

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 650 185

②1 N° d'enregistrement national :

89 10015

⑤1 Int Cl⁹ : A 61 K 39/395.

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 25 juillet 1989.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 5 du 1^{er} février 1991.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

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

⑦2 Inventeur(s) : John Mac Gregor ; Sophie Parmentier ;
Bruno Catimel ; Habib Boukerche ; Brigitte Mac Gregor ;
Lilian Mac Gregor.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : S.C. Ernest Gutmann-Yves Plasseraud.

⑤4 Anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine GMP140, leur production et leurs applications.

⑤7 L'invention concerne des anticorps monoclonaux ou leurs fragments idiotypiques, dirigés contre la glycoprotéine GMP 140 présente sur les plaquettes ou relâchée par ces plaquettes à la suite d'un traitement par un agoniste tel que l'ADP, la thrombine ou le collagène et/ou présente sur des cellules endothéliales à la suite d'un traitement avec un agoniste tel que l'ADP, la thrombine ou le collagène ou un agent inducteur caractérisés en ce que après couplage à la protéine A liée de façon covalente à un support en présence de plaquettes traitées au moyen d'un détergent en présence d'un marqueur radioactif, ils présentent deux bandes de poids moléculaire correspondant aux formes réduites et non réduites de la GMP 140.

FR 2 650 185 - A1

ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGES CONTRE LA GLYCOPROTEINE
GMP140. LEUR PRODUCTION ET LEURS APPLICATIONS.

L'invention concerne des anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine GMP140, leur production et leurs applications.

Les mécanismes de l'adhésion, de l'agrégation et de la sécrétion plaquettaires qui entrent dans les différentes étapes de la physiologie plaquettaire, font intervenir in vivo de nombreuses protéines et glycoprotéines, présentes au niveau des plaquettes, de façon permanente ou transitoire, ou/et présentes au niveau d'autres cellules telles que des cellules endothéliales. Certaines de ces protéines ou glycoprotéines ont été identifiées et des anticorps, notamment des anticorps monoclonaux les reconnaissant, ont été préparés.

En particulier, des anticorps utilisables en tant que marqueurs d'activation plaquettaire pour des tests de diagnostic ont déjà été décrits. Le brevet américain 4 783 330 concerne par exemple des anticorps du type IgG1 qui reconnaissent des plaquettes activées et au contraire ne reconnaissent pas les plaquettes inactivées, les granules azurophiles des monocytes et des granulocytes. De préférence, ces anticorps monoclonaux reconnaissent une glycoprotéine de poids moléculaire voisin de 140 000 Da (gp140) sur des plaquettes humaines activées.

Les inventeurs se sont intéressés à de nouveaux moyens pour la mise au point d'anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine GMP140. Ils sont ainsi parvenus à préparer de nouveaux anticorps monoclonaux dont certains présentent des propriétés particulièrement intéressantes.

L'invention concerne donc ces nouveaux anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine GMP140.

La GMP140 a été décrite par McEver et al dans Cell (vol 56 - 1033.1044, 24 Mars 1989).

L'invention concerne en outre, la préparation et la sélection de ces anticorps monoclonaux ainsi que leur utilisation pour le diagnostic et/ou comme agent thérapeutique. Certains de ces anticorps peuvent être appliqués au traitement de pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose, les rétinopathies, le diabète.

Les anticorps monoclonaux de l'invention sont dirigés contre la glycoprotéine GMP140 présente sur les plaquettes ou relachée par ces plaquettes à la suite d'un traitement par un agoniste tel que l'ADP, la thrombine ou le collagène et/ou présente sur des cellules endothéliales à la suite d'un traitement avec un agoniste tel que l'ADP, la thrombine ou le collagène ou un agent inducteur caractérisés en ce que après couplage à la protéine A liée de façon covalente à un support et en présence de plaquettes traitées au moyen d'un détergent en présence d'un marqueur radioactif, ils présentent deux bandes de poids moléculaire correspondant aux formes réduites et non réduites de la GMP140.

L'invention vise également les fragments idiotypiques de ces anticorps monoclonaux. Ces fragments sont des fragments Fab, Fab', F(ab')₂ préparés selon les méthodes classiques, notamment par digestion enzymatique par exemple avec la pepsine ou la papaïne, selon le résultat recherché.

Une première catégorie d'anticorps monoclonaux entrant dans le cadre des définitions ci-dessus est constituée par des anticorps ayant la capacité

d'interférer avec les fonctions plaquettaires décrites précédemment.

Un anticorps particulièrement avantageux appartenant à cette catégorie est l'anticorps LYP20 (encore désigné par P20).

L'interférence entre l'activité physiologique plaquettaire ou avec l'activité des cellules endothéliales dans le cadre des pathologies thrombotiques correspond, dans le cadre des définitions de l'invention, à une inhibition partielle de certaines fonctions telles que les réactions d'adhésion, d'agrégation ou de sécrétion ou de plusieurs de ces réactions, qui ont lieu à la suite de stimulation provenant par exemple de lésions au niveau de l'endothélium vasculaire ou encore à une inhibition de réactions au niveau des cellules endothéliales. Cette limitation doit être telle que l'action des anticorps choisis ou de leurs fragments, éventuellement en combinaison avec d'autres substances, prévient la formation d'un thrombus.

Les propriétés de modulation des anticorps selon l'invention peuvent varier avec la nature de l'anticorps et l'antigène reconnu.

Il en résulte que ces anticorps peuvent être utilisés dans le traitement de pathologies telles que celles citées précédemment, sans présenter le désavantage de bloquer de manière excessive les processus physiologiques plaquettaires, ce qui risquerait d'entraîner des phénomènes hémorragiques.

Selon un aspect particulier de l'invention, des anticorps particuliers ou leurs fragments idiotypiques, entrant dans la première catégorie ci-dessus définie, sont encore caractérisés en ce qu'ils reconnaissent un épitope ayant un effet fonctionnel

vis à vis des fonctions normalement exercées par l'antigène qui le contient.

Selon un autre aspect préféré de l'invention, certains de ces anticorps monoclonaux sont sensibles à la réduction de l'antigène qu'ils reconnaissent. Au titre ils sont inactivés lorsque l'antigène reconnu est réduit.

L'effet fonctionnel de l'épitope vis à vis de l'antigène qui le contient indique que cet antigène ne peut exercer ses fonctions dans la physiologie plaquettaire si l'épitope n'est pas présent ou s'il est inactivé.

Une autre catégorie d'anticorps répondant aux définitions de l'invention, est représentée par l'anticorps LYP21.

Les anticorps appartenant à cette deuxième catégorie sont encore caractérisés par leur capacité à reconnaître un épitope de la GMP140 des plaquettes, après solubilisation de ces plaquettes dans un détergent ou encore à reconnaître la partie hydrosoluble de la GMP140 lorsqu'elle est secrétée par les cellules endothéliales.

L'invention concerne également un mélange d'anticorps monoclonaux ou de fragments idiotypiques de ces anticorps ou encore un mélange d'anticorps et de fragments, caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux anticorps ou fragments différents décrits précédemment.

Un mélange particulièrement préféré est un mélange comprenant les anticorps LYP20 et LYP21 et/ou leurs fragments idiotypiques.

L'invention vise par ailleurs des anticorps monoclonaux ou leurs fragments idiotypiques tels qu'ils ont été décrits plus haut caractérisés en ce qu'ils sont marqués, le marquage étant de préférence

réalisé avec une substance radioactive, notamment un radioélément halogénique ou métallique, par exemple ^{131}I , ^{111}In ou ^{99}Tc , ou par une substance fluorescente.

La substance de marquage doit être choisie en fonction de l'utilisation souhaitée des anticorps, in vitro ou in vivo. Dans le cas où ces anticorps sont utilisés in vivo, la substance choisie doit être physiologiquement acceptable pour l'homme.

Différents protocoles de marquage pourront être utilisés, en fonction du marqueur choisi. On aura par exemple recours à la technique décrite par Mason D.W et al (1980) Biochem J 1987, 1-9 et l'utilisation après marquage peut être faite par référence aux techniques de Mc Gregor JL et al (1986) Eur J Biochem 159, 443-449.

L'invention concerne à cet égard un procédé pour le marquage d'anticorps ou de leurs fragments tels qu'ils ont été définis précédemment, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- mise en contact de l'anticorps ou de ses fragments que l'on souhaite marquer, avec un marqueur déterminé, par exemple un radioélément, dans des conditions permettant le couplage du marqueur et de l'anticorps,

- le cas échéant purification par exemple par filtration sur gel, pour éliminer les composants n'ayant pas réagi.

Si le marquage est réalisé de façon indirecte on aura recours aux agents chélatants connus pour complexer le marqueur et réaliser le couplage avec l'anticorps ou les fragments. Des agents chélatants utilisables sont par exemple les acides polyaminocarboxyliques, notamment le DTPA (acide diéthylène triamine pentaacétique), le pyrophosphate ou d'autres.

