

(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
19 avril 2001 (19.04.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale

WO 01/27629 A1

- (51) Classification internationale des brevets⁷:
G01N 33/574, 33/68
Française [FR/FR]; 7, rue de l'Abreuvoir, F-92100
Boulogne Billancourt (FR).
- (21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/02788
(74) Mandataire: BREESE, Pierre; Breese-Majerowicz, 3,
avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).
- (22) Date de dépôt international: 6 octobre 2000 (06.10.2000)
(81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, 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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) Langue de dépôt: français
(26) Langue de publication: français
- (30) Données relatives à la priorité:
99/12715 12 octobre 1999 (12.10.1999) FR
(84) États désignés (*régional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(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), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*):
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794
Paris Cedex 16 (FR). ASSISTANCE PUBLIQUE, HOPITAUX DE PARIS (APHP) [FR/FR]; 3, avenue Victoria,
F-75001 Paris (FR).
- (72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): BAR-
RITAUULT, Denis [FR/FR]; 4, rue Française, F-75001
Paris (FR). ACHOUR, Ammar [DZ/FR]; 14 bis, rue de
Mayenne, F-94000 Creteil (FR). COURTY, José [FR/FR];
15, allée Verte, F-94440 Villecresnes (FR). BAUDOUIN,
- Publiée:
— Avec rapport de recherche internationale.
- 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.

(54) Title: DIAGNOSIS OF PATHOLOGIES OF MONONUCLEATED BLOOD CELLS

(54) Titre: DIAGNOSTIC DES PATHOLOGIES DES CELLULES MONONUCLEÉES DU SANG

(57) Abstract: The invention relates to a method which uses the growth factor HARP to detect mononucleated blood cells and which provides a means of diagnosing the proliferative pathologies of this type of cell such as chronic lymphoid leukaemia. The method for detecting the B lymphocytes comprises bringing a blood sample and some HARP polypeptide, a fragment or a derivative of HARP into contact with each other and detecting the fixation of the HARP polypeptide, fragment or derivative of HARP to the surface of the B lymphocytes. The method for diagnosing proliferative pathologies of mononucleated blood cells also comprises the comparison of the rates of fixation of HARP to the B lymphocytes of a sample from a patient and the B lymphocytes of a sample from a healthy subject.

(57) Abrégé: La présente invention concerne un procédé utilisant le facteur de croissance HARP pour détecter les cellules mononucléées du sang, permettant ainsi le diagnostic des pathologies prolifératives de ce type de cellules, comme les leucémies lymphoïdes chroniques. Le procédé de détection des lymphocytes B comprend, d'une part, la mise en contact d'un échantillon sanguin et du polypeptide HARP, d'un fragment ou d'un dérivé de HARP et, d'autre part, la détection de la fixation à la surface des lymphocytes B du polypeptide HARP, d'un fragment ou d'un dérivé de HARP. Le procédé de diagnostic des pathologies prolifératives des cellules mononucléées du sang comprend en outre la comparaison des taux de fixation de HARP sur les lymphocytes B d'un échantillon provenant d'un patient et sur les lymphocytes B d'un échantillon provenant d'un sujet sain.

WO 01/27629 A1



DIAGNOSTIC DES PATHOLOGIES
DES CELLULES MONONUCLÉÉES DU SANG.

5 La présente invention concerne un procédé utilisant le facteur de croissance HARP pour détecter certaines cellules mononuclées du sang, et utile ainsi pour le diagnostic des pathologies prolifératives de ce type de cellules, comme par exemple les leucémies lymphoïdes chroniques.

10 Les syndromes lymphoprolifératifs regroupent un ensemble de pathologies lymphoïdes diverses caractérisées par une augmentation du nombre de lymphocytes circulants ou par des anomalies morphologiques des lymphocytes pathologiques. La possibilité de thérapeutiques spécifiques
15 pour certains types de syndromes lymphoprolifératifs impose impérativement un diagnostic précis que l'examen clinique ou l'étude cytologique ne permet pas toujours. Or, il n'existe pas à l'heure actuelle de marqueurs immunologiques spécifiques des différents syndromes lymphoprolifératifs.
20 Le diagnostic reste bien souvent difficile à faire malgré les efforts de ces dernières années pour parvenir à une classification utilisable pour tous les cas. La démarche diagnostique repose donc sur l'analyse d'un ensemble de marqueurs dont certains ont prouvé leur pertinence dans la
25 discrimination entre les deux grandes classes de syndromes lymphoprolifératifs que sont les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) et les lymphomes malins non hodgkiniens (LNH). Ces marqueurs sont les CD5, CD23, FMC7, CD22 et les immunoglobulines de surface.

30 Le phénotypage immunologique caractéristique des LLC, dont beaucoup d'entre elles sont indolentes, (CD5+, CD23+, FMC7-, CD20 faible, CD22 faible, immunoglobulines de surface (Igs) faibles) les distingue d'un autre syndrome lymphoprolifératif B CD5+ beaucoup plus

agressif, le LNH du manteau (CD5+, CD23-, FMC7+, CD20 fort, Igs fortes).

