Suède). Les différentes fractions obtenues sont éluées par un tampon PBS 0,01 M, NaCl 0,1 M, pH 7,2 avec un débit de 0,2 ml par minutes. La concentration des triglycérides au niveau de chaque fraction est déterminée comme précédemment.

30

2- Résultats :

Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 6.

3- Interprétation :

5

L'accumulation des particules riche en triglycérides chez les souris contrôles après un régime riche en lipides, n'est pas observée chez les souris transgéniques AA4RP, ce qui confirme le rôle de l'AA4RP dans l'élimination des particules remnants (résiduelles).

10

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Brewer, H.B., Shulman R., Herbert P., Roman R. and Werrly K., *The complete amino acids sequence of alanine apolipoprotein from plasma very low density lipoprteins*. J. Biol. Chem., 1974. **249**: p. 4975-4984.
5
2. Lenich, C., Brecher P., Makrides S., Chobanian A. and Zannis V.I., *Apolipoprotein gene expression in rabbit: abundance, size and distribution of apolipoprotein mRNA species in different tissues*. J. Lip. Res., 1988. **29**: p. 755-764.
- 10 3. Hoddis, H.N., and Mack W.J., *Triglyceride-rich lipoproteins and the progression of coronary artery disease*. Curr. Opin. Lipidol., 1995. **6**: p. 209-214.
4. Sacks, F.M., et al., *VLDL, apolipoproteins B, CIII, and E, and risk of recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial*. Circulation, 2000. **102**(16): p. 1886-92.
15
5. Westhof, E., et al., *Correlation between segmental mobility and the location of antigenic determinants in proteins*. Nature, 1984. **311**(5982): p. 123-6.
6. Karplus, P.A., and G. E. Schulz, *Prediction of chain flexibility in proteins*.
20 Naturwiss-enschaften, 1985. **72**: p. 212-216.
7. Hoop, T., and K. Woods, *A computer program for predicting protein antigenic determinants*. Molecular Immunology, 1983. **20**: p. 483-489.
8. Kyte, J. and R.F. Doolittle, *A simple method for displaying the hydrophatic character of a protein*. J Mol Biol, 1982. **157**(1): p. 105-32.
- 25 9. Jameson, B.A., and H. Wolf, *The antigenic index : a novel algorithm for predicting antigenic determinants*. Comput. Appl. Biosci., 1988. **4**: p. 181-186.
10. Chou, P.Y. and G.D. Fasman, *Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence*. Adv Enzymol Relat Areas Mol
30 Biol, 1978. **47**: p. 45-148.
11. Garnier, J., D.J. Osguthorpe, and B. Robson, *Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins*. J Mol Biol, 1978. **120**(1): p. 97-120.
12. Vaitukaitis, J., et al., *A method for producing specific antisera with small
35 doses of immunogen*. J Clin Endocrinol Metab, 1971. **33**(6): p. 988-91.

13. Bassiri, R.M., Dvorak J. and Utiger R.D., *Thyrotropin-releasing hormone*, in *Methods of hormone radioimmunoassay*, B.M. In: Jaffe, and Behrman H.R. (Eds), Editor. 1979, New York Academic Press: New York. p. p: 46.
14. Merrifield, R.B., *Solide phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide*. J. Am. Chem. Soc, 1963. **85**: p. 2149-2154.
- 5
15. Harlow, E.a.L., D., ed. *Antibodies: a Laboratory Manual*. 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Publications: New York. pp: 139-243.
16. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
- 10
17. Ward, E.S., et al., *Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli*. Nature, 1989. **341**(6242): p. 544-6.
18. Jones, P.T., Dear P. H., Foote J., Neuberger M. S. and Winter G., *Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse*. Nature, 1986. **321**: p. 522-525.
- 15
19. Riechmann, L., Clark M., Waldmann H. and Winter G., *Monoclonal antibody therapeutic trials in seven patients with T-cell lymphoma*. Nature, 1988. **332**: p. 323-327.
20. Fruchart, J.C. and P. Duriez, *High density lipoproteins and coronary heart disease. Future prospects in gene therapy*. Biochimie, 1998. **80**(2): p. 167-72.
- 20
21. Axen, R., J. Porath, and S. Ernback, *Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides*. Nature, 1967. **214**(95): p. 1302-4.
- 25
22. Lowry O.H., R.J., Farr A.L., and Randall R.J., *Protein measurement with folin phenol reagent*. J. Biol. Chem., 1951. **193**: p. 265-275.
23. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
- 30