Entre également dans le cadre de l'invention, l'épitope reconnu par les anticorps monoclonaux définis précédemment ou encore reconnu par les fragments idiotypiques de ces anticorps cet épitope étant présent au niveau de la GMP140, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un épitope conformationnel, nécessaire à l'activité dans les réactions ci-dessus de l'antigène qui le contient.

Un épitope particulier de l'invention est un épitope sensible à la réduction de l'antigène qui le contient.

L'invention concerne de façon plus spécifique les épitopes distincts reconnus par chacun des anticorps LYP20 et LYP21.

Les épitopes reconnus par les différents anticorps ou fragments idiotypiques de ces anticorps sont encore caractérisés par le procédé d'obtention décrit ci-après

Un premier protocole pour les caractériser comprend :

- la dégradation protéolytique de la glycoprotéine supposée contenir l'épitope,
- la localisation du déterminant de l'anticorps monoclonal par SDS PAGE et Western blot, à partir de petits fragments de glycoprotéine,
- l'obtention de la séquence d'acides aminés du (des) fragment(s) reconnu(s) par l'anticorps monoclonal,
- la production de peptides se chevauchant,
- la sélection du ou des peptide (s) capables d'inhiber la liaison de l'anticorps avec son récepteur lors d'un test de réaction d'inhibition mettant en oeuvre l'anticorps monoclonal et la glycoprotéine purifiée ou les plaquettes lavées.

Cette technique peut être mise en oeuvre par référence aux publications de Foster P.A et al (1988) J Biol Chem 263, 5230-5234 et Geysen MH et al Ciba Foundation Symposium 119, 130-149.

Un autre protocole pouvant être mis en oeuvre comporte :

- l'utilisation d'anticorps monoclonaux ayant un effet inhibiteur et capables de se livrer en Western blot,

- l'isolement du gène complet de glycoprotéine à partir d'une banque de cDNA gt11 d'une lignée cellulaire exprimant l'antigène reconnu par l'anticorps,

- le séquençage du gène,

- l'isolement de cDNA de différentes tailles, reconnus par l'anticorps monoclonal,

- la détermination, à partir du cDNA isolé, du déterminant de l'anticorps monoclonal selon un procédé conforme au premier protocole.

Ce protocole peut être réalisé par référence à la publication Bahou WF et al (1989) J Clin Invest 84, 56-61.

L'invention vise également une composition pour le diagnostic de l'activation plaquettaire chez un sujet susceptible de présenter une pathologie associée à des troubles de la physiologie plaquettaire en particulier pour mettre en évidence une thrombopathie, caractérisée en ce qu'elle comprend des anticorps ou leurs fragments idiotypiques tels qu'ils ont été définis ci-dessus, en particulier des anticorps LYP20, ou encore leurs fragments idiotypiques. Pour les besoins de la détection, ces anticorps ou fragments d'anticorps sont marqués.

D'autres compositions pour le diagnostic de l'activation plaquettaire, répondant aux définitions

ci-dessus, sont des compositions caractérisées en ce qu'elles comprennent en outre des anticorps monoclonaux ou leurs fragments idiotypiques dirigés contre la thrombospondine et de préférence des anticorps du type LYP9 ou/et LYP11.

Les anticorps LYP9 et LYP11 sont des anticorps dirigés contre la thrombospondine obtenus par une méthode telle que celle décrite dans la publication de Clezardin et al (Eur J Biochem. 154, 95-102 (1986)).

Les compositions pour la diagnostic décrites ci-dessus peuvent d'être utilisées pour détecter in vitro dans un échantillon biologique tel que le sang, la présence d'antigène plaquettaire significative d'un état de thrombose.

Ces compositions sont également utilisables pour le diagnostic in vivo, lorsque les anticorps monoclonaux ou leurs fragments ont préalablement été marqués avec une substance physiologiquement acceptable pour l'homme dans des conditions permettant leur détection avec des appareils adaptés et en particulier grâce aux méthodes de gamma-scintigraphie et de RNM.

Un autre avantage des compositions pour le diagnostic précédemment décrites est de permettre un diagnostic sélectif de la présence de la GMP140 caractéristique d'étapes déterminées de la physiologie plaquettaire.

Une autre application des anticorps de l'invention et de façon préférée des anticorps de type LYP21 est la purification de la glycoprotéine GMP140.

L'invention vise également des compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins un anticorps monoclonal ou ses fragments idiotypes, tels que décrits précédemment, lesdits anticorps ou fragments étant choisis parmi

ceux qui ont la capacité d'interférer avec les fonctions plaquettaires, en combinaison avec un véhicule pharmaceutique acceptable.

Une telle composition pharmaceutique comprend lesdits anticorps ou/et fragments idiotypiques en une dose suffisante pour produire l'interaction avec l'activité plaquettaire recherchée.

Elle est administrée selon une posologie déterminée en fonction du degré d'inhibition des fonctions plaquettaires recherché.

Selon un mode de réalisation avantageux des compositions pharmaceutiques de l'invention, les anticorps ou leurs fragments sont combinés à une substance thrombolytique, par exemple une enzyme thrombolytique. A titre d'exemple des enzymes thrombolytiques telles que le tPa, la streptokinase ou l'urokinase peuvent être couplées aux anticorps monoclonaux ou à leurs fragments.

Pour effectuer le couplage, on aura recours aux méthodes classiques telles que celle décrite par Bode et al (1985) Science 229, 765.

On peut également avoir recours à des procédés connus en soi, tels que celui décrit par FRANTZ et ROBERTSON dans Infect and Immunity 33 193-198 (1981) ou celui décrit dans Applied and Environmental Microbiology (Oct 81) vol. 42, n° 4 611-614 par P-E. KAUFFMAN.

Dans la pratique, on utilisera avantageusement comme agent de couplage les composés suivants, cités à titre non limitatif : aldéhyde glutarique, chloroformiate d'éthyle, carbodiimides hydrosolubles [N-éthyl-N'(3-diméthylamino-propyl) carbodiimide, HCl], diisocyanates, bis-diazobenzidine, di- et trichloro-s-triazines, bromures de cyanogène, benzoquinone, ainsi que les agents de couplage

mentionnés dans Scand. J. Immunol., 1978, vol. 8, p. 7-23 (AVRAMEAS, TERNYNCK, GUESDON).

Une autre combinaison des substances thrombolytiques avec les anticorps ou leurs fragments peut être réalisée par remplacement d'une partie des anticorps monoclonaux ou des fragments idiotypiques de ces anticorps par ladite substance.

Selon un mode de réalisation particulièrement préféré des compositions pharmaceutiques de l'invention comprennent des anticorps LYP21 ou leurs fragments idiotypiques.

Une utilisation des compositions pharmaceutiques comprenant les anticorps de l'invention ou leurs fragments peut être le traitement de maladies cardiovasculaires.

L'invention concerne également l'utilisation des anticorps ayant la capacité d'interagir avec la physiologie plaquettaire pour la fabrication d'un médicament pour le traitement des pathologies liées à des troubles de la physiologie plaquettaire.

L'invention vise également un procédé pour la préparation d'anticorps monoclonaux ou de leurs fragments idiotypiques, dirigés contre la glycoprotéine GMP140, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes

a/ fusion de cellules spléniques de souris avec des cellules myélomateuses, lesdites souris étant préalablement immunisées avec un antigène déterminé, les cellules spléniques étant en excès par rapport aux cellules myélomateuses, en présence d'un promoteur de fusion, par exemple le PEG,

b/ culture des hybridomes formés par la fusion,

c/ clonage et sous-clonage des hybridomes producteurs des anticorps recherchés.

Pour la production des anticorps LYP20 on utilise à titre d'antigène, des plaquettes de sang humain traitées à la chymotrypsine. Dans ce cas, les cellules myélomateuses utilisées pour la fusion des cellules Sp2/O-Ag14.

Pour la préparation des anticorps LYP21 on utilise un mélange des antigènes GMP140, glycoprotéine Ia, Ic, IIa, GP110-115 pour immuniser les souris. Dans ce cas les cellules myélomateuses utilisées pour la fusion sont des cellules P3 x 63 Ag 8.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans les figures et les exemples qui suivent :

Figure 1 :

Profile d'élution des extraits plaquettaires traités au Lubrol obtenus à partir d'une colonne Q de Sepharose à flux rapide sur FPLC.

La fraction éluée de la colonne de Sepharose WGA a été dialysé contre 0,1 % de Lubrol dans un tampon Tris. Le pic 1 a été élué à 0,15 M NaCl, le pic 2 à 0,25M NaCl et le pic 3 à 0,32M NaCl.

Figure 2 :

Comparaison des données obtenues en SDS-PAGE de GPIIb-IIIa, de l'antigène de S12 et P20.

