

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-522941
(P2004-522941A)

(43) 公表日 平成16年7月29日(2004.7.29)

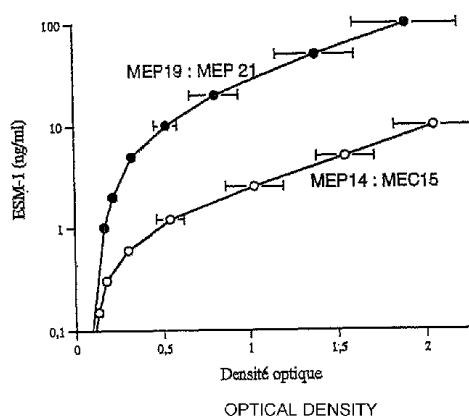
(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 D	4 B O 2 4
CO 7 K 16/18	GO 1 N 33/53 U	4 B O 6 4
C 1 2 N 5/10	CO 7 K 16/18	4 B O 6 5
C 1 2 N 15/02	GO 1 N 33/543 5 1 5 Z	4 H O 4 5
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/574 A	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 83 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-541397 (P2002-541397)	(71) 出願人	500259658
(86) (22) 出願日	平成13年11月8日 (2001.11.8)		アンスティテュ パストゥール ドゥ リル
(85) 翻訳文提出日	平成15年5月9日 (2003.5.9)		フランス共和国 エフ-59019 リル
(86) 国際出願番号	PCT/FR2001/003477		セデックス ボワット ポスタル 24
(87) 国際公開番号	W02002/039123		5 リュ ドゥ プロフェッスール カル
(87) 国際公開日	平成14年5月16日 (2002.5.16)		メット 1
(31) 優先権主張番号	00/14421	(71) 出願人	595166088
(32) 優先日	平成12年11月9日 (2000.11.9)		アンスティテュ ナショナル ドゥ ラ
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		サンテ エ ドゥ ラ ルシェルシュ メ
			ディカル
			フランス国, 75654 パリ セデ 1
			3, リュドゥ トルビアク101
		(74) 代理人	100089705
			弁理士 社本 一夫
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質ESM-1を検出するためのキット及び前記キットを使用する検出方法

(57) 【要約】

本発明は、資料中のESM-1タンパク質の検出のための装置又はキットに関し：a) ESM-1タンパク質のアミノ酸配列の位置20におけるアミノ酸と位置78におけるアミノ酸の間に包含される、前記タンパク質のN末端領域に特異的に結合する第一抗体；及びb) ESM-1タンパク質の配列の位置79におけるアミノ酸と位置184におけるアミノ酸の間に包含される、C末端領域に特異的に結合する第二抗体；を含んでなる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中のタンパク質 E S M - 1 の検出用キットであって：

a) このタンパク質のアミノ酸配列の位置 20 におけるアミノ酸と位置 78 におけるアミノ酸の間に含有されるタンパク質 E S M - 1 の N 末端領域に特異的に結合する第一抗体；及び

b) タンパク質 E S M - 1 のアミノ酸配列の位置 79 におけるアミノ酸と位置 184 におけるアミノ酸の間に含有される C 末端領域に特異的に結合する第二抗体を含んでなるキット。

【請求項 2】

請求項 1 記載の検出用キットであって、タンパク質 E S M - 1 の N 末端領域に特異的に結合する抗体が、真核細胞により産生された組み換えタンパク質 E S M - 1 で哺乳類を免疫化することによって得られたことを特徴とするキット。

【請求項 3】

請求項 1 及び 2 の 1 項に記載の検出用キットであって、タンパク質 E S M - 1 の N 末端領域に特異的に結合する抗体が、受託番号 I - 2572 のもと 2000 年 10 月 17 日にパスツール研究所のコレクション・デ・カルチャーズ・デ・マイクロオルガニズムズ (C N C M) に寄託され M E C 15 と命名されたハイブリドーマ株によって産生されるモノクローナル抗体であることを特徴とするキット。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 の 1 項に記載の検出用キットであって、E S M - 1 の C 末端に特異的に結合する抗体が、次の 3 つの抗原決定基：

a) E S M - 1 の位置 79 におけるプロリン残基から位置 99 におけるシステイン残基に及ぶ決定基 A g D 1 ；

b) タンパク質 E S M - 1 の位置 119 におけるセリン残基から位置 139 におけるバリリン残基に及ぶ抗原決定基 A g D 2 ；

c) タンパク質 E S M - 1 の位置 159 におけるグリシン残基から位置 184 におけるアルギニン残基に及ぶ抗原決定基 A g D 3 ；

の 1 つを認識することのできる抗体の中から選ばれることを特徴とするキット。

【請求項 5】

請求項 4 記載の検出用キットであって、タンパク質 E S M - 1 の C 末端領域に特異的に結合する抗体が、次の抗体：

a) 受託番号 I - 1944 のもと 1997 年 11 月 19 日に C N C M へ寄託されたハイブリドーマ株によって産生される抗体 M E P 21 ；

b) 受託番号 I - 1941 のもと C N C M へ 1997 年 11 月 19 日に寄託されたハイブリドーマ株によって産生されるモノクローナル抗体 M E P 08 ；

c) 受託番号 I - 1942 のもと C N C M へ 1997 年 11 月 19 日に寄託されたハイブリドーマ株によって産生されるモノクローナル抗体 M E P 14 ；

d) 受託番号 I - 1943 のもと C N C M へ 1997 年 11 月 19 日に寄託されたハイブリドーマ株によって産生されるモノクローナル抗体 M E P 19 ；

の中から選ばれることを特徴とするキット。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 の 1 項に記載の検出用キットであって、該 2 つの抗体の少なくとも 1 つがある分子に共有結合で連結されて、その直接的又は間接的検出を可能にすることを特徴とするキット。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 の 1 項に記載の検出用キットであって、該第一又は該第二抗体が支持体上に不動化されることを特徴とするキット。

【請求項 8】

請求項 7 記載の検出用キットであって、支持体上に不動化される抗体がタンパク質 E S M

10

20

30

40

50

- 1 の C 末端領域を特異的に認識する抗体であることを特徴とするキット。

【請求項 9】

試料中のタンパク質 E S M - 1 を検出するための方法であって、次の段階：

a) 試験される試料を、タンパク質 E S M - 1 の N 末端領域に特異的に結合する第一抗体と、又はタンパク質 E S M - 1 の C 末端領域に結合する第一抗体と接触させ；

b) 該試料中に存在するタンパク質 E S M - 1 と該第一抗体の間に潜在的に形成される複合体を、N 末端領域又は C 末端領域から選ばれるタンパク質 E S M - 1 の領域であって該第一抗体により認識されない領域に特異的に結合する第二抗体と接触させ；そして

c) タンパク質 E S M - 1 と該第二抗体の間に形成される複合体を検出すること

を含んでなることを特徴とする方法。

10

【請求項 10】

請求項 9 記載の検出方法であって、該第一抗体が支持体上に不動化されることを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 9 及び 10 の 1 項に記載の検出方法であって、該第一抗体が、タンパク質 E S M - 1 の C 末端領域に特異的に結合する抗体であり、該第二抗体が、タンパク質 E S M - 1 の N 末端領域に特異的に結合する抗体であることを特徴とする方法。

【請求項 12】

請求項 9 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の検出方法であって、タンパク質 E S M - 1 の N 末端領域に特異的に結合する抗体が、受託番号 I - 2572 のもと CNCM へ 2000 年 10 月 17 日に寄託されたハイブリドーマによって産生される抗体 M E C 15 であることを特徴とする方法。

20

【請求項 13】

請求項 9 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の検出方法であって、段階 c) が、該第二抗体に固定されることのできるビオチン化抗体を使用して行われることを特徴とする方法。

【請求項 14】

該番号 I - 1942 のもと 1997 年 11 月 19 日に CNCM へ寄託されたハイブリドーマ株 M E C 15。

【請求項 15】

受託番号 I - 2572 のもと CNCM へ 2000 年 10 月 17 日に寄託されたハイブリドーマ株 M E C 15 によって産生されるモノクローナル抗体。

30

【請求項 16】

ヒトにおける内皮血管壁の劣化を *in vitro* で検出するための、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の検出用キットの使用。

【請求項 17】

免疫抑制化合物で処置された患者におけるタンパク質 E S M - 1 を *in vitro* で定量する、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の検出用キットの使用。

【請求項 18】

癌を患う患者におけるタンパク質 E S M - 1 を *in vitro* で定量するための請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の検出用キットの使用。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、試料中のタンパク質 E S M - 1 を検出するためのキットに関する。本発明は、このようなキットを使用して試料中のタンパク質 E S M - 1 を検出するための方法にも関する。

【0002】

タンパク質 E S M - 1 のための本発明によるキット及び検出方法は、生物学的試料、特に内皮血管壁の劣化が疑われる患者からの生物学的試料中のタンパク質 E S M - 1 を定量することについて、特に産業上利用可能性がある。

50

【背景技術】

【0003】

タンパク質 E S M - 1 (内皮細胞特異的分子 1 (Endothelial cell-specific Molecule-1)) は、主に内皮細胞によって発現され、そして血管内皮細胞によって優勢に発現されるタンパク質である。タンパク質 E S M - 1 は、LASSALLE et al. (1996) によって初めて記載された。E S M - 1 のメッセンジャー R N A は、その配列が LASSALLE et al. (1996) による論文の図 1 に記載されている 184 アミノ酸のポリペプチドをコードする。

【0004】

ヒト内皮細胞の細胞溶解産物から単離されたタンパク質 E S M - 1 は、20 k D a の見かけ分子量を有する。タンパク質 E S M - 1 の分泌形態が 50 k D a の見かけ分子量を有するので、このことは、その分泌されたタンパク質 E S M - 1 が翻訳後修飾を受けたことを示している。 10

【0005】

タンパク質 E S M - 1 を検出するためのモノクローナル抗体の使用は、番号第 2, 775, 691 号のもとで公開されたフランス特許出願、及び BECHARD et al. (2000) による論文中に開示されている。これらモノクローナル抗体は、タンパク質 G S T (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ) と融合されたタンパク質 E S M - 1 の位置 79 におけるアミノ酸から位置 184 におけるアミノ酸に及ぶ配列から構成される抗原でマウスを免疫化することによって調製された。3 ファミリーのモノクローナル抗体が特性決定され、これら抗体ファミリーは、抗原決定基 A g D 1 79 P - 99 C (抗体 M E P 0 1、M E P 0 6 及び M E P 2 1)、A g D 2 119 S - 139 V (抗体 M E P 0 8 及び M E P 1 3) 及び A g D 3 159 G - 184 R (抗体 M E P 0 4、M E P 1 4 及び M E P 1 9) にそれぞれ固定された。 20

【0006】

BECHARD et al. (2000) は、モノクローナル抗体 M E P 1 9 及び M E P 2 1 を使用して試料中のタンパク質 E S M - 1 を検出する試験を行う“サンドイッチ”タイプの免疫酵素的試験の開発が記載している。この試験によって、その著者は、敗血症性ショックのために入院している患者の血清中にタンパク質 E S M - 1 が強く産生されていることを証明できた。この文献の図 4 中に掲示された結果は、抗体 M E P 1 9 及び M E P 2 1 を使用する検出試験によって、4 n g / m L を上回るタンパク質 E S M - 1 の濃度を検出できることを示している。 30

【0007】

しかしながら、BECHARD et al. (2000) によって記載されたタンパク質 E S M - 1 についての免疫酵素的試験は、試料中の高い濃度のタンパク質 E S M - 1 については適するが、少量のこのタンパク質を検出しない。しかしながら、この少量のタンパク質は、本発明によって示されるように、患者における内皮細胞壁の劣化のような生理学的障害においては有意なものである。

【発明の要旨】

【0008】

本発明者らは、技術の現状において記載された試験よりもずっと感度が良い、試料中のタンパク質 E S M - 1 を検出するための免疫学的試験を開発するために努力してきた。 40

【0009】

本発明の目的は、試料中のタンパク質 E S M - 1 を検出用キットであって：

a) タンパク質 E S M - 1 のアミノ酸配列の位置 1 におけるアミノ酸と位置 78 におけるアミノ酸の間に含有される N 末端領域に特異的に固定される第一抗体；及び

b) タンパク質 E S M - 1 のアミノ酸配列の位置 79 におけるアミノ酸と位置 184 におけるアミノ酸の間に含有される C 末端領域に特異的に固定される第二抗体

を含んでなるキットである。

【0010】

本発明の更なる目的は、試料中のタンパク質 E S M - 1 を検出するための方法であって、 50

次の段階：

- a) 試験される試料を、タンパク質 E S M - 1 のアミノ酸配列の N 末端領域又は C 末端領域に特異的に固定される第一抗体がその上に不動化されている支持体と接触させ；
- b) 該不動化抗体とタンパク質 E S M - 1 との間に潜在的に形成される複合体を、該第一抗体によって認識されない N 末端領域又は C 末端領域に特異的に固定される第二抗体と接触させ；そして
- c) タンパク質 E S M - 1 と該第二抗体の間に潜在的に形成される複合体を検出することを含んでなることを特徴とする方法である。

【0011】

本発明は、上の方法において使用される一定の抗体にも関する。

10

本発明の更なる目的は、患者、特に敗血症性ショックもしくは癌を患っている患者又は血管内皮細胞に対して細胞障害性となるおそれのある治療的処置を受ける患者における、内皮血管壁の劣化を検出するための本発明による検出用キットの使用である。

【発明の詳しい説明】

【0012】

本発明による検出用キット

本発明による検出用キットは、試料中のタンパク質 E S M - 1 の存在を高い感度で検出できるようにする。

【0013】

タンパク質 E S M - 1 の存在が探求される試料は、あらゆるタイプのものでありうる。好ましくは、それは、血清、血漿、全血、尿、脳脊髄液、又は、培養上澄み液もしくは細胞溶解産物のような、生物学的流体である。

20

【0014】

本発明者らは、真核細胞によって分泌されたタンパク質 E S M - 1 が、大腸菌の細胞のような原核細胞によって産生されたタンパク質 E S M - 1 においては見出されない格別な特性を有することを示した。

【0015】

タンパク質 E S M - 1 は、真核細胞、特に内皮細胞によって、糖タンパク質の形態で、より正確にはコンドロイチン/デルマタン硫酸タイプの鎖を有するプレテオグリカンの形態で分泌される。更に、本発明者らは、真核細胞によって分泌されたタンパク質 E S M - 1 が、このタンパク質の N 末端領域のシステイン残基間でジスルフィド架橋が形成されることによって引き起こされるコンホメーション修飾を包含する他の翻訳後修飾を受けることを示した。184 アミノ酸のポリペプチド E S M - 1 は、配列番号 1 として参照される。

30

【0016】

タンパク質 E S M - 1 についての高感度免疫学的検出試験法を開発するため、本発明者らは、LASSALLE et al. (1996) によって記載された配列番号 1 の位置 20 におけるアミノ酸から位置 78 におけるアミノ酸に及ぶ N 末端領域であって、その位置 20 におけるアミノ酸が、分泌されたタンパク質 E S M - 1 のアミノ末端アミノ酸を構成する N 末端領域に対して向けられるモノクローナル抗体を調製する戦略をとった。

【0017】

本発明者らによって調製されるモノクローナル抗体は、好ましくは、真核細胞によって分泌されて上で述べた翻訳後修飾を受けたタンパク質 E S M - 1 に対して向けられる。

40

より具体的には、本発明者らは、ジスルフィド架橋の生成から起きるコンホメーション修飾を受けるタンパク質 E S M - 1 の領域に特異的に固定されるモノクローナル抗体、換言すれば、配列番号 1 のタンパク質 E S M - 1 のアミノ酸配列の位置 20 におけるアミノ酸から位置 78 におけるアミノ酸に及ぶタンパク質 E S M - 1 の N 末端領域に対して向けられた抗体を産生するハイブリドーマの細胞株を生成させた。

【0018】

試料中のタンパク質 E S M - 1 を検出するツールを得るために、本発明者らは、タンパク質 E S M - 1 の 2 つの別異の領域に特異的に結合する 2 つの抗体、即ち、それぞれ E S M

50

- 1 の位置 20 におけるアミノ酸から位置 78 におけるアミノ酸に及ぶ N 末端領域に特異的に結合する抗体と、E S M - 1 の配列の位置 79 から位置 184 に及ぶ C 末端領域に特異的に結合する抗体を使用する、“サンドイッチ”タイプの免疫学的試験を開発した。

【0019】

従って、本発明の第一の目的は、試料中のタンパク質 E S M - 1 を検出するためのキットからなり、前記キットは：

a) このタンパク質のアミノ酸配列の位置 20 におけるアミノ酸と位置 78 におけるアミノ酸の間に含有されるタンパク質 E S M - 1 の N 末端領域に特異的に結合する第一抗体；及び

b) タンパク質 E S M - 1 のアミノ酸配列の位置 79 におけるアミノ酸と位置 184 におけるアミノ酸の間に含有される C 末端領域に特異的に結合する第二抗体を含んでなるキットである。 10

【0020】

E S M - 1 の N 末端領域に特異的に結合する抗体は、好ましくは、真核細胞によって分泌されかつ上で詳述された翻訳後修飾を受けたタンパク質 E S M - 1 の N 末端領域に対して特異的に向けられる。これは、N 末端領域に特異的に結合する抗体が、真核細胞によって産生されるタンパク質 E S M - 1 の精製調製物を動物に注射する段階を包含する方法に従って得られたことを意味する。

【0021】

本発明の文脈における“抗体”によって、タンパク質 E S M - 1 の N 末端領域又は C 末端領域に特異的に結合することのできる“パラトープ”を含有する分子が意味されると理解されるべきである。本発明による“抗体”によって、タンパク質 E S M - 1 の N 末端領域又は C 末端領域に特異的に結合することができる同じ“パラトープ”を全てが含有する分子の集団が意味されるとも理解されるべきである。 20

【0022】

“パラトープ”によって、イムノグロブリンの H 鎖又は L 鎖の可変ドメイン V_H 及び V_L の超可変ドメイン、若しくは、C D R ドメイン中に局在化した抗体の F a b 断片中に含有される抗原結合部位が意味されると理解されるべきである。

【0023】

本発明による抗体は、KOHLEH 及び MIELSTEIN(1975) によって記載された技術によるハイブリドーマからでも、KOZBOR(1983) によって記載されたヒト B 細胞のハイブリドーマの技術によってでも調製されうる。本発明による抗体は、米国特許第 4, 946, 778 号中に、及び MARTINEAU et al. (1998) によって開示されたもののような単一鎖 F v キメラ抗体 (S c F v は“単一鎖 F v”を表す) の断片をも包含する。本発明による抗体は、RIDDER et al. (1995) によって記載されたもののようなファージバンク (“ファージディスプレイライブラリー”) によっても産生されうる。本発明による抗体は、REINMANN et al. (1997) 又は LEGER et al. (1997) によって記載された技術に従って産生されるヒト抗体でもありうる。 30

【0024】

タンパク質 E S M - 1 についての本発明による検出用キットは、好ましくは、2つの抗体の1つが支持体上に不動化されることを含んでなる。この好ましい態様においては、本検出用キットは、タンパク質 E S M - 1 についての“サンドイッチ”タイプの免疫検出試験を行うための“すぐに使える”形態で与えられる。 40

【0025】

本発明によって、試料中のタンパク質 E S M - 1 の存在を検出するための上で定義されたようなキットの使用は、BECHARD et al. (2000) によって記載された E S M - 1 を検出する試験で観察された検出感度よりも 10 倍大きいものをもたらしことが示された。

【0026】

本発明による免疫検出試験法の高い感度は、生物学的試料、例えば、ヒト血清中の、非常に低い濃度のタンパク質 E S M - 1 を検出することを可能にし、従って、患者における内 50

皮血管壁の劣化を早期に検出できるようにした。

【0027】

特に、本発明による免疫検出用キットの使用は、敗血症を患う“アトピー”個体における1~3 ng/mLのESM-1の血清濃度を検出できるようにした。

実施例に示されるように、本発明による免疫検出用キットの使用は、100~200 pg/mLのオーダーのESM-1の濃度を検出するために使用されうる一方で、BECHARD et al. (2000) によって記載された試験は、1 ng/mL未満のESM-1の濃度を検出しないものである。

【0028】

ESM-1のN末端領域に対して向けられる抗体は、有利には、真核細胞、例えば、LASS ALLE et al. によって記載されたタンパク質ESM-1をコードするDNA挿入物を含有する発現ベクター、例えば、ベクターpcDNA3によって形質転換されたCHO株の細胞によって合成された組み換えタンパク質ESM-1で、哺乳類、好ましくはマウスを免疫化した後に得られるハイブリドーマ株によって産生されるモノクローナル抗体である。

【0029】

好ましくは、受託番号I-2572のもと2000年10月17日にパスツール (Pasteur) 研究所のコレクション・デ・カルチャーズ・デ・マイクロオルガニズムズ (Collection de Cultures de Micro-organismes) (CNCM) に寄託されMEC15と命名されたハイブリドーマ株によって産生されるモノクローナル抗体である。

【0030】

このMEC15抗体は、本発明の目的を構成する。

タンパク質ESM-1のC末端部分に特異的に結合する抗体は、大腸菌のような原核細胞によって産生されタンパク質ESM-1に対して向けられる抗体でも、CHO株の細胞のような真核細胞によるもののいずれでもよい。

【0031】

タンパク質ESM-1のC末端部分に特異的に結合する抗体は、好ましくは、タンパク質ESM-1の次の3つの抗原決定基：

- ・ BECHARD et al. (2000) によって記載されたハイブリドーマ株MEP01、MEP06及びMEP21によって産生される抗体のような、ESM-1の位置79におけるプロリン残基から位置99におけるシステイン残基に及ぶ決定基AgD1；

