

①2 **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

②2 Date de dépôt : 17.06.91.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 18.12.92 Bulletin 92/51.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE
ET DE LA RECHERCHE MEDICALE-INSERM
Etablissement public — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Alvarez Fernando.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Ores.

⑤4 Fragments peptidiques issus du cytochrome humain P450 IID6, anticorps anti-fragments peptidiques et leurs applications dans le diagnostic de l'hépatite auto-immune.

⑤7 Fragments peptidiques issus du cytochrome P450 IID6 humain, anticorps anti-fragments peptidiques et leurs applications dans le diagnostic de l'hépatite auto-immune et plus particulièrement dans le diagnostic différentiel entre l'hépatite auto-immune et d'autres hépatites chroniques d'origine virale, telles que l'hépatite C ou l'hépatite B.

Ledit fragment peptidique du cytochrome P450 humain contient au moins un épitope immunodominant du cytochrome P450 IID6, est constitué par une séquence en aminoacides qui comprend entre 3 et 70 aminoacides et se lie spécifiquement avec les auto-anticorps anti-LKM produits lors de l'hépatite auto-immune.

FR 2 677 653 - A1



La présente invention est relative à des fragments peptidiques issus du cytochrome P450 IID6 (anciennement dénommé cytochrome P450 db1) humain, à des anticorps anti-fragments peptidiques et à leurs applications dans le diagnostic de l'hépatite auto-immune et plus particulièrement dans le diagnostic différentiel entre l'hépatite auto-immune et d'autres hépatites chroniques d'origine virale, telles que l'hépatite C ou l'hépatite B.

10 L'hépatite auto-immune, en particulier chez l'enfant, est une maladie inflammatoire qui progresse vers la cirrhose et l'insuffisance hépatique, qui répond généralement à un traitement immunosuppresseur et est caractérisée par la présence de titres élevés d'auto-anticorps non spécifiques d'organe.

Deux sous-groupes ont été définis, en fonction de l'auto-anticorps présent dans le sérum : anticorps anti-muscle lisse (anti-SMA) et anticorps anti-foie-rein-microsome (anti-LKM), dénommés ci-après anticorps anti-20 LKM.

L'antigène reconnu par les anticorps anti-LKM est une protéine de poids moléculaire de 50 kDa, présente à une concentration relativement élevée dans le réticulum endoplasmique. Plusieurs études suggèrent que cet anti-25 gène correspond à une protéine de la famille du cytochrome P450 (WAXMAN B. J. et al., Gastroentérol. 1988, 95, 1326). Ceci a été confirmé par le criblage d'une banque d'ADNc de foie de rat en présence d'un anticorps anti-protéine 50KDa, purifié par affinité à partir d'un 30 sérum LKM positif. Deux formes constitutives du cytochrome P450, appartenant à la sous-famille IID 1 et 2 (db1 et db2 de rat) ont été identifiées, comme les antigènes reconnus par l'anticorps anti-LKM (GUEGUEN M. et al., J. Exp. Med., 1988, 168, 801). D'autres études 35 (GUEGUEN M. et al., Biochem. Biophys. Ref. Commun., 1989, 159, 542 ; ZANGER U.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA,

1988, 27, 8256 ; MANNS M.P. et al., J. Clin. Invest., 1989, 83, 1066) ont montré que le cytochrome P450 IID6 est la protéine reconnue, dans le foie humain, par l'anticorps anti-LKM.

5 Plusieurs méthodes de dosage des anticorps anti-LKM ont été proposées :

- une première méthode de détection de ces anticorps a été décrite dans RIZZETTO et al., 1973, Clin. Exp. Immunol., 15, 331, et a été notamment utilisée pour
10 le diagnostic des maladies de foie associées à la production d'anticorps anti-LKM chez l'enfant (MAGGIORE et al., J. Pediatrics, 1986, 108, 3, 399-404 : *Liver-disease associated with anti-liver-kidney microsome antibody in children*) ; cette méthode consiste à détecter lesdits
15 anticorps (sérum) par immunofluorescence indirecte sur des sections de foie et de rein de rat.

Les sérums sont considérés comme positifs pour les anticorps anti-LKM, lorsqu'ils réagissent à une dilution minimale de 1:100 avec le cytoplasme d'hépatocytes
20 et de tubules rénaux proximaux, alors qu'aucune coloration n'est obtenue au niveau des tubules distaux.

Toutefois, cette méthode d'immunofluorescence indirecte présente l'inconvénient majeur d'être peu sensible et d'entraîner ainsi des faux négatifs qui peuvent
25 diriger le clinicien vers un mauvais diagnostic et désorienter ainsi ce dernier par rapport aux signes cliniques observés.

De plus, les résultats obtenus sont généralement d'interprétation difficile, limitée à des labora-
30 toires spécialisés.

D'autres tests ont par conséquent été proposés, on peut citer notamment :

- un test RIA (Clin. Exp. Immunol., 1984, 57, 600-608 : *Detection of liver-kidney microsomal auto-
35 antibodies by radioimmunoassay and their relation to anti-mitochondrial antibodies in inflammatory liver*

diseases), qui présente les inconvénients généraux des tests RIA (notamment difficulté d'obtention et de manipulation des réactifs marqués) ;

- des tests ELISA :

5 . dans J. Ped. Gastroenterol. Nutr. 1988, 7,
816-822 (*Detection of anti-endoplasmic reticulum antibody-positive autoimmune hepatitis in children, using an ELISA technique*), les Auteurs (K. PARADIS, A. DIB, JC. HOMBERG, O. BERNARD, D. ALAGILLE et F. ALVAREZ) ont
10 décrit une méthode de détection par ELISA, utilisant, comme antigène une préparation de microsomes de foie de rat.

Cette technique s'est révélé plus sensible que l'immunofluorescence indirecte ; cependant elle a
15 l'inconvénient d'entraîner la contamination de l'antigène utilisé par d'autres fractions, dont les mitochondries, ce qui peut entraîner des faux positifs, en particulier chez l'adulte, qui notamment dans la cirrhose biliaire primitive présente des anticorps antimitochondries.