Des lysats de plaquettes marquées avec I^{125} ont été incubés avec des IgG non-immunes (lignes 1, 5), P20 (lignes 2, 6), avec S12 (lignes 3, 7) et avec un anticorps anti-GPIIb-IIIa (lignes 4, 8). Des échantillons ont été dénaturés dans des conditions non-réductrices (lignes 1, 2, 3, 4) et réductrices (lignes 5, 6, 7, 8), placés sur un gradient SDS-PAGE 5-15 % et autoradiographiés. La ligne 9 montre le lysat total marqué non-réduit.

Figure 3 :

Liaison d'anticorps monoclonal P20 à des plaquettes non-stimulées et stimulées.

Des plaquettes lavées à une concentration de 10^8 /ml ont été incubées pendant 30 minutes à 25°C dans une solution complète de Tyrode avec différentes concentrations (0,1-4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de P20 marqué avec I^{125} . Les plaquettes lavées ont permis de montrer une liaison accrue de P20 marqué avec I^{125} après stimulation par 1U/ml d'alpha-thrombine.

Figure 4 :

Comparaison du nombre d'anticorps P20 marqués avec I^{125} et des constantes K_d pour des plaquettes non-stimulées et des plaquettes stimulées avec la thrombine.

Des plaquettes non-stimulées ont accroché $2,400 \pm 266$ anticorps P20 marqués, par plaquette ($K_d = 2,3\text{nM} \pm 0,54$). Les plaquettes stimulées à la thrombine ont permis d'accrocher 12200 ± 1184 anticorps P20 marqués, par plaquette ($K_d = 5,0\text{nM} \pm 0,61$). Une analyse Scatchard des données d'accrochage des plaquettes de 4 donneurs a été utilisée.

Figure 5 :

Effet de P20 sur l'adhésion plaquettaire.

L'effet de P20 sur l'adhésion des plaquettes marquées avec Cr^{51} au niveau des puits de microtitration recouverts avec de la fibronectine (FN), du fibrinogène (FG) et du collagène a été testé. Les plaquettes ont été incubées avec 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de P20 pendant 30 minutes à 37°C avant incubation dans les puits recouverts. Des contrôles négatifs ont été réalisés en utilisant des puits recouverts avec BSA et le nombre de plaquettes accrochées a été comparé avec

celui obtenu pour de puits recouverts avec FN, FG et du collagène.

Figure 6 :

Effet de P20 sur l'agrégation plaquettaire

L'anticorps monoclonal P20 (50 µg/ml) inhibe partiellement (60 %) l'agrégation induite par 2,5 µM d'ADP, une dose de 40 µg/ml inhibe l'agrégation induite par 2µg/ml de collagène (63 % d'inhibition). P20 (90 µg/ml) inhibe également (50 %) l'agrégation induite par 0,016 U/ml de thrombine.

EXEMPLE 1

- Isolement et caractérisation de glycoprotéines de plaquettes par chromatographie FPLC suivie d'un séquençage en phase gazeuse.

Dans cette expérience on a isolé des glycoprotéines présentes en faible quantité à la surface des plaquettes. Pour cela on a utilisé la chromatographie rapide en phase liquide (FPLC) ainsi que le séquençage en phase gazeuse permettant de procéder à l'étude de la structure, des caractères immunologiques et fonctionnels des glycoprotéines présentes sur les plaquettes, en faible quantité.

Les membranes plaquettaires solubilisées dans du sodium déoxycholate ont été appliquées sur une colonne de germe de blé (WGA) et de lectine (Lens Culinaris LCH) montée séquentiellement avec une chromatographie FPLC. Les glycoprotéines éluées des colonnes de lectine dans un détergent non ionique ont ensuite été séparées sur une colonne échangeuse d'anions (Mono-Q). Les pics élués à partir de la colonne Mono-Q à différentes concentrations de NaCl ont été soumis à des électrophorèses en une et deux dimensions sur des gels de polyacrylamide SDS et analysés en Western blot

sur des membranes Immobilon PVDF. Les glycoprotéines présentes sur les membranes Immobilon ont été directement séquencées en utilisant un séquenceur automatique en phase gazeuse. La colonne WGA a permis de lier un mélange d'antigènes comprenant la gpIb, la gpIIIb (ou gpIV) la gpIIb-IIIa en plus d'un certain nombre de protéines telles que gp150/155 (poids moléculaire non réduit/réduit) gp150/130, gp130/135, gp128/132 et gp115/120. Ces glycoprotéines séparées par FPLC ont ensuite pu être identifiées en utilisant un anticorps monoclonal (AcM) ou des anticorps polyclonaux. La gp128/132 a été identifiée comme correspondant à la GMP140 ou PADGEM par un anticorps monoclonal LYP21. La gp150/155 et la gp132/135 ont été identifiées sous forme de complexe GPIa-IIa par un anticorps monoclonal LYP22. La colonne LCH a permis de lier principalement le complexe GPIIb-IIIa, identifié par un anticorps monoclonal anti-GPIIb-IIIa (LYP4). Les parties N-terminales d'un nombre limité de ces glycoprotéines séparées ont été microséquencées en utilisant un séquenceur en phase gazeuse. L'usage combiné de FPLC et du séquençage en phase gazeuse permet un isolement rapide et une caractérisation des glycoprotéines plaquettaires. Par ailleurs, l'identification des séquences d'acides aminés N-terminales permet la synthèse de sondes oligonucléotidiques pour cribler et isoler différents clones cDNA de glycoprotéines à partir de banques de données.

Matériels et méthodes

Préparation des membranes :

Des concentrés de plaquettes humaines ont été obtenus au centre de transfusion sanguine de Beynost. Les membranes plaquettaires ont été préparées selon la

méthode décrite par Cooper et al (1979, Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 1069-11073), en utilisant 10 unités de concentré de plaquettes humaines (50.10/unité). Les globules rouges sédimentés ont été séparés des plaquettes par centrifugation à 160g pendant 25 minutes à 25°C. Les plaquettes ont été isolées et lavées en utilisant la méthode de Massini et al modifiée par Mc Gregor et al, (respectivement 1974, Biochimica and Physica Acta 372: 109-121; 1979, Thromb. Res. 16: 437-452). Les plaquettes lavées ont été resuspendues (5.10/ml) dans 15 mM Tris (Hydroxyméthyl-Aminométhane) -HCL (Boehringer Mannheim, Meylan France) à pH 7,4 avec 5mM EDTA (BDH, Poole, Grande Bretagne) et 1 µM de leupeptine (Boehringer Mannheim). Ces plaquettes ont ensuite été soumises à un appareil à sonication Branson réglé sur le mode discontinu avec un cycle d'opération de 50 % et un niveau d'intensité des ultrasons de 5. Les plaquettes traitées par ultrasons ont été centrifugées à 4°C pendant 20 minutes à 9000g dans un rotor à angle fixe SS34 en utilisant une centrifugeuse Sorvall RC2B (Dupont de Nemours, Newtown, Connecticut, USA). Le surnageant a ensuite été retiré et centrifugé pendant une heure à 4°C à 100 000g dans un rotor à angle variable TST 55.5 en utilisant une centrifugeuse Kontron 2060 (Kontron, Zurich, Suisse). Les membranes sous forme de culot ont été resuspendues dans un tampon contenant 10 mM Tris-HCL à pH 8,2, dans 5 mM EDTA et 1 µM de leupeptine.

Extraction avec le sodium deoxycholate (DOC):

Les membranes plaquettaires ont été traitées pendant 30 minutes à 4°C avec du sodium deoxycholate 1 % (w/w) (Merck, Darmstadt, RFA) dans 10 mM Tris-HCL à pH 8,2 avec 5 mM EDTA et 1 µM de leupeptine. Les

membranes extraites des plaquettes ont été soumises à une ultracentrifugation à 4°C pendant 30 minutes à 100000 g dans un rotor à angle variable TST 55.5 en utilisant une centrifugeuse Kontron 2060. Le surnageant ultracentrifugé a été collecté.

Chromatographie d'affinité sur lectine

Le germe de blé-lectine (WGA) lié au Sepharose 6MB (Pharmacia, Uppsala, Suède) a été placé dans une colonne de verre HR10/10 (100 mm x 10 mm) (Pharmacia). La colonne a ensuite été reliée à un système de chromatographie rapide en phase liquide (FPLC) (Pharmacia). La colonne a été équilibrée dans un tampon de départ contenant 10 mM Tris-HCl à pH 8,2 avec 0,5 % DOC, 5 mM EDTA. Les membranes des plaquettes solubilisées ont été déposées sur la colonne avec un débit de 0,5 ml/mn et la colonne a été lavée avec un tampon de départ jusqu'à l'obtention d'une densité optique égale à la valeur de base. Les glycoprotéines liées à la colonne de WGA ont été éluées avec un sucre, le N-Acetyl Glucosamine 2,5 % (Sigma, Saint Louis, MO, USA). Les pics d'éluion ont été dialysés pendant une nuit contre 10 mM Tris-HCl à pH 7,4 avec 0,1 % de lubrol PX (Sigma).

