



(72) MONTERO JULIAN, FELIX A., FR

(72) MOREL MONTERO, ANNE M., FR

(72) BRAILLY, HERVE, FR

(72) DELAAGE, MICHEL, FR

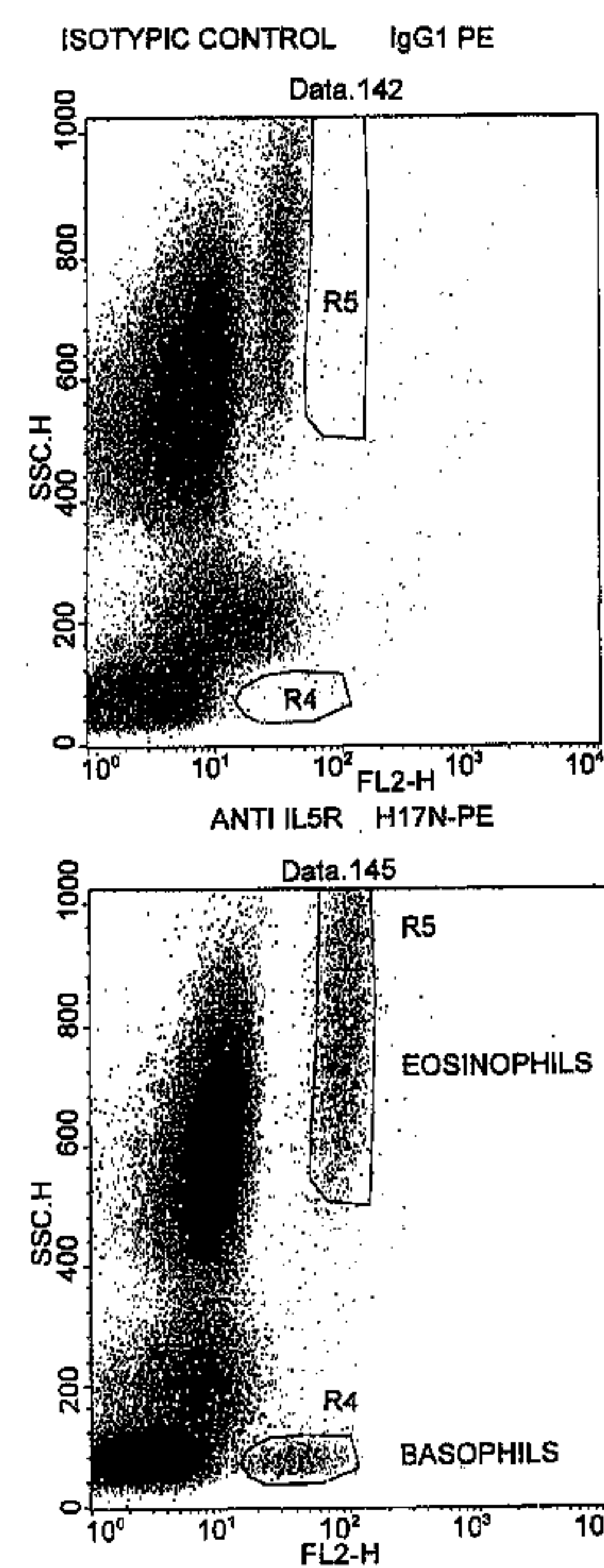
(71) IMMUNOTECH, FR

(51) Int.Cl.<sup>7</sup> G01N 33/68, G01N 33/566, C07K 16/28

(30) 1998/09/10 (98/11456) FR

(54) **PROCEDE DE DETECTION OU DE QUANTIFICATION DES  
BASOPHILES ET DES EOSINOPHILES**

(54) **METHOD FOR DETECTING OR QUANTIFYING BASOPHILS  
AND EOSINOPHILS**



(57) Un procédé pour la détection ou la quantification des éosinophiles et des basophiles, comprenant la mise en contact d'un échantillon contenant éventuellement lesdits éosinophiles ou basophiles avec un anticorps monoclonal anti-récepteur de l'IL-5 (chaîne alpha) qui n'interfère pas avec la fixation de l'IL5 à son récepteur et qui n'inhibe pas l'activité biologique de l'IL-5 pour détecter et si désiré procéder à la quantification des éosinophiles et des basophiles, un kit pour la détection ou la quantification des éosinophiles et des basophiles et un anticorps anti-RIL-5.

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE  
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> : G01N 33/68, 33/566, C07K 16/28	A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 00/16103</b> (43) Date de publication internationale: 23 mars 2000 (23.03.00)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02145</p> <p>(22) Date de dépôt international: 9 septembre 1999 (09.09.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/11456 10 septembre 1998 (10.09.98) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): IMMUNOTECH [FR/FR]; 130, avenue De-Lattre-de-Tassigny, B.P. 177, F-13276 Marseille Cedex 9 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MONTERO JULIAN, Félix, A. [FR/FR]; 6, rue Marie Louise, Le Marie Louise Bât C, F-13008 Marseille (FR). MOREL MONTERO, Anne, M. [FR/FR]; 6, rue Marie Louise, Le Marie Louise Bât C, F-13008 Marseille (FR). BRAILLY, Hervé [FR/FR]; l'Amandière Le Clos, F-13360 Roquevaire (FR). DE-LAAGE, Michel [FR/FR]; 16 rue Adophe Thiers, F-13001 Marseille (FR).</p> <p>(74) Mandataire: RINUY, SANTARELLI; 14, avenue de la Grande Armée, Boîte postale 237, F-75822 Paris Cedex 17 (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>	