5 La leucémie à tricholeucocyte présente quant à
elle le phénotypique typique suivant : CD5-, CD11c fort,
CD25+, CD103+, qui la différencie des autres hémopathies
lymphoïdes B CD5- ainsi que du LNH splénique à lymphocytes
villeux, qui lui est morphologiquement très proche. En
10 outre, chez les patients porteurs de LLC, un
immunophénotype peu typique peut être associé à une
trisomie 12 ou à une morphologie des cellules mixtes (1).
Ces marqueurs ont finalement permis l'établissement de
scores, somme de points attribués en fonction de leur
15 expression, en perpétuelle observation (2).

 Malgré ces progrès et la confrontation avec les
différents aspects, cliniques, cytologiques, histologiques
et cytogénétiques, bien des cas restent encore litigieux.
20 De nombreux travaux de recherche sont en cours pour
découvrir de nouvelles molécules qui permettraient de mieux
discriminer les LLC, qui sont les leucémies les plus
fréquentes de notre monde occidental, des autres syndromes
lymphoprolifératifs plus agressifs.

25 On connaît dans l'art antérieur de nombreux
facteurs de croissance angiogéniques comme les facteurs
HARP, MK, FGF-1, FGF-2, VEGF, HIV1-tat, HIV2-tat, HGF, HB-
EGF ou encore l'angiogenine.

30 HARP (Heparin Affin Regulatory Peptide), aussi
appelé PTN (Pleiotrophin) ou encore HB-GAM (heparin
binding-growth associated molecule) constitue avec MK
(Midkine) une famille de ces facteurs de
croissance/différenciation structurellement apparentés qui

se lie à l'héparine, présentant 50% d'homologie en acides aminés (3)(4).

5 Le facteur de croissance HARP est un polypeptide de 168 acides aminés contenant un motif N-terminal hydrophobe de 32 acides aminés correspondant à un peptide signal. Sous sa forme mature, HARP est une protéine sécrétée de 136 (sous sa forme courte) ou 139 (sous sa forme longue) acides aminés dont le poids moléculaire apparent, déterminé en SDS-PAGE en conditions réductrices, 10 est de 18 kDa.

Initialement, HARP a été isolé à partir de cerveaux de rats nouveaux nés comme une molécule induisant *in vitro* une croissance neuritique (5) suggérant que ce polypeptide est impliqué dans la maturation des cellules 15 neuronales (6).

Plus tard, des études ont montré que ce polypeptide était aussi présent dans des tissus non-neuronaux, dont le cœur (7), l'utérus (8), les cartilages (9) et les extraits d'os (10), démontrant que la fonction 20 de HARP n'est pas limitée à une activité promotrice d'une croissance neuritique comme précédemment rapporté (5).

HARP est capable de stimuler la croissance de 25 cellules fibroblastiques, épithéliales et endothéliales *in vitro* (8)(9). Cette activité mitogène a été depuis confirmée par l'utilisation de protéines recombinantes produites à partir de systèmes d'expression eucaryote (9)(10)(11). HARP induit également *in vitro* la formation de 30 pseudo-capillaires (10). *In vivo*, dans différents modèles tissulaires, la localisation de HARP est notamment associée aux cellules endothéliales des capillaires sanguins (11). A l'heure actuelle, les données concernant HARP suggèrent que ce polypeptide joue un rôle dans les mécanismes 35 complexes impliqués dans l'angiogénèse et la néoangiogénèse

tumorale. De nombreuses recherches ont été effectuées dans cette voie afin de déterminer l'implication de HARP dans la progression tumorale, notamment dans les tumeurs hormono-dépendantes comme le sein ou la prostate.

5 Des études relatives aux propriétés biologiques de HARP ont été effectuées par de nombreux laboratoires (4) et en dépit de résultats controversés, il apparaît admis que HARP, tout comme MK, est impliqué dans le contrôle de la prolifération cellulaire (4)(9)(12).

10 De plus, il a été démontré que la protéine HARP humaine recombinante (hrHARP) purifiée est mitogénique pour les cellules endothéliales (9)(10) et exerce *in vitro* une activité angiogénique (10).

15 HARP est donc connue et utilisée pour ses propriétés angiogéniques et neurotrophiques.

La présence d'ARNm correspondant à la protéine HARP a été observée par les inventeurs dans les cellules des vaisseaux sanguins, à la fois dans les cellules endothéliales et les cellules des muscles lisses, mais aussi dans les cellules des muscles lisses des glandes mammaires humaines (11).

20 Les données rapportant que HARP est un facteur de croissance angiogénique et qu'il est synthétisé et localisé dans les cellules endothéliales vasculaires ont conduit les inventeurs à travailler sur une fonction potentielle de HARP sur les cellules du sang. Ils ont donc recherché si HARP pouvait se fixer sur ces cellules du sang notamment les cellules mononucléées humaines du sang périphérique (PBMC) fraîchement isolées. Les inventeurs ont pu montrer que HARP se fixait spécifiquement sur les cellules B caractérisées par la présence du marqueur CD19. La présence de sites de fixation de HARP sur les cellules circulantes n'a jamais été décrite jusqu'à maintenant.

30 A ce jour, les récepteurs de HARP sont très peu connus. La présence de site de liaison de très forte

affinité ($K_d = 600\text{pM}$) avec HARP dans les cellules NIH 3T3 a déjà été rapporté (13). Ces sites de liaison de HARP ont aussi été retrouvés dans plusieurs types cellulaires, incluant les cellules de rein de rats, cellules de l'adénocarcinome mammaire d'homme, cellules du carcinome épidermique d'homme, cellules de l'hépatocarcinome humain, neuroblastes de souris, et cellules du phéochromocytome.