Chromatographie d'échange d'anions:

Les glycoprotéines éluées à partir de la colonne de lectine et resuspendues dans du lubrol PX ont été placées sur une colonne d'échange d'anions MONO Q HR5/5 (50 mm x 5 mm) (Pharmacia). Le tampon de départ contenait 0,1 % de lubrol PX dans 20 mM Tris-HCl à pH 7,4 et le tampon final était composé de 0,1 % lubrol PX dans Tris-HCl à pH 7,4 contenant 1M de chlorure de sodium (Merck). Un gradient a été établi pendant 25 minutes avec un débit de 1 ml/mn.

Chromatographie d'immunoaffinité :

Les glycoprotéines éluées à partir de la colonne MONO Q ont été identifiées sur des colonnes d'immunoaffinité en utilisant les anticorps monoclonaux LYP21 (dirigés contre la GMP140) et LYP22 (dirigés contre la gpIIa) liés au Sepharose-4B. Ces anticorps ont été obtenus après immunisation de souris avec un mélange de glycoprotéines isolées par affinité sur colonne WGA et chromatographie d'échange d'anions. Les glycoprotéines IIB-IIIa ont été identifiées sur colonne d'immunoaffinité en utilisant l'anticorps monoclonal LYP4 décrit par Mc Gregor et al (1986, Eur. J. Biochem. 159: 443-440).

EXEMPLE 2

- Inhibition des fonctions plaquettaires de plaquettes humaines par un anticorps monoclonal LYP20 dirigé contre une glycoprotéine de membrane dont l'expression dépend de l'activation.

Un nombre limité de glycoprotéines de membrane (Ib, IIB-IIIa, Ia-IIa, Ic-IIa, IIIb) jouent un rôle important dans l'agrégation plaquettaire et l'adhésion. On a utilisé les anticorps monoclonaux LYP20 et LYP21. Les anticorps LYP20 ont été obtenus après immunisation d'une souris BALB/C avec un concentré de plaquettes de sang humain lavées, traitées à la chymotrypsine. Les anticorps monoclonaux LYP21 ont été obtenus avec des glycoprotéines de membrane de plaquettes éluées à partir d'une colonne d'affinité à l'agglutinine de germe de blé. L'immunoprécipitation faisant appel à des lysats plaquettaires marqués en surface, activés à l'aide de thrombine, a montré que LYP20 et LYP21 précipitent une protéine de 128 kDa (non réduite) et 132 kDa (réduite) qui est appelée gp128. Les anticorps LYP20 et LYP21 reconnaissent des épitopes distincts

sur la gp128, le déterminant antigénique de LYP20 étant dépendant de la présence de ponts disulfure intacts. Des plaquettes au repos lavées ont permis de lier 2400 ± 270 molécules par anticorps LYP20 marqué avec l'iode 125 et 12.200 ± 1.184 molécules par anticorps après activation par 1 U/ml de thrombine. Ces données montrent que LYP20 et LYP21 sont dirigés contre une protéine de surface plaquettaire (gp128) dont l'expression dépend de l'activation plaquettaire et de la sécrétion. La gp128 migre conjointement avec l'antigène plaquettaire immunoprécipité par un anticorps dirigé contre la glycoprotéine GMP140 ou PADGEM. Ceci montre que la gp128 est liée ou identique à la GMP140 ou PADGEM. Afin de déterminer le rôle potentiel de la gp128 dans les fonctions plaquettaires, les études concernant l'agrégation avec des plaquettes humaines lavées ont été réalisées. Des fragments F(ab)₂' de LYP20 mais pas de LYP21 inhibent partiellement l'agrégation plaquettaire et la libération induite par 2,5µM d'ADP, 2µg/ml de collagène et 0,016U/ml de thrombine. Ces résultats montrent que :

a/ LYP20 et LYP21 sont dirigés contre des épitopes différents de la protéine de surface plaquettaire (gp128) dont l'expression dépend de l'activation plaquettaire ;

b/ la gp128 est liée ou identique à la GMP140 ou PADGEM ;

c/ la gp128 exposée à la surface de plaquettes activées peut jouer un rôle important dans l'agrégation plaquettaire.

EXEMPLE 3

- Préparation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine GMP 140

- Matériel

L'adénosyldiphosphate (ADP), l'aprotinine, la fibronectine (FN), la lactoperoxidase et la leupeptine, le lubrol WX, la N-acétyl glucosamine, l'orthophényldiamine (OPD), le fluorure de phénylméthylsulphonyle (PMSF), la prostaglandine E1 (PGE1) et le triton X-100 ont été obtenus auprès de Sigma (StLouis, MO, USA). Le ⁵¹ Chrome, l'¹²⁵ Iode et la ¹⁴C sérotonine ont été obtenus chez Amersham International (U.K.). La peroxidase de raifort conjuguée à des anticorps anti-souris de chèvre, la gélatine, le réactif de développement de couleur HRP et le Tween 20 ont été obtenus auprès de BioRad (Richmont, CA, USA). Le sodium deoxycholate (DOC), le dithiothreitol (DTT), la leupeptine et le PMSF ont été obtenus auprès de Merck (Darmstadt, RFA). Le polyethylene Glycol (PEG) et le Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) ont été obtenus auprès de BDH (Poole, U.K.). Le gel à flux rapide Q-sepharose (Q Sepharose fast flow gel (marque déposée)), la protéine A sépharose, l'agglutinine de germe de blé (WGA) et un système complet FPLC ont été obtenus auprès de Pharmacia (Uppsala, Suède). La sérum albumine bovine (BSA) et les anticorps IgG anti-souris de lapin proviennent de Miles Laboratories (Naperville, IL, USA). Le collagène provient de Hormon-Chemie (Munich, RFA). La Thrombine a été obtenue auprès de Hoffman-La Roche (Bâle, Suisse) et l'alpha-thrombine, le fibrinogène (FG) proviennent de IMCO. La pansorbine provient de Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Tous les réactifs de culture cellulaire ont été obtenus auprès des laboratoires Flow (Les Ulis, France) et Intermed (Lyon, France). Le 2,4,6,10 teramethylpentadecane (Pristane) provient de Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI, USA). Les membranes de difluorure de

polyvinylidène (Immobilon) proviennent de Millipore Corporation (Bedford, MA, USA). Le D-phényl-L-propyl-L-arginine chlorométhyl cétone (PPACK) proviennent de Calbiochem-Behring (Paris, France).

- Méthodes

a) *Préparation de Plaquettes et Marquage*

Des concentrés de plaquettes (Centre de Transfusion Sanguine de de Beynost) ont été lavés selon la technique de Massini et al (1974), *Biochim biophys. Acta* 372, 109-121.

Les protéines de surface ont été iodées selon la méthode décrite par Philipps et Al. (1977) *J. Clin. Invest.* 60, 535-545, en utilisant la lactoperoxidase.

Les plaquettes utilisées dans les études de fixation, d'agrégation et d'adhésion proviennent du sang (1 volume ACD : 6 volumes de sang) de volontaires normaux. Les plaquettes ont été isolées et lavées selon la technique de Mustard et Al. (1972) *Br. J. Haematol.* 22, 193-204 avec de légères modifications : 20 ng/ml PGE1 et 10^{-6} M PPACK ont été ajoutés au premier lavage.

b) *Isolement des glycoprotéines de membrane plaquettaire*

Les plaquettes lavées conformément à la méthode de Massini et Al. citée plus haut ont été resuspendues à un niveau de 40×10^9 cellules/ml dans 0,02 M Tris-HCl à pH 8,6, avec 0,005 M EDTA, 1% (w/v) de DOC, 17U/ml d'aprotinine, 1mM de leupeptine. La solubilisation a été réalisée à 4°C sous agitation constante pendant une heure. Le lysat a été centrifugé à 100.000 g pendant une heure à 4°C. Le surnageant a été dilué dans 5 volumes de 0,02 M Tris-HCl à pH 8,6, 1mM EDTA, 0,5% (w/v) DOC (tampon A) et déposé sur une colonne de

sépharose 6B-WGA. La colonne était pré-équilibrée dans le tampon A et couplée à un système de chromatographie rapide en phase liquide (FPLC). La colonne a été lavée à 0,4 ml/minute avec le tampon A jusqu'à ce que le matériel non fixé soit éliminé. La fraction spécifiquement liée a été éluée par 2,5% (w/v) de N-acétyl glucosamine. La fraction collectée a été dialysée pendant une nuit contre un mélange de 0,02 M Tris-HCl à pH 7,4, avec 0,005 M EDTA et 0,1% de Lubrol PX à 4°C. L'échantillon dialysé a été soumis à une chromatographie d'échange d'anions en utilisant une colonne Q à flux rapide, reliée au système FPLC et pré-équilibrée dans 0,02 M Tris-HCl à pH 7,4 contenant 0,1% (w/v) de lubrol WX (tampon B). L'échantillon a été appliqué sur la colonne à un débit de 2 ml par minute et les différentes fractions ont été éluées en utilisant un gradient de NaCl (0 à 1 M) dans le tampon B. Chaque fraction a été collectée, concentrée et analysée par SDS-PAGE en utilisant la technique Laemmli (1970) *Nature* 227, 680-685. La concentration de protéine a été déterminée par la méthode de Lowry (1951) modifiée par Markwell (1978) *Anal. Biochem.* 87.206-210. Pour plus de détails concernant l'isolement des glycoprotéines on pourra se reporter à exemple 1.

c) *Production d'anticorps monoclonaux Production d'anticorps mono*

c.1) Préparation de l'anticorps LYP21

Des souris BALB/c (des femelles de 6 semaines), obtenues chez IFFA CREDO (L'Arbresle, France), ont été immunisées intrapéritonéalement avec 100µg d'un mélange de 4 glycoprotéines (isolées de la façon décrite ci-dessus et correspondant aux glycoprotéines GMP140, Ia, Ic, IIa, GP110-115), avec un volume égal d'adjuvant complet de Freund. Deux semaines plus tard,

100µg de l'antigène ont été injectés aux souris en présence d'adjuvant incomplet de Freund.