REVENDICATIONS

1. Procédé pour la sélection, l'identification ou la caractérisation de composés, caractérisé en ce qu'il comprend la détermination de la capacité d'un composé test à augmenter l'activité de la protéine AA4RP.
5
2. Procédé pour la sélection, l'identification ou la caractérisation de composés, caractérisé en ce qu'il comprend la détermination de la capacité d'un composé test à augmenter la concentration de la protéine AA4RP dans les particules HDL.
10
3. Procédé pour la sélection, l'identification ou la caractérisation de composés, caractérisé en ce qu'il comprend la détermination de la capacité d'un composé test à augmenter la concentration de la protéine AA4RP dans les particules VLDL.
15
4. Procédé pour la sélection, l'identification ou la caractérisation de composés, caractérisé en ce qu'il comprend la détermination de la capacité d'un composé test à mimer l'action biologique de la protéine AA4RP.
20
5. Utilisation d'un composé augmentant ou mimant l'activité de la protéine AA4RP pour la préparation d'un médicament destiné à réduire le taux de triglycérides et/ou d'apolipoprotéine CIII dans le sang, en particulier pour réduire le taux de lipoparticules riches en triglycérides ou en apolipoprotéine CIII.
25
6. Utilisation d'un composé augmentant ou mimant l'activité de la protéine AA4RP pour la préparation d'un médicament destiné au traitement curatif ou préventif de pathologies cardiovasculaires ou du syndrome métabolique.
30
7. Utilisation d'un composé augmentant ou mimant l'activité de la protéine AA4RP pour la préparation d'un médicament destiné à réguler le transport inverse du cholestérol.

8. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que le médicament est destiné au traitement curatif ou préventif de pathologies cardiovasculaires.
- 5 9. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que le médicament est destiné au traitement curatif ou préventif du syndrome métabolique.
10. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que le médicament est destiné au traitement curatif ou préventif de l'athérosclérose.
- 10
11. Utilisation selon l'une des revendications 5 à 7, caractérisée en ce que le composé augmentant l'activité de la protéine AA4RP stimule son expression ou sa sécrétion.
- 15 12. Utilisation selon l'une des revendications 5 à 7, caractérisée en ce que le composé augmentant l'activité de la protéine AA4RP augmente la concentration de la protéine AA4RP dans les particules HDL.