Les inventeurs ont récemment montré que le facteur de croissance HARP, molécule connue comme facteur angiogénique et neurogénique, stimule la production de cytokines de l'inflammation (IL1, IL6, IL8, IFN gamma et TNF alpha) et augmente l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules mononucléées du sang circulant de sujets normaux après 7 jours de culture, et ceci d'autant plus fortement que les cellules sont quiescentes au départ. C'est à la suite de ces constatations que les inventeurs se sont intéressés aux relations de cette molécule avec les cellules hématopoïétiques, et plus spécialement sur les lymphocytes de sujets normaux et de patients porteurs d'hémopathies malignes.

Les inventeurs ont maintenant montré que HARP est capable de se fixer spécifiquement sur les cellules lymphocytaires B et permet ainsi le diagnostic des pathologies dans lesquelles ces cellules sont impliquées, et au cours desquelles le nombre de lymphocytes B est considérablement augmenté, comme les leucémies lymphoïdes chroniques.

L'invention se rapporte donc à un procédé de détection des lymphocytes B comprenant les étapes suivantes :

- la mise en contact d'un échantillon sanguin d'un sujet, ou d'une fraction de cet échantillon sanguin, avec le polypeptide HARP, un fragment ou un dérivé de HARP

- la détection de la fixation à la surface des lymphocytes B du polypeptide HARP, d'un fragment ou d'un dérivé de HARP par tout moyen approprié.

5 Un échantillon sanguin peut être prélevé sur des sujets sains ou sur des sujets atteints de pathologies prolifératives des cellules mononucléées du sang. Cet échantillon est mis en contact avec le polypeptide HARP dans des conditions favorisant la réaction de fixation du
10 peptide. Dans le procédé de détection selon l'invention, l'échantillon sanguin peut être mis en contact avec :

- le polypeptide HARP, c'est à dire une protéine dont la séquence en acides aminés répond à la séquence en acides aminés donnée dans la littérature (3, 5,
15 8),

- un fragment de HARP, soit une protéine ou un peptide capable de se fixer sur les lymphocytes B et dont la séquence en acides aminés répond à une partie de la séquence en acides aminés représentée en annexe sous le
20 numéro SEQ ID N°1.

- un dérivé de HARP, c'est à dire un peptide ou un polypeptide capable de se fixer sur les lymphocytes B et dont la séquence en acides aminés est proche de la séquence en acides aminés identifiée en annexe sous le numéro SEQ ID
25 N°1. Par dérivé de HARP, on entend également une protéine capable de se fixer sur les lymphocytes B et comprenant une partie ou la totalité de la séquence en acides aminés répondant à la séquence en acides aminés représentée en annexe sous le numéro SEQ ID N°1 associée à un autre
30 élément de nature protéique ou non protéique. Avantagement, cet élément permet la détection de la fixation du dérivé de HARP sur les lymphocytes B. Cet élément peut par exemple être un élément radioactif, une séquence en acides aminés codant pour une enzyme dont un
35 substrat chromogène peut aussi être ajouté dans le milieu

de réaction. Une autre possibilité est, par exemple, l'association covalente de biotine à HARP, permettant la révélation de l'interaction HARP - lymphocytes B par l'ajout de streptavidine.

5

Le procédé selon l'invention peut être appliqué en mettant en contact le polypeptide HARP, un fragment ou un dérivé de HARP avec un échantillon de sang total.

10

Selon une autre possibilité de réalisation du procédé, une étape au cours de laquelle les cellules sanguines mononucléées sont séparées de l'échantillon de sang total est effectuée préalablement à la mise en contact des cellules avec le polypeptide HARP, un fragment ou un dérivé de HARP.

15

Le procédé selon l'invention peut être mis en oeuvre de telle façon que la fixation à la surface des cellules mononucléées du sang du polypeptide HARP, d'un fragment ou d'un dérivé de HARP, est détectée directement.

20

La détection directe de la fixation de HARP, d'un fragment ou d'un dérivé de HARP peut être réalisée en utilisant, par exemple, le polypeptide HARP marqué radioactivement. Il est également possible d'utiliser le polypeptide HARP couplé à une enzyme ou à de la biotine, et dans ce cas la fixation de HARP aux lymphocytes B sera détectée par l'ajout d'un substrat chromogène correspondant ou de la streptavidine. Il est aussi possible de faire réagir un échantillon sanguin avec le polypeptide HARP, un fragment ou un dérivé de HARP, puis un anticorps fluorescent reconnaissant spécifiquement le polypeptide HARP, le fragment ou le dérivé de HARP mis en œuvre dans la réaction. La fixation de l'anticorps anti-HARP sur les cellules peut ensuite être détectée par cytofluorimétrie en flux.

25

30

35

Le procédé selon l'invention peut être mis en oeuvre de telle façon que la fixation à la surface des cellules mononucléées du sang du polypeptide HARP, d'un fragment ou d'un dérivé de HARP, est détectée indirectement.