(54) Title: METHOD FOR DETECTING OR QUANTIFYING BASOPHILS AND EOSINOPHILS

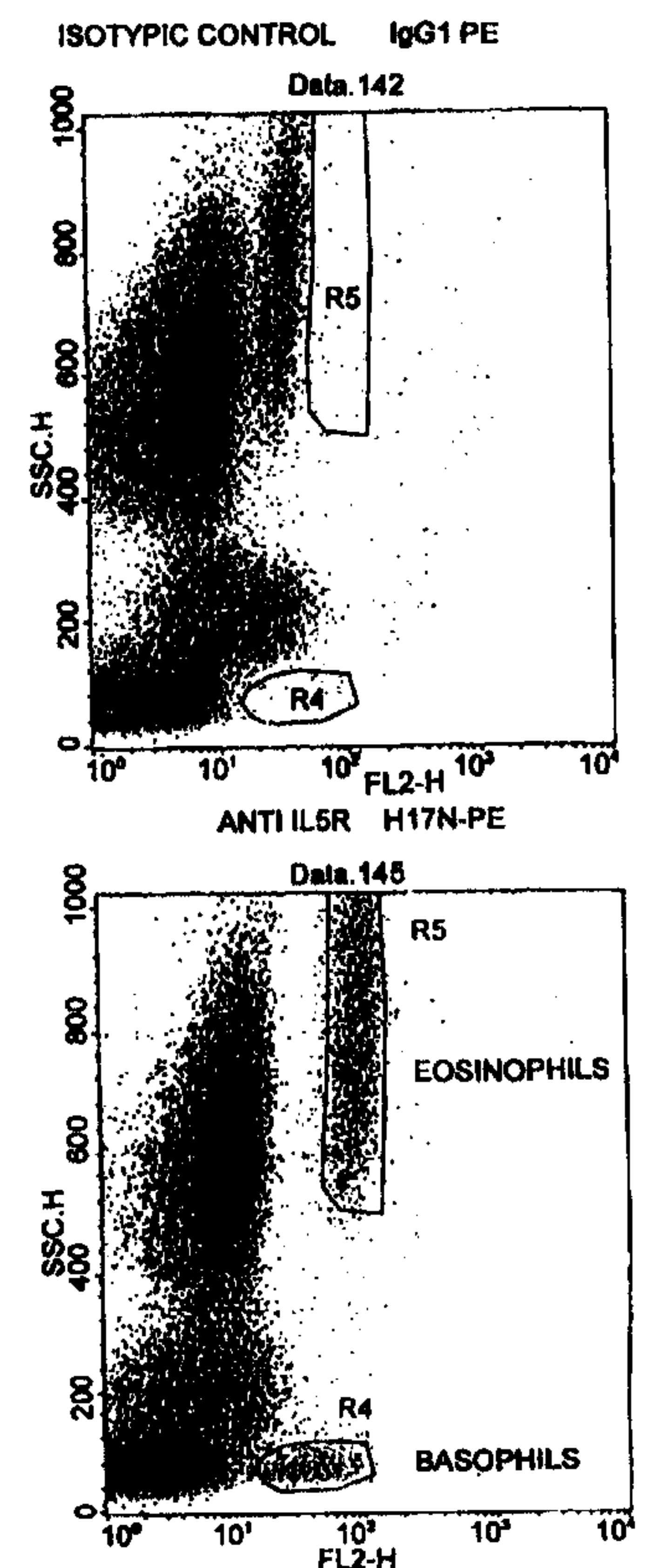
(54) Titre: PROCEDE DE DETECTION OU DE QUANTIFICATION DES BASOPHILES ET DES EOSINOPHILES

## (57) Abstract

The invention concerns a method for detecting or quantifying eosinophils and basophils, which consists in contacting a sample possibly containing said eosinophils or basophils with an IL-5 anti-receptor (alpha-chain) monoclonal antibody which does not interfere with IL-5 fixation to its receptor and does not inhibit the IL-5 biological activity to detect and, if required, to quantify eosinophils and basophils. The invention also concerns a kit for detecting or quantifying eosinophils or basophils and an anti-IL5R antibody.

## (57) Abrégé

Un procédé pour la détection ou la quantification des éosinophiles et des basophiles, comprenant la mise en contact d'un échantillon contenant éventuellement lesdits éosinophiles ou basophiles avec un anticorps monoclonal anti-récepteur de l'IL-5 (chaîne alpha) qui n'interfère pas avec la fixation de l'IL5 à son récepteur et qui n'inhibe pas l'activité biologique de l'IL-5 pour détecter et si désiré procéder à la quantification des éosinophiles et des basophiles, un kit pour la détection ou la quantification des éosinophiles et des basophiles et un anticorps anti-IL-5.