1/3

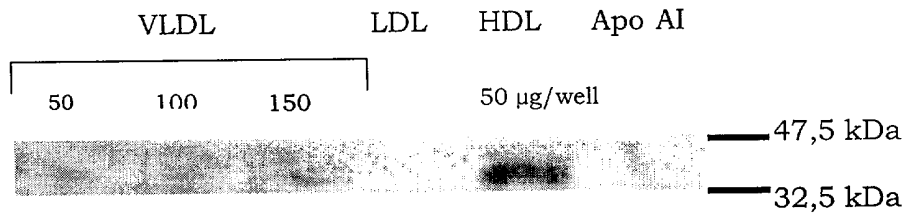


Figure 1

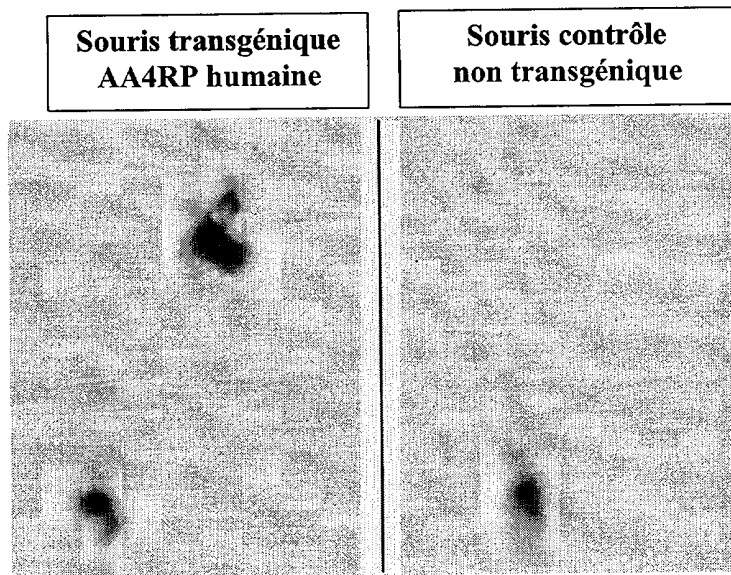


Figure 2

2/3

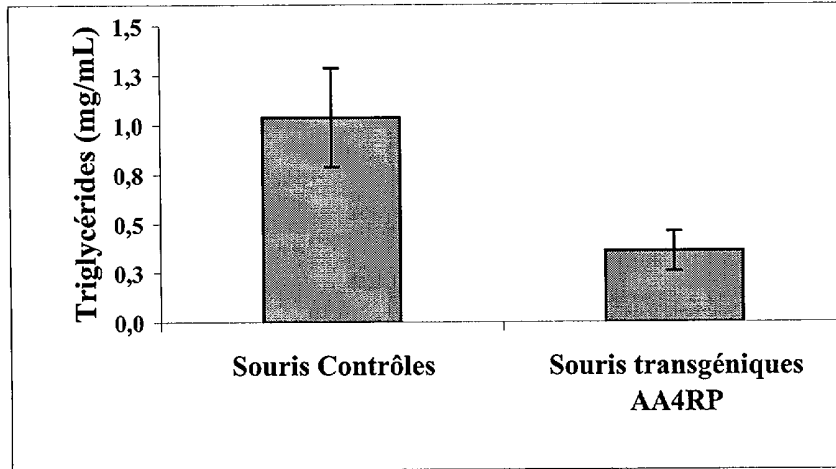


Figure 3

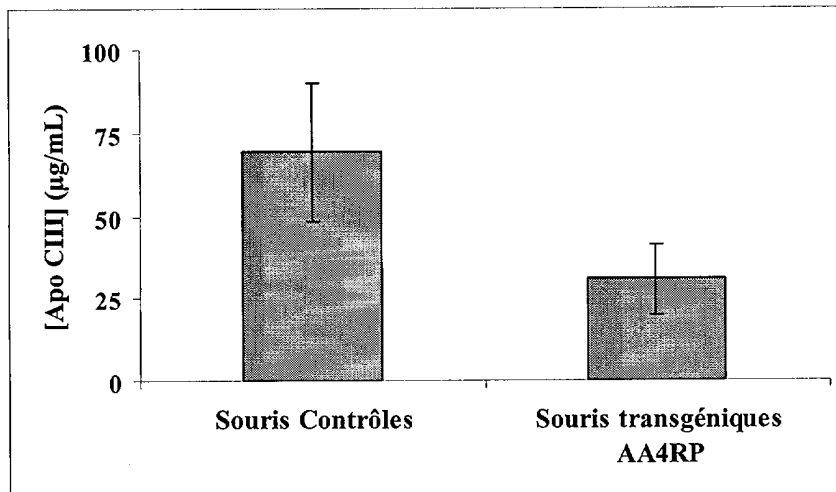


Figure 4

3/3

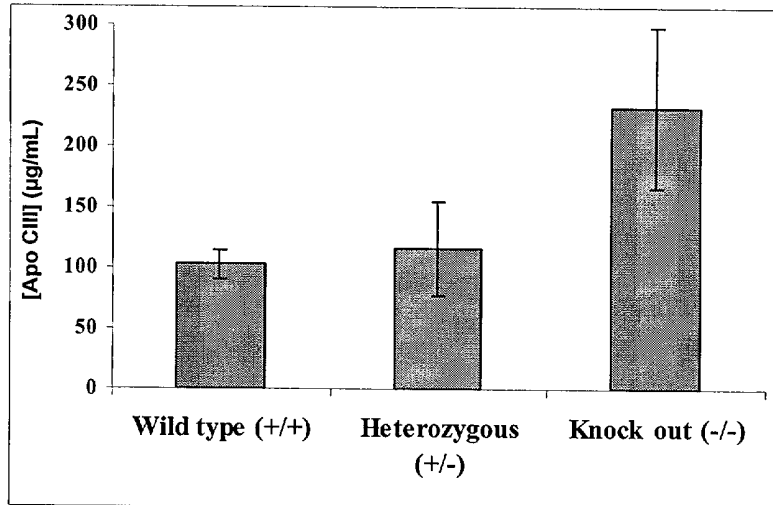


Figure 5

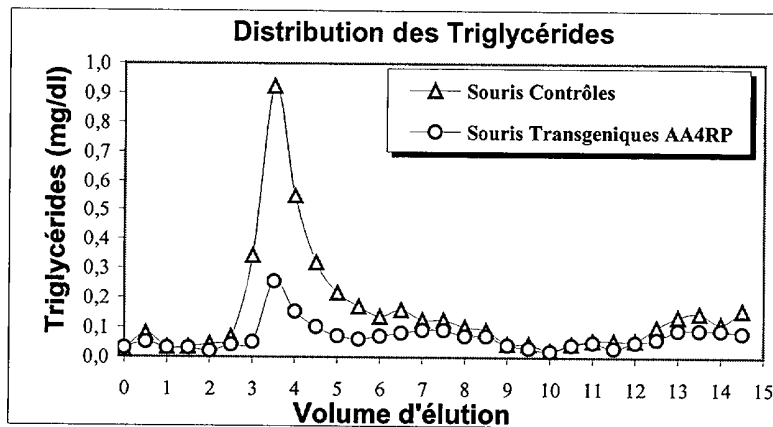


Figure 6

LISTE DE SEQUENCES

<110> GENFIT SA

<120> Methodes de criblage de molecules utiles pour la
prevention ou le traitement du syndrome metabolique,
des maladies cardiovasculaires et de l'atherosclerose

<130> B0093FR

<140>

<141>

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 366

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Ser Met Ala Ala Val Leu Thr Trp Ala Leu Ala Leu Leu Ser
1 5 10 15

Ala Phe Ser Ala Thr Gln Ala Arg Lys Gly Phe Trp Asp Tyr Phe Ser
20 25 30

Gln Thr Ser Gly Asp Lys Gly Arg Val Glu Gln Ile His Gln Gln Lys
35 40 45

Met Ala Arg Glu Pro Ala Thr Leu Lys Asp Ser Leu Glu Gln Asp Leu
50 55 60

Asn Asn Met Asn Lys Phe Leu Glu Lys Leu Arg Pro Leu Ser Gly Ser
65 70 75 80

Glu Ala Pro Arg Leu Pro Gln Asp Pro Val Gly Met Arg Arg Gln Leu
85 90 95

Gln Glu Glu Leu Glu Glu Val Lys Ala Arg Leu Gln Pro Tyr Met Ala
100 105 110

Glu Ala His Glu Leu Val Gly Trp Asn Leu Glu Gly Leu Arg Gln Gln
115 120 125

Leu Lys Pro Tyr Thr Met Asp Leu Met Glu Gln Val Ala Leu Arg Val

130						135										140