Dans l'une des mises en œuvre du procédé selon l'invention pour la détection indirecte de la fixation de HARP sur les lymphocytes B, un échantillon sanguin est mis en contact avec le polypeptide HARP, un fragment ou un dérivé de HARP, puis est ajouté un anticorps fixant spécifiquement le polypeptide HARP, un fragment ou un dérivé de HARP, enfin un anticorps fluorescent liant spécifiquement le premier anticorps est ajouté. La fixation de l'anticorps anti-anticorps sur les cellules peut ensuite être détectée par cytofluorimétrie en flux.

L'invention a en particulier pour objet un procédé de diagnostic des pathologies prolifératives des cellules mononucléées du sang. Ce procédé est caractérisé en ce que l'on détecte les lymphocytes B dans un échantillon sanguin d'un patient puis en ce que l'on mesure le taux de fixation de HARP sur les lymphocytes B et l'on compare ce taux à une valeur témoin obtenue chez un sujet sain, de façon à associer une augmentation de fixation de HARP à une augmentation des lymphocytes B et à une pathologie proliférative des cellules mononucléées du sang.

Selon l'une des applications possibles de l'invention, le facteur HARP est avantageusement utilisé pour le diagnostic des pathologies prolifératives des cellules mononucléées du sang, comme les leucémies lymphoïdes chroniques.

Un autre aspect de l'invention concerne un élément des cellules mononucléées du sang permettant la

fixation du facteur HARP sur lesdites cellules. Cet élément peut notamment être un récepteur liant, exclusivement ou non exclusivement, le facteur HARP.

5

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent où il sera fait référence aux dessins en annexe dans lesquels :

10

La figure 1 représente la fixation de HARP sur des PBMCs issus d'individus sains ou atteints de leucémie lymphoïde chronique. Les barres noires correspondent aux cellules issues d'individus sains donneur de sang, les barres blanches correspondent aux cellules issues de patients souffrant de leucémie lymphoïde chronique.

15

La figure 2 représente les histogrammes de fluorescence biparamétriques conditionnés, obtenus à l'aide d'un cytomètre de flux sur la fenêtre d'acquisition des lymphocytes de sujets normaux, obtenue à partir d'un cytogramme représentant la taille cellulaire en fonction de la structure cellulaire.

20

a =double marquage CD19-PE en ordonnées contre HARP-FITC en abscisses en absence de hrHARP.

25

b =double marquage CD2-PC5 en ordonnées contre HARP-FITC en abscisses en absence de hrHARP.

c= double marquage CD19-PE en ordonnées contre HARP-FITC en abscisses en présence de hrHARP.

30

d= double marquage CD2-PC5 en ordonnées contre HARP-FITC en abscisses en présence de hr HARP.

La figure 3 représente des histogrammes de fluorescence conditionnés sur des cellules lymphoïdes

malignes (LLC) : en l'absence de HARP humain recombinant (hrHARP) (fig.3a) et en présence de hrHARP (fig.3b).

5 Exemple 1 : Utilisation de HARP comme marqueur des lymphocytes des patients présentant une leucémie lymphoïde chronique.

10 Les cellules mononucléées ont été isolées du sang périphérique de sujets normaux, donneurs de sang, ou de sujets porteurs d'hémopathies variées : 30 sujets atteints de LLC, 6 atteints de LNH B, 4 atteints de maladies de Sézary, 2 atteints de leucémies aiguës myéloïdes (LAM2 et LAM3) et 1 atteint de leucémie myéloïde
15 chronique (LMC). Le sang a été prélevé sur tube Vacutainer contenant de l'EDTA. Les cellules mononucléées ont été séparées par gradient de Ficoll, comptées et ajustées à 10^6 cellules par ml. Le facteur de croissance HARP utilisé a été la protéine humaine recombinante HARP (hrHARP) de 139
20 acides aminés, fournie par le laboratoire CRRET (ESA CNRS 7053) à Créteil Université Paris 12 (France). L'anticorps anti-HARP (Immunoglobuline de chèvre anti-HARP humain) provient de la société R&D Systems Minneapolis (Minnesota USA) a été utilisé à la dilution finale de 1/250. Un
25 anticorps anti IgG de chèvre couplé au FITC (provenant de Caltag, Burlingame, CA, USA) à la dilution de 1/50 a été utilisé comme anticorps secondaire. Pour réaliser le contrôle négatif, l'anti-HARP a été remplacé par du sérum de chèvre (provenant de la société Jackson, West Grove, PE,
30 USA).

 D'autres anticorps ont été utilisés pour identifier les populations cellulaires : CD19-PE, CD2-PC5, CD10-FITC, CD45Ra-FITC, CD45Ro-FITC, CD4-PE, CD8-ECD, CD3-FITC, CD16/56-PE, CD25-FITC (tous ces anticorps proviennent

de la société Beckman Coulter-Immunotech, Hialeah, FL, USA).

5 Afin de mesurer le contenu endogène en facteur de croissance HARP des cellules circulantes, celles-ci ont été séparées sur ficoll puis lavées en PBS-0.1% BSA. Ces cellules ont été ensuite incubées avec l'anticorps primaire anti-HARP pendant 30 minutes à température ambiante, puis lavées en PBS-0.1% BSA et remises en incubation avec l'anticorps secondaire pendant 30 minutes. Après lavage et
10 fixation en formol 1% les cellules ont été analysées au cytofluorimètre XL (Beckman-Coulter Hialeah, FL, USA).