- ・ BECHARD et al. (2000) によって記載されたハイブリドーマMEP08及びMEP13によって産生される抗体によって認識される、ESM-1の位置119におけるセリン残基から位置139におけるバリン残基に及ぶ抗原決定基AgD2；

- ・ BECHARD et al. (2000) によって記載されたハイブリドーマ株MEP04、MEP14及びMEP19によって産生される抗体によって認識される、ESM-1の位置159におけるグリシン残基から位置184におけるアルギニン残基に及ぶ抗原決定基AgD3のうちの1つを認識することのできる抗体の中から選ばれる。

【0032】

好ましい態様においては、当業者は、タンパク質ESM-1のC末端領域に特異的に結合する抗体の使用について、次の抗体：

- ・ 受託番号I-1944のもと1997年11月19日にCNCMへ寄託されたハイブリドーマ株によって産生される、抗原決定基D1の特異的モノクローナル抗体（抗体MEP21）；

- ・ 受託番号I-1941のもと1997年11月19日にCNCMへ寄託されたハイブリドーマ株によって産生される、抗原決定基D2の特異的モノクローナル抗体（抗体MEP08）；

- ・ 受託番号I-1942及びI-1943のもと1997年11月19日にCNCMへ寄託されたハイブリドーマ株によって産生される、抗原決定基D3の特異的モノクローナル抗体（I-1942：抗体MEP14、I-1943：抗体MEP19）；

を有利なものとして挙げる事ができる。

【0033】

本発明による免疫検出用キットの好ましい態様においては、第一及び第二抗体は、2つの抗体のそれぞれの認識部位があまりに近い場合における立体障害現象によって引き起こされうる一方の抗体の他方に関する競合的固定がタンパク質上でいかようにも起こらないように、タンパク質ESM-1上のそれらのそれぞれの認識部位が互いから非常に離れるように選ばれる。

【0034】

従って、本発明による検出用キットの好ましい態様においては、タンパク質ESM-1のN末端領域に特異的に結合する第一抗体は、ハイブリドーマ株MEC15によって産生される抗体である。この好ましい態様によれば、タンパク質ESM-1のC末端領域に特異的に結合する抗体は、ハイブリドーマ株MEP14によって産生されるモノクローナル抗体である。

10

【0035】

一般に、タンパク質ESM-1のC末端領域に対して向けられる抗体は、タンパク質GSTと融合したタンパク質ESM-1のC末端領域をコードするDNA挿入物を含有する発現ベクターを調製し、次いで、前記発現ベクターで形質転換された大腸菌細胞の細胞溶解産物から得られた精製タンパク質ESM-1でマウスを免疫化することからなる、BECHAR D et al. (2000) によって記載された技術に従って選択されうる。このように免疫化されたマウス脾臓細胞を、モノクローナル抗体を産生する一連のハイブリドーマを得るために骨髓腫細胞と融合した後、タンパク質ESM-1のC末端領域に特異的に結合する興味の対象となる抗体が、ESM-1に由来するペプチドであって、このタンパク質のC末端領域のN終末の進行性欠失を含有するペプチドを使用して、エピトープをマッピングすることによって選択されうる。

20

【0036】

同様に、当業者は、全タンパク質ESM-1、好ましくは真核宿主細胞によって産生される全タンパク質ESM-1でマウスを免疫化し、次いで、その免疫化マウスの脾臓細胞から一連のハイブリドーマ株を産生させ、次いで、N末端領域に特異的に結合する興味の対象である抗体を、例えば、ESM-1のC末端領域に特異的に固定される抗体での競合的免疫検出試験法により選択することによって、タンパク質ESM-1のN末端領域に特異的に結合する抗体を選択することができる。興味の対象である抗体は、ESM-1のC末端領域の特異的抗体と競合しないもの、換言すれば、タンパク質ESM-1の抗原決定基D1、D2及びD3の特異的抗体と競合しない抗体である。

30

【0037】

本発明による検出用キットを構成する2つの抗体のうちの1つは、好ましくは、支持体上に不動化される。抗体がその上に不動化される支持体は、免疫検出試験、特に“サンドイッチ”タイプの免疫検出試験の当業者にとって公知のあらゆるタイプのものでありうる。

【0038】

例としては、抗体がその上に不動化される支持体は、水に不溶性の有孔性又は非有孔性材料でありうる。その支持体は、親水性であり、そして、シリカ、硫酸マグネシウム及び硫酸アルミニウムのような無機粉末；天然ポリマー、特に、セルロース材料及びそれらの誘導体；ニトロセルロース、セルロースアセテート、ポリ(塩化ビニル)、ポリアクリルアミド、架橋デキスロラン、アガロース、ポリアクリレート、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ(4-メチルブテン)、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリ(エチレンテレフタレート)、ナイロン、ポリ(ビニルブチレート)のような天然又は合成ポリマー類；生体ガラス又はセラミックスのような一定のタイプのガラスを含有することができる。

40

【0039】

本発明による抗体の支持体上への固定は、当業者にとって周知の技術によって行われうる。その支持体は、小片、又は特にビーズを包含する種々の異なる形態であってもよい。支持体の表面は、特異的であっても非特異的であってもよい共有結合性又は非共有結合性相互作用を介して抗体を固定するために、多官能基性であっても多官能基化されることがで

50

きるものであってもよい。

【0040】

例としては、抗体を支持体上に不動化させるために、当業者は、米国特許第4,168,146号又は米国特許第4,347,311号を有利に参照することができる。検出用キットを構成する抗体の1つは、有利には、その直接的又は間接的検出を可能とする分子に共有結合で結合する。

【0041】

抗体が支持体上に不動化される態様においては、他方の抗体は、その直接的又は間接的検出を可能とする分子に好ましくは共有結合で結合する。検出を可能にする分子は、同位体であっても非同位体であってもよい。

10

【0042】

例示的であるが非限定的な例として、検出を可能にする分子は、酵素、酵素断片、酵素基質、酵素阻害剤、補酵素又は触媒のように、触媒反応に参与しうる。検出を可能にする分子は、蛍光体、着色剤、又は化学発光分子のような色原体でもありうる。

【0043】

従って、検出を可能にする分子は、ICHINOSE et al. (1991) によって記載された分子若しくは蛍光性イソチオシアネート誘導体、フィコエリトリン、ローダミンイソチオシアネート、ダンシルクロリド又は化合物X R I T C、魚類 *Aequorea Victoria* のタンパク質GFP (“ 緑色蛍光タンパク質 ”) 及びその多くの誘導体、又はタンパク質YFP (“ 黄色蛍光タンパク質 ”) 並びにタンパク質ルシフェラーゼのような、蛍光分子でありうる。

20

【0044】

触媒活性を有する検出を可能にする分子のうち、好ましい分子は、国際分類 I.U.B. に従う次の酵素：(i) クラス1の酸化還元酵素、及び(ii) クラス3の加水分解酵素である。好ましい酸化還元酵素は、(i) クラス1.1、最も特定のには、1.1.1、1.1.3及び1.1.99の脱水素酵素、及び(ii) クラス1.11のペルオキシダーゼ、及び(iii) クラス3.1、最も特定のにはクラス3.1.3、及びクラス3.2、最も特定のにはクラス3.2.1の加水分解酵素である。好ましい脱水素酵素は、リンゴ酸脱水素酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素及び乳酸脱水素酵素である。好ましい酸化酵素は、グルコース酸化酵素である。好ましいペルオキシダーゼは、ホースラディッシュペルオキシダーゼである。好ましい加水分解酵素は、アルカリ性ホスファターゼ、

30

【0045】

検出を可能にする分子は、例えば、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{32}\text{P}]$ 及び $[^{125}\text{I}]$ の中から選ばれる同位体によって放射標識された分子でもありうる。

検出を可能にする分子が間接的マーカーを含んでなる態様においては、本発明による検出用キットを構成する抗体の1つは、ビオチン又はストレプトアビジンのようなリガンドに共有結合しうる。

【0046】

この特定の態様においては、検出を可能にする分子は、抗体に共有結合しているリガンド上に固定されるように選ばれる。検出を可能にする分子は、例えば、それ自体がビオチン又はストレプトアビジンそれぞれに結合しうる。

40

【0047】

本発明による検出用キットの別の態様によれば、試験される試料中に存在するタンパク質ESM-1とタンパク質ESM-1の特異的抗体の1つとの間に複合体が形成されたことを明らかにする手段は、抗体、例えば、抗ESM-1抗体のFc部分に特異的に結合できる抗体又はその抗ESM-1抗体が属するイソタイプに特異的に結合することができる抗体、例えば、イソタイプIgG1のマウス抗体を特異的に認識する抗体でありうる。

【0048】

本発明による検出用キットの好ましい態様においては、支持体上に不動化されるのは、タンパク質ESM-1のC末端領域を特異的に認識する抗体である。

50

そのような検出用キットは、有利には、ハイブリドーマMEP14(CNCM番号I-1942)によって産生される抗体が支持体上に不動化されており、そしてハイブリドーマMEC15(CNCM番号I-2572)によって産生される抗体がタンパク質ESM-1のN末端領域に特異的に結合する抗体であるところのキットである。

【0049】

従って、本検出ツールは、例えばラットからの、イソタイプIgG1のマウス抗体を特異的に認識するビオチン化モノクローナル抗体であることができ、その検出系はストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ接合体によって供給される。

本発明による免疫検出法

本発明の更なる目的は、試料中のタンパク質ESM-1を検出するための方法であって、
次の段階：

a) 試験される試料を、タンパク質ESM-1のN末端領域に特異的に結合する第一抗体又はタンパク質ESM-1のC末端領域に結合する第一抗体と接触させ；
b) 該試料中に存在するタンパク質ESM-1と該第一抗体の間に潜在的に形成される複合体を、該N末端領域及び該C末端領域の中から選ばれ該第一抗体により認識されないタンパク質ESM-1の領域に特異的に結合する第二抗体と接触させ；そして
c) タンパク質ESM-1と該第二抗体の間に形成される複合体を検出する
段階を含んでなることを特徴とする方法である。

【0050】

“タンパク質ESM-1と該第二抗体の間に形成される複合体”によって：
・タンパク質ESM-1と該第一抗体の間に形成される複合体、及び
・該第二抗体
の間に形成される複合体が把握されるべきである。

【0051】

上の免疫検出法の第一の態様によれば、第一又は第二抗体が、支持体の表面上に不動化されうる。

上の免疫検出法の第二の態様によれば、支持体上に不動化される抗体が、タンパク質ESM-1のC末端領域に特異的に結合する抗体であり、そして、第二抗体が、このタンパク質のN末端領域に特異的に結合する抗体である。

【0052】

上の免疫検出法の第三の態様によれば、支持体上に不動化される抗体は、タンパク質ESM-1のN末端領域に特異的に結合する抗体であり、そして、第二抗体は、このタンパク質のC末端領域に特異的に結合する抗体である。

【0053】

ESM-1のN末端又はC末端領域上に特異的に結合する抗体は、上に定義された通りである。

本発明による検出方法の好ましい態様においては、タンパク質ESM-1のN末端領域に特異的に結合する抗体は、受託番号I-2572のもとCNCMへ2000年10月17日に寄託されたハイブリドーマによって産生される抗体MEC15である。

【0054】

第二抗体は、受託番号I-1942のもと1997年11月19日にCNCMへ寄託されたハイブリドーマによって産生される抗体MEP14でありうる。

上に記載された方法の段階c)は、第二抗体に固定されることができ、その検出を可能にする分子は、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼタイプの複合体からなる。

本発明による検出方法の用途

本発明者らは、タンパク質ESM-1の本発明による免疫検出の方法が、ヒト、特に敗血症を患っている患者におけるタンパク質ESM-1の血清濃度を高い感度で定量でき、かつそれら患者にいて循環しているタンパク質ESM-1の量とその敗血症の重症度の間の相関関係を樹立できることを示した。

10

20

30

40

50

【0055】

American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference (1992年の、敗血症及び多発性臓器不全についての定義及び敗血症における革新的治療法の使用についてのガイドライン; Crit Care Med., vol. 20: 864-874) によって定義された基準によれば、敗血症は、増大する重症度の3つのカテゴリー、即ち、：敗血症、重症敗血症及び敗血症ショックに分けられることができる。

【0056】

本発明による免疫検出法の恩恵で、敗血症の重症度とその患者において循環しているタンパク質 E S M - 1 の濃度の間の相関関係が樹立された。

更に、本発明による免疫検出試験法の高い感度によって、単純敗血症を患う患者は、低濃度とはいえ有意に検出可能でありかつ健康なボランティアの血清中に見出されるタンパク質 E S M - 1 の濃度よりも有意に高い ($p < 0.001$) 循環性タンパク質 E S M - 1 の濃度を有することが示された。

10

【0057】

これまで、患者における敗血症の進展は、3つのマーカー、即ち、それぞれC反応性タンパク質、可溶性 I C A M - 1 タンパク質及びプロカルシトニンを定量することによって追跡されていた。

【0058】

本発明によって、C反応性タンパク質及び可溶性 I C A M - 1 タンパク質のレベルの進展は E S M - 1 の濃度の進展と相関しないことが示された。

20

対照的に、プロカルシトニンのレベルの進展とタンパク質 E S M - 1 のものとの間には良好な相関関係がある。しかしながら、敗血症の場合におけるプロカルシトニンの生物学的意義は分かっておらず、従って、このタンパク質は敗血症の進展についての良好な生物学的マーカーに該当しない。

【0059】

他方、タンパク質 E S M - 1 は、炎症反応の調節におけるその役割のために、敗血症の進展の新たなマーカーを構成する。その生物学的意義は、炎症反応、特に、白血球の新たな補充であって、原因となる異なる組織、特に肺組織におけるこれら細胞の血管外遊出又は大量浸潤の現象中の、又は、内皮血管壁の劣化と少なくとも同時発生的な現象の時点での白血球の新たな補充の制御されない進展と直接関連付けられることである。

30

【0060】

かくして、本発明者らは、本発明の免疫検出試験法が $1 \sim 3 \text{ ng/mL}$ のオーダーの低濃度の循環性タンパク質 E S M - 1 を検出できるようにし、アトピー患者において見出されるこれら低濃度を、健康なボランティアにおいて測定される ng/mL のオーダー又は一層低い基礎濃度から明らかに識別できることを示した。

【0061】

更に、敗血症を患っている患者において見出される血清 E S M - 1 の量が、これら患者についての致死の信頼性ある診断法に相当することが示された。かくして、試験された68患者について、その入院後10日後に死亡した患者は、生存した患者の血清中に見出された E S M - 1 の濃度より有意に高い循環性 E S M - 1 の濃度 (生存した患者における $4.0 \pm 0.6 \text{ ng/mL}$ に対し、死亡した患者においては $10.6 \pm 0.8 \text{ ng/mL}$ [$p > 0.01$]) を、第0日及び第1日に示した。

40

【0062】

循環性タンパク質 E S M - 1 のレベルと患者の致死の予測との間におけるこの密接な相関関係は、敗血症の慣用的マーカー、換言すれば、C反応性タンパク質、プロカルシトニン及び可溶性 I C A M - 1 タンパク質については見出されなかった。

【0063】

しかしながら、患者における循環性 E S M - 1 の濃度を測定するだけでは、医師が患者の状態全体に適する治療的手段をとれるようにする医学的診断を行うには十分でない。

本発明の更なる目的は、ヒト、特に患者における内皮血管壁の劣化を *in vitro* で検出す

50

るための、タンパク質 E S M - 1 についての本発明による検出用キットの使用からなる。

【 0 0 6 4 】

本発明は、患者における敗血症の重症度のマーカーを *in vitro* で追跡するための上で定義されたタンパク質 E S M - 1 についての検出用キットの使用にも関する。

本発明によって、正常よりも高い循環性タンパク質 E S M - 1 の濃度が、臓器移植を受けて免疫抑制化合物で処置された患者において見出されることも示された。循環性タンパク質 E S M - 1 の濃度の増大は、内皮細胞、特に血管壁の内皮細胞に対する免疫抑制化合物の細胞障害活性の指標である。

【 0 0 6 5 】

従って、タンパク質 E S M - 1 についての本発明による検出用キットの使用によって、免疫抑制化合物で治療された患者を追跡してこれら免疫抑制化合物が細胞障害性となる時を特定することが可能となる。

【 0 0 6 6 】

これら患者において正常よりも高い循環性 E S M - 1 のレベルを検出することは、この測定が患者における他の生理学的パラメーターを伴う時には、投与される免疫抑制化合物の量を適度にするための医師にとっての指標に相当しうる。

【 0 0 6 7 】

更なる側面によると、本発明は、免疫抑制化合物で処置された患者、特に臓器移植を受けた患者において *in vitro* でタンパク質 E S M - 1 を定量するための本発明による免疫検出用キットの使用に関する。

【 0 0 6 8 】

本発明者らは、癌、特に気管支 - 肺癌を患っている患者における循環性タンパク質 E S M - 1 のレベルが有意に増大することも示した。

更に別の側面によると、本発明は、癌を患っている患者においてタンパク質 E S M - 1 を *in vitro* で定量するための上で定義されたような免疫検出用キットの使用にも関する。

【 0 0 6 9 】

一般に、 1 ng / mL より高い循環性タンパク質 E S M - 1 のレベルは、血管壁の内皮細胞の劣化を意味し、従って、患者の臨床的診断が確立される間に医師によって考慮に入れられるべきパラメーターに相当するが、このパラメーター単独では、即ち、独立して解釈しても、患者についての治療的又は臨床的診断方法をそれ自体確立し得ないことが理解される。

【 0 0 7 0 】

本発明は、次の図及び実施例によって更に例示されるが、いかなるやり方によっても限定されるものではない。

【 実施例 】

【 0 0 7 1 】

実施例 1 : 真核細胞によって産生されるタンパク質 E S M - 1 の N 末端領域に特異的に結合するモノクローナル抗体の調製

システイン残基に富むタンパク質 E S M - 1 の N 末端領域に対して向けられる抗 E S M - 1 モノクローナル抗体を得るために、タンパク質 E S M - 1 をコードする DNA 挿入物を含有する発現ベクターによって形質移入された CHO 細胞株によって産生された天然形態のタンパク質 E S M - 1 が、精製された。

【 0 0 7 2 】

タンパク質 E S M - 1 をコードする cDNA 配列は、配列表における配列番号 2 として参照される。

E S M - 1 の cDNA は、真核性発現ベクター p cDNA 3 (*in vitro* gen) に挿入され、次いで、製造業者の推奨によるリポフェクタミン (Gibco) で CHO 細胞中に形質移入された。形質移入の 48 時間後、その細胞は、 $1000 \mu \text{g / mL}$ の量の選択剤 (G418 , Gibco) の存在下で継代培養された。2 週間の選択の後、G418 に耐性のある CHO 細胞は、限界希釈によってクローン化された。次いで、E S M - 1

を発現しているクローンが選択され、CHO-ESM (CNCMへ寄託された) と命名された。

【0073】

産生のため、CHO-ESM細胞は、子ウシ胎児血清を有さない培地(培地CHO SFMI I, Gibco)中で懸濁状態で培養された。その上澄み液はpH8に調整され、そしてDEAE-セファロースのカラム(ファルマシア)に通された。そのカラムは、50 mM Tris、pH8、0.2 M NaCl緩衝液で洗浄された。タンパク質ESM-1は、50 mM Tris、pH8、1 M NaCl緩衝液中で溶出された。次いで、その溶出液は、50 mM Tris、pH8緩衝液中で1:4に希釈され、そしてアガロース(Biorad)上に不動化された抗ESM-1モノクローナル抗体(MEC4)の存在下でインキュベートされた。攪拌しながら4で一晚インキュベートした後、そのアガロースビーズが、50 mM Tris、pH8、0.2 M NaCl緩衝液で洗浄された。ESM-1は、3 M MgCl₂で溶出された。その溶出液は、濃縮され、50 mM Tris、pH8、0.5 M NaCl緩衝液中で透析され、そして-70で保存された。

10

【0074】

Balb/cマウスは、Freundのアジュバントの存在下、標準的免疫化プロトコールに従って、マウス当たり10 µgの精製組み換えタンパク質ESM-1の注射によって免疫化された。

【0075】

抗ESM-1モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ細胞は、BECHARD et al. (2000)によって記載された技術に従って、融合し、スクリーニングし、そしてサブクローニングすることによって得られた。

20

【0076】

5つのハイブリドーマ細胞クローンが得られ、総称的にMEC(CHO細胞によって産生されたESM-1へのマウスモノクローナル抗体(Mouse Monoclonal Antibody to ESM-1 produced by CHO Cells))と命名された。

【0077】

選択された4つハイブリドーマのは、イソタイプIgG1, kのもので、それぞれMEC4、MEC5、MEC15及びMEC36と命名された。

それらハイブリドーマの1つは、イソタイプIgM, kのもので、ハイブリドーマMEC11であった。

30

【0078】

これらハイブリドーマ細胞クローンは、血清の不存在下で培地中で培養され、それら抗ESM-1抗体は、ファルマシア(UPPSALA、スウェーデン)によって販売されているタンパク質G-セファロースのカラム上でクロマトグラフィーによって精製された。

【0079】

実施例2: CHO株の細胞によって産生されたタンパク質ESM-1のN末端部分に対して特異的に向けられるモノクローナル抗体の選択

クラスIgG1, KのMEC抗体は、異なるイソタイプのMEP抗体の存在下1 µg/mLの最終濃度においてMECシリーズの抗体とESM/Fcとの間に強い結合が持続することによって選択された。それら試験は、MEP及びMEC抗体の選択についての上の例に従って(特に、LASSALLE et al. (1996)によって記載された競合実験による免疫検出法によって)、ELISAによって行われた。

40

【0080】

実施例3: タンパク質ESM-1についての本発明による免疫検出試験

本免疫検出試験は、その全体に渡った特性がBECHARD et al. (2000)によって記載されたものと同一である“サンドイッチ”タイプの免疫酵素的試験からなった。