20 . Poursuivant leurs travaux, les Auteurs (M. GUEGEN, AM. YAMAMOTO, O. BERNARD et F. ALVAREZ) ont remplacé les microsomes de foie, par une protéine de fusion comprenant le cytochrome P450 (Biochem. Biophys. Res. Comm., 1989, 159, 2, 542-547).

25 Toutefois, un tel antigène a l'inconvénient de présenter également des faux positifs, notamment en raison de la présence de la protéine associée.

Dans le but de résoudre le problème de l'obtention d'un test fiable et sensible aussi bien chez
30 l'enfant que l'adulte (absence de faux positifs dans tous les cas), l'Inventeur, co-Auteur des articles précités, a mis au point un test de détection spécifique de l'hépatite autoimmune qui puisse notamment permettre le diagnostic différentiel avec les hépatites d'origine
35 virale (hépatite C, notamment). En effet, il est apparu que le test de détection de l'hépatite C donne des résul-

tats faussement positifs chez des sujets présentant, en fait, une hépatite auto-immune.

Ceci est en effet très important car les traitements des hépatites virales telles que l'hépatite B et C et de l'hépatite auto-immune sont complètement différents : dans l'hépatite B et C, on administre généralement de l'interféron recombinant, qui permet une amélioration de l'activité aminotransférase sérique, alors que dans l'hépatite auto-immune, ce sont la prednisone et l'azathioprine qui entraînent une amélioration de cette hépatite.

Il est donc important, dans la mesure où le pronostic et le traitement de ces deux types d'hépatites est radicalement différent, de pouvoir disposer d'un test et de réactifs de l'hépatite auto-immune, qui présentent notamment des propriétés diagnostiques hautement spécifiques, rapides à mettre en oeuvre et réalisables dans n'importe quel laboratoire d'analyse médicale de ville.

La présente invention s'est en conséquence donné pour but de pourvoir à des fragments peptidiques issus du cytochrome P450 humain, qui répondent mieux aux besoins de la pratique que les réactifs de l'Art antérieur, notamment en permettant la mise au point de tests diagnostiques hautement spécifiques ainsi que la préparation d'anticorps (polyclonaux et/ou monoclonaux) à visée thérapeutique et/ou diagnostique, également hautement spécifiques vis-à-vis d'au moins un épitope immunodominant de l'hépatite auto-immune.

La présente invention a pour objet un fragment peptidique du cytochrome P450 humain, caractérisé en ce qu'il contient au moins un épitope immunodominant du cytochrome P450 IID6, en ce qu'il est constitué par une séquence en aminoacides qui comprend entre 3 et 70 aminoacides et en ce qu'il se lie spécifiquement avec les auto-anticorps anti-LKM produits lors de l'hépatite auto-immune.

Au sens de la présente invention, "fragment peptidique", englobe non seulement les séquences comprenant un fragment du cytochrome P450 IID6 humain, mais également ceux n'en différant que par la substitution, la
5 détection, l'addition d'un petit nombre d'acides aminés, à condition que les séquences ainsi modifiées aient une spécificité de liaison avec les auto-anticorps anti-LKM équivalente à celle des fragment sus-mentionnés.

Parmi ces fragments peptidiques, l'on peut
10 citer en particulier :

a - un premier ensemble de fragments, comprenant au moins un fragment de la séquence du cytochrome P450 IID6 compris entre l'acide aminé 239 et l'acide aminé 278, et comprenant le site antigénique majeur du cyto-
15 chrome P450 et notamment :

. un fragment peptidique, caractérisé en ce qu'il est constitué de 39 acides aminés, dont la séquence présente la formule I suivante :
Lys-Val-Leu-Arg-Phe-Gln-Lys-Ala-Phe-Leu-Thr-Gln-Leu-Asp-
20 Glu-Leu-Leu-Thr-Glu-His-Arg-Met-Thr-Trp-Asp-Pro-Ala-Gln-Pro-Pro-Arg-Asp-Leu-Thr-Glu-Ala-Phe-Leu-Ala (I),
laquelle séquence correspond aux acides aminés 239-278 du cytochrome P450 IID6 humain.

. un fragment peptidique, caractérisé en ce
25 qu'il est constitué de 18 acides aminés, dont la séquence présente la formule II suivante :
Leu-Leu-Thr-Glu-His-Arg-Met-Thr-Trp-Asp-Pro-Ala-Gln-Pro-Pro-Arg-Asp-Leu (II),
laquelle séquence correspond aux acides aminés 254-271 du
30 cytochrome P450 IID6 humain.

. un fragment peptidique, caractérisé en ce qu'il est constitué de 13 acides aminés, dont la séquence présente la formule III suivante :
Glu-His-Arg-Met-Thr-Trp-Asp-Pro-Ala-Gln-Pro-Pro-Arg
35 (III),
laquelle séquence correspond aux acides aminés 257-269 du

cytochrome P450 IID6.

. un fragment peptidique, caractérisé en ce qu'il est constitué de trois aminoacides dont la séquence présente la formule IV suivante :

5 Thr-Trp-Asp (IV),
laquelle séquence correspond aux aminoacides 261, 262, et 263 du cytochrome P450 IID6 humain.

b - un deuxième ensemble de fragments, comprenant au moins un fragment de la séquence du cytochrome
10 P450 IID6 compris entre l'acide 282 et l'acide 351, et notamment :

. un fragment peptidique, caractérisé en ce qu'il est constitué de 70 aminoacides, dont la séquence présente la formule V suivante :

15 Ala-Lys-Gly-Asn-Pro-Glu-Ser-Ser-Phe-Asn-Asp-Glu-Asn-Leu-Arg-Ile-Val-Val-Ala-Asp-Leu-Phe-Ser-Ala-Gly-Met-Val-Thr-Thr-Ser-Thr-Thr-Leu-Ala-Trp-Gly-Leu-Leu-Leu-Met-Ile-Leu-His-Pro-Asp-Val-Gln-Arg-Arg-Val-Gln-Gln-Glu-Ile-Asp-Asp-Val-Ile-Gly-Gln-Val-Arg-Arg-Pro-Glu-Met-Gly-Asp-Gln-Ala
20 (V),
laquelle séquence correspond aux aminoacides 282-371 du cytochrome P450 IID6 humain ;

. un fragment peptidique, caractérisé en ce qu'il est constitué de 13 aminoacides, dont la séquence
25 présente la formule VI suivante :

Ala-Lys-Gly-Asn-Pro-Glu-Ser-Ser-Phe-Asn-Asp-Glu-Asn
(VI),

laquelle séquence correspond aux aminoacides 282-294 du cytochrome P450 IID6.