Afin de rechercher le ou les sites de fixation cellulaire de HARP, les cellules mononucléées ont été préalablement incubées avec le HARP recombinant (hrHARP) à
15 la concentration de 1 µg/ml pendant 1h à température ambiante, puis lavées, avant d'être marquées selon la technique précédente. L'effet de hrHARP sur des cellules mononucléées normales après 5 jours de culture a été étudié en atmosphère humide à 37°C enrichie avec 5% de CO₂, en
20 l'absence et en présence de 1 µg/ml de hrHARP. Une fois lavées, les cellules ont été marquées à l'aide d'anticorps monoclonaux anti CD19, CD2, CD4, CD8 ainsi qu'avec l'anti-HARP. La lecture au cytofluorimètre a été réalisée à l'aide d'un rayon laser de 488 nm. Une fenêtre d'acquisition a été
25 dessinée autour des lymphocytes sur un histogramme biparamétrique représentant la taille cellulaire selon un mode linéaire en fonction du logarithme de la granulométrie. Des histogrammes représentant l'intensité de fluorescence en mode logarithmique en fonction du nombre de
30 cellules ont été ainsi obtenus à partir de cette population de cellules sélectionnée. Les résultats ont été acquis en pourcentages de cellules

Les cellules mononucléées ont été analysées positives pour l'anticorps concerné. Des histogrammes biparamétriques représentant l'expression de fluorescence
35

de deux antigènes différents marqués par des fluorochromes différents ont permis d'analyser les doubles marquages CD19/HARP.

5 Les résultats sur la recherche de la présence de HARP endogène ont été négatifs et aucune expression directe de HARP n'a pu être mise en évidence sur les lymphocytes des 10 sujets normaux testés, ni des cellules lymphoïdes et myéloïdes malignes testées, après séparation des cellules mononucléées sur gradient de ficoll. La recherche de sites de fixation cellulaire de HARP a permis de montrer que sur les lymphocytes B de sujets normaux une fixation HARP. Il est à noter que pour 2 sujets sur les 10 analysés, des cellules CD2 positives sont également capables de fixer hrHARP sans que l'on puisse faire une distinction entre les cellules T et NK Ainsi les histogrammes de fluorescence biparamétriques conditionnés sur la fenêtre d'acquisition des lymphocytes de sujets normaux obtenue à partir d'un cytogramme représentant la taille cellulaire en fonction de la structure cellulaire sont présentés dans la figure 2. Un double marquage au CD19-PE contre HARP-FITC (fig2a) et CD2-PC5 contre HARP-FITC (fig.2b) en absence de rhHARP d'une part et les mêmes marquages fig.2c et fig.2d en présence de hrHARP d'autre part montrent une fixation de HARP associée au CD19 chez les sujets sains.

Chez les malades atteints de certaines LLC ou de certains LNH, il a été observé une fixation de HARP sur les lymphocytes. Ceci a été montré par des triples marquages entre un marqueur des cellules lymphoïdes B, le CD19, un marqueur pan T, le CD2 et le HARP. 100% des cellules lymphoïdes B fixent le HARP tandis que les cellules CD2 positives ne le fixent pas. En outre, il semblerait que les cellules exprimant le CD10 ne peuvent fixer le HARP dans nos conditions d'étude. Ces résultats sont présentés dans la figure 3, ce sont des histogrammes

de fluorescence conditionnés sur des cellules lymphoïdes malignes : (fig.3a) en l'absence de hrHARP et (fig.3b) en présence de hrHARP. Par ailleurs les cellules myéloïdes pathologiques des deux LAM et de la LMC ainsi que les
5 cellules lymphomateuses de Sézary de phénotype T n'ont pas montré de fixation de hrHARP.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- 5 1) DiGiuseppe JA, Borowitz MJ, Clinical utility of flow cytometry in the chronic lymphoid leukemias. Semin Oncol 1998, 25(1):6-10).
- 10 2) Matutes E. et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. Leukemia 1994, 8(10):1640-5).
- 15 3) Bohlen P and Kovesdi I. 1991. HBNF and MK, members of a novel gene family of heparin-binding proteins with potential roles in embryogenesis and brain function. Prog. Growth Factor Res. 3: 143
- 20 4) Laaroubi K, Vacherot F, Delbe J, Caruelle D, Barritault D and Courty J. 1995. Biochemical and mitogenic properties of the heparin-binding growth factor HARP. Prog. Growth Factor Res. 6:25).
- 25 5) Rauvala H. 1989. An 18-kd heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factors. EMBO J. 8:2933.
- 30 6) Merenmies J and Rauvala H. 1990. Molecular cloning of the 18-kDa growth associated protein of developing brain. J. Biol. Chem. 265:16721.
- 35 7) Hampton B S, Marshak D R and Burgess W H. 1992. Structural and functional characterization of full-length heparin-binding growth associated molecule Mol. Biol. Cell. 3:85).
- 8) Milner P G, Li Y S, Hoffman R M, Kodner C M, Siegel N R and Deuel T F. 1989. A novel 17 kD

heparin-binding growth factor (HBGF-8) in bovine uterus: purification and N terminal amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165: 1096.

5 9) Fang W, Hartmann N, Chow D T, Riegel A T and Wellstein A. 1992. Pleiotrophin stimulates fibroblasts and endothelial and epithelial cells and is expressed in human cancer. *J. Biol. Chem.* 267:25889).