【0081】

ハイブリドーマ株MEP14(CNCM番号I-1942)によって産生された抗ESM-1モノクローナル抗体は、0.1 M、pH9.5の炭酸緩衝液中で5 µg/mLの濃

50

度に希釈され、そして96穴プレート(プレートE.I.A./R.I.A., Costar, Cambridge, MA, 米国)上に+4で一晚吸着された。

【0082】

そのプレートは、0.1%のウシ血清アルブミン及び5mMのEDTAを含有する200 μ L/穴の容量のPBS緩衝液と共に実験室温度で1時間飽和され、次いで、ELISA緩衝液(0.1%のTween20を追加された上のPBS緩衝液)で2回洗浄された。

【0083】

BECHARD et al. (2000) によって記載された技術に従って、精製タンパク質ESM-1で較正が行われた。

血液試料は、ELISA緩衝液中で逐次的に希釈され(1:2~1:128)、そして実験室温度で1時間ELISAプレート上でインキュベートされた。 10

【0084】

それら穴は、ELISA緩衝液で3回洗浄され、次いで、ESM-1に対して向けられた、穴あたり100 μ Lの緩衝液中の0.1 μ g/mLの濃度の第二モノクローナル抗体、即ち、抗体MEC15(CNCM番号I-2572)と共に、実験室内温度で1時間インキュベートされた。

【0085】

3回洗浄した後、ELISA緩衝液中で希釈された、マウスIgG1に対して向けられるビオチン化ラットモノクローナル抗体(PHARMINGENによって販売されているもの)が加えられ、1時間放置してインキュベートされた。 20

【0086】

ELISA緩衝液中で3回洗浄した後、その穴は、1:10,000v/vの希釈率でストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ接合体(ZYMEDによって販売されているもの)と共にインキュベートされた。

【0087】

ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ接合体との30分のインキュベーションの後、各々の穴の3回洗浄がELISA緩衝液中で、次いで、2回洗浄がPBS緩衝液中で行われた。

【0088】

ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ接合体は、5 μ LのH₂O₂の存在下、SIGMA(Saint-Louis, MO, 米国)によって販売されている基質TMBに30分間曝露された。 30

【0089】

この曝露反応は、100 μ Lの容量の2NのH₂SO₄の添加によって停止された。

そのプレートは、分光光度計(anthos labtech LP40, フランス)を用いて、405nmの波長で読まれた。

【0090】

タンパク質ESM-1の血漿又は血清濃度は、光学密度測定値から計算され、ng/mLで表現された。

【0091】

実施例4:

本発明による免疫検出試験及び従来技術の免疫検出試験でのESM-1の測定の比較結果形質移入されたCHO細胞株によって産生され、次いで、実施例1において記載された通りに精製された既知の濃度の組み換えタンパク質ESM-1の比較測定が行われた。

【0092】

第一の測定は、実施例3の教示に従って行われた。簡単に説明すると、抗体MEP14がELISAタイプの96穴プレート上に不動化され、次いで、既知の濃度のタンパク質ESM-1を含有する一連のPBS緩衝液と接触状態に置かれた。洗浄の後、不動化抗体MEP14とタンパク質ESM-1の間に形成された複合体が、本発明の抗体MEP15を含有する緩衝溶液と共にインキュベートされた。 50

【0093】

更に数組の洗浄の後、その形成された抗原/抗体複合体は、ビオチン化ラット抗体抗マウスIgG1、次いでストレプトアビジン-ペルオキシダゼ接合体と逐次的にインキュベートされてから、過酸化水素に曝露された。

【0094】

第二の試験は、ELISAタイプの96穴プレート上に不動化された抗体MEP19を使用しかつ抗体MEP21を“サンドイッチ”タイプのこの免疫酵素的技術における第二抗体として使用することを除いて同じ条件下で行われた。

【0095】

その結果を、図1中に示す。

本発明による抗体の組み合わせで、0.15~0.2 ng/mLのオーダーのタンパク質ESM-1の濃度で光学密度値の有意な差が得られた。

【0096】

対照的に、抗体MEP19とMEP21の組み合わせでは、1又は2 ng/mLに等しいESM-1の濃度について光学密度値における有意な増大が得られるに過ぎなかった。

これら2試験の間では本発明の免疫検出試験の方が5~10倍高い感度差で観察されうるので、図1において得られた結果は、タンパク質ESM-1についての本発明による免疫検出試験が、従来技術の免疫検出試験と比較して高い感度を有することを明確に示している。

【0097】

実施例5:

株HEK293の形質移入細胞によって産生されたタンパク質ESM-1のN末端領域に対して向けられた本発明の異なる複数の抗体を用いる免疫検出試験の比較結果

“サンドイッチ”タイプの免疫検出試験は、実施例3において記載されたプロトコールに従って行われた。

【0098】

全ての場合において、抗体MEP14が、ELISAタイプの96穴プレートの穴中に不動化された。このように調製されたプレートを株HEK293の形質転移細胞によって産生された組み換えESM-1の既知濃度の溶液と共にインキュベートして洗浄した後、形成された抗原/抗体複合体が、第二抗体、即ち、それぞれ抗体MEC2、抗体MEC15及び抗体MEC36の存在下でインキュベートされた。

【0099】

その結果を図2中に示す。

真核細胞によって産生された組み換えタンパク質ESM-1のN末端領域に対して向けられるモノクローナル抗体を“サンドイッチ”タイプの免疫酵素的試験において使用することは、高い感度のタンパク質ESM-1の測定をもたらし、かくして、その感度がある抗体から別の抗体まで再現されることが、この結果によって示される。

【0100】

0.15~0.2 ng/mLのオーダーのESM-1の濃度を、試験された抗体MEC15、MEC2及びMEC36のグループについて検出することができた。

【0101】

実施例6:異なる重症度の敗血症を患っている患者における循環性タンパク質ESM-1を定量するための本発明による免疫検出試験の応用

A.材料及び方法

A.1 免疫検出試験

本免疫検出試験は、上の実施例3に記載されたプロトコールに従って行われた。

A.2 他の血液マーカーの試験

血清可溶性ICAM-1タンパク質の定量試験が、市販のELISA試験(Diaclone-Research, Besancon, フランス)で行われた。そのプレートは、分光光度計(Anthos labtech LP 40, フランス)を用いて450 nmの波長で読まれた。血清可溶性ICAM-1の

10

20

30

40

50

濃度は、光学密度の測定値から計算され、 ng/mL で表現された。可溶性ICAM-1タンパク質の濃度の正常値は、 $571 \pm 168 \text{ ng/mL}$ ($219 \sim 1042$; $n = 77$)であった。

【0102】

タンパク質プロカルシトニンを定量する試験は、ILMAタイプの免疫学的試験(Lumitest, B. R. A. M. S.-Diagnostica GmbH, ドイツ)で行われた。

プロカルシトニンの正常値は、 0.5 ng/mL 未満である。全身性炎症反応症候群(SIRS)を患っている患者について測定された値は、一般に $0.5 \sim 2 \text{ ng/mL}$ であった。

【0103】

C反応性タンパク質の量は、免疫ネフェロメトリーによって測定された。その正常値は 10 mg/L 未満(Morley et al., 1982, Ann. Acad. N. Y. Sci., vol. 389:406-418)であった。

A.3 対象

本検討は、4グループの対象、即ち、1グループの非アトピー健康対象(性比1)及び3グループの全身性及び/又は肺敗血症炎症性問題を患っている患者(性比1.6、年齢: 56 ± 2 才)について行われた。

【0104】

全ての非アトピー健康対象は即時型過敏症皮膚反射試験(乱刺法)に陰性反応を示し、そしてアレルギーの臨床的履歴を示さなかった。

血液試料が採取された時には、68患者のうち、コルチコステロイドで処置された者も、血液透析を受けた者もいなかった。

【0105】

本実験プロトコールは、スイス大学病院の地方倫理委員会によって承認された。

A.4 定義

次の用語が、本検討において用いられた。

【0106】

感染症は、微生物の存在下での炎症反応、又はこれら微生物によって宿主の本来無菌の組織が侵襲されることによる炎症反応によって特徴付けられる細菌現象である。

感染症の兆候を伴わない全身性炎症反応症候群(SIRS)は、4つの次の臨床的基準

- a) 発熱又は低体温(100.4°F より上 [< 38]、又は $> 96.8^\circ\text{F}$ [> 36]の体温) ;
- b) 頻脈(> 90 拍動/分) ;
- c) 頻呼吸(> 20 呼吸/分、又は $\text{PaCO}_2 < 4.3 \text{ kPa}$ [32 mmHg]) ; 及び
- d) 異常白血球数 $> 12,000$ 細胞/ mm^3 ; < 4000 細胞/ mm^3 、又は10%を超える未成熟形態の存在それぞれ ;

の少なくとも2つの存在によって特徴づけられる。

【0107】

敗血症は、感染症を伴うSIRSと定義される。

重症敗血症は、臓器の機能不全、低灌流又は低血圧が付随した敗血症と定義される。低灌流及び灌流における異常には、尿量過少(分泌容量 $< 30 \text{ mL/h}$)、乳酸アシドーシス(2 mmol/L より大きい血清乳酸のレベル)、又は鎮静を伴わない精神状態の急性劣化(Glasgowタイプの昏睡スコアに従う基礎値に関して少なくとも3点減少するもの)が含まれるが、それらに限られない。

【0108】

敗血症ショックは、適切な蘇生法及び妥当な血圧を維持するための血管活性アミンが必要であるにも関わらず、灌流異常病態(上を参照のこと)の存在が付随した、収縮期血圧における持続性減少($< 90 \text{ mmHg}$ 、又は収縮期血圧の基礎値と比較して 40 mmHg の減少)を伴う、敗血症の存在と定義づけられる(Crit. Care Med. 19992, vol. 20:864

10

20

30

40

50

-874)。

A. 5 検討の説明

各々の患者について、次の生物学的及び臨床的パラメータが得られた：年齢、性別、Crit. Care ed., 1992, vol. 20: 864-874 において定義された第一及び第二の診断、先例、治療、血液採取10日前の生命状態、タンパク質ESM-1の血清及び血漿濃度。

【0109】

殆どの患者について、循環性可溶性ICAM-1 (sICAM-1)、プロカルシトニン (proCT) 及びC反応性タンパク質 (CRP) のような他の血液生物学的パラメータも測定された。

【0110】

血液試料は、患者 (又は健康なボランティア) の各々から乾燥チューブ中及びEDTAで処理されたチューブ中に取り込まれ、Jouanc31タイプ (フランス) の遠心機中で、3500 r.p.m. の速度で30分遠心分離された。

【0111】

その血清及び血漿試料は、試験が行われる前に-20 で短時間保存された。入院10日間の生存期間は「これら患者において感染症が死に直接寄与した」又は「他の死因と比較して初期炎症性問題の寄与が除外されえない」と仮定することによって選ばれた。

A. 7 統計的分析

データは、平均±標準偏差として表現される。

【0112】

異なるグループの間のESM-1、sICAM-1、プロカルシトニン及びCRPの平均レベルの比較が、“一元分析”試験ANOVA (Bonferroni-Dunn)、Kruskal-Wallis 試験及びMann-Whitney 試験を使用して行われた。

【0113】

マーカーの値間の相互関連付けが、Spearman 等級付け試験を使用して行われた。循環性マーカーのレベルと患者状態の重症度の間の相互関連付けが、“一元分析”試験ANOVA (Bonferroni-Dunn)、Mann-Whitney 試験及びWilcoxon 試験を使用して行われた。

【0114】

一般に、 $p < 0.05$ の値は、統計的に有意であるとみなされた。グラフは、それらの中央値及び第一及び第三四分位値により表される縦棒のグラフの形態で作製された。

B. 結果

B. 1 ESM-1の血漿レベルと血清レベルの間の相関関係

第一の試験では、血液試料を採取する条件がESM-1レベルの値に影響しうるかどうかを確認した。41の健康な対象におけるESM-1の血漿レベルと血清レベルの値の比較により、強い相関関係 ($r = 0.85$; $p < 0.0001$) が示されていた。図3では、コントロールグループに関する限り、この検討の最初の36患者については、所与の患者についてESM-1の血漿レベルと血清レベルの間に有意な差は検出されえないことが観察できる。

【0115】

これら結果は、まず、血液の凝固はESM-1レベルを変えないことを示唆する。これら結果は、タンパク質ESM-1が、血液試料と血漿試料のいずれからでも定量されうることも示唆する。

【0116】

従って、ESM-1の血清レベルだけが、残りの検討について用いられた。

B. 2 コントロールグループ

ESM-1の血清レベルの平均値は、表1に示されているように、健康な対象においては 0.7 ± 0.4 ng/mLである一方で、アトピー対象のグループにおいてはESM-1

10

20

30

40

50

の血清レベルは $1.0 \pm 0.1 \text{ ng/mL}$ であった。

【0117】

差は小さいものの、統計的に有意 ($p < 0.05$) であった。

結論として、本検討において言及されたコントロールグループは、一般集団の代表である健康な非アトピー対象のグループであるので、この健康な非アトピー対象のグループにおける ESM-1 レベルの平均値が基準正常値と決定された。

B.3 患者のグループ

患者の複数のグループにおける循環性マーカーの結果が、表1に纏められ、図4及び5中に示されている。

【0118】

重症敗血症と認定された患者の血清において、sESM-1、sICAM-1、CRP及びproCTレベルが、各々の患者グループについて、コントロールグループと比較して強く増大した(表1)。

【0119】

これら増大したレベルは、敗血症を患っている患者のグループにおけるプロカルシトニン(表1、図4及び5)を除いて、全てのマーカー及び全ての患者のグループについて統計的に有意なもの ($p < 0.01$ 又はそれを下回る) であった。

【0120】

障害の重症度は、敗血症、重症敗血症及び敗血症ショックとそれぞれ命名された3つのレベルに従って定義された。これらグループの各々において、ESM-1レベルは、障害の重症度に統計的に相関するやり方 ($p < 0.01$, $n = 61$) で増大した(表2を参照のこと)。

【0121】

類似の増大が、血清プロカルシトニン及びCRPレベル(それぞれ $p = 0.0001$, $n = 34$ と、 $p < 0.01$, $n = 43$) について見出された。

しかしながら、sICAM-1のレベルは正常値の約5倍まで増加したが、各々の患者のグループ内においては、類似のレベルを示したにすぎなかった。

【0122】

CRP (Anova及びMann-Whitney) 及びProCTレベル (Mann-Whitney) は、敗血症を患っている患者のグループを、重症敗血症を患っている患者から識別できるようにしたが、それは、ESM-1レベルについてはそうではなかった。

【0123】

ESM-1 (Anova及びMann-Whitney) 及びProCTレベル (Mann-Whitney) は、重症敗血症を患っている患者のグループを、敗血症ショックを患っている患者から識別できるようにしたが、CRPレベルについてはそうではなかった(表2参照のこと)。

【0124】

これら結果からみて、CRPは、最も重症度の低い障害についての最も感度の良好なマーカーと考えられ、そして、ESM-1レベルは、より重症な敗血症についてProCTマーカーよりも良好なマーカーと考えられる。

【0125】

ESM-1、sICAM-1、CRP又はProCTの血清レベルの間の相関関係を調査することによって、CRPレベルとプロカルシトニンレベルの間の有意な相関関係 ($p < 0.01$ 、表3) が樹立された。

【0126】

しかしながら、他のマーカー間には有意な相関関係が見出されなかった(表3参照のこと)。

更に、敗血症ショックを患っている患者のグループにおいては、ESM-1のレベルと血漿クレアチニンのレベルの間に相関関係が観察されなかった(結果は示されていない)。

【0127】

ESM-1の血清レベルが死亡兆候を予測できるかどうかを確認するために、第一のサブ

10

20

30

40

50

ローチは、死亡した患者と生存している患者の間で血清 E S M - 1 の平均レベルを比較することであった。

【 0 1 2 8 】

蘇生した患者及び致命的結末を迎えた患者の全ての患者を考慮に入れると、その結果は、入院の日（第 0 日）における血清 E S M - 1 のレベルが、第 1 0 日に死亡した患者のグループにおいて有意により高かったことを示した（第 1 0 日； $p < 0 . 0 1$ ；図 6 A 及び図 7）。このような差は、他のマーカーである s I C A M - 1、C R P 又は P r o C T については示されなかったことが強調されうる（図 6 B ~ 9）。

【 0 1 2 9 】

第二のアプローチにおいては、s E S M - 1 及び s I C A M - 1 のレベルが、入院の日（第 0 日）と 2 4 時間後（第 1 日）の両方で測定された。第 0 日での E S M - 1 のレベルは、生存した患者よりも死亡した患者において有意に高かった（図 7 A）。この差は、第 1 日でも持続した（ $n = 2 0$ ， $p < 0 . 0 5$ ）（図 7 A）。

【 0 1 3 0 】

このような差は、他のマーカーである s I C A M - 1（図 7 B）、C R P、プロカルシトニン又は s I C A M - 1 のもいずれにも観察されなかった。

敗血症ショックを患っている患者のグループ内だけで、第 0 日及び第 1 日（ $n = 1 1$ ）における E S M - 1 の血清レベルは、生存した患者よりも死亡した患者において有意に高かった（図 8 A ~ B）。

【 0 1 3 1 】

各々のグループにおいて、各々の患者の第 0 日における s I C A M - 1、第 1 日における s I C A M - 1（図 8 B）、第 0 日における C R P 又は第 0 日における P r o C T のレベルと、第 1 0 日の生存の間に統計的に有意な相関関係が見出されなかった。

【 0 1 3 2 】

この実施例におけるこれら結果は、循環性タンパク質 E S M - 1 の濃度の平均値が、健康な対象と比較して大きく高いことを示している。この循環性 E S M - 1 の平均濃度の増大は、その障害の臨床的重症度のレベルと相関している。障害の初期の段階における循環性 E S M - 1 の最も高いレベルは、1 0 日後の患者の生存の見込みがより低いことと関連した。

【 0 1 3 3 】

先の検討と矛盾することなく、C 反応性タンパク質若しくは C R P (Morley et al.)、プロカルシトニン若しくは P r o C T (ASSICOT M et al.; MULLER B et al.; WANNER GA et al.) 及び可溶性 I C A M - 1 若しくは s I C A M - 1 (KAYAL S et al.; SESSLER C N et al. (1995); SESSLER C N et al. (1993)) のような循環性マーカーも、本検討の患者において有意に増大した。C R P 及び P r o C T マーカーは、患者の臨床的重症度に相関した。

【 0 1 3 4 】

しかしながら、3 つのマーカー、即ち、C R P、P r o C T、s I C A M - 1 のレベルを測定しても、循環性タンパク質 E S M - 1 のレベルの測定とは対照的に、死亡前兆を予測できなかった。更に、E S M - 1 の血清レベルの予言的な値は、入院の第 0 日における血清 E S M - 1 の初期値に優勢にリンクしていた。

【 0 1 3 5 】

本検討においては、血清 E S M - 1 のレベルの増大は、血漿クレアチニンレベルの増大によって測定されたとき、腎機能不全とは相関しなかった。この結果は、敗血症ショックを患っている患者における血清中のタンパク質 E S M - 1 の増大したレベルが、劣化した肺組織又はストレス状態にある血管壁の細胞から起きることを示唆する。

【 0 1 3 6 】

結論として、この実施例に提示された検討の結果は、E S M - 1 が、敗血症を患っている患者における内皮細胞の機能不全の新たなマーカーに相当することを示している。

可溶性接着分子、サイトカイン類、プロカルシトニン、又は一定の細胞の特殊な機能不全

他のマーカーのような循環性マーカーを他のパラメーターの値と組み合わせれば、タンパク質 ESM-1 のレベルは、敗血症を患っている患者についての臨床的重症度と結末に関する有用な情報を供給する。

【 0 1 3 7 】

【表 1】

表 1

健康なボランティア、及び敗血症を患っている患者の異なるグループ
における循環性タンパク質 ESM-1 の濃度の値

グループ	n	血液 マーカー			
		sESM-1 (ng/mL)	sICAM-14 (ng/mL)	CRP (mg/L)	プロカルシトニン (ng/mL)
正常値 (健康な非アトピー)	20	0.7±0.1	571±168	<10	<0.5
全患者	61	5.4±0.8***	2510±261***	194±21**	39.8±12.4***
敗血症 (肺)	29	2.5±0.3***	2336±406***	126±15***	2.0±1.4
重症 敗血症	12	4.5±1.4***	2696±721*	292±73**	23.8±9.2***
敗血症ショック	20	10.0±1.8***	2661±373***	245±29***	90.8±29.5***

血液マーカーの値は、平均値±標準偏差として表される。各々の患者グループと正常値(健康な非アトピー対象)の間の有意差: *p<0.01; **p<0.001; ***p<0.001。

【 0 1 3 8 】

【表 2】

表 2

循環性マーカーのレベルを関数とする患者の状態の重症度の可能な識別法

有意差を示すマーカー (ANOVA)	sESM-1	sICAM-1	CRP	ProCT
ECS と S/S	p<0.01	NS	NS	NS
ECS と S	p<0.0001	NS	p<0.05	P<0.01
S/S と S	NS	NS	p<0.01	NS
Kruskal-Wallis	p<0.01	NS	p<0.01	P=0.0001

有意差を示すマーカー (Mann-Whitney)	sESM-1	sICAM-1	CRP	ProCT
ECS と S/S	p<0.05	NS	NS	p<0.05
ECS と S	p<0.001	NS	p<0.01	p=0.0001
S/S と S	NS	NS	P<0.05	p<0.01