On a vérifié que le sérum des souris réagissait vis à vis de l'antigène en utilisant la technique ELISA. A cet égard, on rappelle brièvement la technique : des puits de plastique ont été recouverts avec 100µl d'antigène (mélange de 4 glycoprotéines) dilués à 2µg/ml dans un tampon de bicarbonate (25 mM Na₂CO₃, 25mM NaHCO₃, pH 9,6) laissés pendant 3 heures à 37°C. Les puits ont été lavés et saturés avec 0,5% de BSA dans un tampon Tris (15mM Tris-HCl, pH 7,4, 2mM CaCl₂, 0,05% (w/v) Tween) pendant 30 minutes à température ambiante. Le sérum de souris ou les surnageants d'hybridomes (100µl) ont été incubés dans les puits pendant 1 heure à 37°C. Après 3 lavages dans un tampon Tris, un anticorps anti-souris de chèvre (anticorps secondaire, dilué à 1/3000) conjugué à la peroxidase a été ajouté à chaque puits et soumis à réaction pendant 30 minutes à 37°C. Les puits ont ensuite été lavés une nouvelle fois et remplis avec une solution de 100µl de substrat (4 mg OPD dans 10 ml de 0,1M tampon citrate, à pH 5, avec 0,7 µl de 30%H₂O₂). La réaction a été arrêtée avec 100µl de 4NH₂SO₄, 4N. La densité optique a été mesurée avec un lecteur de plaque.

Quatre semaines après la première injection, les souris immunisées ont subi un rappel avec 100µg de mélange d'antigènes. Les cellules spléniques ont été fusionnées 4 jours plus tard selon la méthode de Kohler et Milstein (1975) *Nature* 256, 177-181, avec des cellules myelomateuses P3X63Ag8 selon un rapport de 10:1, en présence de PEG. Les hybridomes ont été divisés, 24 heures plus tard, sur des plaques à 24 puits, dans un milieu hypoxanthine/aminoptérine/thymidine (HAT) avec des

macrophages du péritoine de souris non immunes de la même souche que les souris immunisées, en tant que cellules nourricières. Les surnageants d'hybridomes ont été criblés en utilisant la technique ELISA décrite plus haut. Des surnageants positifs ont été testés pour leur capacité d'accrochage aux antigènes de surface de membrane plaquettaire marqués, selon le protocole décrit dans la partie "Immunoprécipitation", ainsi que pour leur capacité d'accrochage sur des antigènes de membrane plaquettaire non marqués, transférés sur des membranes Immobilon selon le protocole décrit dans "Immunoblot". Des puits positifs ont été clonés et sous-clonés par dilution limitée et criblés à nouveau en utilisant les mêmes techniques avant la production d'ascites dans les souris BALB/c traitées avec du pristane. Des immunoglobulines monoclonales ont été purifiées par la méthode Ey et al. (1978) *Immunochemistry* 15, 429-436 en utilisant une chromatographie d'affinité sur protéine A-sépharose. Les fragments F(ab')₂ d'un anticorps monoclonal ont été préparés conformément à la technique décrite Lamoyi et al (1986) *Meth in Enzym* vol 121 p 652-663 Acad. Press Inc.

c.2) Préparation de l'anticorps LYP20

L'anticorps monoclonal LYP20 a été obtenu après immunisation de souris BALB/C avec des plaquettes de sang humain traitées à la chymotrypsine et lavées.

Le traitement à la chymotrypsine (0,2 mg/ml/10⁸ plaquettes) a été fait pendant 30 minutes à 37 C. Les plaquettes ont ensuite été lavées. Les plaquettes traitées à la chymotrypsine (1 x 10⁸ plaquettes/100 ml) ont été mélangées avec un volume égal (100 ml) d'adjuvant complet et injectées intrap riton alement à la souris BALB/C. Les souris ont été immunisées 3 fois en 3 semaines avec les plaquettes ainsi traitées. Puis

ces souris ont été laissées au repos pendant un mois avant de subir un rappel avec les plaquettes traitées à la chymotrypsine. Trois jours après les cellules spléniques (de la rate) ont été prélevées et fusionnées avec des cellules Sp2/O-Ag4 selon la technique décrite précédemment pour préparer les anticorps LYP21. Les surnageants de fusion obtenus avec les plaquettes traitées à la chymotrypsine ont été sélectionnés pour leur capacité à inhiber les fonctions plaquettaires. Les cellules spléniques ont été fusionnées avec une lignée cellulaire Sp2/O-Ag14 en présence de PEG selon le protocole décrit pour la préparation des anticorps LYP21.

Immunoprécipitation

L'immunoprécipitation a été réalisée selon la méthode décrite par McEver et al (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 9799-9804. Les plaquettes ont été activées (1U/ml de trombine pendant 10 minutes, suivi par 10^{-6} M PPACK pendant 10 minutes) préalablement à une iodation, solubilisées dans 0,01M Tris-HCl, 0,15M NaCl, 1mM EDTA, contenant 1% de lubrol PX (tampon S) et microcentrifugées. Les surnageants marqués ont été incubés avec soit le surnageant d'hybridomes, soit le fluide d'ascite ou l'anticorps purifié pendant 2 heures à température ambiante, sous agitation constante. 10 μ l d'anticorps purifié anti-souris de lapin, dilué selon un rapport 1/10 dans le tampon S ont été ajoutés à chaque échantillon et placé sur un agitateur à balancier à température ambiante pendant 30 minutes. La protéine A sépharose (10% dans le tampon S) a été incubée (1 volume de lysat pour 2 volumes de protéines A) avec chaque échantillon, sur un agitateur à balancier pendant 30 minutes à température ambiante. Une centrifugation a ensuite été

réalisée à 9.000 g pendant 2 minutes dans une centrifugeuse Eppendorf. Chaque culot de centrifugation a été lavé 4 fois dans le tampon S. Après le dernier lavage, chaque culot a été resuspendu dans 0,4 ml de tampon Laemmli (1970) *Nature* 227, 680-685, puis chauffé à 100°C pendant 5 minutes. Une partie aliquote de chaque échantillon a été réduite en présence de 0.04M DTT. Tous les échantillons ont été ensuite microcentrifugés et le surnageant a été conservé à -70°C.

SDS-PAGE et immunoblot

Une électrophorèse sur gel en une dimension a été réalisée selon la méthode de Laemmli. La technique SDS-PAGE en deux dimensions (non réduit/réduit) a été réalisée selon la méthode de Phillips et Al. (1977) *J. Clin. Invest.* 60, 535-545. Les gels ont été colorés à l'argent selon la méthode de Merril et Al. (1982) *Electrophoresis*, 3, 17-23.

Les gels et les membranes Immobilon ont été équilibrés dans 0.025M Tris, 0,192 M glycine, à pH8,3, pendant 30 minutes avant de réaliser un western blot. Les protéines ont été transférées par électrophorèse selon la méthode de Towbin (1979) *Proc. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350-4354, à partir du gène vers la membrane Immobilon en utilisant un appareil miniblot de BioRad à 100 V pendant une heure. Après le transfert, la membrane a été laissée pendant 30 minutes dans un tampon TBS (0,02 M Tris, 0,05 M NaCl, pH 7.5) contenant 0,05% (w/v) tween-20 et 3% (w/v) de gélatine pour bloquer les sites de liaison non spécifiques. Les bandes Immobilon ont été coupées et placées dans un tube contenant soit le surnageant d'hybridomes, soit le fluide ascitique soit l'anticorps purifié. Chaque tube a été soumis à

réaction sur un bloc pendant une heure à température ambiante. Les bandes ont ensuite été lavées trois fois dans un tampon TBS contenant 0,05% (w/v) de Tween-20 et 1% (w/v) de gélatine. Ils ont ensuite été incubés pendant 30 minutes en présence de peroxidase de raifort conjuguée à des anticorps anti-souris de chèvre, dilués à 1/3000 dans un tampon tween TBS avec 1% de gélatine. Toutes les bandes ont été lavées et une fois dans un tampon TBS-tween et deux fois dans le TBS. Le substrat a été préparé rapidement en utilisant 60 mg de réactif de développement de couleur HRP dans 20 ml de méthanol à température de la glace, 100 ml de TBS et 60µl de 30% de H₂O₂. La réaction a été arrêtée en rinçant les bandes avec de l'eau distillée.