10 10) Laaroubi K, Delbe J, Vacherot F, Desgranges P, Tardieu M, Jaye M, Barritault D and Courty J. 1994. Mitogenic and in vitro angiogenic activity of human recombinant heparin affin regulatory peptide. *Growth Factors* 10:89.

15 11) Ledoux D, Caruelle D, Sabourin C, Liu J, Crepin M, Barritault D and Courty J. 1997. Cellular distribution of the angiogenic factor heparin affin regulatory peptide (HARP) mRNA and protein in the human
20 mammary gland. *J. Histochem. Cytochem.* 45:1.

 12) Wellstein A et al. 1992. A heparin-binding growth factor secreted from breast cancer cells homologous to a developmentally regulated cytokine. *J. Biol. Chem.*
25 267:2582.

 13) Kuo MD, Huang SS and Huang JS. 1992. Characterization of heparin-binding growth-associated factor receptor on NIH 3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182:188).

30

REVENDEICATIONS

1) Procédé de détection des lymphocytes B caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

5 - la mise en contact d'un échantillon sanguin d'un sujet, ou d'une fraction de cet échantillon sanguin, avec le polypeptide HARP, un fragment ou un dérivé de HARP

10 - la détection de la fixation à la surface des lymphocytes B du polypeptide HARP, d'un fragment ou d'un dérivé de HARP par tout moyen approprié.

2) Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le polypeptide HARP, un fragment ou un dérivé de HARP est mis en contact avec un échantillon de sang total.

15 3) Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend une étape au cours de laquelle les cellules sanguines mononucléées sont séparées des autres composants de l'échantillon sanguin préalablement à la mise
20 en contact desdites cellules avec le polypeptide HARP, un fragment ou un dérivé de HARP.

25 4) Procédé selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que la fixation à la surface des cellules mononucléées du sang du polypeptide HARP, d'un fragment ou d'un dérivé de HARP, est détectée directement.

30 5) Procédé selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que la fixation à la surface des cellules mononucléées du sang du polypeptide HARP, d'un fragment ou d'un dérivé de HARP, est détectée indirectement.

35 6) Procédé de diagnostic des pathologies prolifératives des cellules mononucléées du sang caractérisé en ce que l'on détecte les lymphocytes B dans

un échantillon sanguin d'un patient selon l'une des revendications 1 à 5 puis en ce que l'on mesure le taux de fixation de HARP sur les lymphocytes B et l'on compare ce taux à une valeur témoin obtenue chez un sujet sain, de façon à associer une augmentation de fixation de HARP à une augmentation des lymphocytes B et à une pathologie proliférative des cellules mononucléées du sang.

8) Utilisation du facteur HARP pour le diagnostic des pathologies prolifératives des cellules mononucléées du sang, comme les leucémies lymphoïdes chroniques.