30 . un fragment peptidique, caractérisé en ce qu'il est constitué de 43 aminoacides, dont la séquence présente la formule VII suivante :

Met-Val-Thr-Thr-Ser-Thr-Thr-Leu-Ala-Trp-Gly-Leu-Leu-Leu-Met-Ile-Leu-His-Pro-Asp-Val-Gln-Arg-Arg-Val-Gln-Gln-Glu-Ile-Asp-Asp-Val-Ile-Gly-Gln-Val-Arg-Arg-Pro-Glu-Met-Gly-Asp
35 (VII),

laquelle séquence correspond aux aminoacides 307 et 349 du cytochrome P450 IID6.

c - un troisième ensemble de fragments, comprenant au moins un fragment de la séquence du cytochrome
 5 P450 IID6 compris entre l'acide 349 et l'acide 389, et notamment :

. un fragment peptidique, caractérisé en ce qu'il est constitué de 41 aminoacides, dont la séquence présente la formule VIII suivante :

10 Asp-Gln-Ala-His-Met-Pro-Tyr-Thr-Thr-Ala-Val-Ile-His-Glu-
 Val-Gln-Arg-Phe-Gly-Asp-Ile-Val-Pro-Leu-Gly-Met-Thr-His-
 Met-Thr-Ser-Arg-Asp-Ile-Gly-Val-Gln-Gly-Phe-Arg-Ile

(VIII),

laquelle séquence correspond aux aminoacides 349-389 du
 15 cytochrome P450 IID6 humain.

. un fragment peptidique, caractérisé en ce qu'il est constitué de 17 aminoacides, dont la séquence présente la formule IX suivante :

Gly-Met-Thr-His-Met-Thr-Ser-Arg-Asp-Ile-Gly-Val-Gln-Gly-

20 Phe-Arg-Ile (IX),

laquelle séquence correspond aux aminoacides 373-389 du cytochrome P450 IID6 humain.

d - un quatrième ensemble de fragments, comprenant au moins un fragment de la séquence du cytochrome
 25 P450 IID6 compris entre l'acide 410 et l'acide 429, et notamment :

. un fragment peptidique, caractérisé en ce qu'il est constitué de 20 aminoacides, dont la séquence de formule X suivante :

30 Glu-Lys-Pro-Tyr-Pro-Glu-His-Phe-Leu-Asp-Ala-Gln-Gly-His-
 Phe-Val-Lys-Pro-Glu-Ala (X),

laquelle séquence correspond aux aminoacides 410-429 du cytochrome P450 IID6 humain.

Ces peptides peuvent en particulier être pré-
 35 parés par synthèse, notamment par la méthode de Merrifield.

La présente invention a également pour objet des anticorps anti-cytochrome P450 humain, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des anticorps anti-fragments peptidiques tels que décrits dans l'invention.

5 Selon un mode de réalisation avantageux desdits anticorps, ils sont constitués par des anticorps polyclonaux.

Ces anticorps polyclonaux sont avantageusement obtenus par immunisation d'un mammifère approprié, notamment le lapin avec un peptide conforme à l'invention, éventuellement couplé à une protéine convenable, telle que la BSA (sérumalbumine bovine) ou la KLH (keyhole limpet hemocyanin).

10 Selon un autre mode de réalisation avantageux desdits anticorps, ils sont constitués par des anticorps monoclonaux spécifiques d'un fragment peptidique issu du cytochrome P450 IID6 humain tel que défini ci-dessus.

Ces anticorps monoclonaux anti-fragments peptidiques sont avantageusement obtenus, d'une manière connue en elle-même, par fusion de cellules spléniques de souris immunisées par un antigène constitué par un fragment peptidique de cytochrome P450 IID6 tel que défini ci-dessus, éventuellement couplé à une protéine convenable telle que la BSA ou la KLH, avec des cellules myé-
25 lomateuses appropriées.

La présente invention a aussi pour objet un réactif immunologique, utilisable pour la détection, le diagnostic et le suivi de l'hépatite auto-immune, caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe qui comprend
30 les fragments peptidiques et les anticorps anti-peptides conformes à l'invention ou un fragment de ceux-ci.

En particulier, lorsque les fragments de formules II, III et IV tels que définis ci-dessus, sont utilisés comme réactifs de diagnostic, ils entraînent une
35 réponse positive chez tous les malades atteints d'hépatite auto-immune et les fragments de formules IX et

X entraînent une réponse positive chez la plupart des malades atteints d'hépatite auto-immune.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection et/ou de diagnostic de l'hépatite auto-immune, caractérisé en ce qu'il consiste à détecter les auto-anticorps éventuellement présents dans un fluide biologique tel que le sang, en mettant en présence ledit fluide biologique avec au moins un réactif immunologique approprié conforme à l'invention, auquel se lient les auto-anticorps anti-LKM, si de tels anticorps sont présents dans l'échantillon biologique à contrôler, la lecture du résultat étant révélée par un moyen approprié, notamment RIA, EIA ou cytométrie de flux.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé, ledit fluide biologique est mis en contact avec au moins trois peptides conformes à l'invention.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, le premier peptide comprend un fragment peptidique choisi dans le groupe constitué par les fragments de formules I, II, III ou IV ; le deuxième peptide comprend un fragment peptidique de formule IX et le troisième peptide comprend un fragment peptidique de formule X.