Procédé de détection ou de quantification des basophiles et des éosinophiles

La présente demande concerne un nouveau procédé de détection ou de quantification des basophiles et des éosinophiles chez des sujets sains ou malades, les procédés de préparation des réactifs nécessaires et leur mise en oeuvre notamment sous forme de kits.

L'étude des éosinophiles et des basophiles est difficile à cause du très faible nombre de ces cellules dans le sang, soit, respectivement, de 1 à 3% et moins de 1%. Cependant, leur nombre peut augmenter de manière importante dans certains états pathologiques tels que les infections parasitaires, les états allergiques, asthmatiques ou certaines leucémies.

Il a été démontré que les éosinophiles jouent un rôle très important dans l'asthme allergique chronique. Les éosinophiles infiltrant les voies respiratoires où ils peuvent être activés et dégranuler. La libération du contenu granulaire, enzymes et protéines basiques, cause un dommage à l'épithélium bronchique. Certains rapports font aussi mention de dysfonctionnements des éosinophiles.

Le pontage des IgE spécifiques, présentes sur les basophiles, par différents allergènes, tels que les pneumallergènes, venins, protéines alimentaires ou médicaments peut entraîner la libération des médiateurs contenus dans les granules ou néoformés et capables d'induire un choc anaphylactique.

Il est donc important, pour connaître l'état d'un sujet et apprécier sa susceptibilité aux agents exogènes, de compter les éosinophiles et basophiles et de mesurer la proportion de ceux qui sont activables par tel ou tel agent.

Les méthodes de comptage des basophiles et des éosinophiles sont basées sur la coloration des granules (comptage manuel) avec, par exemple, du bleu d'ortho-toluidine pour les basophiles et de l'éosine pour les éosinophiles, sur leur taille et leur granulométrie ou sur un immunophénotypage différentiel de leur surface cellulaire. Ce sont des méthodes lourdes, consommatrices de temps, et peu spécifiques. Elles possèdent de grandes incertitudes et des erreurs statistiques importantes à cause du faible effectif de ces types cellulaires. D'autre part, la plupart de ces méthodes ne permet pas d'analyser le degré d'activation de ces cellules.

Pour toutes ces raisons, il serait souhaitable de disposer de produits et de procédés permettant de détecter et quantifier plus spécifiquement les éosinophiles et les basophiles, activés ou non.

Différents procédés, utilisant un cytomètre de flux, ont été décrits  
5 pour la détection des éosinophiles et des basophiles (voir par exemple Nakagawa, et al., (1981) Allergy, 36;pp. 39-47 ; Gane, et al., (1995) Cytometry 19;pp. 361-365 ; Hübl, et al., (1996) J. Clin. Lab. Analysis. 10, 177-183).

Un des principaux problèmes rencontrés lors de l'étude par  
cytométrie de flux des basophiles et des éosinophiles, est la séparation nette  
10 entre les cellules positives et les cellules négatives. Certains auteurs utilisent une caractéristique remarquable des éosinophiles, leur autofluorescence, pour les identifier plus précisément. Cependant, certains échantillons cliniques présentent une autofluorescence très élevée des monocytes, neutrophiles et lymphocytes. Il faut aussi souligner ici la grande variabilité de la granulométrie  
15 des éosinophiles, ce qui se traduit par un étalement de la zone du diagramme de dispersion (répartition en fonction de la taille et de la granulométrie) correspondant à ces cellules. Sur le diagramme de dispersion, les basophiles sont situés à la frontière entre les lymphocytes et les monocytes.

Les leucocytes expriment à leur surface des protéines caractérisées  
20 en CDs (Cluster Differentiation) par des groupes d'anticorps qui les reconnaissent. L'expression de plusieurs CDs sur une même cellule peut permettre de la caractériser. Un même CD peut être exprimé sur différents types cellulaires. C'est pourquoi la plupart des procédés par cytométrie de flux utilisent des mélanges d'anticorps reconnaissant plusieurs de ces CDs comme  
25 marqueurs des basophiles ou des éosinophiles.

Par exemple, l'utilisation de deux mélanges d'anticorps, anti-CD2, anti-CD14, anti-CD16 et anti-CD19 d'une part et anti-CD32, anti-CD25, anti-IgG1 et anti-IgG4 d'autre part, permet de détecter les basophiles au cytofluorimètre en flux. Les anticorps anti-CD2 mettent en évidence les cellules  
30 T, les anticorps anti-CD19 permettent de détecter les cellules B et les anticorps anti-CD14 détectent principalement les monocytes mais aussi les granulocytes. Le CD16, récepteur de type III des IgG, est exprimé sur les neutrophiles,

certaines cellules T (NK) et sur les monocytes. Le CD32, récepteur de type II des IgG, est exprimé sur les monocytes, les neutrophiles et les lymphocytes B. Le CD25 est un marqueur d'activation des cellules T et B ainsi qu'un marqueur d'activation des macrophages. Plusieurs de ces marqueurs sont partagés par  
5 différents types de leucocytes. Les basophiles et les éosinophiles sont des populations minoritaires de leucocytes. C'est pourquoi la plupart des données sur les basophiles et les éosinophiles ont été obtenues à partir de cellules purifiées. Par exemple, les basophiles de sujets atteints de leucémie myéloïde  
10 chronique ont pu être étudiés après plusieurs étapes de purification à l'aide d'anticorps monoclonaux puis lyse des globules rouges par le complément. Cependant, ce procédé est impraticable en routine car il est long et nécessite un grand volume de sang.