NS=有意差なし。

【 0 1 3 9 】

【表 3】

表 3

血液マーカーの異なる値間の相関関係

マーカー	sESM-1	pESM-1	年齢	1 ICAM-1	CRP	ProCT	血漿クレアチニン
sESM-1	-	p<0.0001	NS	NS	NS	NS	NS
sICAM-1	NS	-	-	-	NS	NS	-
CRP	NS	-	-	NS	-	p<0.01	-
ProCT	NS	-	-	NS	p<0.01	-	-

NS=有意差なし。

10

【 0 1 4 0 】

文献

- ・ AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS/SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE CONSENSUS CONFERENCE (1992).
- ・ ASSICOT M et al., 1993, Lancet, vol.341: 515-518
- ・ BECHARD et al. (2000) J. Vasc. Res., vol.37 (5): 417-425.
- ・ ICHINOSE N et al. (1991, In: Fluorometric analysis in Biomedical Chemistry, vol.1.10. ページ110. Chemical Analysis, Winefordner JD et al. 編集者 John Wiley and Sons, New York)
- ・ KAYAL S et al., 1998, Am. J. Respir. Crit Care Med, vol.157:774-776;
- ・ KOHLER 及び MIELSTEIN (1975, Nature, vol.256:495)
- ・ KOZBOR et al. (1983, hybridoma, vol.2 (1): 7-16).
- ・ ASSALLE P et al. (1996) The Journal of Biological Chemistry, vol.271(34): 20.458-20.464).
- ・ LEGER et al., (1997, Hum. Antibodies, Vol.8 (1):3-16).
- ・ MARTINEAU et al. (1998, J. Mol. Biol., vol.280 (1): 117-127).
- ・ MORLEY et al., Ann. N.Y. Acad. Sci, 1982, vol. 389:406-418),
- ・ MULLER B et al (2000), Ceit. Care Med., vol.28:977-983;
- ・ RIDDER et al; (1995, Biotechnology N Y), vol. 13 (3): 255-260).
- ・ REINMANN et al. (1997, AIDS Res. Hum. Retroviruses, vol.13 (11):933-943)
- ・ SESSLER C.N. et al., Am. J. Respir. Crit Care Med., 1995, vol. 151:1420-1427;
- ・ SESSLER C.N., 1993, Chest, vol.104(2): 11S)
- ・ WANNER et al., 2000. Crit. Care Mod., vol 28 (4): 950-957

20

30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 4 1 】

【 図 1 】 図 1 は、タンパク質 E S M - 1 についての本発明による免疫検出試験（白抜きの丸）と、黒塗りの丸で表される BECHARD et al. (2000) により記載された検出試験の検出の感度の比較を示す。縦座標は、試験された試料中のタンパク質 E S M - 1 の ng / mL で表現された濃度を表す。光学密度が横座標上に表されている。

40

【 図 2 】 図 2 は、“サンドイッチ”タイプの免疫酵素的技術に従って行われた免疫検出プロファイルを示す。全ての場合において、ハイブリドーマ M E P 1 4 によって産生されたモノクローナル抗体が、マイクロ滴定プレート上に吸着された。光学密度が横座標上に表されている。縦座標は、H E K 2 9 3 株の細胞によって産生されたタンパク質 E S M - 1 における ng / mL で表現された濃度を表す。この免疫検出試験において用いられた第二抗体は、タンパク質 E S M - 1 の N 末端領域に対して特異的に向けられた抗体であった。それは、抗体 M E C 2 (図 2 A)、M E C 1 5 (図 2 B) 及び M E C 3 6 (図 2 C) であった。

【 図 3 】 図 3 は、健康なボランティア若しくは患者の血漿又は血清中に見出されたタンパク質 E S M - 1 の濃度の比較を示す。縦座標は、タンパク質 E S M - 1 の ng / mL で表

50

現された血清濃度を表す。横座標は、タンパク質 E S M - 1 の ng / mL で表現された血漿濃度を表す。

【図 4】図 4 は、健康なボランティア又は増大する臨床的重症度の敗血症を患っている患者の血清中に見出された循環性タンパク質 E S M - 1 の量を示す。 ng / mL で表現された血清タンパク質 E S M - 1 の濃度が、縦座標上に示されている。横座標は、試験された個体の異なる集団、即ち、それぞれ健康な対象 (C T R L)、Crit. Care Med., 1992, vol. 20: 864-874 に公開されている臨床的定義に従う敗血症、重症敗血症又は敗血症ショックを患っている患者を示す。

【図 5】図 5 は、健康者の集団、又は、敗血症、重症敗血症もしくは敗血症ショックを患っている患者の集団における 3 つの敗血症マーカーの定量を示す。 図 5 A は、血清中の可溶性 I C A M - 1 タンパク質の ng / mL で表現された定量を示す。 図 5 B は、C 反応性タンパク質の mg / mL で表現された定量を示す。 図 5 C は、血清プロカルシトニンの ng / mL で表現された定量を示す。

10

【図 6】図 6 は、それぞれ生存した患者及び死亡した患者の入院第 0 日における、循環性タンパク質 E S M - 1 のレベルと、3 つの慣用的敗血症マーカー、即ち、それぞれ可溶性 I C A M - 1 タンパク質、C 反応性タンパク質及びプロカルシトニンの各々のレベルとの間の比較を示す。 図 6 A は、タンパク質 E S M - 1 の ng / mL で表現された血清レベルを示す。 図 6 B は、可溶性 I C A M - 1 タンパク質の ng / mL で表現された血清レベルを示す。 図 6 C は、C 反応性タンパク質の ng / mL で表現された血清レベルを示す。 図 6 D は、プロカルシトニンの ng / mL で表現されたレベルを示す。

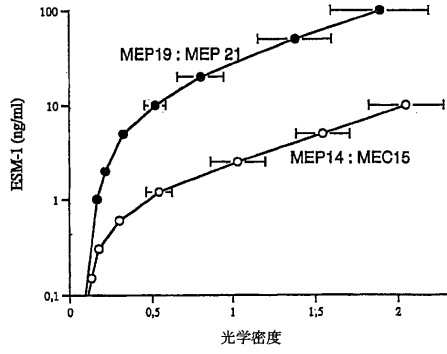
20

【図 7】図 7 は、タンパク質 E S M - 1 又は可溶性 I C A M - 1 タンパク質の量の入院後第 0 日及び第 1 日の患者における前兆値を死亡した患者のものと比較して示す。 図 7 A は、生存した患者 (黒塗りの丸) 及び死亡した患者 (白抜きの丸) において入院後第 0 日及び第 1 日にそれぞれ見出されたタンパク質 E S M - 1 の ng / mL で表現されたレベルを示す。 図 7 B は、その同じ患者における血清可溶性 I C A M - 1 タンパク質のレベルを示す。

【図 8】図 8 は、E S M - 1 及び可溶性 I C A M - 1 タンパク質のレベルの入院後第 0 日及び第 1 日に測定された死亡前兆値を示す。 図 8 A は、生存した患者 (黒塗りの円) 及び死亡した患者 (白抜きの円) における血清タンパク質の ng / mL で表現されたレベルを示す。 図 8 B は、生存した患者 (黒塗りの円) 及び死亡した患者 (白抜きの円) における血清可溶性 I C A M - 1 タンパク質の ng / mL で表現されたレベルを示す。

30

【 図 1 】



【 図 2 】

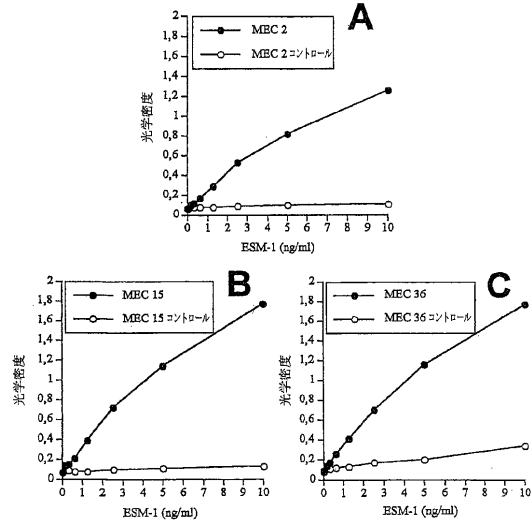
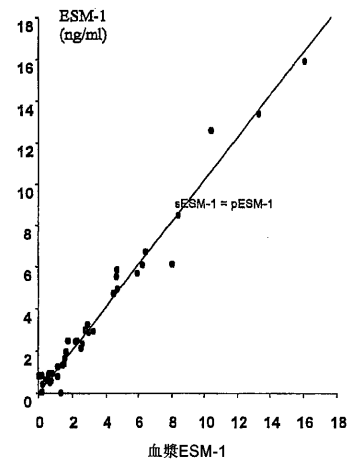
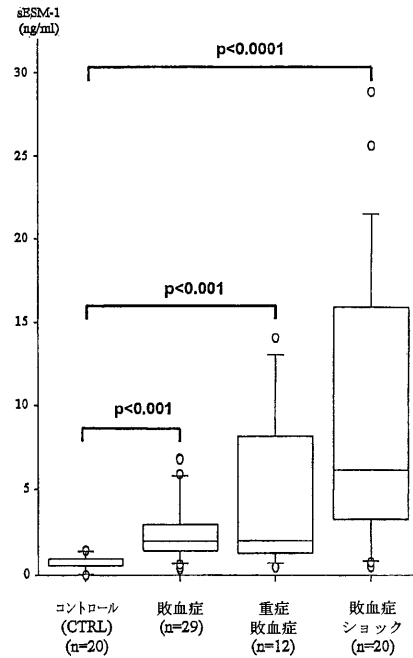


FIGURE 2 A, B, C

【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】

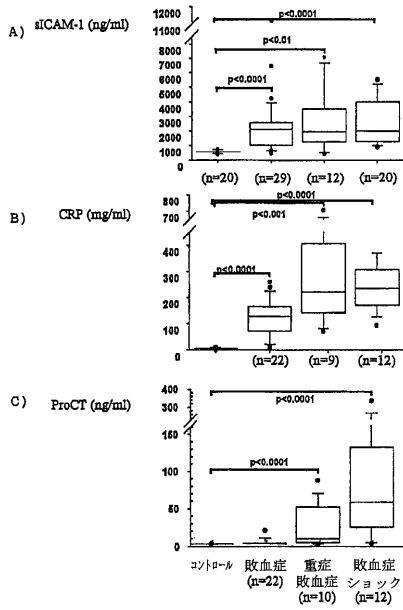


FIGURE 5 A, B, C

【 図 6 】

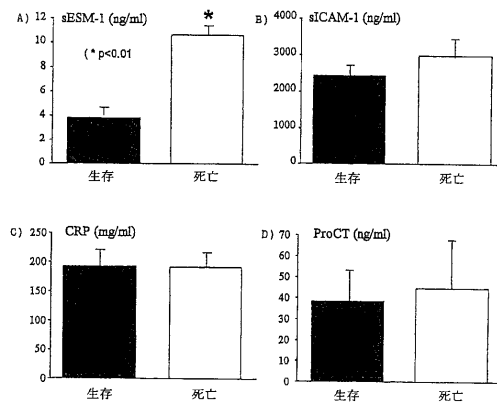


FIGURE 6 A, B, C, D

【 図 7 】

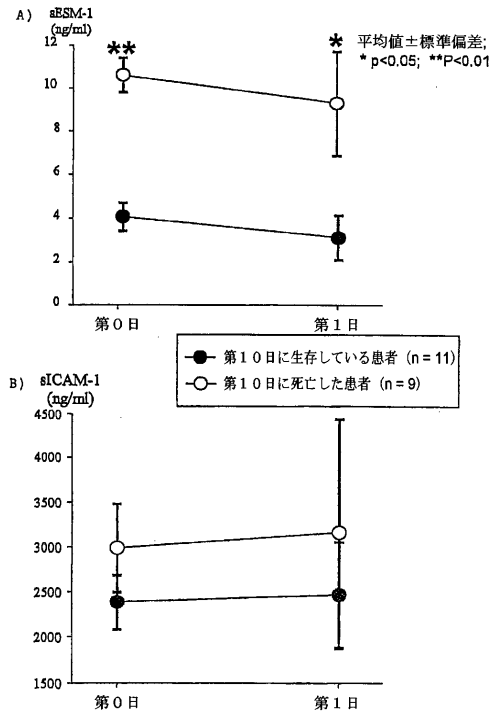


FIGURE 7 A, B

【 図 8 】

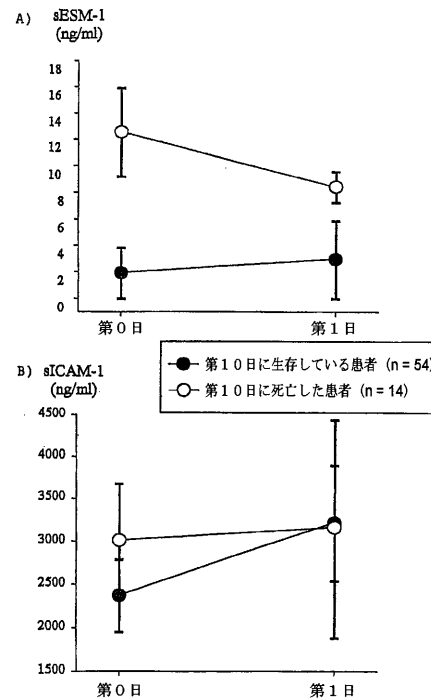


FIGURE 8 A, B

【国際公開パンフレット】

(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
16 mai 2002 (16.05.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/39123 A1(51) Classification internationale des brevets⁷ :
G01N 33/74, 33/68, C07K 16/22, C12N 5/12(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/03477(22) Date de dépôt international :
8 novembre 2001 (08.11.2001)

(25) Langue de dépôt : français

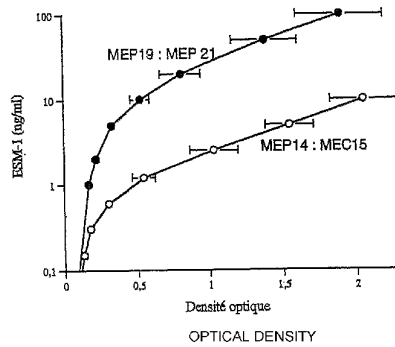
(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/14421 9 novembre 2000 (09.11.2000) FR(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : IN-
STITUT PASTEUR DE LILLE [FR/FR]; 1 rue du Pro-
fesseur Calmette, F-59019 LILLE cedex (FR). INSTITUT
NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE
MÉDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101 rue de Tolbiac,
F-75654 PARIS cedex 13 (FR).(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : LAS-
SALLE, Philippe [FR/FR]; Résidence Sébastopol,
Appartement 14, 13 rue Colbrant, F-59000 LILLE (FR).
BECHARD, David [FR/FR]; 30 rue des Martyrs, F-75009
PARIS (FR). TONNEL, André-Bernard [FR/FR]; rue
Gabriel Péri, F-59840 PREMESQUES (FR).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: KIT AND METHOD FOR DETECTING THE ESM-1 PROTEIN

(54) Titre : TROUSSE ET PROCÉDE DE DETECTION DE LA PROTEINE ESM-1



(57) Abstract: The invention concerns an equipment or kit for detecting the ESM-1 protein in a sample, comprising: a) a first antibody specifically binding with the N-terminal region of the ESM-1 protein included between the amino acid in position 20 and the amino acid in position 78 of the sequence of amino acids of said protein; and b) a second antibody specifically binding with the C-terminal region included between the amino acid in position 79 and the amino acid in position 184 of the sequence of amino acids of the ESM-1 protein.

[Suite sur la page suivante]

WO 02/39123 A1

WO 02/39123 A1



(74) Mandataires : CATHERINE, Alain etc.; Cabinet HARLE et PHELIP, 7 rue de Madrid, F-75008 PARIS (FR).

(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avec une (des) indication(s) relative(s) à du matériel biologique déposé, fournie(s) selon la règle 13bis, séparément, et non avec la description

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

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien

(57) Abrégé : L'invention est relative à un nécessaire ou trousse de détection de la protéine ESM-1 dans un échantillon, comprenant: a) un premier anticorps se liant spécifiquement à la région N-terminale de la protéine ESM-1 comprise entre l'acide aminé en position 20 et l'acide aminé en position 78 de la séquence en acides aminés de cette protéine; et b) un second anticorps se liant spécifiquement à la région C-terminale comprise entre l'acide aminé en position 79 et l'acide aminé en position 184 de la séquence en acides aminés de la protéine ESM-1.

TROUSSE ET PROCEDE DE DETECTION DE LA PROTEINE ESM-1

5 **Domaine de l'invention**

La présente invention concerne un nécessaire ou trousse de
détection de la protéine ESM-1 dans un échantillon. Elle est également
relative à un procédé de détection de la protéine ESM-1 dans un
10 échantillon mettant en oeuvre un tel nécessaire ou une telle trousse.

La trousse et le procédé de détection de la protéine ESM-1
selon l'invention sont industriellement applicables notamment à la
quantification de la protéine ESM-1 dans des échantillons biologiques,
tout particulièrement d'échantillons biologiques provenant de patients
15 dont on suspecte une altération des parois vasculaires endothéliales.

Etat de la technique

La protéine ESM-1 (pour « Endothelial-cell-Specific Molecule
20 1 ») est une protéine principalement exprimée par les cellules
endothéliales et majoritairement par les cellules endothéliales
vasculaires. La protéine ESM-1 a été décrite pour la première fois par
LASSALLE et al. (1996). L'ARN messager de ESM-1 code pour un
polypeptide de 184 acides aminés dont la séquence est décrite dans la
25 figure 1 de l'article de LASSALLE et al. (1996).

La protéine ESM-1 retrouvée dans les lysats cellulaires des
cellules endothéliales humaines possède un poids moléculaire apparent
de 20 kDa. La forme sécrétée de la protéine ESM-1 possède un poids
moléculaire apparent de 50 kDa, indiquant que la protéine ESM-1
30 sécrétée a subi des modifications post-traductionnelles.

L'utilisation d'anticorps monoclonaux pour détecter la protéine
ESM-1 est décrite dans la demande de brevet français publiée sous le
n°2.775.691 ainsi que dans l'article de BECHARD et al. (2000). Ces
anticorps monoclonaux ont été préparés par immunisation de souris
35 avec un antigène constitué de la séquence allant de l'acide aminé en
position 79 jusqu'à l'acide aminé en position 184 de la protéine ESM-1

WO 02/39123

PCT/FR01/03477

qui a été fusionnée à la protéine GST (glutathione-S-transferase). Trois familles d'anticorps monoclonaux avaient été caractérisées, ces familles d'anticorps se fixant respectivement sur les déterminants antigéniques AgD1 79P-99C (anticorps MEP 01, MEP 06 et MEP 21), AgD2 119 S-139V (anticorps MEP 08 et MEP13) et AgD3 159G-184R(anticorps MEP 04, MEP 14 et MEP19).

BECHARD et al.(2000) décrivent la mise au point d'un test immunoenzymatique du type « sandwich » mettant en oeuvre les anticorps monoclonaux MEP 19 et MEP 21 pour réaliser un test de détection de la protéine ESM-1 dans un échantillon. Ce test a permis aux auteurs de montrer une forte production de protéine ESM-1 dans le sérum de patients hospitalisés pour un choc septique. Les résultats présentés à la figure 4 de cet article montrent que le test de détection utilisant les anticorps MEP 19 et MEP 21 permet de détecter une concentration de protéine ESM-1 supérieure à 4 nanogrammes par millilitre.

Toutefois, le test immunoenzymatique de la protéine ESM-1 décrit par BECHARD et al. (2000), s'il est adapté à la détection de fortes concentrations de protéine ESM-1 dans un échantillon, ne permet pas de détecter de faibles quantités de cette protéine, qui sont pourtant significatives de troubles physiologiques, tels qu'une altération de la paroi vasculaire endothéliale chez des patients, comme cela est montré selon l'invention.

SOMMAIRE DE L'INVENTION

Le demandeur s'est attaché à mettre au point un test immunologique de détection de la protéine ESM-1 dans un échantillon, beaucoup plus sensible que le test décrit dans l'état de la technique.

L'invention a pour objet un nécessaire ou trousse pour la détection de la protéine ESM-1 dans un échantillon, comprenant:

- a) un premier anticorps se fixant spécifiquement sur la région N-terminale comprise entre l'acide aminé en position 1 et l'acide aminé en position 78 de la séquence en acides aminés de la protéine ESM-1;
- et

WO 02/39123

PCT/FR01/03477

b) un second anticorps se fixant spécifiquement sur la région C-terminale comprise entre l'acide aminé en position 79 et l'acide aminé en position 184 de la séquence en acides aminés de la protéine ESM-1.

L'invention a également pour objet un procédé de détection de la protéine ESM-1 dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

a) mettre en contact l'échantillon à tester avec un support sur lequel est immobilisé un premier anticorps se fixant spécifiquement sur la région N-terminale ou la région C-terminale de la séquence en acides aminés de la protéine ESM-1;

b) mettre en contact le complexe éventuellement formé entre l'anticorps immobilisé et la protéine ESM-1 avec un second anticorps se fixant spécifiquement sur la région N-terminale ou C-terminale non reconnue par le premier anticorps; et

c) détecter le complexe éventuellement formé entre la protéine ESM-1 et le second anticorps.

L'invention est également relative à certains anticorps mis en oeuvre dans le procédé ci-dessus.

L'invention a encore pour objet l'utilisation de la trousse de détection selon l'invention pour la détection d'une altération de la paroi vasculaire endothéliale chez un patient, notamment chez un patient affecté d'un choc septique ou d'un cancer ou encore d'un patient subissant un traitement thérapeutique susceptible d'être cytotoxique vis-à-vis des cellules endothéliales vasculaires.

DESCRIPTION DETAILLÉE DE L'INVENTION

TROUSSE DE DETECTION SELON L'INVENTION

Il est fourni selon l'invention un nécessaire ou trousse permettant de détecter avec une grande sensibilité la présence de la protéine ESM-1 dans un échantillon.