Fig. 1

**Etude de la fixation de HARP sur les
Lymphocytes B (CD19+HARP+)**

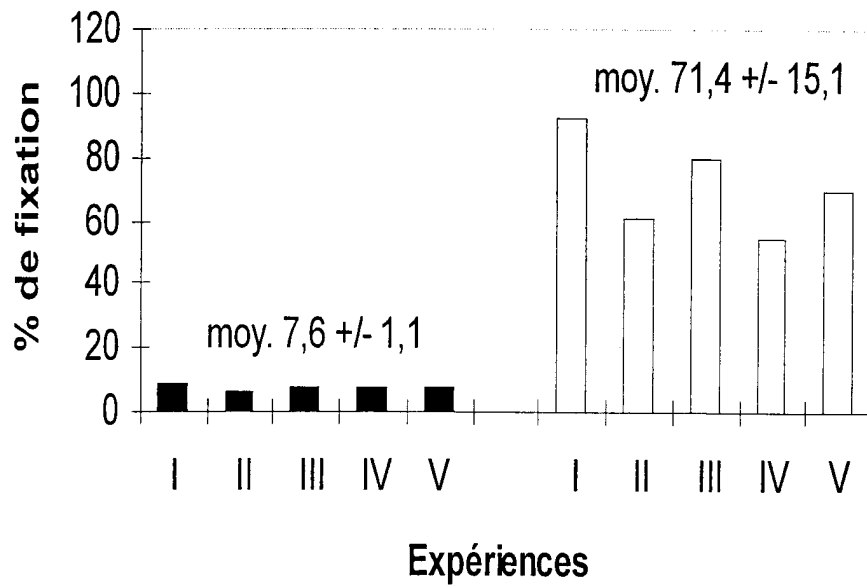


Fig. 2

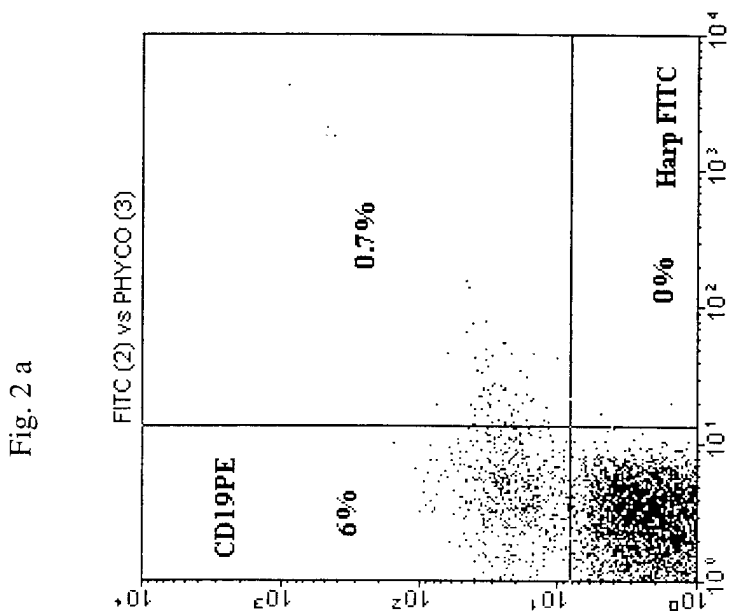
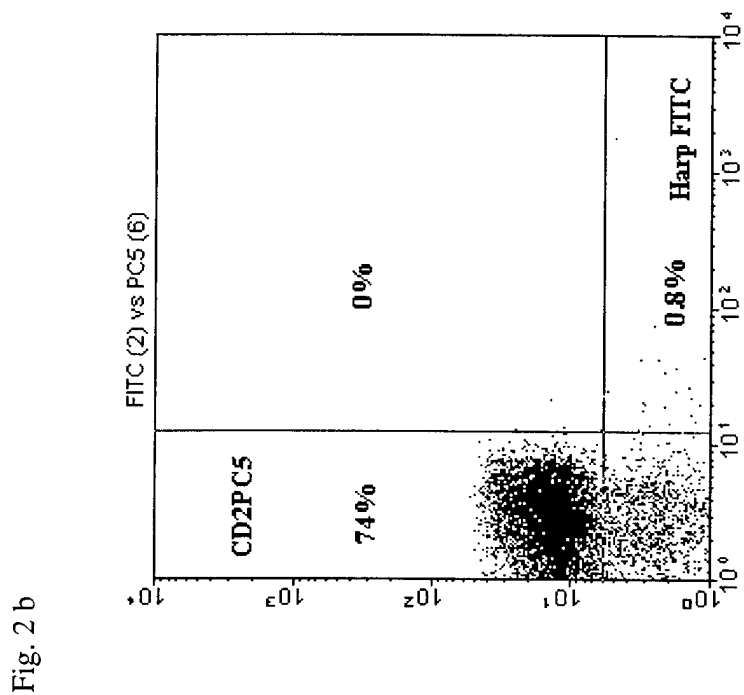