D'autres procédés pour la détection des basophiles utilisent un anticorps anti-IgE ou un anticorps anti-récepteur de haute affinité pour les IgE.  
15 Mais ces procédés ne permettent pas une identification claire des basophiles car de faibles quantités de récepteur de haute affinité pour les IgE ont été mises en évidence sur les monocytes et les éosinophiles et les cellules B peuvent porter des IgE à leur surface. D'autre part, le pontage des IgE ou de leurs récepteurs à la surface des basophiles, par les anticorps utilisés comme  
20 sonde, peut entraîner une activation cellulaire modifiant les propriétés de la membrane. Il a été démontré que l'activation des basophiles par un allergène induit une diminution de la liaison d'un anticorps anti-IgE.

Il serait donc souhaitable de pouvoir facilement et sans risque d'erreur compter les éosinophiles et basophiles, même au milieu des autres  
25 populations cellulaires du sang humain et de mesurer la proportion de ceux qui sont activables par tel ou tel agent.

En réponse au problème du diagnostic et du traitement de maladies telles que l'asthme bronchique chronique ou la dermatite atopique, EP-A-0 811 691 propose des anticorps de divers types, monoclonaux, humanisés etc.  
30 dirigés contre la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'interleukine-5 bloquant l'activité de cette cytokine. Il propose aussi un procédé de détection des éosinophiles. Mais l'utilisation d'anticorps neutralisant l'activité biologique de l'IL-5 donne des

résultats décevants, par analyse en cytométrie de flux. Le signal spécifique obtenu sur des éosinophiles, même purifiés, ne se distingue pas du signal obtenu avec un anticorps de contrôle (bruit de fond).

Lors de la caractérisation d'un groupe d'anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur de l'interleukine-5 (RIL-5), la demanderesse a découvert que, de manière surprenante, les basophiles et les éosinophiles pouvaient, au milieu des autres populations cellulaires du sang humain ou animal, être détectés isolément et conjointement à l'aide de certains anticorps spécifiques de la chaîne alpha du récepteur de l'interleukine-5 et que l'on pouvait, si désiré, en plus compter ces mêmes cellules. La demanderesse a montré par bioessai sur cellules TF1, dépendantes de l'IL5 pour leur survie, que ces anticorps sélectionnés n'inhibaient pas la croissance de ces cellules.

D'autre part, la demanderesse a aussi montré que le récepteur lié à ces anticorps immobilisé sur phase solide est toujours capable de fixer l'IL5 marquée.

C'est pourquoi la présente demande a pour objet un procédé pour la détection ou la quantification des éosinophiles et des basophiles, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact d'un échantillon contenant éventuellement lesdits éosinophiles ou basophiles avec un anticorps monoclonal anti-récepteur de l'IL-5 (chaîne alpha) qui n'interfère pas avec la fixation de l'IL5 à son récepteur et qui n'inhibe pas l'activité biologique de l'IL-5 pour détecter et si désiré procéder à la quantification des éosinophiles et des basophiles.

L'invention utilise donc un anticorps monoclonal anti-récepteur de l'IL-5 (chaîne alpha) et l'expression de la chaîne alpha du récepteur de l'IL-5 comme marqueur spécifique des éosinophiles et des basophiles. On a observé que ce marquage était spécifique de ces cellules sanguines et qu'aucune des cellules B, T, monocytes ou neutrophiles n'était marquée.

Ces anticorps sont donc utilisables pour le comptage des basophiles et des éosinophiles en toutes circonstances avec exactitude et précision.

L'échantillon contenant éventuellement lesdits éosinophiles ou basophiles peut être par exemple un prélèvement sanguin provenant notamment d'un sujet malade, de préférence allergique ou parasité.

Selon le procédé ci-dessus décrit, l'anticorps monoclonal anti-récepteur de l'IL-5 est un anticorps qui n'interfère pas avec la fixation de l'IL5 à son récepteur et qui n'inhibe pas l'activité biologique de l'IL-5.

L'absence d'inhibition de l'activité biologique de l'IL-5 peut être montrée par bioessai sur cellules TF1, dépendantes de l'IL5 pour leur survie, les anticorps selon l'invention n'inhibant pas la croissance de ces cellules TF1.

10 Dans des conditions préférentielles de mise en oeuvre du procédé ci-dessus décrit, l'anticorps monoclonal anti-récepteur de l'IL-5 est un anticorps qui n'interfère pas avec les IgE. L'on entend par « qui n'interfère pas avec les IgE » un anticorps qui n'empêche pas la liaison d'un allergène ou d'un autre anticorps anti-IgE, à ces IgE de surface .

15 Dans encore d'autres conditions préférentielles de mise en oeuvre du procédé ci-dessus décrit, l'anticorps monoclonal anti-récepteur de l'IL-5 est un anticorps qui n'interfère pas avec l'activation cellulaire des éosinophiles ou des basophiles. L'on entend par « qui n'interfère pas avec l'activation cellulaire des éosinophiles ou des basophiles » un anticorps qui par sa liaison à la surface de  
20 la cellule, n'induit pas ou n'inhibe pas l'apparition d'un marqueur d'activation de surface des basophiles ou des éosinophiles.