L'échantillon dans lequel la présence de la protéine ESM-1 est recherchée peut être de toute nature. De préférence, il s'agit d'un fluide

WO 02/39123

PCT/FR01/03477

biologique tel qu'un sérum, un plasma, du sang total, de l'urine, un liquide cébrospinal, ou des surnageants de culture ou encore des lysats cellulaires.

5 Le demandeur a montré que la protéine ESM-1 sécrétée par les cellules eucaryotes présentait des caractéristiques spécifiques qui n'étaient pas retrouvées dans la protéine ESM-1 produite par des cellules procaryotes, telles que les cellules de *Escherichia coli*.

La protéine ESM-1 est sécrétée par les cellules eucaryotes, et tout particulièrement par les cellules endothéliales, sous la forme d'une
10 glycoprotéine, plus précisément un protéoglycane possédant une chaîne du type chondroïtine/sulfate de dermatane. De plus, le demandeur a montré que la protéine ESM-1 sécrétée par les cellules eucaryotes subissait d'autres modifications post-traductionnelles incluant des modifications conformationnelles provoquées par la formation de ponts
15 disulfure entre les résidus cystéines localisés majoritairement dans la région N-terminale de cette protéine. Le polypeptide ESM-1 de 184 acides aminés est référencé comme la séquence SEQ ID N°1.

Pour la mise au point d'un test de détection immunologique de la protéine ESM-1 de grande sensibilité, le demandeur s'est attaché à
20 préparer des anticorps monoclonaux dirigés contre la région N-terminale allant de l'acide aminé en position 20 à l'acide aminé en position 78 de la séquence SEQ ID N°1 décrite par LASSALLE et al. (1996), l'acide aminé en position 20 constituant l'acide aminé amino-terminal de la protéine ESM-1 sécrétée.

25 De préférence, les anticorps monoclonaux préparés par le demandeur sont dirigés contre la protéine ESM-1 sécrétée par des cellules eucaryotes et ayant subi les modifications post-traductionnelles précitées.

30 Plus spécifiquement, le demandeur a fabriqué des lignées cellulaires d'hybridomes produisant des anticorps monoclonaux se fixant spécifiquement sur la région de la protéine ESM-1 subissant des modifications conformationnelles du fait de la création de ponts disulfure, c'est-à-dire des anticorps dirigés contre la région N-terminale de la protéine ESM-1 allant de l'acide aminé en position 20 jusqu'à l'acide

WO 02/39123

PCT/FR01/03477

aminé en position 78 de la séquence en acides aminés de la protéine ESM-1 de séquence SEQ ID N°1.

Afin d'obtenir un outil de détection de la protéine ESM-1 dans un échantillon, le demandeur a mis au point un test immunologique du type « sandwich » mettant en oeuvre deux anticorps se liant spécifiquement à deux régions distinctes de la protéine ESM-1, respectivement un anticorps se liant spécifiquement à la région N-terminale allant de l'acide aminé en position 20 jusqu'à l'acide aminé en position 78 de ESM-1 et un anticorps se liant spécifiquement à la région C-terminale allant de la position 79 à la position 184 de la séquence de ESM-1.

Un premier objet de l'invention consiste donc en une trousse ou nécessaire de détection de la protéine ESM-1 dans un échantillon, ladite trousse comprenant:

a) un premier anticorps se liant spécifiquement à la région N-terminale de la protéine ESM-1 comprise entre l'acide aminé en position 20 et l'acide aminé en position 78 de la séquence en acides aminés de cette protéine; et

b) un second anticorps se liant spécifiquement à la région C-terminale comprise entre l'acide aminé en position 79 et l'acide aminé en position 184 de la séquence en acides aminés de la protéine ESM-1.

De manière tout à fait préférée, l'anticorps se liant spécifiquement à la région N-terminale de ESM-1 est dirigé spécifiquement contre la région N-terminale de la protéine ESM-1 sécrétée par les cellules eucaryotes et ayant subi les modifications post-traductionnelles détaillées ci-dessus. Cela signifie que l'anticorps se liant spécifiquement à la région N-terminale a été obtenu selon un procédé comportant une étape au cours de laquelle on injecte à un animal une préparation purifiée de la protéine ESM-1 produite par une cellule eucaryote.

Par « anticorps » au sens de l'invention, on entend toute molécule comprenant un « paratope » capable de se lier spécifiquement à la région N-terminale ou à la région C-terminale de la protéine ESM-1. Par « anticorps » selon l'invention, on entend aussi une population homogène de molécules comprenant toutes le même « paratope »

capable de se lier spécifiquement à la région N-terminale ou C-terminale de la protéine ESM-1.

On entend par « paratope » le site de combinaison antigénique compris dans le fragment Fab d'un anticorps qui est localisé dans les 5 régions hypervariables ou CDR des domaines variables V_H et V_L de la chaîne lourde et de la chaîne légère d'une immunoglobuline.

Un anticorps selon l'invention peut être préparé à partir d'hybridomes selon la technique décrite par KOHLER et MIELSTEIN (1975), ou encore par la technique de l'hybridome de cellules B 10 humaines décrites par KOZBOR (1983). Un anticorps selon l'invention englobe également les fragments d'anticorps chimériques Fv simple chaîne (ScFv pour « Single Chain Fv ») tel que décrit dans le brevet US n°4.946.778 et par MARTINEAU et al.(1998). Un anticorps selon l'invention peut également être produit par des banques de phages 15 (« Phage Display Libraries ») telles que décrites par RIDDER et al. (1995). Un anticorps selon l'invention peut être également un anticorps humanisé produit selon la technique décrite par REINMANN et al.(1997) ou encore par la technique décrite par LEGER et al.(1997).

De manière tout à fait préférée, la trousse de détection de la 20 protéine ESM-1 selon l'invention comprend l'un des deux anticorps sous une forme immobilisée sur un support. Dans ce mode de réalisation préféré, la trousse de détection de l'invention se présente sous une forme dite « prête à l'emploi » pour réaliser un test d'immunodétection du type « sandwich » de la protéine ESM-1.

Il a été montré selon l'invention que la mise en oeuvre d'une 25 trousse telle que définie ci-dessus pour la détection de la présence de la protéine ESM-1 dans un échantillon permettrait d'obtenir une sensibilité de détection 10 fois plus grande que celle observée avec le test de détection de ESM-1 décrit par BECHARD et al. (2000).

La haute sensibilité du test d'immunodétection selon l'invention 30 a rendu possible la détection de concentrations très faibles de la protéine ESM-1 dans un échantillon biologique, par exemple dans un sérum humain, et a ainsi permis la détection précoce d'altération des parois vasculaires endothéliales chez un patient.

WO 02/39123

PCT/FR01/03477

Notamment, la mise en oeuvre d'une trousse d'immunodétection selon l'invention a permis de détecter des concentrations sériques de ESM-1 allant de 1 à 3 nanogrammes par ml chez des individus dits « atopiques » atteints de sepsis.

5 Comme cela est montré dans les exemples, la mise en oeuvre d'une trousse d'immunodétection selon l'invention permet de détecter des concentrations de ESM-1 de l'ordre de 100 à 200 picogramme/ml, alors que le test décrit par BECHARD et al.(2000) ne permet pas la

10 détection de concentrations de ESM-1 inférieures à 1 nanogramme/ml. Avantageusement, l'anticorps dirigé contre la région N-terminale de ESM-1 est un anticorps monoclonal produit par une lignée d'hybridome obtenue après immunisation d'un mammifère, de préférence une souris, avec la protéine ESM-1 recombinante synthétisée par une cellule eucaryote, par exemple par une cellule de la lignée CHO

15 transformée par un vecteur d'expression comprenant un insert d'ADN codant pour la protéine ESM-1 décrite par LASSALLE et al. , par exemple le vecteur pcDNA3. De manière tout à fait préférée, il s'agit de l'anticorps monoclonal produit par la lignée d'hybridome désignée MEC 15 déposée

20 à la Collection de Cultures de Micro-organismes (CNCM) de l'Institut Pasteur le 17 Octobre 2000 sous le N° d'accès I-2572. L'anticorps MEC15 constitue un objet de l'invention.

L'anticorps se liant spécifiquement à la partie C-terminale de la protéine ESM-1 peut être indifféremment un anticorps dirigé contre la

25 protéine ESM-1 produite par une cellule procaryote, telle que *Escherichia coli*, ou par une cellule eucaryote, telle que les cellules de la lignée CHO. Préférentiellement, l'anticorps se liant spécifiquement à la région C-terminale de ESM-1 est choisi parmi les anticorps capables de

30 reconnaître l'un des trois déterminants antigéniques suivants de la protéine ESM-1:
- le déterminant AgD1 allant du résidu proline en position 79 jusqu'au résidu cystéine en position 99 de ESM-1, tels que les anticorps produits par les lignées d'hybridome MEP01, MEP06 et MEP21 décrits

35 par BECHARD et al. (2000) ;

WO 02/39123

PCT/FR01/03477

- le déterminant antigénique AgD2 allant du résidu sérine en position 119 jusqu'au résidu valine en position 139 de ESM-1 reconnu par les anticorps produits par les hybridomes MEP08 et MEP13 décrits par BECHARD et al.(2000);

5 - le déterminant antigénique AgD3 allant du résidu glycine en position 159 jusqu'au résidu arginine en position 184 de ESM-1 est reconnu par les anticorps produits par les lignées d'hybridome MEP04, MEP14 ET MEP19 décrits par BECHARD et al. (2000).

De manière tout à fait préférée, l'homme du métier pourra
10 avantageusement se référer, pour l'utilisation d'un anticorps se liant spécifiquement à la région C-terminale de la protéine ESM-1, aux anticorps suivants:

- les anticorps monoclonaux spécifiques du déterminant antigénique D1 produits par la lignée d'hybridome déposée auprès de la
15 CNCM le 19 Novembre 1997 sous le N° d'accès I-1944 (anticorps MEP 21);

- les anticorps monoclonaux spécifiques du déterminant antigénique D2 produits par la lignée d'hybridome déposée le 19
20 Novembre 1997 auprès de la CNCM sous le N° d'accès I-1941 (anticorps MEP08);

- les anticorps monoclonaux spécifiques du déterminant antigénique D3 produits par la lignée d'hybridome déposée le 19
25 Novembre 1997 auprès de la CNCM sous le N° d'accès I-1942 (anticorps MEP14) et I-1943 (anticorps MEP19).

Dans le mode de réalisation préféré d'une trousse
d'immunodétection selon l'invention, le premier et le second anticorps
sont choisis de telle sorte que leurs sites respectifs de reconnaissance
sur la protéine ESM-1 soient très distants l'un de l'autre afin d'éviter tout
30 événement de fixation compétitive d'un anticorps vis-à-vis de l'autre sur la protéine, qui pourrait être provoqué par un phénomène d'encombrement stérique dans le cas où les sites de reconnaissance respectifs des deux anticorps sont trop voisins.

Ainsi, dans un mode de réalisation préféré d'une trousse de
détection selon l'invention, le premier anticorps se liant spécifiquement
35 sur la région N-terminale de la protéine ESM-1 est l'anticorps produit par

la lignée d'hybridome MEC15. Selon ce mode de réalisation préféré, l'anticorps se liant spécifiquement à la région C-terminale de la protéine ESM-1 est l'anticorps monoclonal produit par la lignée d'hybridome MEP14.

5 De manière générale, un anticorps dirigé contre la région C-terminale de la protéine ESM-1 peut être sélectionné selon la technique décrite par BECHARD et al. (2000), qui consiste à préparer un vecteur d'expression comprenant un insert d'ADN codant pour la région C-terminale de la protéine ESM-1 fusionnée à la protéine GST, puis à
10 immuniser des souris avec la protéine ESM-1 purifiée obtenue à partir de lysats cellulaires de cellules de *Escherichia coli* transformées avec le vecteur d'expression précité. Après fusion de cellules spléniques des souris ainsi immunisées avec des cellules de myélome afin d'obtenir une série d'hybridomes produisant des anticorps monoclonaux, les anticorps
15 d'intérêt se liant spécifiquement à la région C-terminale de la protéine ESM-1 peuvent être sélectionnés par cartographie d'épitopes à l'aide de peptides dérivés de ESM-1 contenant des délétions progressives de l'extrémité N-terminale de la région C-terminale de cette protéine.

De même, l'homme du métier peut sélectionner des anticorps
20 se liant spécifiquement à la région N-terminale de la protéine ESM-1 en immunisant des souris avec la protéine ESM-1 complète, de préférence la protéine ESM-1 complète produite par une cellule hôte eucaryote, puis en produisant une série de lignées d'hybridomes à partir des cellules spléniques des souris immunisées, puis à sélectionner les anticorps
25 d'intérêt se liant spécifiquement sur la région N-terminale, par exemple par des tests d'immuno-détection compétitifs avec les anticorps se fixant spécifiquement sur la région C-terminale de ESM-1. Les anticorps d'intérêt sont ceux qui n'entrent pas en compétition avec les anticorps spécifiques de la région C-terminale de ESM-1, c'est-à-dire les anticorps
30 qui n'entrent en compétition avec aucun des anticorps spécifiques des déterminants antigéniques D1, D2 et D3 de la protéine ESM-1.

De préférence, l'un des deux anticorps constitutifs de la trousse de détection selon l'invention est immobilisé sur un support. Le support sur lequel est immobilisé l'anticorps peut être de toute nature connue de

WO 02/39123

PCT/FR01/03477

l'homme du métier spécialiste des tests d'immuno-détection, en particulier des tests d'immuno-détection du type « sandwich ».

A titre illustratif, le support sur lequel est immobilisé l'anticorps peut être un matériau insoluble dans l'eau poreux ou non poreux. Le support peut être hydrophile ou susceptible d'être rendu hydrophile et comprend les poudres inorganiques telles que la silice, le sulfate de magnésium et l'aluminium; les matériaux polymères naturels, en particulier les matériaux cellulosiques et les matériaux dérivés de la cellulose; des polymères naturels ou synthétiques tels que la nitro-cellulose, l'acétate de cellulose, le poly(chlorure de vinyle), le polyacrylamide, le dextran réticulé, l'agarose, le polyacrylate, le polyéthylène, le polypropylène, le poly(4-méthylbutène), le polystyrène, le polyméthacrylate, le poly(téréphtalate d'éthylène), le Nylon, le poly(butyrate de vinyle), certains types de verre tels que le Bioglass, ou des céramiques.

La fixation d'un anticorps selon l'invention sur un support peut être réalisée par des techniques bien connues de l'homme du métier. Le support peut se présenter sous des formes diverses, y compris sous forme de bandes ou de particules telles que des billes. La surface du support peut être polyfonctionnelle ou susceptible d'être polyfonctionnalisée de manière à fixer l'anticorps via des interactions covalentes ou non covalentes qui peuvent être spécifiques ou non spécifiques.

A titre illustratif, pour l'immobilisation d'anticorps sur un support, l'homme du métier peut avantageusement se référer au brevet US N°4,168,146 ou encore au brevet US N°4,347,311.

Avantageusement, l'un des anticorps constitutifs de la trousse de détection selon l'invention est lié de manière covalente à une molécule permettant sa détection directe, ou indirecte.

De préférence, dans le mode de réalisation dans lequel l'un des anticorps est immobilisé sur un support, l'autre anticorps est lié de manière covalente à une molécule permettant sa détection directe, ou indirecte.

La molécule détectable peut être isotopique ou non isotopique.

WO 02/39123

PCT/FR01/03477

A titre illustratif, mais non limitatif, la molécule détectable peut intervenir dans une réaction catalytique, telle qu'une enzyme, un fragment d'enzyme, un substrat d'enzyme, un inhibiteur d'enzyme, un co-enzyme ou un catalyseur. La molécule détectable peut être également un chromogène, tel qu'un fluorophore, un colorant, une molécule chimiluminescente.

La molécule détectable peut ainsi être une molécule fluorescente telle que les molécules décrites par ICHINOSE et al. (1991) ou encore des dérivés d'isothiocyanate fluorescents, la phycoerythrine, l'isothiocyanate de rhodamine, le chlorure de dansyle ou encore le composé XRITC, la protéine GFP (« Green Fluorescent Protein ») du poisson *Aequorea Victoria* et ses nombreux dérivés, ou encore la protéine YFP (« Yellow Fluorescent Protein ») ainsi que la protéine luciférase.

Parmi les molécules détectables possédant une activité catalytique, les molécules préférées sont les enzymes suivantes, selon la Classification Internationale I.U.B.: (i) les oxydoréductases de classe 1 et (ii) les hydrolases de la classe 3. Les oxydoréductases préférées sont (i) les déshydrogénases de la classe 1.1, plus particulièrement 1.1.1, 1.1.3 et 1.1.99 et (ii) les peroxydases de la classe 1.11 et (iii) des hydrolases de la classe 3.1, et plus particulièrement de la classe 3.1.3 et de la classe 3.2, plus particulièrement 3.2.1. Les déshydrogénases préférées sont la malate déshydrogénase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase et la lactate déshydrogénase. L'oxydase préférée est la glucose oxydase. La peroxydase préférée est la peroxydase de raifort (« horse radish peroxydase »). Les hydrolases préférées sont les phosphatases alcalines, la β -glucosidase et le lysozyme.

La molécule détectable peut être également une molécule marquée radioactivement, par exemple par un isotope choisi parmi [^3H], [^{32}P] et [^{125}I].

Dans le mode de réalisation dans lequel la molécule détectable constitue un marqueur indirect, l'un des anticorps constitutifs d'une trousse de détection selon l'invention peut être lié covalamment à un ligand telle que la biotine ou la streptavidine.

WO 02/39123

PCT/FR01/03477

Dans ce mode de réalisation particulier, la molécule détectable est choisie de manière à ce qu'elle se fixe sur le ligand lié de manière covalente à l'anticorps. La molécule détectable peut par exemple être liée elle-même respectivement à la biotine ou à la streptavidine.

5 Selon encore un autre mode de réalisation d'une trousse de détection selon l'invention, le moyen de révélation de la formation d'un complexe entre la protéine ESM-1 présente dans l'échantillon testé et l'un des anticorps spécifiques de la protéine ESM-1, peut être un anticorps, par exemple un anticorps capable de se lier spécifiquement à la partie Fc de l'anticorps anti-ESM-1 ou encore un anticorps capable de se fixer spécifiquement à l'isotype auquel appartient l'anticorps anti-ESM-1 considéré, par exemple un anticorps reconnaissant spécifiquement les anticorps de souris de l'isotype IgG1.

10 Dans un mode de réalisation préféré d'un nécessaire de détection selon l'invention, c'est l'anticorps reconnaissant spécifiquement la région C-terminale de la protéine ESM-1 est immobilisé sur un support

Avantageusement, une telle trousse de détection est celle dans laquelle l'anticorps produit par l'hybridome MEP14 (CNCM N°I-1942) est immobilisé sur le support, est l'anticorps se liant spécifiquement sur la région N-terminale de la protéine ESM-1 et l'anticorps produit par l'hybridome MEC15 (CNCM N°I-2572).

L'outil de détection peut être alors un anticorps monoclonal biotinylé, par exemple de rat, reconnaissant spécifiquement les anticorps de souris de l'isotype IgG1, le système de détection pouvant être fourni par un conjugué streptavidine-peroxydase.

PROCEDE D'IMMUNODETECTION SELON L'INVENTION

30 L'invention a encore pour objet un procédé de détection de la protéine ESM-1 dans un échantillon caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

a) mettre en contact l'échantillon à tester avec un premier anticorps se liant spécifiquement sur la région N-terminale de la protéine

WO 02/39123

PCT/FR01/03477

ESM-1 ou avec un premier anticorps se liant sur la région C-terminale de la protéine ESM-1.

b) mettre en contact le complexe éventuellement formé entre la protéine ESM-1 présente dans l'échantillon et le premier anticorps avec un second anticorps se liant spécifiquement à la région de la protéine ESM-1 choisie parmi la région N-terminale et la région C-terminale non reconnue par le premier anticorps; et

c) détecter le complexe formé entre la protéine ESM-1 et le second anticorps.

10 Par « complexe formé entre la protéine ESM-1 et le second anticorps », on entend le complexe formé entre le complexe formé entre :

- le complexe formé entre la protéine ESM-1 et le premier anticorps, et

15 - le second anticorps.

Selon un premier mode de réalisation du procédé d'immunodétection ci-dessus, le premier ou le seconde anticorps est immobilisé à la surface d'un support.

20 Selon un second mode de réalisation du procédé d'immunodétection ci-dessus, l'anticorps qui est immobilisé sur un support est un anticorps se liant spécifiquement sur la région C-terminale de la protéine ESM-1 et le second anticorps est un anticorps se liant spécifiquement sur la région N-terminale de cette protéine.

25 Selon un troisième mode de réalisation particulier du procédé d'immuno-détection, l'anticorps qui est immobilisé sur un support se lie spécifiquement sur la région N-terminale de la protéine ESM-1 et le second anticorps se lie spécifiquement sur la région C-terminale de cette protéine.

30 Les anticorps se liant spécifiquement sur les régions N-terminale ou C-terminale de ESM-1 sont tels que définis précédemment.

Dans un mode de réalisation préféré du procédé de détection selon l'invention, l'anticorps se liant spécifiquement sur la région N-terminale de la protéine ESM-1 est l'anticorps MEC15 produit par l'hybridome déposé le 17 Octobre 2000 auprès de la CNCM sous le N° d'accès I-2572.

WO 02/39123

PCT/FR01/03477

Le second anticorps peut être l'anticorps MEP14 produit par l'hybridome déposé à la CNCM le 19 Novembre 1997 sous le N°1-1942.

L'étape c) du procédé ci-dessus peut être réalisée à l'aide d'un anticorps biotinylé capable de se fixer au second anticorps, la molécule détectable pouvant être constituée d'un conjugué du type streptavidine-peroxydase.