Fig. 2 suite

Fig. 2 d

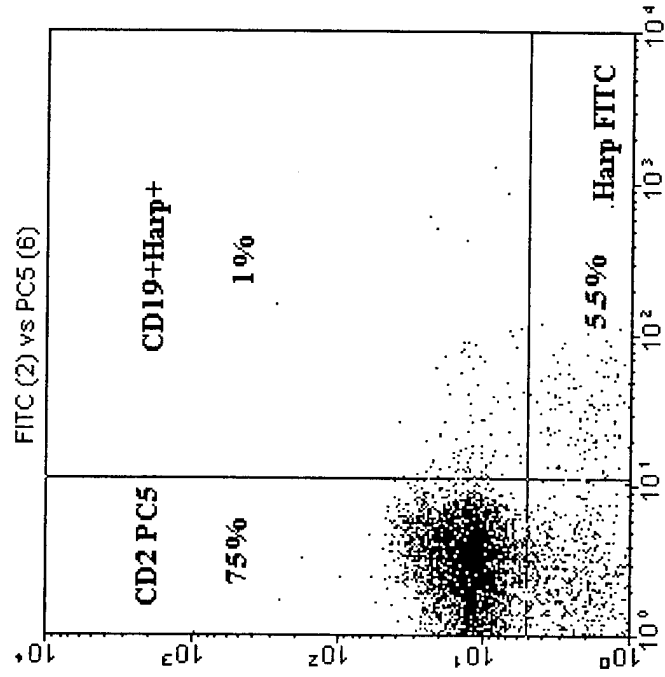


Fig. 2 c

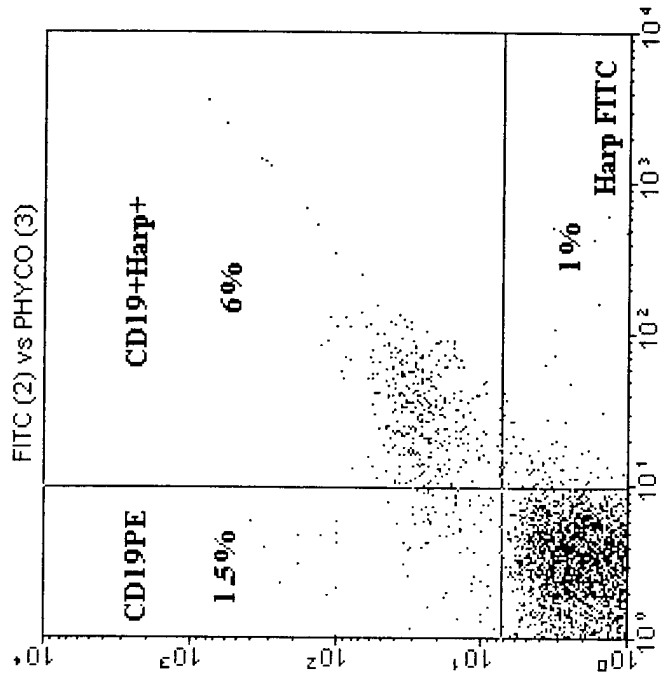


Fig. 3

Fig. 3 a

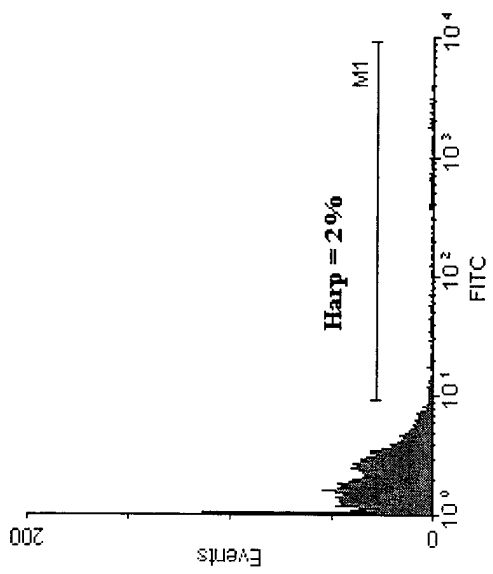
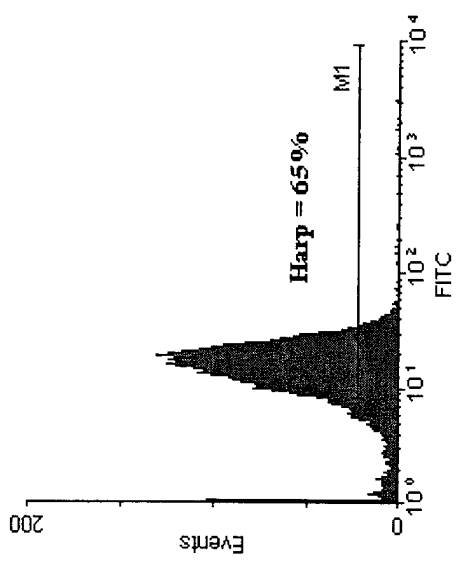


Fig. 3 b



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02788

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 G01N33/574 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 7 G01N

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

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

EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	W. FANG ET AL.: "Pleiotrophin stimulates fibroblasts and endothelial and epithelial cells and is expressed in human cancer." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 267, no. 36, 25 December 1992 (1992-12-25), pages 25889-25897, XP002142407 AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD., US ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document -----	1-8
A	US 5 773 252 A (J. M. GREENE ET AL.) 30 June 1998 (1998-06-30) -----	

Further documents are listed in the continuation of box C.

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 referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

Date of the actual completion of the international search

2 January 2001

Date of mailing of the international search report

17/01/2001

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

Griffith, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/02788

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5773252 A	30-06-1998	US 6013477 A	11-01-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem: Internationale No

PCT/FR 00/02788

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 CIB 7 G01N33/574 G01N33/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
 CIB 7 G01N

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

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
 EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	W. FANG ET AL.: "Pleiotrophin stimulates fibroblasts and endothelial and epithelial cells and is expressed in human cancer." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 267, no. 36, 25 décembre 1992 (1992-12-25), pages 25889-25897, XP002142407 AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD., US ISSN: 0021-9258 cité dans la demande le document en entier -----	1-8
A	US 5 773 252 A (J. M. GREENE ET AL.) 30 juin 1998 (1998-06-30) -----	

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents
 Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *&* document qui fait partie de la même famille de brevets
--	---

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 2 janvier 2001	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 17/01/2001
--	---

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Griffith, G</p>
---	---

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem: Internationale No

PCT/FR 00/02788

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5773252 A	30-06-1998	US 6013477 A	11-01-2000

专利名称(译)	单核细胞病理诊断		
公开(公告)号	EP1222464A1	公开(公告)日	2002-07-17
申请号	EP2000967973	申请日	2000-10-06
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家科学研究中心		
申请(专利权)人(译)	中心国家DELA RECHERCHE科学研究 (CNRS) 援助PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS		
当前申请(专利权)人(译)	中心国家DELA RECHERCHE科学研究 (CNRS) 援助PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS		
[标]发明人	BARRITAUULT DENIS ACHOUR AMMAR COURTY JOSE BAUDOUIN FRANCOISE		
发明人	BARRITAUULT, DENIS ACHOUR, AMMAR COURTY, JOSÉ BAUDOUIN, FRANÇOISE		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/02 G01N33/566 G01N33/569 G01N33/574 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/57426 G01N33/56972 G01N2333/475		
代理机构(译)	布里斯, PIERRE		
优先权	1999012715 1999-10-12 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种使用生长因子HARP检测单核细胞的方法，该方法提供了诊断这类细胞如慢性淋巴细胞白血病的增殖病理的方法。检测B淋巴细胞的方法包括使血液样品和一些HARP多肽，HARP的片段或衍生物彼此接触并检测HARP多肽，HARP的片段或衍生物固定到B淋巴细胞表面。。用于诊断单核细胞的增殖病理学的方法还包括比较来自患者的样品和来自健康受试者的样品的B淋巴细胞的HARP与B淋巴细胞的固定率。