Dans toujours d'autres conditions préférentielles de mise en oeuvre du procédé ci-dessus décrit, la détection et si désiré la quantification des éosinophiles et des basophiles utilise un cytomètre de flux ou à balayage  
25 optique.

Les basophiles humains expriment à leur surface des marqueurs tels que les CD11, CD13, CD18, CD26, CD31, CD32, CD33, CD40, CD43, CD44, CD45, CD49d, CD54 et les éosinophiles expriment à leur surface les CD15, CD32, CD44, CD49d, CD52, CD65, CD66, CD67. Par contre ni les basophiles,  
30 ni les éosinophiles n'expriment les CD3, CD14, CD16, CD19. Ces listes de marqueurs ne sont pas exhaustives.

C'est pourquoi la présente demande a aussi pour objet un procédé ci-dessus caractérisé en ce que en outre l'on met en contact l'échantillon avec un ou de préférence plusieurs autres anticorps monoclonaux dirigés contre d'autres marqueurs permettant d'exclure les types cellulaires autres que les  
5 éosinophiles ou les basophiles. Ainsi on peut discriminer les lymphocytes, monocytes et neutrophiles des éosinophiles et basophiles.

On utilise donc des marqueurs d'exclusion pour améliorer encore la précision du comptage en excluant les événements erratiques. La présente demande a notamment pour objet un procédé ci-dessus caractérisé en ce que  
10 les autres anticorps monoclonaux sont dirigés contre les marqueurs CD3, CD16 et CD19 qui permettent d'exclure les événements erratiques.

L'invention permet la détection et la quantification spécifique des basophiles et des éosinophiles activés ou non activés. Il a été démontré récemment que le CD63, protéine lysosomale de la famille du tétraspan et  
15 initialement décrite comme marqueur d'activation des plaquettes, était également présent dans les granules des basophiles et neutrophiles. L'expression du CD63 à la surface cellulaire est dépendante du calcium. Lors de l'activation des basophiles, le CD63 exprimé à la surface peut être reconnu par un anticorps spécifique. L'intensité du marquage est fonction du nombre de  
20 cellules activées.

C'est pourquoi la présente demande a encore pour objet un procédé ci-dessus caractérisé en ce que l'on procède à la détection ou la quantification des basophiles activés en mettant en outre en contact l'échantillon avec un ou plusieurs autres anticorps monoclonaux dirigés contre des marqueurs  
25 d'activation des basophiles et notamment contre l'antigène CD 63.

De même, la présente demande a encore pour objet un procédé ci-dessus caractérisé en ce que l'on procède à la détection ou la quantification des éosinophiles activés en mettant en outre en contact l'échantillon avec un ou plusieurs autres anticorps monoclonaux dirigés contre des marqueurs  
30 d'activation des éosinophiles et notamment contre l'antigène CD 69.

De plus la détection et le comptage des basophiles et des éosinophiles séparément est possible dès lors que l'on dispose d'un moyen additionnel de discrimination tel que

- la diffusion de la lumière dans les cytomètres en flux où les éosinophiles se distinguent des basophiles par une valeur beaucoup plus élevée de la diffusion latérale (side scatter),

- l'activité peroxydasique propre aux éosinophiles que l'on révèle par utilisation de substrats précipitants comme le DAB (diamino benzidine) ou fluorescents comme le diacétate de dichlorofluorescéine, substrat non-fluorescent transformé en 2',7'-dichlorofluorescéine hautement fluorescente.

La présente demande a encore pour objet un anticorps anti-RIL-5 caractérisé par :

- l'absence d'interférence avec la fixation de l'IL5 à son récepteur
- l'absence d'interférence avec les IgE
- l'absence d'interférence avec l'activation cellulaire des éosinophiles ou des basophiles
- l'absence d'inhibition de l'activité biologique de l'IL-5.

Une réalisation avantageuse de l'invention consiste en l'utilisation d'un mélange d'anticorps dirigés d'une part contre le RIL-5, avec ou sans marqueurs "spécifiques" des lymphocytes T et B, cellules NK, monocytes et neutrophiles et, si l'on s'intéresse aux éosinophiles ou basophiles activés, d'autre part un marqueur d'activation de basophiles et des éosinophiles. Le marqueur d'activation cellulaire peut être un anticorps spécifique d'une protéine apparaissant à la surface de la membrane cellulaire après activation ou la mise en évidence d'une activité enzymatique oxydative. Celui-ci permet la mise en évidence et, éventuellement, la quantification de l'activation cellulaire.