APPLICATIONS DU PROCÉDE DE DETECTION SELON L'INVENTION.

10

Le demandeur a montré que le procédé d'immunodétection de la protéine ESM-1 selon l'invention permettait de quantifier avec une grande sensibilité la concentration sérique de protéine ESM-1 chez l'homme, en particulier chez des patients atteints de sepsis, et a permis d'établir une corrélation entre la quantité de protéine ESM-1 circulante et la gravité du sepsis chez les patients.

Selon la norme définie par l'American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference (1992, definitions for sepsis and multiple organ failure, and guide lines for the use of innovative therapies in sepsis; Crit Care Med., vol.20: 864-874), le sepsis peut être divisé en trois catégories de gravité croissante: le sepsis, le sepsis sévère et le choc septique.

Grâce au procédé d'immunodétection selon l'invention, il a été établi une corrélation entre la gravité du sepsis et la concentration de protéine ESM-1 circulante chez les patients.

De plus, la grande sensibilité du test d'immunodétection selon l'invention a permis de montrer que les patients atteints d'un sepsis simple possédaient une concentration de protéine ESM-1 circulante laquelle, bien que faible, était significativement détectable et significativement supérieure ($p < 0.001$) à la concentration de protéine ESM-1 retrouvée dans le sérum de volontaires sains.

Jusqu'à présent, l'évolution du sepsis chez un patient était suivie par la quantification de trois marqueurs, respectivement la protéine C-réactive, la protéine ICAM-1 soluble et la pro-calcitonine.

WO 02/39123

PCT/FR01/03477

Il a été montré selon l'invention que l'évolution des taux de protéine C-réactive et de protéine ICAM-1 soluble ne corrélaient pas avec l'évolution de la concentration de ESM-1.

En revanche, il existe une bonne corrélation entre l'évolution des taux de pro-calcitonine et de la protéine ESM-1. Toutefois, la signification biologique de la pro-calcitonine dans le cas du sepsis n'est pas connue et cette protéine ne constitue donc pas un bon marqueur biologique de l'évolution du sepsis.

Au contraire, la protéine ESM-1, du fait de son rôle dans la régulation des réactions inflammatoires, constitue un nouveau marqueur de l'évolution du sepsis dont la signification physiologique est liée directement au développement non contrôlé de la réaction inflammatoire, particulièrement du recrutement des leucocytes pendant les phénomènes d'extrasation et d'infiltration massive de ces cellules dans les différents tissus, notamment les tissus pulmonaires, phénomènes causals, ou à tout le moins concomitants, avec une altération de la paroi vasculaire endothéliale.

Ainsi, le demandeur a montré que le test d'immunodétection de l'invention permettait la mise en évidence de faibles concentrations de protéine ESM-1 circulante, de l'ordre de 1 à 3 nanogrammes par millilitre, ces faibles concentrations retrouvées chez les patients atopiques pouvant être clairement distinguées des concentrations basales de l'ordre du nanogramme/ml ou même inférieure mesurée chez les volontaires sains.

De plus, il a été montré que la quantité de ESM-1 sérique retrouvée chez les patients atteints de sepsis constituait un pronostic fiable de mortalité chez ces patients. Ainsi, sur 68 patients testés, les patients ayant décédé 10 jours après leur hospitalisation présentaient des concentrations de ESM-1 circulantes au jour 0 et au jour 1 significativement supérieures aux concentrations de ESM-1 retrouvées dans le sérum des patients ayant survécu ($10,6 \pm 0,8$ nanogrammes par ml chez les patients décédés contre $4,0 \pm 0,6$ nanogrammes par ml chez des patients ayant survécu [$p > 0,01$]).

Cette corrélation étroite entre le niveau circulant de protéine ESM-1 et le pronostic de mortalité chez les patients n'est pas retrouvée

WO 02/39123

PCT/FR01/03477

avec des marqueurs classiques du sepsis, c'est-à-dire la protéine C-réactive, la procalcitonine et la protéine ICAM-1 soluble.

Toutefois, la mesure de la concentration de ESM-1 circulante chez un patient ne suffit pas elle seule à réaliser un diagnostic médical permettant au médecin de prendre les mesures thérapeutiques adaptées à l'état global du patient

Un autre objet de l'invention consiste en l'utilisation d'une trousse de détection de la protéine ESM-1 selon l'invention pour détecter *in vitro* des altérations de la paroi vasculaire endothéliale chez l'homme, en particulier chez des patients.

L'invention est également relative à l'utilisation d'une trousse de détection de la protéine ESM-1 telle que définie ci-dessus pour le suivi *in vitro* d'un marqueur de la gravité d'un sepsis chez un patient.

Il a aussi été montré selon l'invention qu'une concentration de protéine ESM-1 circulante supérieure à la normale était retrouvée chez des patients ayant subi une greffe d'organes et traités par un composé immunosuppresseur. Chez ces patients greffés et traités par un composé immunosuppresseur. L'augmentation de la concentration de la protéine ESM-1 circulante est indicative d'une activité cytotoxique du composé immunosuppresseur vis-à-vis des cellules endothéliales, particulièrement des cellules endothéliales de la paroi vasculaire.

Ainsi, la mise en oeuvre d'une trousse d'immunodétection de la protéine ESM-1 selon l'invention rend possible le suivi de patients traités par des composés immunosuppresseurs et la détermination du moment où ces immunosuppresseurs deviennent cytotoxiques.

La détection de taux de ESM-1 circulante supérieure à la normale chez ces patients peut constituer une indication pour le médecin de nature à lui permettre de modérer les doses de composés immunosuppresseurs administrés, lorsque cette mesure est associée à d'autres paramètres physiologiques du patient.

Selon un autre aspect, l'invention concerne l'utilisation d'une trousse d'immunodétection selon l'invention pour la quantification de la protéine ESM-1 *in vitro* chez un patient traité par un composé immunosuppresseur, en particulier chez un patient ayant subi une greffe d'organe.

WO 02/39123

PCT/FR01/03477

Le demandeur a également montré une augmentation significative du taux de protéine ESM-1 circulante chez des patients atteints de cancer, en particulier de cancer broncho-pulmonaire.

5 Selon encore un autre aspect, l'invention concerne l'utilisation d'une trousse d'immunodétection telle que définie ci-dessus pour la quantification *in vitro* de la protéine ESM-1 chez un patient affecté d'un cancer.

De manière générale, un taux de protéine ESM-1 circulante supérieure à 1 nanogramme par ml est significatif d'une altération des
10 cellules endothéliales de la paroi vasculaire et peut ainsi constituer un paramètre à prendre en compte lors de l'établissement d'un diagnostic clinique d'un patient donné par un médecin, étant entendu que ce seul paramètre, pris isolément, ne permet en lui-même d'établir aucun diagnostic thérapeutique ou clinique d'un patient.

15 La présente invention est en outre illustrée, sans être pour autant limitée, aux figures et aux exemples suivants:

FIGURES

La figure 1 illustre une comparaison de la sensibilité de
20 détection du test d'immuno-détection de la protéine ESM-1 selon l'invention (cercles vides) avec le test de détection décrit par BECHARD et al. (2000) représenté par les cercles pleins. L'échelle des ordonnées représente la concentration de la protéine ESM-1 dans l'échantillon à tester, exprimée en nanogrammes par ml. Sur l'échelle des abscisses,
25 est représentée la densité optique.

La figure 2 illustre les profils d'immunodétection réalisés selon la technique immunoenzymatique de type « sandwich ». Dans tous les cas, l'anticorps monoclonal produit par l'hybridome MEP14 est adsorbé sur une plaque de micro-titration. Sur l'échelle des abscisses est figurée
30 la valeur de densité optique. Sur l'échelle des ordonnées, est représentée la concentration en protéine ESM-1 produite par les cellules de la lignée HEK293, exprimée en nanogrammes par ml. Le second anticorps utilisé dans le test d'immunodétection est un anticorps dirigé spécifiquement contre la région N-terminale de la protéine ESM-1. Il

WO 02/39123

PCT/FR01/03477

s'agit de l'anticorps MEC2 (figure 2A), MEC15 (figure 2B) et MEC36 (figure 2C).

La figure 3 illustre une comparaison de la concentration de protéine ESM-1 retrouvée dans le plasma ou le sérum de volontaires sains ou de patients. L'échelle des ordonnées représente la concentration sérique de la protéine ESM-1, exprimée en nanogramme par ml. L'échelle des abscisses représente la concentration plasmatique de la protéine ESM-1, exprimée en nanogramme par ml.

La figure 4 illustre la quantité de protéine ESM-1 circulante retrouvée dans le sérum de volontaires sains ou de patients atteints de sepsis de gravité clinique croissante. La concentration de protéine ESM-1 sérique, exprimée en nanogramme par ml, est représentée en ordonnée. En abscisse sont représentées les différentes populations d'individus testés, respectivement les sujets sains (CTRL), les patients atteints de sepsis, de sepsis sévère ou de choc sceptique, selon la définition clinique publiée dans Crit. Care Med., 1992, vol.20:864-874.

La figure 5 illustre la quantification de trois marqueurs du sepsis chez des populations de patients sains, ou de patients atteints de sepsis, de sepsis sévère ou de choc sceptique.

La figure 5A illustre la quantification de protéine ICAM-1 soluble dans le sérum, exprimée en nanogramme par ml.

La figure 5B illustre la quantification de protéine C-réactive, exprimée en milligramme par ml.

La figure 5C illustre la quantification de procalcitonine sérique, exprimée en nanogramme par ml.

La figure 6 illustre une comparaison entre les niveaux de protéine ESM-1 circulante, et de chacun des trois marqueurs classiques du sepsis, respectivement la protéine ICAM-1 soluble, la protéine C-réactive et la procalcitonine au jour 0 d'hospitalisation des patients, respectivement chez les patients ayant survécu et chez les patients ayant décédé.

La figure 6A illustre le niveau sérique de protéine ESM-1, exprimé en nanogramme par ml.

La figure 6B illustre le niveau sérique de protéine ICAM-1 soluble, exprimé en nanogramme par ml.

WO 02/39123

PCT/FR01/03477

La figure 6C illustre le niveau de protéine C-réactive, exprimé en nanogramme par ml.

La figure 6D illustre le niveau de procalcitonine, exprimé en nanogramme par ml.

5 La figure 7 illustre la valeur pronostic de la quantité de protéine ESM-1 ou de la protéine soluble ICAM-1 chez des patients au jour 0 et au jour 1 après l'hospitalisation, vis-à-vis de leur mortalité.

La figure 7A illustre le niveau de protéine ESM-1, exprimé en nanogramme par ml retrouvé respectivement chez les patients ayant survécu (cercle plein) et les patients ayant décédé (cercle vide), respectivement au jour 0 et au jour 1 après l'hospitalisation.

10 La figure 7B illustre le niveau de protéine soluble ICAM-1 sérique chez les mêmes patients.

La figure 8 illustre la valeur pronostic de mortalité du niveau de protéine ESM-1 et ICAM-1 soluble mesurée au jour 0 et au jour 1 après l'hospitalisation.

15 La figure 8A illustre le niveau de protéine sérique, exprimé en nanogramme par ml, chez les patients ayant survécu (cercle plein) et chez les patients ayant décédé (cercle vide).

20 La figure 8B illustre le niveau de protéine soluble ICAM-1 sérique, exprimé en nanogramme par ml, chez les patients ayant survécu (cercle plein) et chez les patients ayant décédé (cercle vide).

EXEMPLES

25 **EXEMPLE 1: Préparation des anticorps monoclonaux se liant spécifiquement sur la région N-terminale de la protéine ESM-1 produite par les cellules eucaryotes.**

Afin d'obtenir des anticorps monoclonaux anti-ESM-1 dirigés contre la région N-terminale de la protéine ESM-1 riche en résidus cystéine, la forme native de la protéine ESM-1 produite par la lignée cellulaire CHO transfectée par un vecteur d'expression contenant un insert d'ADN codant pour la protéine ESM-1 a été purifiée.

30 La séquence d'ADNc codant pour la protéine ESM-1 est référencée comme la séquence SEQ ID N°2 du listage de séquences.

l'ADNc de ESM-1 est inséré dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3 (In vitrogen) puis transfecté dans les cellules CHO avec la lipofectamine (Gibco) selon les recommandations du fabricant. 48 h après la transfection les cellules sont repiquées en présence d'un agent de sélection (G418, Gibco) à la dose de 1000 microgramme / ml). Après deux semaines de sélection les cellules CHO résistantes au G418 sont clonées par dilution limite. Des clones exprimant ESM-1 sont ensuite sélectionnés et appelés CHO-ESM (déposé à la CNCM).

Pour la production, les cellules CHO-ESM sont cultivées en suspension dans un milieu conditionné sans serum de veau fœtal (milieu CHO SFM II, Gibco). Le surnageant est ajusté à pH 8 et passé sur une colonne de DEAE-sépharose (Pharmacia). La colonne est lavée avec un tampon 50 mM Tris, pH 8, 0.2 M NaCl. La molécule ESM-1 est éluée dans un tampon 50 mM Tris, pH 8, 1 M NaCl. L'éluat est ensuite dilué au 1:4 dans un tampon 50 mM Tris, pH 8 et incubé en présence d'anticorps monoclonal anti-ESM-1 (MEC4) immobilisé sur agarose (Biorad). Après une nuit d'incubation à 4°C sous agitation, les billes d'agarose sont lavées avec le tampon 50 mM Tris, pH 8, 0.2 M NaCl. ESM-1 est élué avec 3 M MgCl₂. L'éluat est concentré et dialysé dans le tampon 50 mM Tris, pH 8, 0.5 M NaCl et stocké à -70°C.

Des souris Balb/C ont été immunisées par injection de 10 µg de protéine ESM-1 recombinante purifiée par souris, selon un protocole d'immunisation standard en présence d'adjuvant de Freund.

Les cellules d'hybridomes sécrétant les anticorps monoclonaux anti-ESM-1 ont été obtenues par fusion, criblage et sous-clonage selon la technique décrite par BECHARD et al. (2000).

Cinq clones cellulaires d'hybridome ont été obtenus et ont été désignés génériquement MEC (« Mouse Monoclonal Antibody to ESM-1 produced by CHO Cells »).

Quatre des hybridomes sélectionnés sont d'isotype IgG1,k respectivement les hybridomes désignés MEC4, MEC5, MEC15 et MEC36.

L'un des hybridomes est l'isotype IgM,k, l'hybridome MEC11.

Les clones cellulaires d'hybridomes ont été cultivés dans du milieu de culture en l'absence de sérum et les anticorps anti-ESM-1 ont

été purifiés par chromatographie sur colonne de protéine G-Sépharose commercialisée par la Société Pharmacia (UPSALA, Suède).

5 **EXEMPLE 2: Sélection des anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre la partie N-terminale de la protéine ESM-1 produite par les cellules de la lignée CHO.**

Les anticorps MEC, de classe IgG1,K sont sélectionnés par la persistance d'une liaison forte des anticorps de la série MEC à ESM/Fc en présence d'anticorps MEP d'isotype différent et à la concentration finale de 1 µg/ml. Les tests sont réalisés par ELISA selon les exemples précédemment décrits pour la sélection des anticorps MEP et MEC, (notamment par les expériences d'immuno-détection par compétition décrites par LASSALLE et al. (1996).

15 **EXEMPLE 3: Test d'immuno-détection de la protéine ESM-1 selon l'invention.**

Le test d'immuno-détection consiste en un test immuno-enzymatique du type « sandwich » dont les caractéristiques générales sont identiques à celui décrit par BECHARD et al. (2000).

L'anticorps monoclonal anti-ESM-1 produit par la lignée d'hybridomes MEP14 (CNCM N°1-1942) a été dilué à la concentration de 5µg/ml dans un tampon carbonate 0,1 M, pH 9,5, et adsorbé pendant 25 une nuit à +4°C sur une plaque 96 puits (plaque E.I.A./R.I.A., Costar, Cambridge, MA, USA).

La plaque a été saturée pendant une heure à la température du laboratoire avec un volume de 200 µl/puits de tampon PBS contenant 0,1% de sérum albumine bovine et 5mM de EDTA, puis lavée deux fois 30 avec un tampon ELISA (le tampon PBS ci-dessus additionné de 0,1% de Tween 20).

Un calibrage a été réalisé avec la protéine ESM-1 purifiée selon la technique décrite par BECHARD et al. (2000).

WO 02/39123

PCT/FR01/03477

Les échantillons de sang ont été dilués en série (1:2 à 1:128), dans un tampon ELISA et incubés sur une plaque ELISA pendant une heure à la température du laboratoire.

Les puits ont été lavés trois fois avec un tampon ELISA puis incubés pendant 1 heure à la température du laboratoire avec un second anticorps monoclonal dirigé contre ESM-1, l'anticorps MEC15 (CNCM N°I-2572) à la concentration de 0,1µg/ml dans 100 µl de tampon par puits.

Après trois lavages, on a ajouté un anticorps monoclonal de rat biotinylé dirigé contre les IgG1 de souris (commercialisé par PHARMINGEN) dilué dans un tampon ELISA et laissé incubé ce second anticorps pendant une heure.

Après trois lavages dans le tampon ELISA, les puits ont été incubés avec un conjugué de streptavidine-peroxydase à la dilution 1:10.000 v/v (commercialisé par la Société ZYMED).

Après 30 minutes d'incubation avec le conjugué streptavidine-peroxydase, on réalise trois lavages de chaque puits dans un tampon ELISA puis deux lavages dans un tampon PBS.

Le conjugué streptavidine-peroxydase est révélé avec le substrat TMB commercialisé par la Société SIGMA (Saint-Louis, MO, USA) en présence de 5 µl de H₂O₂ pendant 30'.

La réaction de révélation est stoppée par l'addition d'un volume de 100µl de H₂SO₄ 2N.

La plaque est lue à l'aide d'un spectrophotomètre (anthos labtec LP40, France) à la longueur d'onde de 405 nanomètres.

La concentration de la protéine ESM-1 plasmatique ou sérique est calculée à partir des mesures de densité optique et exprimée en nanogramme par ml.

EXEMPLE 4:

Résultats comparatifs de dosage de ESM-1 avec le test d'immuno-détection selon l'invention et un test d'immuno-détection de l'état de la technique.

Les dosages comparatifs de concentration connue de la protéine ESM-1 recombinante produite dans la lignée cellulaire CHO transfectée, puis purifiée comme décrit à l'exemple 1, ont été réalisés.

Le premier dosage a été effectué conformément à l'enseignement de l'exemple 3. Brièvement, l'anticorps MEP14 a été immobilisé sur une plaque 96 puits du type ELISA, puis mis en contact avec une série de solutions tampons PBS contenant une concentration connue de protéine de ESM-1. Après lavage, le complexe formé entre l'anticorps MEP14 immobilisé et la protéine ESM-1 a été incubé avec une solution tampon contenant l'anticorps MEP 15 de l'invention.

Après une nouvelle série de lavages, le complexe antigène/anticorps formé a été incubé successivement avec un anticorps de rat anti-IgG1 de souris biotinylé, puis avec un conjugué streptavidine-peroxydase avant révélation par le peroxyde d'hydrogène.

Le second test a été réalisé dans les mêmes conditions, mais en utilisant l'anticorps MEP19 immobilisé sur la plaque 96 puits de type ELISA et l'anticorps MEP21 en tant que second anticorps dans cette technique immunoenzymatique du type « sandwich ».

Les résultats sont présentés sur la figure 1.

Avec la combinaison d'anticorps selon l'invention, une différence significative dont la valeur de densité optique est obtenue avec une concentration de la protéine ESM-1 de l'ordre de 0,15 à 0,2 nanogrammes par millilitre.

En revanche, avec la combinaison des anticorps MEP19 et MEP21, une augmentation significative de la valeur de densité optique n'est obtenue que pour une concentration de ESM-1 égale à 1 ou 2 nanogrammes par ml.

Les résultats présentés à la figure 1 montrent clairement la grande sensibilité du test d'immunodétection de la protéine ESM-1 selon l'invention, par rapport à un test d'immunodétection de l'état de la technique, puisqu'on observe une différence de sensibilité comprise entre 5 et 10 fois entre ces deux tests, en faveur du test d'immunodétection de l'invention.

35 EXEMPLE 5:

Résultats comparatifs de tests d'immunodétection mettant en oeuvre différents anticorps de l'invention dirigés contre la région N-terminale de la protéine ESM-1 produite par les cellules de la lignée HEK293 transfectées.

5 Des tests d'immunodétection de type « sandwich » ont été réalisés conformément au protocole décrit à l'exemple 3.

Dans tous les cas, l'anticorps MEP14 a été immobilisé sur les puits d'une plaque 96 puits de type ELISA. Après incubation de la plaque ainsi préparée avec des solutions de concentrations connues de ESM-1 recombinautes produites par des cellules de la lignée HEK293 transfectées et lavage, le complexe antigène/anticorps formé a été incubé en présence d'un second anticorps, respectivement l'anticorps MEC2, l'anticorps MEC15 et l'anticorps MEC36.

Les résultats sont représentés à la figure 2.

15 Les résultats montrent que l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigée contre la région N-terminale de la protéine ESM-1 recombinaute produite par des cellules eucaryotes dans un test immunoenzymatique de type « sandwich » permet un dosage de la protéine ESM-1 de très grande sensibilité, et dont la sensibilité est reproductible d'un anticorps à l'autre.

20 Pour l'ensemble des anticorps MEC15, MEC2 ET MEC36 testés, des concentrations de l'ordre de 0,15 à 0,2 nanogrammes par ml de ESM-1 ont pu être détectées.

25 **EXEMPLE 6: Application du test d'immuno-détection selon l'invention pour quantifier la protéine ESM-1 circulante chez des patients atteints de formes plus ou moins graves de sepsis.**

A. Matériels et méthodes.

30 **A.1 Test d'immuno-détection**

Le test d'immunodétection a été réalisé conformément au protocole décrit à l'exemple 3 ci-dessus.