Les réactifs et le procédé de détection conformes à l'invention ont l'avantage de permettre un diagnostic différentiel entre l'hépatite auto-immune et les autres hépatites d'origine virale.

La présente invention a également pour objet des agents à visée thérapeutique et/ou préventive, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par, ou comprennent en tant que constituant actif, un peptide conforme à l'invention et/ou ses fragments, seul ou conjugué ou recombiné ou associé à d'autres substances.

La présente invention a également pour objet des agents à visée thérapeutique et/ou préventive, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par, ou comprennent

en tant que constituant actif, des anticorps antipeptides conformes à l'invention, et/ou leurs fragments, seuls ou conjugués ou recombinés ou associés avec d'autres substances.

5 La présente invention a en outre pour objet un kit ou trousse de diagnostic pour la détection, le diagnostic ou le suivi de l'hépatite auto-immune, caractérisé en ce qu'il comprend :

- un support solide approprié convenablement
10 revêtu d'au moins un ligand choisi dans le groupe qui comprend les peptides conformes à l'invention, les anticorps conformes à l'invention, les fragments F(ab)'₂ et les fragments F ab' desdits anticorps ;

- au moins un flacon contenant des conjugués
15 choisis dans le groupe qui comprend les conjugués enzyme appropriée-anticorps anti-Ig humains appropriés, les conjugués enzyme appropriée-anticorps anti-fragment Fc des Ig humaines et les conjugués enzyme appropriée-anticorps anti-peptides conformes à l'invention ;

20 - des quantités ou doses appropriées d'une substance de révélation appropriée.

Dans le cas d'une méthode directe, par exemple, les anticorps anti-LKM du patient se fixent aux peptides conformes à l'invention, préalablement fixés au
25 support solide et des conjugués enzyme appropriée-anticorps anti-Ig humains appropriés ou des conjugués enzyme appropriée-anticorps anti-fragment Fc des Ig humaines sont introduits, se lient avec les Ig du patient et sont ensuite révélés de manière appropriée.

30 Dans le cas d'une méthode indirecte, par exemple, des conjugués enzyme appropriée-anticorps antipeptides conformes à l'invention entrent en compétition avec les anticorps du patient pour se lier au support solide revêtu de peptides ou d'anticorps conformes à
35 l'invention.

Outre les dispositions qui précèdent

l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention.

5 Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Sélection et préparation des fragments pepti-
10 **diques conformes à l'invention.**

a) Construction des plasmides d'expression
pEX627-LKMHC5 et pEX627-LKMC1.

LKMHC5 est un clone d'ADNc dans le phage λ GT-
11, codant pour le cytochrome humain P450 IID6 (GUEGUEN
15 M. et al. 1989, référence citée). Le fragment EcoRI-PstI
d'ADNc (1007 bp) est sous-cloné dans le plasmide EX-627,
qui permet l'expression d'une protéine de fusion (β -
galactosidase/P450 IID6) dans la bactérie *E. coli* pop
2136. La carte de restriction du cytochrome P450 IID6 est
20 obtenue à partir de la GenBank et utilisée pour créer
différentes constructions. Les endonucléases utilisées
sont : EcoRI, ApaI, BstEII, SauI, AvaI, StuI, PstI, EcoNI
et PpuMI; les sites de restriction spécifiques sont
représentés à la figure 1. Les protocoles utilisés pour
25 la restriction et la ligation sont ceux décrits dans
SAMBROOK et al. (Molecular cloning, Laboratory Manual,
1989, Cold Spring Harbor Laboratory). Les différentes
constructions obtenues, désignées par des lettres,
correspondent à différents fragments du cytochrome P450
30 comme suit :

- Construction A : séquence en aminoacides 125-152 ;
- Construction B : séquence 125-239 ;
- Construction C : séquence 125-273/428-458 ;
- Construction D : séquence 428-458 ;
- 35 - Construction E : séquence 125-273 (*) ;
- Construction F : séquence 125-208/273-458 ;

- Construction G : séquence 349-458 ;
- Construction H : séquence 349-428 (▲) ;
- Construction I : séquence 273-307 et
- Construction J : séquence 349-389 (▲) (voir figure 1).

5 Chacune de ces constructions est clonée et analysée avant l'expression, pour confirmer que la dimension prévue de l'ADN est bien obtenue.

Dans la figure 1, le signe * indique un site antigénique reconnu par les sérums de tous les malades testés et le signe ▲ indique d'autres sites antigéniques reconnus par un certain nombre de malades.

- Le clone LKMC1 est un clone d'ADNc dans le phage λ GT-11, codant pour le cytochrome P450 db2 de rat. Le fragment EcoRI-BamHI de LKMC1 (800 bp) est cloné dans le plasmide pEX-627 et transfecté dans *E.coli* pop 2136. Ceci permet de tester le peptide correspondant à la région 5' du gène (codant pour l'acide aminé 1 à l'acide aminé 125).

- mise en évidence des épitopes :

20 La protéine P450 IID6 complète comprend 495 acides aminés. Le clone LKMHC5 EcoRI/PSTI, tel que défini ci-dessus, qui code pour les acides aminés 125 à 458, permet l'analyse de la partie C terminale de la molécule, tandis que la région N-terminale est analysée en utilisant un sous-clone EcoRI/BamHILKMC1, tel que défini ci-dessus, et qui code pour la séquence en acides aminés 1-266 du cytochrome P450 IID6 humain.