Gln	Glu	Leu	Gln	Glu	Gln	Leu	Arg	Val	Val	Gly	Glu	Asp	Thr	Lys	Ala	
145						150					155					160
Gln	Leu	Leu	Gly	Gly	Val	Asp	Glu	Ala	Trp	Ala	Leu	Leu	Gln	Gly	Leu	
				165						170					175	
Gln	Ser	Arg	Val	Val	His	His	Thr	Gly	Arg	Phe	Lys	Glu	Leu	Phe	His	
			180						185						190	
Pro	Tyr	Ala	Glu	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Ile	Gly	Arg	His	Val	Gln	Glu	
		195						200							205	
Leu	His	Arg	Ser	Val	Ala	Pro	His	Ala	Pro	Ala	Ser	Pro	Ala	Arg	Leu	
	210						215								220	
Ser	Arg	Cys	Val	Gln	Val	Leu	Ser	Arg	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Ala	Lys	
225					230					235					240	
Ala	Leu	His	Ala	Arg	Ile	Gln	Gln	Asn	Leu	Asp	Gln	Leu	Arg	Glu	Glu	
					245					250					255	
Leu	Ser	Arg	Ala	Phe	Ala	Gly	Thr	Gly	Thr	Glu	Glu	Gly	Ala	Gly	Pro	
			260						265						270	
Asp	Pro	Gln	Met	Leu	Ser	Glu	Glu	Val	Arg	Gln	Arg	Leu	Gln	Ala	Phe	
		275						280							285	
Arg	Gln	Asp	Thr	Tyr	Leu	Gln	Ile	Ala	Ala	Phe	Thr	Arg	Ala	Ile	Asp	
	290						295								300	
Gln	Glu	Thr	Glu	Glu	Val	Gln	Gln	Gln	Leu	Ala	Pro	Pro	Pro	Pro	Gly	
305						310					315				320	
His	Ser	Ala	Phe	Ala	Pro	Glu	Phe	Gln	Gln	Thr	Asp	Ser	Gly	Lys	Val	
					325					330					335	
Leu	Ser	Lys	Leu	Gln	Ala	Arg	Leu	Asp	Asp	Leu	Trp	Glu	Asp	Ile	Thr	
			340						345						350	
His	Ser	Leu	His	Asp	Gln	Gly	His	Ser	His	Leu	Gly	Asp	Pro			
		355						360					365			