C'est pourquoi la présente demande a aussi pour objet des kits ciblés pour différentes applications, lesdits kits ayant pour base un anticorps monoclonal anti-RIL-5, préférentiellement de souris, de rat ou de lapin, ou bien modifié génétiquement et premièrement

un kit pour la détection ou la quantification des éosinophiles ou des basophiles contenant

- au moins un anticorps monoclonal anti-RIL-5 tel que défini ci-dessus couplé à un premier fluorochrome,

- un mélange d'anticorps marqueurs des lymphocytes, monocytes et neutrophiles, couplés à un deuxième fluorochrome,

5 ainsi qu'un kit pour la détection et la quantification des éosinophiles et des basophiles activés contenant

- au moins un anticorps monoclonal anti-RIL-5 tel que défini ci-dessus couplé à un premier fluorochrome,

10 - un mélange d'anticorps marqueurs des lymphocytes, monocytes et neutrophiles, couplés à un deuxième fluorochrome et

- des anticorps dirigés contre des marqueurs d'activation et couplés à un troisième fluorochrome.

La présente demande a encore pour objet un kit ci-dessus caractérisé en ce qu'il renferme en outre un substrat spécifique de l'activité oxydative des éosinophiles .

La présente demande a aussi pour objet un kit pour la détection ou la quantification de l'activité oxydative des éosinophiles ou des basophiles contenant

20 - au moins un anticorps monoclonal anti-RIL-5 tel que défini ci-dessus couplé à un premier fluorochrome

- un mélange d'anticorps marqueurs des lymphocytes, monocytes et neutrophiles conjugués à un second fluorochrome

- un substrat marqueur de l'activité oxydative des éosinophiles ou des basophiles.

25 Les conditions préférentielles de mise en oeuvre des procédés ci-dessus décrites s'appliquent également aux autres objets de l'invention visés ci-dessus.

La présente demande a enfin pour objet un procédé, anticorps ou kit ci-dessus caractérisé en ce que l'anticorps monoclonal anti-récepteur de l'IL-5 est un anticorps de type IgG1 dont l'hybridome correspondant a été déposé à 30 la Collection Nationale de Culture de Micro-organismes (CNCM) sous le N° I-2068.

L'invention peut être appliquée dans le test, par les laboratoires cliniques et pharmaceutiques, de la réponse des basophiles ou des éosinophiles à différents types d'agents dégranulants (allergènes, substances chimiques, parasites, etc.), afin de réaliser un diagnostic ou un suivi de désensibilisation, ou encore de mettre en évidence la capacité de nouvelles molécules à moduler la dégranulation des basophiles ou des éosinophiles et pour l'étude de pathologies allergiques, parasitaires et leucémiques.

Les exemples qui suivent illustrent la présente demande.

10

La figure 1 est l'illustration d'un " dot plot " obtenu avec l'anticorps monoclonal anti-RIL-5 H17N (B) et un contrôle isotypique (A) conjugués à la phycoérythrine. Les abscisses représentent l'intensité de fluorescence exprimée en échelle logarithmique et les ordonnées représentent la diffusion latérale.

15

Les polygones marqués R4 et R5 représentent respectivement les basophiles et les éosinophiles.

Les figures 2A et 2B sont l'illustration d'un double marquage obtenu avec l'anticorps anti-RIL-5 conjugué à la phycoérythrine pour les basophiles et les éosinophiles, respectivement. Les abscisses représentent la fluorescence émise par la fluorescéine (FITC) et les ordonnées la fluorescence émise par la phycoérythrine (PE).

20

Le "dot plot" de gauche représente le double marquage entre l'anti-RIL-5-PE et un anticorps spécifique d'un autre marqueur couplé au FITC. Le "dot plot" de droite représente le marquage obtenu avec un contrôle isotypique et l'anti-RIL-5-PE.

25

Les marqueurs utilisés sont, de haut en bas, anti-CD16 (ce marqueur est présent sur les neutrophiles, les cellules NK, les cellules de Kupffer et une sous population des macrophages), anti-CD49d (chaîne alpha 4 des intégrines exprimée sur les basophiles et les éosinophiles mais aussi sur les lymphocytes, monocytes et thymocytes).

30

La figure 3 est l'illustration d'un double marquage obtenu avec un anticorps anti-RIL-5 conjugué à la phycoérythrine en combinaison avec un mélange d'anticorps CD3, CD19, CD16, tous conjugués à la phycoérythrine-Cyanine 5 (PECy5). Le canal FL-1 correspond à la fluorescence émise par la fluorescéine, le canal FL-2 correspond à la fluorescence émise par la phycoérythrine et le canal FL-3 correspond à la fluorescence émise par la phycoérythrine Cyanine 5.

Le diagramme A correspond à la dispersion selon la taille et la granulométrie. On distingue la région R1 qui correspond aux lymphocytes, la région R2 qui correspond aux monocytes et la région R3 qui correspond aux granulocytes.

Le diagramme B correspond à la fluorescence de l'anticorps anti-IL-5R-PE en fonction de la diffusion latérale, fonction de la taille cellulaire. R4 correspond aux basophiles et R5 correspond aux éosinophiles.

Le diagramme C représente la fluorescence du mélange d'anticorps anti-CD3, anti-CD16, anti-CD19, en fonction de la diffusion latérale. R6 correspond aux éosinophiles non marqués.

Le diagramme D représente la fluorescence du mélange d'anticorps anti-CD3, anti-CD16, anti-CD19 et la fluorescence de l'anticorps anti-IL-5R-PE. Les éosinophiles se projettent dans les régions R5 et R6. Seuls les événements présents en R5 et R6 sont pris en compte dans le diagramme D.