L'analyse de ces clones montre qu'il existe une homologie de 70,4 % entre la partie NH₂-terminale de 125 acide aminé de la protéine de rat P450-db2 (LKMC1) et la protéine humaine P450 IID6. Les constructions d'ADN telles que définies ci-dessus, dans le plasmide EX-627, ont permis de tester différentes régions de la protéine P450 IID6 humaine, situées entre les acides aminés 125 et 458. Sur les immunoblots, figure 2, tous les sérums positifs LKM, reconnaissent les protéines de fusion obtenues

à partir des constructions C, E et F. Six sur les onze sérums testés reconnaissent les constructions G, H et J. Aucun des sérums des patients testés ne reconnaît les constructions A, B, D, I et LKMC1/BamHI. Toutes les protéines de fusion sont reconnues par les anticorps anti- β -galactosidase. Ces résultats illustrent la présence d'au moins deux sites antigéniques sur la protéine humaine P450 IID6 reconnue par les anticorps anti-LKM. Les résultats combinés des constructions A(-), B(-), C(+), D(-) et E(+) montrent qu'une région peptidique de 34 aminoacides (aminoacides 239 à 273 de la protéine P450 IID6 humaine) contient au moins l'un des épitopes reconnus par tous les sérums LKM positifs testés. Puisque les constructions G, H et J sont reconnues par six des onze sérums positifs LKM testés, un autre site antigénique est probablement localisé entre les aminoacides 349 et 389. La région située entre les constructions H et I n'a pas été testée de manière spécifique mais était présente dans la construction F. Un troisième épitope est situé entre les aminoacides 307 et 349. La présence d'épitopes multiples sur un auto-antigène, est en faveur de l'hypothèse qui considère que la réponse auto-immune est polyclonale. Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres systèmes auto-antigènes/auto-anticorps et ceux-ci ont été interprétés comme l'absence d'une mutation faite au hasard comme le mécanisme de la production d'auto-anticorps et permettent de soutenir le fait que la réponse auto-immune soit induite par l'antigène.

b) Expression et analyse en immunoblot des protéines de fusion en provenance des différentes constructions de pEX-627-LKMH5 et pEX-627-LKMC1/BamHI.

L'expression des protéines de fusion à partir des constructions d'ADNc est décrite par STANLEY (Nucleic Acids Research, 1983, 11, 4077). Des échantillons de 100 μ l de culture, pour chaque protéine de fusion, sont soumis à une électrophorèse sur du gel de polyacrylamide-

SDS 8-20%, transférés sur nitrocellulose et analysés par la technique immunoblot.

Les premiers anticorps utilisés pour la méthode immunoblot sont :

- 5 1) des sérums de patients répondant positivement aux anticorps anti-LKM ;
- 2) des sérums de patients répondant positivement aux anticorps anti-SMA ;
- 3) des anticorps anti- β -galactosidase de souris ; et
- 10 4) un sérum humain normal.

En fonction de l'origine du premier anticorps, le second anticorps est soit un conjugué peroxydase-IgG anti-humaine de chèvre, soit un conjugué peroxydase-IgG anti-souris de chèvres (Biosys), à une dilution de 15 1/1000.

Les microsomes de foie de rat et de foie humain et la β -galactosidase, exprimée par le plasmide pEX-627 ne comprenant pas l'insert d'ADN P450, sont 20 inclus sur les mêmes gels en tant que contrôles positifs et contrôle négatif, respectivement.

c) la synthèse des peptides.

la synthèse du peptide en phase solide est 25 réalisée en utilisant un appareil Applied Biosystems. Les peptides sont synthétisés sur une résine p-benzyloxy-benzylalcool, en utilisant du 9-fluorénylméthoxycarbonyl (Fmoc). Les dérivés d'acides aminés protégés sont obtenus chez Novabiochem et les autres réactifs chez Applied 30 Biosystems. Les peptides sont scindés à partir de la résine avec un mélange acide-fluoro-acétique:phénol:éthanedithiol:thioanasole:eau (80:3:1:2:2) et purifiés par chromatographie en phase inverse sur une colonne Nucléosil C8 300 A. Trois peptides sont ainsi synthétisés (séquences 241-260, 254-271 35 et 264-281) et ont permis d'analyser l'une des régions (241-280) de la protéine de fusion, qui est reconnue par

les sérums positifs LKM (voir Tableau I ci-dessous).

Le peptide 241-260 est synthétisé avec un résidu cystéine additionnel à l'extrémité NH₂-terminale, afin d'éviter la modification de la lysine 245 (Tableau I), pendant le couplage à la sérumalbumine bovine.

TABLEAU I

	Peptides du cytochrome P450 IID6	Test ELISA	Immunoblot
10	Fragment 241-260	-	-
	Peptide de formule II	+	+
	Peptide de formule III	+	+
	Peptide de formule IX	+	+
	Peptide de formule X	+	+
15	Fragment 264-281	-	-
	Fragment 347-367	-	-
	Fragment 359-377	-	-
	Fragment 383-394	-	-
	Fragment 392-417	-	-

20 Le site antigénique majeur localisé entre les aminoacides 239 et 273 a été analysé également en utilisant trois peptides synthétiques qui couvrent la région comprise entre les aminoacides 241 et 281 comme visible sur le Tableau I ci-dessus. L'un des peptides couvrant la
 25 région 254-271 est reconnu par tous les sérums positifs LKM lorsqu'il est testé en ELISA et en immunoblot, tandis que les deux autres peptides ne le sont pas. Dans la mesure où ces trois peptides synthétisés se recoupent, le tripeptide Thr-Trp-Asp représente une partie essentielle
 30 de l'épitope.

d) couplage des peptides issus du cytochrome P450 IID6 avec la sérumalbumine bovine (BSA).

Les différents peptides et notamment les peptides 254-271 (peptide de formule II), 264-281 et 410-429
 35 (peptide de formule X), sont couplés à la BSA par l'intermédiaire de leur groupe NH₂-terminal libre, en utilisant du glutaraldéhyde (voir notamment E. HARLOW et D. LANE, 1988, Antibodies, A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory).

Un certain nombre de peptides (241-260, 383-399, 392-417 et peptide de formule X) portent un résidu cystéine N-terminal supplémentaire qui permet le couplage à la BSA par l'intermédiaire du groupe sulfhydryle de la cystéine, en utilisant un ester de m-maléimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide.

EXEMPLE 2 : Test ELISA.