Etude de la fixation des plaquettes

Le nombre d'anticorps monoclonaux LYP20 ET LYP21 marqués avec I-¹²⁵ fixés à des plaquettes non stimulées et à des plaquettes stimulées (par l'ADP et la thrombine) ont été testés selon la méthode par McGregor et Al. (1986) *Eur. J. Biochem.* 159, 443-449. Lorsque la thrombine (1U/ml) a été utilisée, son activité a été bloquée avec 10⁻⁶ M PPACK avant l'addition des autres réactifs. Les plaquettes non stimulées et stimulées ont été incubées avec différentes concentrations des anticorps monoclonaux marqués P20 ou P21 (0,1 à 4µg/ml) pendant 30 minutes à 25° C. Ensuite 50µl de la suspension ont été repris et étalés sur des tubes Eppendorf 400 µl contenant 300 µl de 20% (w/v) sucrose et 2% (w/v) BSA dans une solution.

Les tubes ont été centrifugés dans une microcentrifugeuse Eppendorf, pendant 6 minutes. Les extrémités des tubes de centrifugation ont été coupées et la quantité d'anticorps marqués avec l'iode 125

(I¹²⁵) fixés a été déterminée avec un compteur gamma. La fixation non spécifique a été réalisée par l'addition d'anticorps non marqués concentrés 100 fois. Le nombre de sites de fixation et la constante de dissociation (CD) ont été déterminés par analyse Scatchard.

Agrégation et Sécrétion plaquettaires

Des études d'agrégation ont été réalisées avec des plaquettes lavées traitées avec la sérotonine ¹⁴C selon la méthode de Greenberg et al. (1979...). Les plaquettes, ajustées à 2×10^8 plaquettes/ml ont agrégé avec 2,5 μ M ADP, 2 μ g/ml de collagène ou 0,016 U/ml de thrombine en présence ou à l'absence soit de l'anticorps monoclonal P20 soit de l'anticorps monoclonal P21, (anticorps monoclonal complet ou fragment F(ab)₂). Après chaque agrégation, la suspension a été microcentrifugée et 100 μ l de surnageant ont été passés dans un compteur- β pour mesurer le niveau de sécrétion.

Adhésion plaquettaire

Les études d'adhésion ont été réalisées sur des plaquettes lavées traitées avec du ⁵¹Cr (0,1 mCi par 5×10^8 plaquettes) selon la méthode décrite par Cazenave et al. (1979...), PGE₁ (20 ng/ml) a été ajouté à une solution de Tyrode pendant toute la procédure. Les puits plastiques ont été recouverts avec 100 μ l de BSA (0,5 %), de la fibronectine (2 μ g/ml), du fibrinogène (2 μ g/ml) ou du collagène (2 μ g/ml) dans 25 mM de tampon de bicarbonate à pH 9,5 pendant 3 heures à 37°C. Les puits ont été bloqués pendant 90 minutes à température ambiante avec 1 % de BSA. Les plaquettes ajustées à hauteur de 5×10^8 cellule/ml ont été préincubées avec soit l'anticorps

monoclonal P20 ou l'anticorps monoclonal P21 (10 µg/ml) à 37°C pendant une heure. La suspension de plaquettes préincubées (100 µl) a été ajoutée à chaque puits et soumise à réaction à 37°C pendant une heure. Tous les puits ont été lavés soigneusement dans une solution de Tyrode afin d'enlever les plaquettes non accrochées. Les puits ont ensuite été séparés et soumis un comptage individuel sur compteur gamma.

RESULTATS

Isolement des glycoprotéines de membranes plaquettaires

Des extraits de plaquettes obtenus après traitement avec un détergent ont été solubilisés dans 1 % de DOC et soumis à une chromatographie d'affinité (WGA) en présence de 0,5 % DOC à pH 8,6. Aucune glycoprotéine du complexe GPIIb-IIIa n'était présente dans la fraction éluée comme le montrent les analyses SDS-PAGE et ELISA. Après dialyse contre 0,1 % de Lubrol WX, cette fraction a été appliquée sur une colonne Q d'échange d'anions à flux rapide, et éluée dans du NaCl. Le premier pic contient quatre protéines comme le montre le résultat de SDS-PAGE. Les poids moléculaires étaient respectivement de 85, 120, 130 et 150 kD dans des conditions non réductrices et 85, 125, 140 et 155 après réduction. Aucune glycoprotéine GPIb n'était présente dans cette fraction comme le montre la détection après coloration à l'argent du gel. Cependant, la GPIb était présente dans le pic n° 3. La première fraction a été sélectionnée pour immuniser les souris de façon à produire des anticorps monoclonaux spécifiques pour les quatre antigènes de membrane plaquettaire.

Production anticorps monoclonaux

Des surnageants d'hybridomes ont été criblés avec un mélange de 4 glycoprotéines en utilisant la technique ELISA. Plusieurs surnageants ont présenté une réaction vis à vis du mélange d'antigènes. Les anticorps sélectionnés P20 et P21, ont été purifiés sur Sépharose protéine A et ces deux anticorps ont été caractérisés comme étant des IgG, puisqu'ils ont été élués à pH 6.

Identification de l'antigène plaquettaire reconnu par P20 et P21

Les lysats de plaquettes marquées immunoprécipités par P20 et P21 ont été comparés dans la méthode SDS-PAGE, à ceux immunoprécipités par l'anticorps S12 dirigé contre la GMP-140 et décrit par McEver dans la publication déjà citée. Une autre comparaison a été faite vis-à-vis de l'anticorps monoclonal spécifique du complexe GPIIb-IIIa. Des autoradiogrammes (Fig. 3) montrent clairement que l'antigène reconnu par P20 n'est ni la GPIIb ni la GPIIIa. Le poids moléculaire apparent de cet antigène a été estimé à environ 130 kD (non-réduit) et 140 kD (réduit). L'antigène reconnu par P20 migre en même temps que l'antigène immunoprécipité par un anticorps S12 de McEver qui ne présente aucune réaction de modulation des fonctions plaquettaires. Les mêmes résultats ont été obtenus avec P21.

Ce résultat a été confirmé par une analyse Western blot.

L'anticorps monoclonal P20 s'accroche spécifiquement à l'antigène dans des conditions dénaturantes non-réductrices. Le poids moléculaire apparent de la tache était estimé à 128 kD. Cependant, P21 a reconnu l'antigène dénaturé dans des conditions non-réductrices et réductrices.

Accrochage de l'anticorps P20 aux plaquettes lavées

Des plaquettes lavées (4 donneurs) ont accroché 2.400 ± 266 molécules d'anticorps P20 marqués, par plaquette non-stimulée ($K_d = 2,3nM \pm 0,54$) et 12.200 ± 1184 molécules d'anticorps P20 marquées par cellule après stimulation avec la thrombine ($K_d = 5nM \pm 0,61$) (Fig. 5, 6). L'anticorps marqué P21 n'a reconnu ni les plaquettes au repos ni les plaquettes stimulées.

Effet des anticorps P20 et P21 sur l'adhésion plaquettaire

Ni P20 ni P21 n'ont un effet significatif sur l'adhésion des plaquettes présentes sur des puits plastiques recouverts de fibronectine, de fibrinogène ou de collagène (Fig. 7).

Effet de P20 et P21 sur l'agrégation plaquettaire et la sécrétion

P20 inhibe partiellement l'agrégation induite à l'ADP (60 %), au collagène (63 %) et à la thrombine (50 %) comparée au contrôle. Des fragments Fab de P20 permettent l'obtention des mêmes résultats (Fig.8). P20 permet aussi la réduction de la sécrétion plaquettaire induite par le collagène et la thrombine. P21 n'a pas d'effet sur l'agrégation plaquettaire.