La figure 4 est l'illustration de la corrélation entre les pourcentages donnés par un hématimètre et le procédé de l'invention. Les abscisses représentent le pourcentage des éosinophiles (A) et le pourcentage des basophiles (B) obtenus en cytométrie de flux et les ordonnées représentent le pourcentage des éosinophiles (A) et le pourcentage des basophiles (B) donnés par l'hématimètre.

Le graphique du haut correspond aux données obtenues sur les éosinophiles et le graphique du bas aux données obtenues sur les basophiles. Les coefficients de corrélation sont donnés à l'intérieur de chaque graphe.

La figure 5 est l'illustration typique d'un résultat obtenu après activation des basophiles avec un anticorps anti-IgE.

Sur cette figure 5, le "dot plot" 1 représente la taille et la granulométrie des cellules du sang, le diagramme 2 représente le marquage obtenu avec l'anticorps anti-RIL-5-PE (diagramme similaire à celui présenté sur la figure 1), le diagramme 3 représente l'isolement des basophiles et le nettoyage de la population des autres contaminants possibles, tels que les lymphocytes et les monocytes. Le diagramme 4 représente les basophiles.

La figure 5B représente 4 « dot plots » de basophiles activés. Chaque « dot plot » correspond à une stimulation de sang total par des concentrations décroissantes d'anti-IgE. Le nuage de points de chaque « dot plot » correspond à la population, isolé selon le « dot plot » 5A-4. Les abscisses représentent la fluorescence émise par la fluorescéine couplée à l'anticorps anti-CD63, et les ordonnées représentent la fluorescence émise par la phycoérythrine couplée à l'anticorps anti-RIL-5.

La figure 6 est l'illustration de la comparaison entre les pourcentages des cellules CD63+IL5R+ et le pourcentage d'histamine libérée.

Chaque diagramme représente un donneur. Les symboles noirs représentent le % des cellules CD63+IL-5R+ et les symboles blancs le pourcentage d'histamine libérée. Les abscisses représentent la concentration d'anti-IgE utilisée par la stimulation des basophiles exprimés en  $\mu\text{g/ml}$  et les ordonnées représentent le pourcentage de basophiles exprimant CD63 ou le pourcentage d'histamine libéré.

La figure 7 est l'illustration de l'activation des éosinophiles par un ester de phorbol (PMA : phorbol myristate acétate). Les abscisses représentent la concentration de PMA ajouté et les ordonnées représentent le pourcentage des éosinophiles exprimant la molécule CD69 ou CD63. Chaque diagramme représente un donneur différent.

### **EXEMPLE I. Obtention des anticorps monoclonaux anti-RIL-5.**

30 1- Réactifs.

Les réactifs courants (sels, tampons, etc.) ont été achetés chez Merck, Darmstadt, Allemagne. Les réactifs de culture cellulaire proviennent de

Biowitthaker Virviers, Belgique et de Sigma, Saint-Louis, USA. Les anticorps monoclonaux anti-CD3, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD49d, anti-CD63, anti-CD69 conjugués au N-isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou au phycoérythrine Cyanine 5 (PECy5) et l'anticorps monoclonal anti-IgE clone 5 E124.2.8. sont des produits commerciaux obtenus chez Immunotech, Marseille, France.

## 2- Fusion

L'anticorps anti-RIL-5, clone H17N, a été obtenu après immunisation de souris avec une forme soluble recombinante du RIL-5, protéine produite à partir d'un gène fusion RIL-5 – IL-2 et exprimée dans les cellules CHO, puis fusion des blastocytes avec les cellules de myélome X63, selon la technique classique décrite par Köhler et Milstein (1975, Nature 256, 495). La production d'anticorps a été criblée par ELISA en utilisant des plaques recouvertes avec soit la protéine hybride RIL-5-IL-2 soit avec l'IL-2. Les clones positifs sur les plaques recouvertes avec le RIL-5-IL-2 et négatifs sur les plaques recouvertes avec l'IL-2 ont été clonés par dilution limite. La sélection des anticorps s'effectue sur des cellules TF-1 en raison de leur capacité à reconnaître le RIL-5 en présence et en absence d'IL-5, critère selon la présente invention.

Parmi les anticorps monoclonaux sélectionnés, l'anticorps monoclonal anti-RIL-5, appelé H17N, présente une forte affinité pour l'antigène mais n'inhibe pas l'activité biologique de l'IL-5. En conséquence, malgré la liaison de l'IL-5 à son récepteur aucune inhibition n'est observée. L'hybridome correspondant a été déposé à la Collection Nationale de Culture de Micro-organismes (CNCM) à Paris le 3 septembre 1998 sous le N° I-2068. L'anticorps monoclonal anti-RIL-5, appelé H17N est de type IgG1.

## 3- Couplage à un marqueur fluorescent

Le couplage de l'anticorps anti-RIL-5 H17N à la phycoérythrine a été réalisé selon le protocole décrit dans « Bioconjugate techniques » par G. Hermanson, Academic Press, 1996.