Les peptides sont redissous dans un tampon PBS, pH 7,4 et dilués pour obtenir des concentrations de 0,1, 0,2, 0,5 et 1 µg/ml ; 100 µl par puits de chaque solution de peptide est incubé une nuit dans des plaques de microtitration, contenant 96 puits (Immulon 2, Dynatech, Poly-Labo, Paris - FRANCE). L'analyse ELISA est alors réalisée comme décrit dans GUEGUEN M. et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun., 1989, 159, 542), en utilisant les différents sérums humains décrits ci-dessus. Les premiers anticorps sont testés aux dilutions allant de 1/100 à 1/12 800. L'anticorps IgG anti-humain de chèvre conjugué avec la phosphatase alcaline est utilisé comme second anticorps, à une dilution de 1/1000. Le test est développé en ajoutant 100 µl de p-nitrophénylphosphate à une concentration de 1 mg/ml, dans un tampon NaCO₃ 0,05 M, pH 9,8 et MgCl₂ 0,001 M. Les résultats lus après 30 minutes d'incubation à température ambiante sont considérés positifs lorsqu'ils sont supérieurs d'un facteur 2 par rapport au sérum contrôle.

La figure 3 qui comprend en abscisse les dilutions et en ordonnée les densités optiques, illustre un test ELISA réalisé sur des sérums de 10 malades (courbes 1 à 10), avec comme antigène un peptide comprenant au moins un fragment de la séquence 239-273 (peptides de formules I, II, III ou IV) ; la courbe -x- correspond à la limite supérieure de la normale.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui vien-

nent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente
5 invention.

REVENDICATIONS

1') Fragment peptidique du cytochrome P450 humain, caractérisé en ce qu'il contient au moins un épi-
tope immunodominant du cytochrome P450 IID6, en ce qu'il
5 est constitué par une séquence en aminoacides qui com-
prend entre 3 et 70 aminoacides et en ce qu'il se lie
spécifiquement avec les auto-anticorps anti-LKM produits
lors de l'hépatite auto-immune.

2') Fragment peptidique selon la revendication
10 1, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment
de la séquence du cytochrome P450 IID6 compris entre
l'acide aminé 239 et l'acide aminé 278.

3') Fragment selon la revendication 2, carac-
térisé en ce qu'il est constitué de 39 aminoacides, dont
15 la séquence présente la formule I suivante :

Lys-Val-Leu-Arg-Phe-Gln-Lys-Ala-Phe-Leu-Thr-Gln-Leu-Asp-
Glu-Leu-Leu-Thr-Glu-His-Arg-Met-Thr-Trp-Asp-Pro-Ala-Gln-
Pro-Pro-Arg-Asp-Leu-Thr-Glu-Ala-Phe-Leu-Ala (I),
laquelle séquence correspond aux aminoacides 239-278 du
20 cytochrome P450 IID6 humain.

4') Fragment peptidique selon la revendication
2, caractérisé en ce qu'il est constitué de 18 amino-
acides, dont la séquence présente la formule II sui-
vante :

25 Leu-Leu-Thr-Glu-His-Arg-Met-Thr-Trp-Asp-Pro-Ala-Gln-Pro-
Pro-Arg-Asp-Leu (II),
laquelle séquence correspond aux aminoacides 254-271 du
cytochrome P450 IID6 humain.

5') Fragment peptidique selon la revendication
30 2, caractérisé en ce qu'il est constitué de 13 amino-
acides, dont la séquence présente la formule III sui-
vante :

Glu-His-Arg-Met-Thr-Trp-Asp-Pro-Ala-Gln-Pro-Pro-Arg
(III),

35 laquelle séquence correspond aux aminoacides 257-269 du
cytochrome P450 IID6.

6') Fragment peptidique selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est constitué de trois aminoacides dont la séquence présente la formule IV suivante :

Thr-Trp-Asp (IV),

5 laquelle séquence correspond aux aminoacides 261, 262, et 263 du cytochrome P450 IID6 humain.

7') Fragment peptidique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment de la séquence du cytochrome P450 IID6 compris entre

10 l'acide aminé 282 et l'acide aminé 351.

8') Fragment peptidique selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est constitué de 70 aminoacides, dont la séquence présente la formule V suivante :

Ala-Lys-Gly-Asn-Pro-Glu-Ser-Ser-Phe-Asn-Asp-Glu-Asn-Leu-
15 Arg-Ile-Val-Val-Ala-Asp-Leu-Phe-Ser-Ala-Gly-Met-Val-Thr-
Thr-Ser-Thr-Thr-Leu-Ala-Trp-Gly-Leu-Leu-Leu-Met-Ile-Leu-
His-Pro-Asp-Val-Gln-Arg-Arg-Val-Gln-Gln-Glu-Ile-Asp-Asp-
Val-Ile-Gly-Gln-Val-Arg-Arg-Pro-Glu-Met-Gly-Asp-Gln-Ala.

(V),

20 laquelle séquence correspond aux aminoacides 282-371 du cytochrome P450 IID6 humain ;

9') Fragment peptidique selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est constitué de 13 aminoacides, dont la séquence présente la formule VI sui-

25 vante :

Ala-Lys-Gly-Asn-Pro-Glu-Ser-Ser-Phe-Asn-Asp-Glu-Asn

(VI),

laquelle séquence correspond aux aminoacides 282-294 du cytochrome P450 IID6.

30 10') Fragment peptidique selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est constitué de 43 aminoacides, dont la séquence présente la formule VII suivante :

Met-Val-Thr-Thr-Ser-Thr-Thr-Leu-Ala-Trp-Gly-Leu-Leu-Leu-
35 Met-Ile-Leu-His-Pro-Asp-Val-Gln-Arg-Arg-Val-Gln-Gln-Glu-
Ile-Asp-Asp-Val-Ile-Gly-Gln-Val-Arg-Arg-Pro-Glu-Met-Gly-

Asp (VII),
laquelle séquence correspond aux aminoacides 307 et 349
du cytochrome P450 IID6.