DISCUSSION

Des anticorps monoclonaux dirigés contre la GMP-140 des plaquettes solubilisées ont été produits. Ces anticorps P20 et P21 testés par immunoprécipitation ont montré qu'ils présentent une spécificité pour l'antigène de membrane plaquettaire également reconnu par l'anticorps S12 de McEver. Cependant, à la différence de l'anticorps S12, P20 et P21 sont dirigés contre un épitope conformationnel de

la GMP-140. De plus, P20 est actif sur les fonctions plaquettaires. Une autre caractéristique de ces anticorps est qu'ils reconnaissent la GMP-140 dénaturée comme le montrent les résultats positifs de Western blot. P20 reconnaît uniquement la GMP-140 non-réduite alors que P21 reste actif contre la GMP-140 réduite. Ces résultats suggèrent que le site de liaison du P20 contient des ponts disulfure. En revanche, le site de liaison de P21 ne contient probablement pas de ponts disulfure. On peut conclure à ce stade que P20 et P21 sont spécifiques d'épitopes différents sur la GMP-140 plaquettaire.

Les plaquettes au repos lavées ont permis de fixer environ 2000 molécules d'anticorps P20 marqué avec l'iode. Après activation des plaquettes avec l'alpha-thrombine, les plaquettes ont accroché environ 12 000 molécules d'anticorps P20 marqués. L'activation à l'ADP n'a pas accru la liaison des anticorps P20. Les plaquettes ont probablement été légèrement activées pendant les étapes de lavage bien que PGE₁ et PPACK aient été ajoutées au niveau du premier lavage.

Les anticorps P21 marqués ne s'accrochent ni aux plaquettes au repos ni aux plaquettes stimulées avec la thrombine. Des expériences de contrôle sur des échantillons de P21 ont été réalisées afin de vérifier la réactivité de P21 vis-à-vis de la GMP-140 solubilisée. Ces résultats se sont avérés positifs. On en conclut que P21 ne s'accroche pas à des plaquettes entières qu'elles soient activées ou non, l'épitope reconnu par P21 n'étant en pas accessible sur la membrane native de la GMP-140. Le site de liaison de P21 pourrait être exprimé soit sur la face cytoplasmique de GMP-140, cette séquence demeurant cytoplasmique après l'activation et l'expression des alpha-granules au niveau de membrane. On pourrait

également penser que l'accrochage de P21 n'est pas possible à cause de la conformation de la GMP-140 native qui masque l'épitope de P21. Cependant, P21 réagit avec des plaquettes entières solubilisées dans le Triton X-100 et soumises à une immunoélectrophorèse croisée, conditions qui ne sont apparemment pas dénaturantes.

P20 inhibe partiellement l'agrégation plaquettaire et la sécrétion. S12 est connu pour son absence d'effet au niveau de l'agrégation plaquettaire. Ceci confirme bien que S12 et P20 sont dirigés contre des épitopes différents. L'effet inhibiteur de l'anticorps P20 sur l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine ou le collagène est tout à fait en accord avec la localisation de la GMP-140 à l'intérieur de la membrane des alpha-granules. Après activation avec la thrombine ou le collagène la membrane des alpha-granules fusionne avec la membrane plasmique des plaquettes et la GMP-140 devient un récepteur de surface. De plus, la sécrétion de Sérotonine C¹⁴ est affectée par la présence de P20.

REVENDEICATIONS

- 1/ Anticorps monoclonaux ou leurs fragments
5 idiotypiques, dirigés contre la glycoprotéine GMP140
présente sur les plaquettes ou relachée par ces
plaquettes à la suite d'un traitement par un agoniste
tel que l'ADP, la thrombine ou le collagène et/ou
présente sur des cellules endothéliales à la suite
10 d'un traitement avec un agoniste tel que l'ADP, la
thrombine ou le collagène ou un agent inducteur
caractérisés en ce que après couplage à la protéine A
liée de façon covalente à un support et en présence de
plaquettes traitées au moyen d'un détergent en
15 présence d'un marqueur radioactif, ils présentent deux
bandes de poids moléculaire correspondant aux formes
réduites et non réduites de la GMP140.
- 2/ Anticorps monoclonaux ou leurs fragments
idiotypiques selon la revendication 1, caractérisés en
20 ce qu'ils ont la capacité d'interférer avec les
fonctions plaquettaires.
- 3/ Anticorps monoclonaux ou leurs fragments
idiotypiques selon l'une quelconque des revendications
1 ou 2, caractérisés en ce qu'il s'agit d'anticorps
25 LYP20 ou d'un anticorps ayant des propriétés
immunologiques équivalentes.
- 4/ Anticorps monoclonaux ou leurs fragments
idiotypiques selon la revendication 1, caractérisés en
ce qu'il s'agit de l'anticorps LYP21 ou d'un anticorps
30 ayant des propriétés immunologiques équivalentes.
- 5/ Composition pharmaceutique caractérisée en ce
qu'elle comprend des anticorps selon l'une quelconque
des revendications 2 à 4 ou leurs fragments
idiotypiques, en combinaison avec un véhicule
pharmaceutique acceptable.

6/ Composition pharmaceutique selon la revendication 5, caractérisée en ce que les anticorps qu'elle contient ou leurs fragments idiotypiques sont couplés à une substance thrombolytique telle que le tPa, la streptokinase, l'urokinase.

7/ Utilisation des anticorps selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, pour la fabrication d'un médicament pour le traitement des pathologies liées à des troubles de la physiologie plaquettaire.

8/ Epitope présent au niveau de la GMF140, caractérisé en ce qu'il est conformationnel, il est reconnu par l'un des anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

9/ Procédé de préparation des anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine GMF140, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a/ fusion de cellules spléniques de souris avec des cellules myélomateuses, lesdites souris étant préalablement immunisées avec au moins un antigène déterminé en excès par rapport aux cellules myélomateuses, en présence d'un promoteur de fusion, par exemple le PEG,

b/ culture des hybridomes formés par la fusion,

c/ clonage et sous-clonage des hybridomes producteurs des anticorps recherchés.

d/ production d'ascites dans les souris,

e/ récupération et purification desdits anticorps.

10/ Hybridomes producteurs des anticorps monoclonaux selon la revendication 3, tels qu'obtenus par fusion des cellules myélomateuses Sp2/O-Ag14 avec des cellules spléniques de souris préalablement immunisées avec des plaquettes de sang humain traitées à la chymotrypsine (0,2mg/ml/10⁹ plaquettes).

11/ Hybridomes producteurs des anticorps monoclonaux
selon la revendication 21, tels qu'obtenus par fusion
de cellules myélomateuses P3 x 63Ag8 avec des cellules
spléniques de souris préalablement immunisées avec un
5 mélange d'antigènes GMP140, glycoprotéine Ia, Ic, IIa,
GP110-115.

10

15

20

25

30

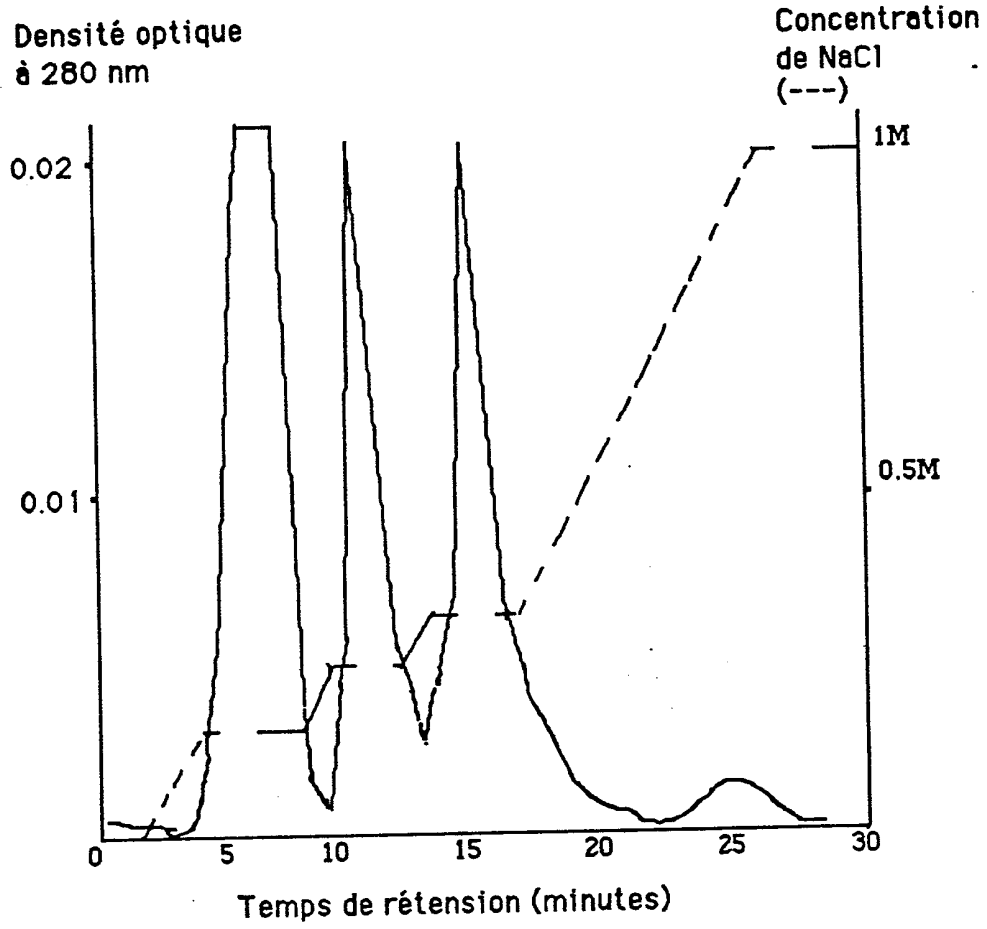
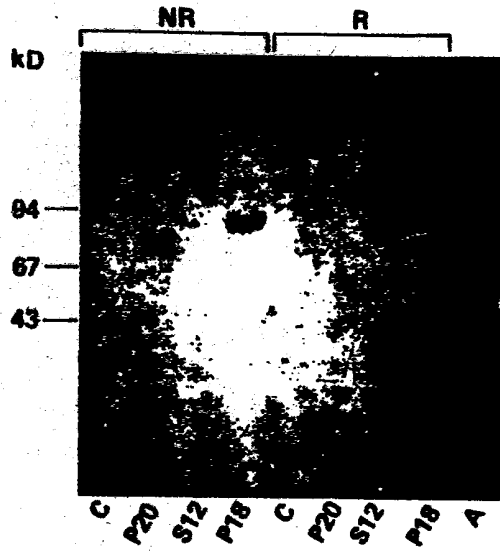