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
D, X	WO 01 00803 A (BOUGUELERET LYDIE ;GENSET SA (FR); DUCLERT AYMERIC (FR); DUMAS MIL) 4 janvier 2001 (2001-01-04) * page 150, ligne 6 - page 163, ligne 27 * * page 27, dernier alinéa * * revendication 12 *	1-4	G01N33/68
X	WO 00 37491 A (BOUGUELERET LYDIE ;DUMAS JEAN BAPTISTE (FR); GENSET SA (FR); DUCLE) 29 juin 2000 (2000-06-29) * page 90, alinéa 3 - page 91, alinéa 2 *	1-4	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
			G01N
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		23 juillet 2002	Gundlach, B
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

**RECHERCHE INCOMPLÈTE
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE C**

Numéro de la demande

FA 612269
FR 0111598

Certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche ou ont fait l'objet d'une recherche incomplète, à savoir:

Revendications ayant fait
l'objet de recherches complètes:
1-4

Revendications n'ayant pas fait
l'objet de recherches:
5-12

Raison:

Les revendications n° 5-12 ne sont pas établies conformément à l'article R.612-16 du code et à l'article 11 de l'arrêté du 19 septembre 1979: elles ne sont pas claires et ne permettent donc pas de définir l'objet pour lequel la protection est demandée.

Les revendications n° 5-12 présentes ont trait à l'utilisation d'un composé défini en faisant référence à une caractéristique ou propriété souhaitable, à savoir sa capacité à augmenter ou mimer l'activité de la protéine AA4RP.

Les revendications couvrent tous les composés présentant cette caractéristique ou propriété, alors que la demande ne fournit aucun fondement pour tels composés. Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d'exposé à un point tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. Indépendamment des raisons évoquées ci-dessus, les revendications manquent aussi de clarté. En effet, on a cherché à définir le composé au moyen du résultat à atteindre. Ce manque de clarté est, dans le cas présent, de nouveau tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible.

En conséquence, la recherche n'a pas été effectuée pour les revendications no 5°-12.

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0111598 FA 612269**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 23-07-2002
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication		Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0100803	A	04-01-2001	AU	1675900 A	12-07-2000
			AU	5838300 A	31-01-2001
			EP	1144444 A2	17-10-2001
			WO	0100803 A2	04-01-2001
			AU	5559400 A	31-01-2001
			AU	5838200 A	31-01-2001
			EP	1200576 A2	02-05-2002
			WO	0100806 A2	04-01-2001
			WO	0100661 A2	04-01-2001
			WO	0037491 A2	29-06-2000
WO 0037491	A	29-06-2000	AU	1675900 A	12-07-2000
			EP	1144444 A2	17-10-2001
			WO	0037491 A2	29-06-2000
			AU	5559400 A	31-01-2001
			AU	5838200 A	31-01-2001
			AU	5838300 A	31-01-2001
			EP	1200576 A2	02-05-2002
			WO	0100806 A2	04-01-2001
			WO	0100661 A2	04-01-2001
			WO	0100803 A2	04-01-2001