11') Fragment peptidique selon la revendica-
tion 1, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un
fragment de la séquence du cytochrome P450 IID6 compris
entre l'acide aminé 349 et l'acide aminé 389.

12') Fragment peptidique selon la revendica-
tion 11, caractérisé en ce qu'il est constitué de 41
aminoacides, dont la séquence présente la formule VIII
suivante :

Asp-Gln-Ala-His-Met-Pro-Tyr-Thr-Thr-Ala-Val-Ile-His-Glu-
Val-Gln-Arg-Phe-Gly-Asp-Ile-Val-Pro-Leu-Gly-Met-Thr-His-
Met-Thr-Ser-Arg-Asp-Ile-Gly-Val-Gln-Gly-Phe-Arg-Ile

(VIII),
laquelle séquence correspond aux aminoacides 349-389 du
cytochrome P450 IID6 humain.

13') Fragment peptidique selon la revendica-
tion 11, caractérisé en ce qu'il est constitué de 17
aminoacides, dont la séquence présente la formule IX sui-
vante :

Gly-Met-Thr-His-Met-Thr-Ser-Arg-Asp-Ile-Gly-Val-Gln-Gly-
Phe-Arg-Ile (IX),

laquelle séquence correspond aux aminoacides 373-389 du
cytochrome P450 IID6 humain.

14') Fragment peptidique selon la revendica-
tion 1, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un
fragment de la séquence du cytochrome P450 IID6 compris
entre l'acide aminé 410 et l'acide aminé 429.

15') Fragment peptidique selon la revendica-
tion 14, caractérisé en ce qu'il est constitué de 20
aminoacides, dont la séquence de formule X suivante :

Glu-Lys-Pro-Tyr-Pro-Glu-His-Phe-Leu-Asp-Ala-Gln-Gly-His-
Phe-Val-Lys-Pro-Glu-Ala (X),

laquelle séquence correspond aux aminoacides 410-429 du
cytochrome P450 IID6 humain.

16') Anticorps anti-cytochrome P450 humain, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des anticorps anti-fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 15.

5 17') Anticorps selon la revendication 16, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des anticorps polyclonaux et en ce qu'ils sont obtenus par immunisation d'un mammifère approprié, notamment le lapin avec un peptide selon l'une quelconque des revendications
10 1 à 15, éventuellement couplé à une protéine convenable, telle que la BSA (sérumalbumine bovine) ou la KLH (keyhole limpet hemocyanin).

18') Anticorps selon la revendication 16, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des anti-
15 corps monoclonaux spécifiques d'un fragment peptidique issu du cytochrome P450 IID6 humain selon l'une quelconque des revendications 1 à 15.

19') Anticorps selon la revendication 18, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par fusion de
20 cellules spléniques de souris immunisées par un antigène constitué par un fragment peptidique de cytochrome P450 IID6 selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, éventuellement couplé à une protéine convenable telle que la BSA ou la KLH, avec des cellules myélomateuses appro-
25 priées.

20') Réactif immunologique, utilisable pour la détection, le diagnostic et le suivi de l'hépatite auto-immune, caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe qui comprend les fragments peptidiques selon l'une quel-
30 conque des revendications 1 à 15 et les anticorps anti-peptides selon l'une quelconque des revendications 16 à 19 ou un fragment de ceux-ci.

21') Procédé de détection et/ou de diagnostic de l'hépatite auto-immune, caractérisé en ce qu'il
35 consiste à détecter les auto-anticorps éventuellement présents dans un fluide biologique tel que le sang, en

mettant en présence ledit fluide biologique avec au moins un réactif immunologique approprié selon la revendication 20, auquel se lient les auto-anticorps anti-LKM, si de tels anticorps sont présents dans l'échantillon biologique à contrôler, la lecture du résultat étant révélée
5 par un moyen approprié, notamment RIA, EIA ou cytométrie de flux.

22') Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que ledit fluide biologique est mis en
10 contact avec au moins trois peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 15.

23') Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que le premier peptide comprend un fragment peptidique choisi dans le groupe constitué par les
15 fragments de formules I, II, III ou IV ; le deuxième peptide comprend un fragment peptidique de formule IX et le troisième peptide comprend un fragment peptidique de formule X.

24') Agents à visée thérapeutique et/ou préventive, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par, ou comprennent en tant que constituant actif, un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 15 et/ou ses fragments, seul ou conjugué ou recombiné ou associé à d'autres substances.

25 25') Agents à visée thérapeutique et/ou préventive, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par, ou comprennent en tant que constituant actif, des anticorps antipeptides selon l'une quelconque des revendications 16 à 19, et/ou leurs fragments, seuls ou conjugués
30 ou recombinés ou associés avec d'autres substances.

26') Kit ou trousse de diagnostic pour la détection, le diagnostic ou le suivi de l'hépatite auto-immune, caractérisé en ce qu'il comprend :

- un support solide approprié convenablement
35 revêtu d'au moins un ligand choisi dans le groupe qui comprend les peptides selon l'une quelconque des revendi-

cations 1 à 15, les anticorps selon l'une quelconque des revendications 16 à 19, les fragments $F(ab)'_2$ et les fragments $F(ab)'$ desdits anticorps ;

- au moins un flacon contenant des conjugués
- 5 choisis dans le groupe qui comprend les conjugués enzyme appropriée-anticorps anti-Ig humains appropriés, les conjugués enzyme appropriée-anticorps anti-fragment F_c des Ig humaines et les conjugués enzyme appropriée-anticorps anti-peptides selon l'une quelconque des
- 10 revendications 16 à 19 ;

- des quantités ou doses appropriées d'une substance de révélation appropriée.