35 **A.2. Test des autres marqueurs sanguins**

WO 02/39123

PCT/FR01/03477

Le test quantitatif de la protéine soluble ICAM-1 sérique a été réalisé avec un test ELISA commercial (Diacclone Research, Besançon, France) La plaque est lue à l'aide d'un spectrophotomètre (Anthos Labtec LP40, France) à la longueur d'onde de 450 nanomètres. La concentration de ICAM-1 soluble sérique a été calculée à partir des mesures de la densité optique et exprimée en nanogramme par ml. La valeur normale de concentration de protéine ICAM-1 soluble a été de 571 ± 168 nanogrammes par ml (219-1042; n = 77).

Le test de quantification de la protéine procalcitonine a été réalisé avec un test immunologique du type ILMA (Lumitest, B.R.A.M.S.-Diagnostica GmbH, Allemagne).

La valeur normale de procalcitonine est inférieure à 0,5 nanogramme par ml. Les valeurs mesurées pour les patients atteints de syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS pour « Systémic Inflammatory Response Syndrom ») sont généralement comprises entre 0,5 et 2 nanogrammes par ml.

La quantité de protéine C réactive a été mesurée par immunonéphélométrie. La valeur normale est inférieure à 10 mg/l (Morley et al., 1982, Ann. N.Y. Acad. Sci., vol.389:406-418).

A.3 Sujets.

L'étude a été réalisée avec quatre groupes de sujets, un groupe de sujets sains non atopiques (rapport de sexe égal à 1) et trois groupes de patients atteints de troubles inflammatoires septiques systémiques et/ou pulmonaires (rapport de sexe égal à 1,6, âge : 56 ± 2 ans).

Tous les volontaires sains non atopiques présentaient une réponse négative au test cutané de réaction d'hypersensibilité immédiate, appelé aussi « prick test », et ne présentaient pas non plus d'historique clinique d'allergies.

Aucun des 68 patients n'était traité par des composés corticostéroïdes ou ne subissaient d'hémodialyse au moment du recueil d'échantillons de sang.

Le protocole d'expérimentation a été approuvé par le Comité Locale d'Éthique des Hôpitaux d'universités de Suisse.

A.4 Définitions.

Les termes suivants ont été utilisés pour l'étude.

- 5 **Infection** est un phénomène microbien caractérisé par une réponse inflammatoire à la présence de micro-organismes ou à l'invasion de tissu de l'hôte normalement stérile par ces micro-organismes.

- 10 **Syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS pour « Systemic Inflammatory Response Syndrome »)** avec aucun signe d'infection, est caractérisé par la présence d'au moins deux des quatre critères cliniques suivants:

- 15 a) fièvre ou hypothermie (température supérieure à 100,4°F [$< 38^{\circ}\text{C}$] ou $> 96,8^{\circ}\text{F}$ [$> 36^{\circ}\text{C}$]);
b) tachycardie (> 90 battements par minute);
c) tachypnée (> 20 respirations par minute ou $\text{PaCO}_2 < 4,3$ kPa [32 mm Hg]); et
d) un compte anormal de globules blancs > 12.000 cellules/mm³, < 4000 cellules / mm³, où la présence de plus de 10% de formes immatures respectivement.

Sepsis est défini comme le SIRS accompagné d'une infection.

- 25 **Sepsis sévère** est défini comme un sepsis associé avec un dysfonctionnement, une hypoperfusion ou une hypotension d'un organe. Des anomalies dans l'hypoperfusion et la perfusion peuvent inclure, mais ne sont pas limitées à l'oligurie (volume excrété < 30 ml/hr), acidose lactique (niveau de lactate sérique supérieur à 2 mmol/L) ou une altération aiguë du statut mental sans sédation (réduction d'au moins 3 points par rapport à la valeur de base selon le score de coma du type Glasgow).

- 30 **Choc septique** est défini comme la présence d'un sepsis accompagné par une réduction durable de la pression sanguine systolique (< 90 mmHg, ou une réduction de 40 mm Hg par rapport à la valeur de base de la pression sanguine systolique), associé à la présence d'anomalités de perfusions (voir ci-dessus), en dépit d'une réanimation adéquate et le

besoin d'amines vasoactives pour maintenir une pression sanguine adéquate (Crit. Care Med. 1992, vol.20:864-874).

A.5 Description de l'étude

5

Pour chaque patient, les paramètres biologiques et cliniques suivants ont été obtenus: âge, sexe, diagnostic principal et secondaire tel que défini dans Crit. Care ed., 1992, vol.20: 864-874, antécédent, traitement, état vital 10 jours avant le recueil d'échantillons de sang, concentrations sérique et plasmatique de la protéine ESM-1.

10

Pour la plupart des patients, on a mesuré également d'autres paramètres biologiques sanguins tels que la ICAM-1 soluble circulante (sICAM-1), la procalcitonine (proCT), et la protéine C-réactive (CRP).

15

Les échantillons de sang ont été recueillis de chacun des patients (ou de chacun des volontaires sains) dans des tubes secs et dans des tubes traités à l'EDTA, puis centrifugés pendant 30 mn à la vitesse de 3500 tr/m dans une centrifugeuse du type jouan C3i(France).

20

Les échantillons de sérum et de plasma ont été conservés pendant une courte durée à -20°C avant la réalisation des tests.

25

La période de survie à dix jours de l'hospitalisation a été choisie en postulant que l'infection avait contribué directement à la mort chez ces patients ou que la contribution du trouble inflammatoire initial par rapport à d'autres causes de mortalité ne pouvait pas être exclue.

25

A.7 Analyse statistique

Les données sont exprimées comme la moyenne plus ou moins l'erreur standard (SEM).

30

Les comparaisons des niveaux moyens de ESM-1, sICAM-1, procalcitonine et CRP entre les différents groupes ont été réalisées en utilisant le test « One way Analysis » Anova (Bonferroni-Dunn), le test de Kruskal-Wallis et le test de Mann-Whitney.

La corrélation entre les valeurs des marqueurs a été réalisée grâce au test Spearman Rank.

La corrélation entre le niveau de marqueur circulant et la gravité de l'issue pour le patient a été réalisée en utilisant le test « One Way » ANOVA (Bonferroni-Dunn), le test de Mann-Whitney et le test de Wilcoxon.

5 En général, une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

Les graphes ont été réalisés sous la forme de graphe en boîtes verticales représentés par leur médiane et les premier et troisième espaces interquartiles.

10

B. RESULTATS

B.1 Corrélation entre les niveaux plasmatiques et sériques de ESM-

1.

15 Dans un premier essai, on a déterminé si les conditions de recueil d'échantillons de sang pouvaient affecter la valeur du niveau de ESM-1. La comparaison des valeurs de niveaux de ESM-1 plasmatiques et sériques chez 41 sujets sains ont montré une forte corrélation ($r = 0,85$; $p < 0,0001$). Dans la figure 3, on peut observer que, comme pour le groupe témoin, aucune différence significative n'est observée pour un patient donné entre les niveaux plasmatiques et sériques de ESM-1, sur 20 les premiers trente six patients de l'étude.

Ces résultats suggèrent tout d'abord que la coagulation du sang ne modifie pas le niveau de ESM-1. Ces résultats suggèrent aussi que la protéine ESM-1 peut être quantifiée indifféremment à partir 25 d'échantillons de sang ou de plasma.

En conséquence, seul le niveau sérique de ESM-1 a été utilisé pour le reste de l'étude.

B.2 Groupe contrôle

30 Une valeur moyenne du niveau sérique de ESM-1 était de $0,7 \pm 0,4$ nanogrammes par ml chez les sujets sains, comme illustré dans le tableau 1, alors que le niveau sérique de ESM-1 était de $1,0 \pm 0,1$ nanogramme par ml dans le groupe de sujets atopiques.

35 Bien que la différence soit faible, elle est statistiquement significative ($p < 0,05$).

On conséquence, le groupe contrôle auquel il est fait référence dans l'étude est le groupe des sujets sains non atopiques représentatifs de la population générale, et la valeur moyenne du niveau de ESM-1 dans ce groupe de sujets sains non atopiques a été déterminé comme la valeur normale standard.

B.3. Groupes de patients

Les résultats des marqueurs circulant dans les groupes de patients sont résumés dans le tableau 1 et illustrés dans les figures 4 et 5.

Dans le sérum des patients admis pour un sepsis sévère, les niveaux de sESM-1, sICAM-1, CRP et proCT sont fortement augmentés pour chaque groupe de patients, comparés au groupe témoin (tableau 1).

Ces niveaux accrus sont statistiquement significatifs ($p < 0,01$ ou moins) pour tous les marqueurs et pour tous les groupes de patients, à l'exception de la procalcitonine dans le groupe de patients atteints de sepsis (tableau 1, figures 4 et 5).

La gravité de la maladie est uniquement définie selon trois niveaux graduels désignés respectivement sepsis, sepsis sévère et choc septique. Dans chacun de ces groupes, les niveaux de ESM-1 augmentent de manière statistiquement corrélée avec la gravité de la maladie ($p < 0,01$, $n = 61$) (voir tableau 2).

Des augmentations similaires ont été retrouvées pour les niveaux de procalcitonine sérique et de CRP (respectivement $p = 0,0001$, $n = 34$ et $p < 0,01$, $n = 43$).

D'autre part, le niveau de sICAM-1 est augmenté d'environ 5 fois la valeur normale, mais présente un niveau similaire dans chacun des groupes de patients.

Les niveaux de CRP (Anova et Mann-Whitney) et de ProCT. (Mann-Whitney) permettent de distinguer les groupes de patients atteints de sepsis des patients atteints de sepsis sévère, ce qui n'est pas le cas pour les niveaux de ESM-1.

Les niveaux de ESM-1 (Anova et Mann-Whitney) et de ProCT (Mann-Whitney) permettent de distinguer les groupes de patients atteints respectivement de sepsis sévère et de choc septique, ce qui n'est pas le cas pour les niveaux de CRP (voir tableau 2).

5 Au vu de ces résultats, le niveau de CRP apparaît comme le marqueur le plus sensible dans la maladie la moins sévère et le niveau de ESM-1 apparaît être un meilleur marqueur que le marqueur ProCT pour les sepsis plus sévères.

10 Une recherche de corrélation entre les niveaux sériques de ESM-1, sICAM-1, CRP ou ProCT a permis d'établir une corrélation significative entre le niveau de CRP et de procalcitonine ($p < 0,01$, tableau 3).

Cependant, il n'a été trouvé aucune corrélation entre les autres marqueurs (voir tableau 3).

15 De plus, aucune corrélation n'a été observée entre les niveaux de ESM-1 et de créatinine plasmatique dans le groupe des patients affectés de chocs septiques (résultats non présentés).

20 Afin de déterminer si les niveaux sériques de ESM-1 pouvaient prédire un pronostic vital, on a comparé, dans une première approche, les niveaux moyens de ESM-1 sérique entre les patients ayant décédé et les patients ayant survécu.

Lorsque tous les patients sont pris en compte dès l'admission en réanimation et selon l'évolution fatale ou non, les résultats montrent que le niveau de ESM-1 sérique au jour d'hospitalisation (jour 0) est 25 significativement plus grand dans le groupe des patients ayant décédé au jour 10 (jour 10; $p < 0,01$; figure 6A et figure 7A). On peut souligner que de telles différences ne sont pas mises en évidence avec des autres marqueurs sICAM-1, CRP ou ProCT (figures 6B-9).

30 Selon une seconde approche, les niveaux de sESM-1 et sICAM1 ont été mesurés à la fois le jour de l'hospitalisation (jour 0) et 24 heures après (jour 1). Le niveau de ESM-1 au jour 0 est significativement plus grand chez des patients ayant décédé que chez les patients ayant survécu (figures 7A). Cette différence persiste au jour 1 ($n = 20$, $p < 0,05$) (figure 7A).

WO 02/39123

PCT/FR01/03477

Une telle différence ne peut pas être observée avec aucun des autres marqueurs sICAM-1 (figure 7B) ni avec la CRP, la procalcitonine ou la sICAM-1.

Dans le groupe unique des patients atteints de choc septique, les niveaux sériques de ESM-1 au jour 0 et au jour 1 (n = 11) sont significativement plus grands chez les patients ayant décédé que chez les patients ayant survécu (figures 8A-B).

Dans chaque groupe séparément, aucune corrélation statistiquement significative n'a été trouvée entre les niveaux de sICAM-1 au jour 0, de sICAM-1 au jour 1 (figure 8B), de CRP au jour 0, ou de ProCT au jour 0 et la survie au jour 10 de chaque patient.

Les résultats présentés dans cet exemple montrent que la valeur moyenne de la concentration de la protéine ESM-1 circulante est très augmentée par rapport aux sujets sains. Cette augmentation de la concentration moyenne de ESM-1 circulante est corrélée avec le niveau de sévérité clinique de la maladie. Les plus hauts niveaux de ESM-1 circulante au stade précoce de la maladie sont associés avec une probabilité plus faible de survie du patient après 10 jours.

En accord avec des études antérieures, les marqueurs circulants tels que la protéine C réactive ou CRP (Morley et al.), la procalcitonine ou ProCT, (ASSICOT M et al.); (MULLER B et al), (WANNER GA et al.) et la protéine soluble ICAM-1 ou sICAM-1 (KAYAL S et al.), (SESSLER C N et al. (1995) SESSLER C N et al.(1993) sont significativement augmentés chez les patients de l'étude également. Les marqueurs CRP et ProCT sont corrélés avec la sévérité clinique des patients.

En revanche, la détermination des niveaux des trois marqueurs CRP, ProCT et sICAM-1 ne permet pas de prédire de pronostic vital, au contraire de la détermination du niveau de la protéine ESM-1 circulante. De plus, la valeur prédictive du niveau sérique de ESM-1 est majoritairement liée à la valeur initiale de ESM-1 sérique au jour 0 d'hospitalisation.

Dans cette étude, l'augmentation du niveau de ESM-1 sérique n'est pas corrélée avec un dysfonctionnement rénale, comme cela a été mesuré par l'augmentation du niveau de créatinine plasmatique. Ce résultat suggère que les niveaux accrus de la protéine ESM-1 dans le

WO 02/39123

PCT/FR01/03477

sérum chez les patients atteints de chocs septiques provient de tissus pulmonaires altérés ou des cellules des parois vasculaires en état de stress.

5 En conclusion, les résultats de l'étude présentée dans cet exemple indiquent que ESM-1 représente un nouveau marqueur du dysfonctionnement des cellules endothéliales chez les patients atteints de sepsis.

10 Associés aux valeurs d'autres paramètres de marqueurs circulants comme les molécules d'adhésion solubles, les cytokines, la procalcitonine ou d'autres marqueurs de dysfonctionnement spécifique de certaines cellules, le niveau de la protéine ESM-1 est de nature à fournir une information d'intérêt sur la sévérité clinique et l'issue chez les patients atteints de sepsis.

TABLEAU 1
Valeurs de concentration de la protéine ESM-1
circulante chez des volontaires sains et dans différents
groupes de patients atteints de sepsis

5

Groupe	n	Marqueurs sanguins			
		sESM-1 (ng/ml)	sICAM-14 (ng/ml)	CRP (mg/l)	Procalcitonine (ng/ml)
Valeur normale (sain non atopique)	20	0,7±0,1.	571±168	< 10	< 0,5
Ensemble des patients	61	5,4±0,8***	2510±261***	194±21**	39,8±12,4***
Sepsis (pulmonaire)	29	2,5±0,3***	2336±406***	126±15***	2,0±1,4
Sepsis sévère	12	4,5±1,4***	2696±721*	292±73**	23,8±9,2***
Choc septique	20	10,0±1,8***	2661±373***	245±29***	90,8±29,5***

Les valeurs des marqueurs sanguins sont exprimées comme la valeur moyenne ± SEM (erreur standard). Différence significative entre chaque groupe de patients et la valeur normale (groupe de sujets sains non atopiques): * p < 0,01; ** p < 0,0001; *** p < 0,0001.

10

WO 02/39123

PCT/FR01/03477

TABLEAU 2
Distinction potentielle de la gravité de l'état du patient
en fonction du niveau des marqueurs circulants

5

Marqueurs présentant une différence significative (ANOVA)	sESM-1	sICAM-1	CRP	ProCT
ECS et S/S	p<0,01	NS	NS	NS
ECS et S	p<0,0001	NS	p<0,05	p<0,01
S/S et S	NS	NS	p<0,01	NS

Kruskal-Wallis	p<0,01	NS	p<0,01	p=0,0001
----------------	--------	----	--------	----------

Marqueurs présentant une différence significative (Mann-Whitney)	sESM-1	sICAM-1	CRP	ProCT
ECS et S/S	p<0,05	NS	NS	p<0,05
ECS et S	p<0,001	NS	p<0,01	p=0,0001
S/S et S	NS	NS	p<0,05	p<0,01

NS = non significatif.

10

TABLEAU 3
Corrélation entre les différentes valeurs des marqueurs sanguins

Marqueur	sESM-1	pESM-1	Age	sICAM-1	CRP	ProCT	Plasma créatinine
sESM-1	-	p<0,0001	NS	NS	NS	NS	NS
sICAM-1	NS	-	-	-	NS	NS	-
CRP	NS	-	-	NS	-	p<0,01	-
ProCT	NS	-	-	NS	p<0,01	-	-

NS = non significatif.

WO 02/39123

PCT/FR01/03477

REFERENCES.

- AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS/SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE CONSENSUS CONFERENCE (1992).
- ASSICOT M et al., 1993, Lancet, vol.341: 515-518
- 5 • BECHARD et al. (2000) J. Vasc. Res., vol.37 (5): 417-425.
-
- ICHINOSE N et al. (1991, In: Fluorometric analysis in Biomedical Chemistry, vol.10, page 110, Chemical Analysis, Winefordner JD et al. editor, John Wiley and Sons, New York)
- 10 • KAYAL S et al., 1998, Am. J.Respir. Crit Care Med, vol.157:774-776;
- KOHLER et MIELSTEIN (1975, Nature, vol.256:495)
- 15 • KOZBOR et al. (1983, hybridoma, vol.2 (1): 7-16).
- LASSALLE P et al.(1996) The Journal of Biological Chemistry, vol.271(34): 20.458-20.464).
- 20 • LEGER et al. , (1997, Hum. Antibodies, Vol.8 (1): 3-16).
- MARTINEAU et al. (1998, J. Mol. Biol., vol.280 (1): 117-127).
- 25 • MORLEY et al., Ann. N.Y. Acad. Sci, 1982, vol. 389:406-418),
- MULLER B et al (2000), Crit. Care Med., vol.28:977-983;
- RIDDER et al; (1995, Biotechnology N Y), vol. 13 (3): 255-260).
- 30 • REINMANN et al. (1997, AIDS Res. Hum. Retroviruses, vol.13 (11):933-943)
- 35 • SESSLER C.N. et al., Am. J. Respir. Crit Care Med., 1995, vol.151:1420-1427;

- SESSLER C.N., 1993, Chest, vol.104 (2): 119
- WANNER et al., 2000, Crit. Care Med. , vol 28 (4): 950-957

REVENDEICATIONS

1. Nécessaire ou trousse de détection de la protéine ESM-1 dans un échantillon, comprenant:
- 5 a) un premier anticorps se liant spécifiquement à la région N-terminale de la protéine ESM-1 comprise entre l'acide aminé en position 20 et l'acide aminé en position 78 de la séquence en acides aminés de cette protéine; et
- b) un second anticorps se liant spécifiquement à la région C-terminale comprise entre l'acide aminé en position 79 et l'acide aminé en position 184 de la séquence en acides aminés de la protéine ESM-1.
- 10 2. Nécessaire de détection selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'anticorps se liant spécifiquement à la région N-terminale de la protéine ESM-1 a été obtenu après immunisation d'un mammifère avec la protéine ESM-1 recombinante produite par une cellule eucaryote.
- 15 3. Nécessaire de détection selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que l'anticorps se liant spécifiquement à la région N-terminale de la protéine ESM-1 est l'anticorps monoclonal produit par la lignée d'hybridome désignée MEC15 déposée à la Collection de Cultures de Micro-organismes de l'Institut Pasteur le 17 Octobre 2000 sous le n° d'accès I-2572.
- 20 4. Nécessaire de détection selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'anticorps se liant spécifiquement à la région C-terminale de ESM-1 est choisi parmi les anticorps capables de reconnaître l'un des trois déterminants antigéniques suivants:
- 25 a) le déterminant AgD1 allant du résidu proline en position 79 jusqu'au résidu cystéine en position 99 de ESM-1;
- b) le déterminant antigénique AgD2 allant du résidu sérine en position 119 jusqu'au résidu valine en position 139 de la protéine ESM-1;
- 30 c) le déterminant antigénique AgD3 allant du résidu glycine en position 159 jusqu'au résidu arginine en position 184 de la protéine ESM-1.
- 35 5. Nécessaire de détection selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'anticorps se liant spécifiquement à la région C-terminale de la protéine ESM-1 est choisi parmi les anticorps suivants:

WO 02/39123

PCT/FR01/03477

- a) l'anticorps MEP 21 produit par la lignée d'hybridome déposée auprès de la CNCM le 19 Novembre 1997 sous le n° d'accès I-1944;
- b) l'anticorps monoclonal MEP08 produit par la lignée d'hybridome déposée le 19 Novembre 1997 auprès de la CNCM sous le n° d'accès -1941;
- 5 c) l'anticorps monoclonal MEP14 produit par la lignée d'hybridome déposée le 19 NOVEMBRE 1997 auprès de la CNCM sous le n° d'accès I-1942;
- d) l'anticorps monoclonal MEP19 produit par la lignée d'hybridome déposée le 19 Novembre 1997 auprès de la CNCM sous le n° d'accès -1943.
- 10 6. Nécessaire de détection selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'un au moins des deux anticorps est lié de manière covalente à une molécule permettant sa détection directe, ou indirecte.
- 15 7. Nécessaire de détection selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le premier ou le second anticorps est immobilisé sur un support.
- 20 8. Nécessaire de détection selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'anticorps immobilisé sur un support est l'anticorps reconnaissant spécifiquement la région C-terminale de la protéine ESM-1.
9. Procédé de détection de la protéine ESM-1 dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:
- 25 a) mettre en contact l'échantillon à tester avec un premier anticorps se liant spécifiquement sur la région N-terminale de la protéine ESM-1 ou avec un premier anticorps se liant sur la région C-terminale de la protéine ESM-1;
- b) mettre en contact le complexe éventuellement formé entre la protéine ESM-1 présente dans l'échantillon et le premier anticorps avec un second anticorps se liant spécifiquement à la région de la protéine ESM-1, choisie parmi la région N-terminale et la région C-terminale, non reconnue par le premier anticorps; et
- 30 c) détecter le complexe formé entre la protéine ESM-1 et le second anticorps.
- 35

WO 02/39123

PCT/FR01/03477

10. Procédé de détection selon la revendication 9, caractérisé en ce que le premier anticorps est immobilisé sur un support.
11. Procédé de détection selon l'une des revendications 9 et 10, caractérisé en ce que le premier anticorps est un anticorps se liant spécifiquement sur la région C-terminale de la protéine ESM-1 et le second anticorps est un anticorps se liant spécifiquement sur la région N-terminale de la protéine ESM-1.
12. Procédé de détection selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisé en ce que l'anticorps se liant spécifiquement sur la région N-terminale de la protéine ESM-1 est l'anticorps MEC15 produit par l'hybridome déposé le 17 Octobre 2000 auprès de la CNCM sous le n° d'accès I-2572.
13. Procédé de détection selon l'une quelconque des revendications 9 à 12, caractérisé en ce que l'étape c) du procédé est réalisée à l'aide d'un anticorps biotinylé capable de se fixer au second anticorps.
14. Lignée d'hybridome MEC15 déposée à la CNCM le 19 Novembre 1997 sous le n°I-1942.
15. Anticorps monoclonal produit par la lignée d'hybridome MEC15 déposé le 17 Octobre 2000 auprès de la CNCM sous le n° d'accès I-2572.
16. Utilisation d'une trousse de détection selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 pour détecter *in vitro* des altérations de la paroi vasculaire endothéliale chez l'homme.
17. Utilisation d'une trousse d'immunodétection selon l'une des revendications 1 à 8 pour la quantification de la protéine ESM-1 *in vitro* chez un patient traité par un composé immunosuppresseur.
18. Utilisation d'une trousse de détection selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 pour la quantification *in vitro* de la protéine ESM-1 chez un patient affecté d'un cancer.