Figure 1



Comparaison des bandes de SDS-PAGE de la GPIIb-IIIa (LYP18), de la GMP-140 (S12) et de l'antigène de LYP20.

Figure 2

3/6

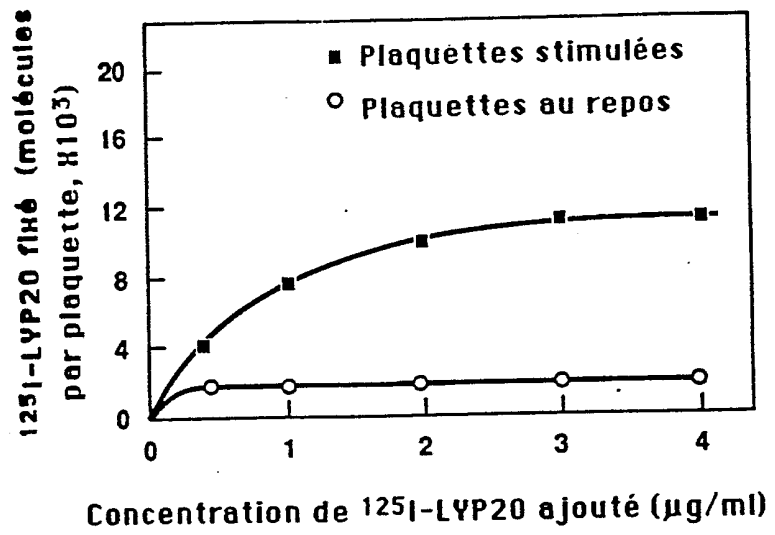


Figure 3

4/6

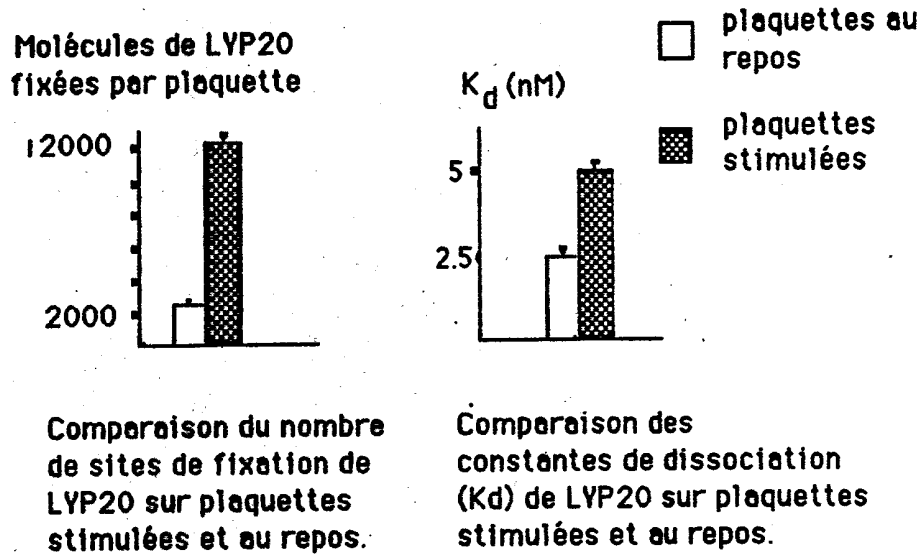
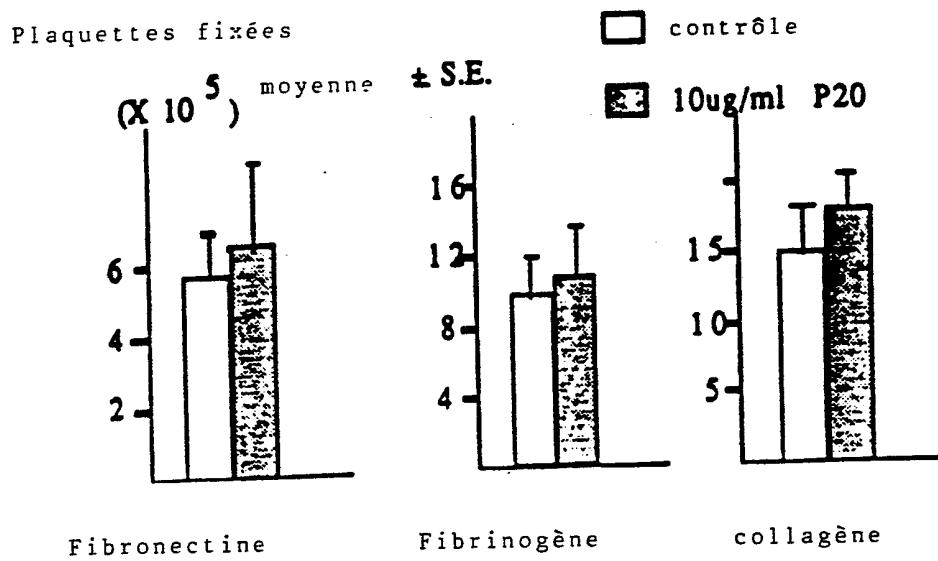


Figure 4

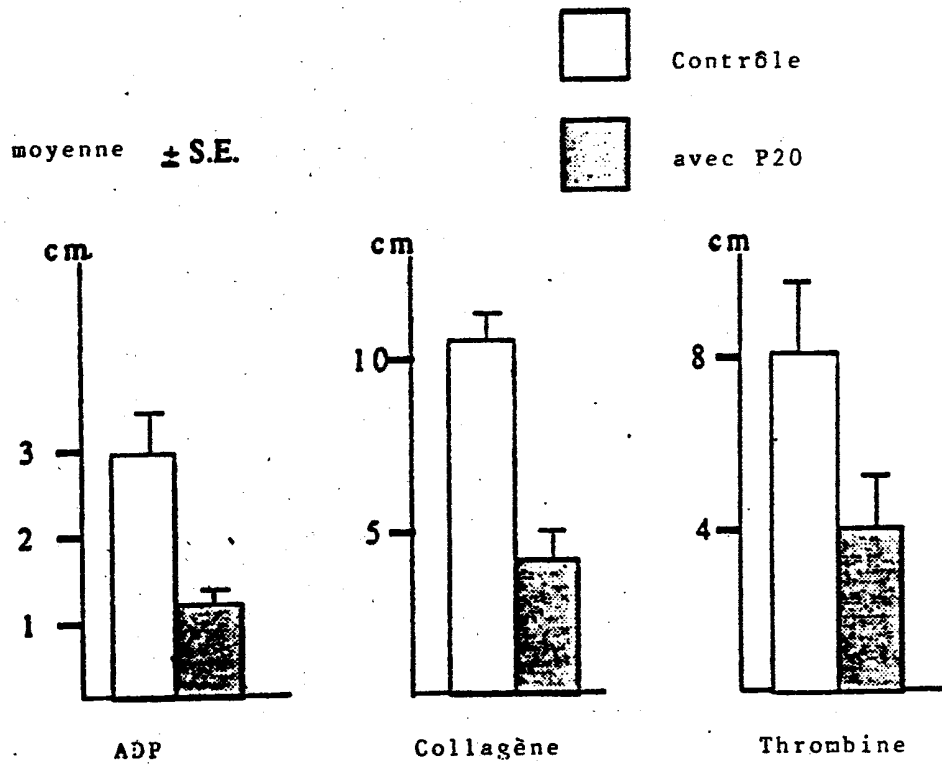
5/6



Effet de P20 sur l'adhésion plaquettaire

Figure 5

6/6



Effet de P20 sur l'aggrégation plaquettaire

Figure 6