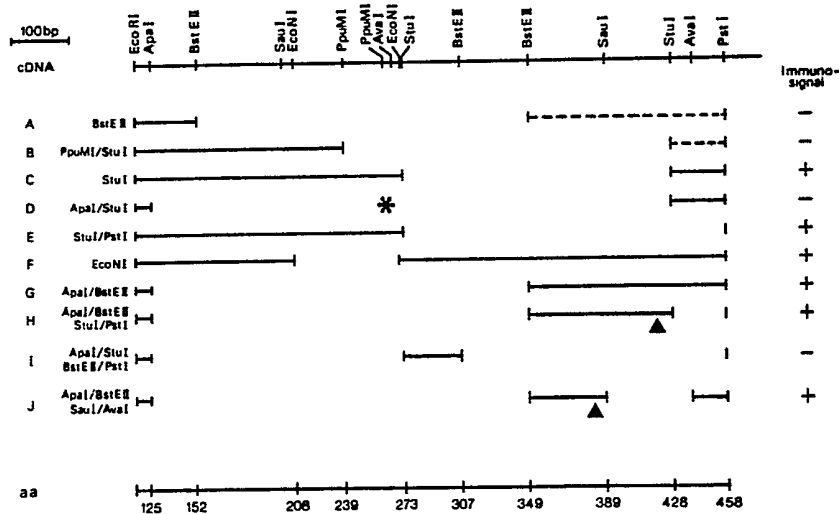
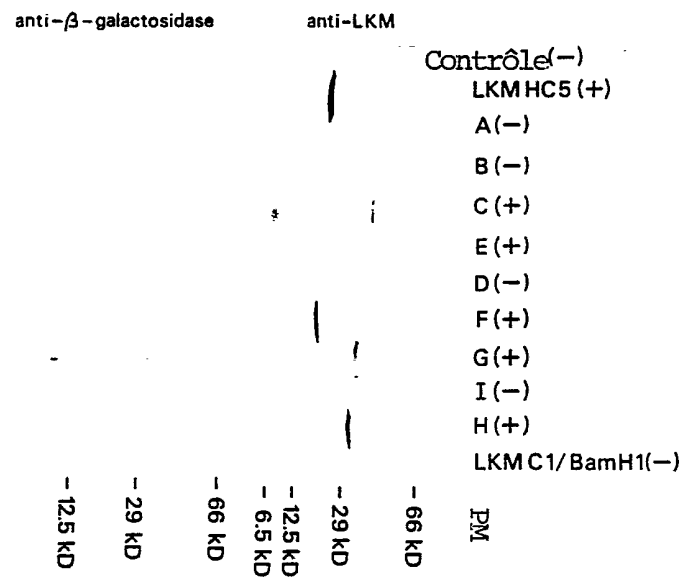


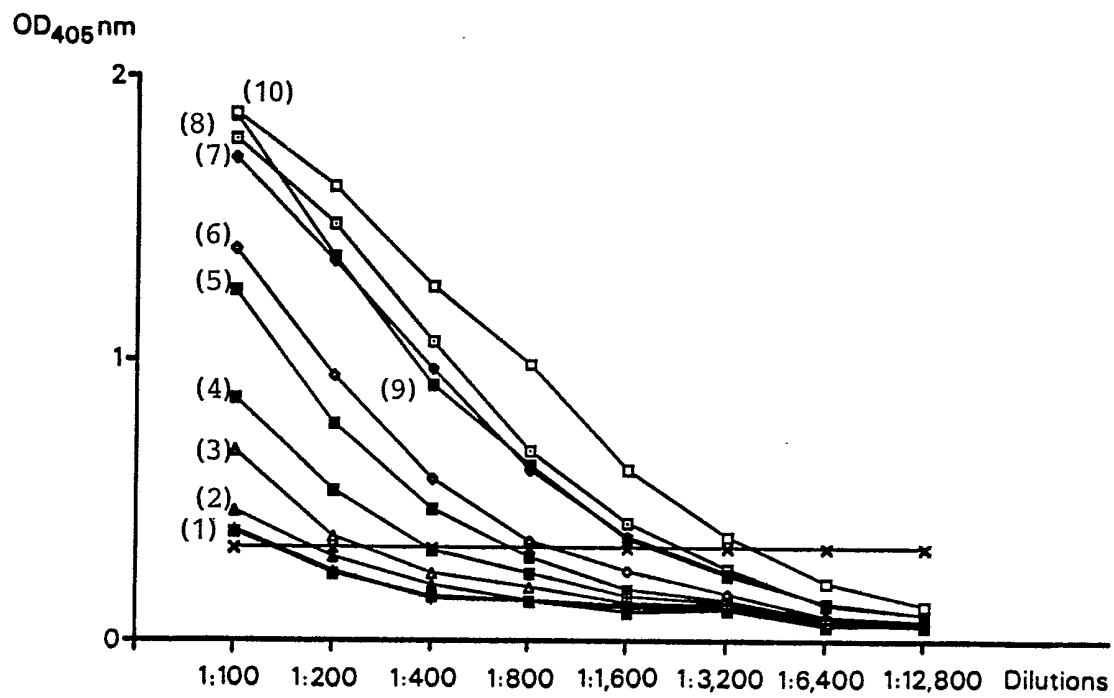
FIGURE 1



Analyse immunoblot des protéines
de fusion P450 IID6/ β -gal

FIGURE 2

2/2

FIGURE 3

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9107363
FA 457667

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 85, Novembre 1988, WASHINGTON US pages 8256 - 8260; U.R. ZANGER ET AL: 'Antibodies against human cytochrome P-450db1 in autoimmune hepatitis type II' * page 8257, colonne de droite * * page 8259, colonne de gauche, ligne 26 - colonne de droite, ligne 16 * ---	1, 16-18
D,A	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. vol. 159, no. 2, 15 Mars 1989, DULUTH, MINNESOTA US pages 542 - 547; M. GUEGUEN ET AL: 'Anti-liver kidney microsome antibody type I recognizes human cytochrome P450 db1' * abrégé * * page 545 * * page 546, ligne 25 - ligne 35 * -----	20-26
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C12N C07K C12P
Date d'achèvement de la recherche 12 FEVRIER 1992		Examineur LE CORNEC N. D. R.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		