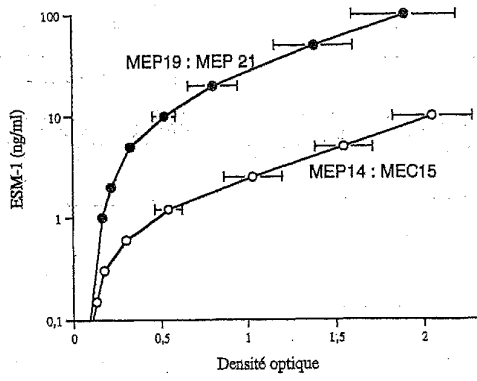


FIGURE 1

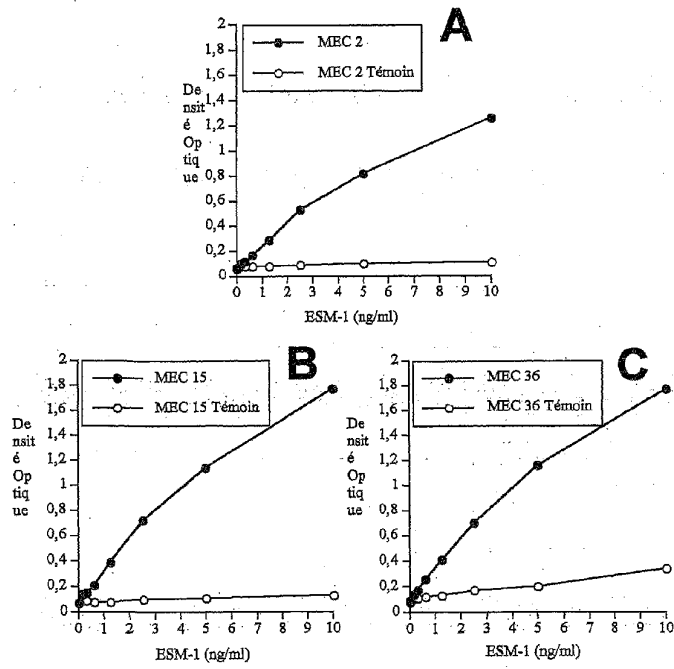


FIGURE 2 A, B, C

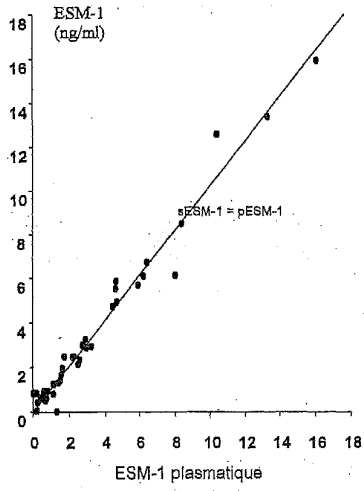


FIGURE 3

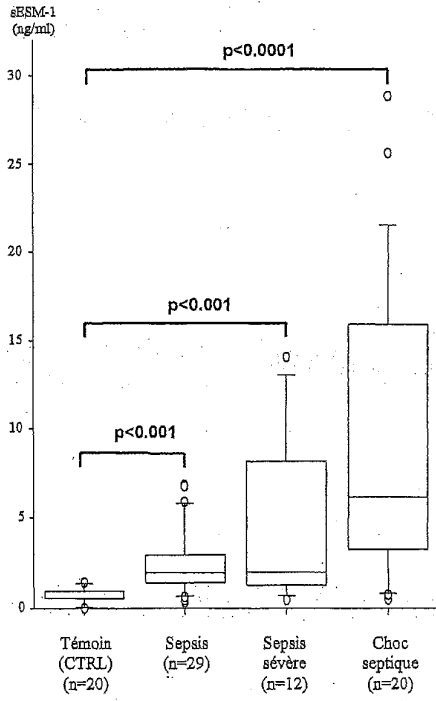


FIGURE 4

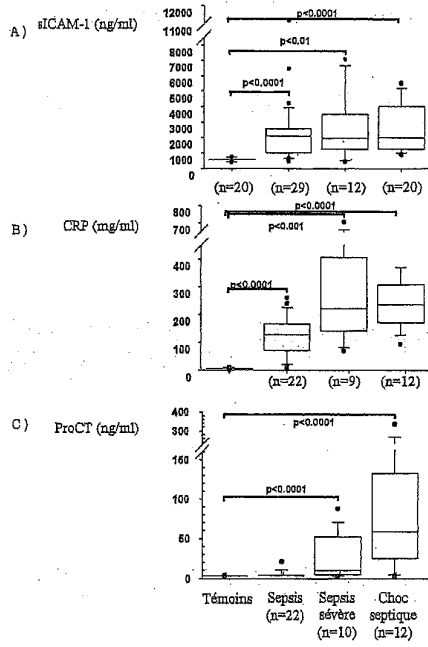


FIGURE 5 A, B, C

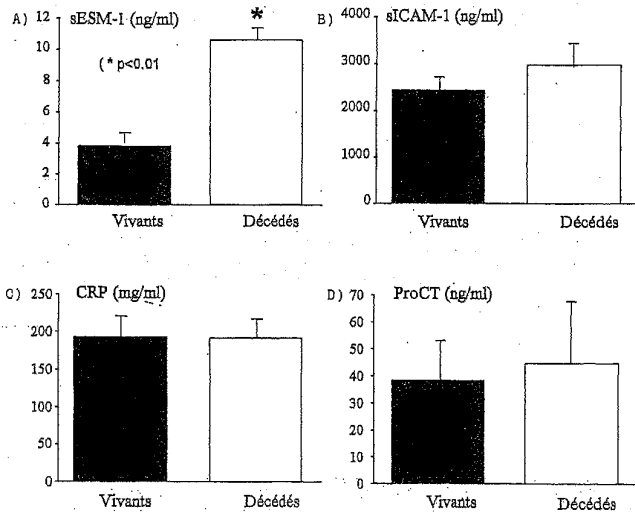


FIGURE 6 A, B, C, D

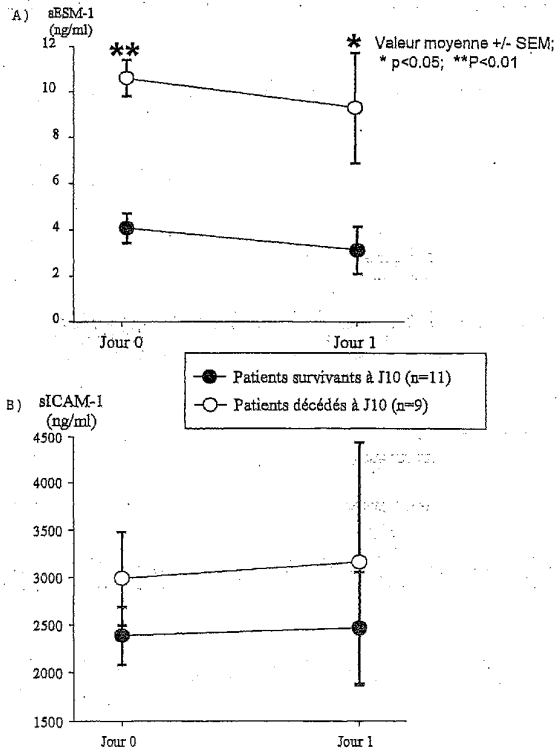


FIGURE 7 A, B

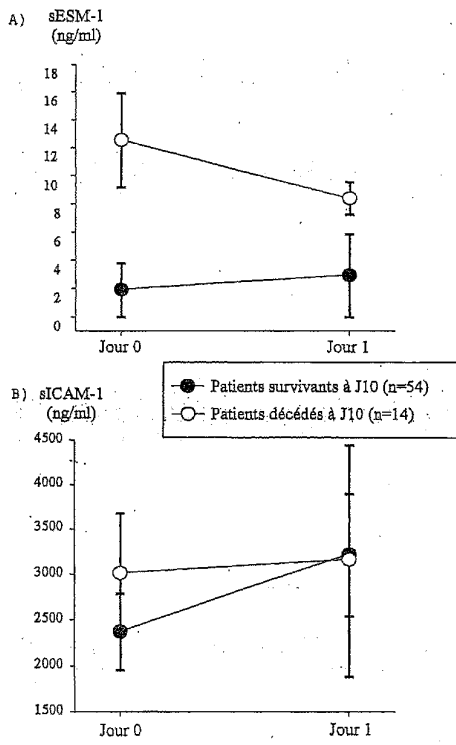


FIGURE 8 A, B

PCT/FR01/03477

1/3

Original (pourPRESENTATION) - imprimé le 08.11.2001 01:15:39 PM

0-1	Formulaire - PCT/RO/134 (EASY) Indications relatives à des micro-organismes ou autre matériel biologique déposés (règle 13bis du PCT)	
0-1-1	Préparé avec	PCT-EASY Version 2.92 (mis à jour 01.03.2001)
0-2	Demande internationale No.	
0-3	Référence du dossier du déposant ou du mandataire	146M PCT 561
1	Les indications ci-dessous ont trait au micro-organisme ou autre matériel biologique visé dans la description:	
1-1	page	7
1-2	ligne	18-21
1-3	Identification du dépôt	
1-3-1	Nom de l'institution de dépôt	Collection nationale de cultures de micro-organismes
1-3-2	Adresse de l'institution de dépôt	FR- Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, F-75724 Paris Cedex 15
1-3-3	Date du dépôt	17 octobre 2000 (17.10.2000)
1-3-4	Numéro d'ordre	CNCM I-2572
1-4	Indications supplémentaires	NEANT
1-5	Etats désignés pour lesquels les indications sont données	Tous les Etats désignés
1-6	Indications fournies séparément Ces indications seront fournies ultérieurement au Bureau international	NEANT
2	Les indications ci-dessous ont trait au micro-organisme ou autre matériel biologique visé dans la description:	
2-1	page	8
2-2	ligne	13-16
2-3	Identification du dépôt	
2-3-1	Nom de l'institution de dépôt	Collection nationale de cultures de micro-organismes
2-3-2	Adresse de l'institution de dépôt	FR- Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, F-75724 Paris Cedex 15
2-3-3	Date du dépôt	19 novembre 1997 (19.11.1997)
2-3-4	Numéro d'ordre	CNCM I-1944
2-4	Indications supplémentaires	NEANT
2-5	Etats désignés pour lesquels les indications sont données	Tous les Etats désignés
2-6	Indications fournies séparément Ces indications seront fournies ultérieurement au Bureau international	NEANT

PCT/FR01/03477

2/3

Original (pourPRESENTATION) - imprimé le 08.11.2001 01:15:39 PM

3	Les indications ci-dessous ont trait au micro-organisme ou autre matériel biologique visé dans la description:	
3-1	page	8
3-2	ligne	17-20
3-3	Identification du dépôt	
3-3-1	Nom de l'institution de dépôt	Collection nationale de cultures de micro-organismes
3-3-2	Adresse de l'institution de dépôt	FR- Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, F-75724 Paris Cedex 15
3-3-3	Date du dépôt	19 novembre 1997 (19.11.1997)
3-3-4	Numéro d'ordre	CNCM I-1941
3-4	Indications supplémentaires	NEANT
3-5	Etats désignés pour lesquels les indications sont données	Tous les Etats désignés
3-6	Indications fournies séparément Ces indications seront fournies ultérieurement au Bureau international	NEANT
4	Les indications ci-dessous ont trait au micro-organisme ou autre matériel biologique visé dans la description:	
4-1	page	8
4-2	ligne	23-24
4-3	Identification du dépôt	
4-3-1	Nom de l'institution de dépôt	Collection nationale de cultures de micro-organismes
4-3-2	Adresse de l'institution de dépôt	FR- Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, F-75724 Paris Cedex 15
4-3-3	Date du dépôt	19 novembre 1997 (19.11.1997)
4-3-4	Numéro d'ordre	CNCM I-1942
4-4	Indications supplémentaires	NEANT
4-5	Etats désignés pour lesquels les indications sont données	Tous les Etats désignés
4-6	Indications fournies séparément Ces indications seront fournies ultérieurement au Bureau international	NEANT
5	Les indications ci-dessous ont trait au micro-organisme ou autre matériel biologique visé dans la description:	
5-1	page	8
5-2	ligne	24

PCT/FR01/03477

3/3

Original (pourPRESENTATION) - imprimé le 08.11.2001 01:15:39 PM

5-3	Identification du dépôt	
5-3-1	Nom de l'institution de dépôt	Collection nationale de cultures de micro-organismes
5-3-2	Adresse de l'institution de dépôt	FR- Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, F-75724 Paris Cedex 15
5-3-3	Date du dépôt	19 novembre 1997 (19.11.1997)
5-3-4	Numéro d'ordre	CNCM I-1943
5-4	Indications supplémentaires	NEANT
5-5	Etats désignés pour lesquels les indications sont données	Tous les Etats désignés
5-6	Indications fournies séparément Ces indications seront fournies ultérieurement au Bureau international	NEANT

RESERVE A L'OFFICE RECEPTEUR

0-4	Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale: (oui ou non)	08 NOV. 2001 (08/11/01)
0-4-1	Fonctionnaire autorisé	Anne-Marie GEORGES

RESERVE AU BUREAU INTERNATIONAL

0-5	Cette feuille est parvenue au Bureau international le :	
0-5-1	Fonctionnaire autorisé	

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/FR 01/03477
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/74 G01N33/68 C07K16/22 C12N5/12		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BECHARD DAVID ET AL: "Characterization of the secreted form of endothelial-cell-specific molecule 1 by specific monoclonal antibodies." JOURNAL OF VASCULAR RESEARCH, vol. 37, no. 5, September 2000 (2000-09), pages 417-425, XP001016197 ISSN: 1018-1172 cited in the application the whole document	1-18
X	FR 2 775 691 A (PASTEUR INSTITUT) 10 September 1999 (1999-09-10) cited in the application the whole document	1-18
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
E earlier document but published on or after the international filing date		
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
O document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.		
A document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
1 February 2002		11/02/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized officer Pellegrini, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 01/03477

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LASSALLE P ET AL: "ESM-1 IS A NOVEL HUMAN ENDOTHELIAL CELL-SPECIFIC MOLECULE EXPRESSED IN LUNG AND REGULATED BY CYTOKINES" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 271, no. 34, 23 August 1996 (1996-08-23), pages 20458-20464, XP002086198 ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 01/03477

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2775691 A	10-09-1999	FR 2775691 A1	10-09-1999
		AU 3257399 A	20-09-1999
		WO 9945028 A1	10-09-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		Demande internationale No PCT/FR 01/03477
A. CLASSIFICATION DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 G01N33/74 G01N33/68 C07K16/22 C12N5/12		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 G01N C07K C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BECHARD DAVID ET AL: "Characterization of the secreted form of endothelial-cell-specific molecule 1 by specific monoclonal antibodies." JOURNAL OF VASCULAR RESEARCH, vol. 37, no. 5, septembre 2000 (2000-09), pages 417-425, XP001016197 ISSN: 1018-1172 cité dans la demande le document en entier	1-18
X	FR 2 775 691 A (PASTEUR INSTITUT) 10 septembre 1999 (1999-09-10) cité dans la demande le document en entier	1-18

	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/>	Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
* Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent	*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour composer le principe ou la théorie constituant la base de l'invention	
E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date	*X* document particulièrement pertinent; l'inven-tion revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément	
L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une suite claimée ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)	*Y* document particulièrement pertinent; l'inven-tion revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier	
O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens	*B* document qui fait partie de la même famille de brevets	
P document publié après la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
1 février 2002	11/02/2002	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5018 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fac. (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Pellegrini, P	

Formule PCT/ISA/210 (plusieurs feuilles) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 01/03477

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	LASSALLE P ET AL: "ESM-1 IS A NOVEL HUMAN ENDOTHELIAL CELL-SPECIFIC MOLECULE EXPRESSED IN LUNG AND REGULATED BY CYTOKINES" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 271, no. 34, 23 août 1996 (1996-08-23), pages 20458-20464, XP002086198 ISSN: 0021-9258 cité dans la demande le document en entier -----	1-18

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No
PCT/FR 01/03477

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2775691 A	10-09-1999	FR 2775691 A1	10-09-1999
		AU 3257399 A	20-09-1999
		WO 9945028 A1	10-09-1999

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/574	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/577	C 1 2 N 5/00	Z N A B
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 15/00	C
	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, P T, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(74) 代理人 100076691
弁理士 増井 忠式

(74) 代理人 100075270
弁理士 小林 泰

(74) 代理人 100080137
弁理士 千葉 昭男

(74) 代理人 100096013
弁理士 富田 博行

(74) 代理人 100098590
弁理士 中田 隆

(72) 発明者 ラサール, フィリップ
フランス国エフ - 5 9 0 0 0 リル, リュー・コルブラン 1 3, レジデンス・セバストポル, ア
パルトマン 1 4

(72) 発明者 ベチャード, デービッド
フランス国エフ - 7 5 0 0 9 パリ, リュー・デ・マルティル 3 0

(72) 発明者 トネル, アンドレ - ベルナルド
フランス国エフ - 5 9 8 4 0 プレメスク, リュー・ガブリエル・ペリ

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 BA80 CA04 CA07 DA02 EA04 GA03 GA09
GA13 HA03 HA04 HA15
4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24 CE12 DA01 DA13
4B065 AA91X AB05 AC14 BA08 BD14 CA25 CA44 CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA20 EA50 FA72 GA26

专利名称(译)	用于检测蛋白质ESM-1的试剂盒和使用所述试剂盒的检测方法		
公开(公告)号	JP2004522941A	公开(公告)日	2004-07-29
申请号	JP2002541397	申请日	2001-11-08
[标]申请(专利权)人(译)	裏爾巴斯德研究所 国家研究所德Rasante埃杜拉尔壳邦医疗		
申请(专利权)人(译)	巴斯德研究所de l'Ile系列 国家研究所德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗		
[标]发明人	ラサールフィリップ ベチャードデービッド トネルアンドレベルナルド		
发明人	ラサール,フィリップ ベチャード,デービッド トネル,アンドレ-ベルナルド		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/543 G01N33/574 G01N33/577 G01N33/68 G01N33/74		
CPC分类号	C07K16/18 G01N33/6863 G01N33/74 Y10S435/975 Y10S436/811 Y10S436/813		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.U C07K16/18 G01N33/543.515.Z G01N33/574.A G01N33/577.B C12N5/00. ZNA.B C12N15/00.C C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024 /EA04 4B024/GA03 4B024/GA09 4B024/GA13 4B024/HA03 4B024/HA04 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065 /AA91X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/BD14 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045 /FA72 4H045/GA26		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫 中田隆		
优先权	2000014421 2000-11-09 FR		
其他公开文献	JP4290424B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于检测文件中的ESM-1蛋白的装置或试剂盒，其包括：a) 编码ESM-1蛋白的核酸序列，其包含在ESM的氨基酸序列的第20位氨基酸和第78位氨基酸之间。特异性结合N末端区域的第一抗体；和b) 特异性结合C末端区域的第二抗体，其包含在第79位氨基酸和ESM-第184位氨基酸之间。抗体。