**EXEMPLE 2. Analyse par cytométrie sur sang total.****1- Echantillons sanguins.**

Les échantillons sanguins utilisés pour l'étude de corrélation ont été  
5 obtenus de l'Hôpital La Conception (Marseille, France). La formulation  
sanguine a été réalisée sur des tubes contenant de l'EDTA comme  
anticoagulant avec un appareil STKS-Coulter, Miami, USA. Le sang utilisé pour  
les activations des basophiles a été prélevé sur des tubes héparinés. Ces  
échantillons ont été prélevés sur des personnes appartenant au laboratoire.

10

**2- Protocole.**

L'expression du RIL-5 dans différentes sous populations cellulaires,  
à partir de sang total, a été analysée à l'aide d'un double immunomarquage,  
utilisant d'une part l'anticorps anti-RIL-5 H17N conjugué à la phycoérythrine  
15 préparé au stade 3 de l'exemple 1 et d'autre part des marqueurs spécifiques  
des populations cellulaires étudiées.

Le protocole utilisé est le suivant : 100 µl de sang total sont incubés  
avec 20 µl d'anticorps anti-RIL-5 H17N-PE et 20 µl d'un deuxième anticorps  
spécifique d'un autre marqueur. L'échantillon est incubé 15 min. à température  
20 ambiante.

Ensuite, 1 ml de réactif de lyse est ajouté et le mélange réactionnel  
vigoureusement mélangé immédiatement. Quand l'échantillon est devenu  
translucide (< 1 min.), 250 µl de réactif de fixation sont ajoutés et l'échantillon  
est à nouveau soigneusement mélangé. Trois ml de tampon phosphate  
25 isotonique (PBS 1X) sont alors ajoutés, puis l'échantillon est centrifugé pendant  
3 minutes à 1200 tours par minute. Le surnageant est aspiré et 500 µl de PBS-  
0.5% formaldéhyde sont ajoutés. Les échantillons sont stockés à 4°C et à  
l'obscurité avant l'analyse au cytomètre.

La liaison non spécifique est contrôlée en utilisant un anticorps  
30 irrelevant du même isotype référence IM 0670 (Immunotech, Marseille). Ceci  
permet d'effectuer les réglages pertinents de l'appareil. L'analyse cytométrique  
des cellules marquées par les différents fluorochromes a été réalisée sur un

appareil FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, USA). Pour chaque échantillon, on a analysé 100 000 événements.

3- Identification des basophiles et des éosinophiles par cytométrie de flux.

L'anticorps anti-RIL-5 H17N a été conjugué à la phycoérythrine (PE) afin de caractériser plus facilement les cellules qui expriment le récepteur de l'IL-5. L'immunomarquage du sang total avec l'anticorps H17N-PE et un anticorps de contrôle (anticorps irrelevant de même isotype référence IM 0670) est montré sur la figure 1 (A et B).

En présence de l'anticorps de contrôle, on observe une absence de marquage (figure 1 A). Par contre, en présence de l'anticorps anti-RIL-5-PE, un décalage de la fluorescence de certaines cellules est observé (figure 1 B). Les deux nuages (fenêtres R5 et R4) des cellules marquées par l'anticorps anti-RIL-5 correspondent aux éosinophiles et basophiles. Cette observation a été confirmée grâce à plusieurs immunomarcages à l'aide d'anticorps spécifiques de différents CD's (Clusters Differentiation). Ainsi, on a observé que les cellules positives pour le RIL-5 sont négatives pour l'expression des CD3, CD19 et CD16, CDs spécifiques des lymphocytes, et négatives pour l'expression du CD14, spécifique des monocytes. Cependant, les cellules sont positives pour CD49d, protéine exprimée par les éosinophiles et les basophiles, mais aussi par les lymphocytes, monocytes et thymocytes.

Ceci démontre que les cellules marquées par l'anticorps anti-RIL-5 correspondent bien aux éosinophiles et aux basophiles.

25

### **EXEMPLE 3. Quantification des éosinophiles et basophiles.**

On a comparé la différence existant entre le pourcentage des éosinophiles et basophiles donné par l'hématimètre STKS (Coulter, Miami), utilisé à l'Hôpital de la Conception à Marseille, et le pourcentage de cellules positives pour l'expression du RIL-5, mises en évidence par l'anticorps anti-RIL-5 H17N selon l'invention.

Les basophiles et les éosinophiles sont les seuls types cellulaires marqués par l'anticorps anti-RIL-5 selon l'invention mais le nuage des basophiles est très proche du nuage de cellules correspondant aux lymphocytes.

5 On a ajouté à l'anticorps anti-RIL-5 conjugué à la PE, un mélange d'anticorps anti-CD3, anti-CD16 et anti-CD19 conjugués au phycoérythrine Cyanine 5, ce qui permet d'exclure les évènements erratiques. Cette combinaison permet d'obtenir des valeurs plus exactes. En utilisant cette méthode, on a comparé les pourcentages d'éosinophiles et de basophiles  
10 obtenus par les deux méthodes pour 50 échantillons différents. Les résultats sont présentés dans la figure 4.

La figure 4A présente la corrélation des pourcentages d'éosinophiles obtenus avec les deux techniques. Celle-ci est de de  $[\% \text{ Hématimètre}] = 0,94 [\% \text{ Cytomètre}] + 0$  pour  $n = 50$ . La figure 4B présente la corrélation des  
15 pourcentages de basophiles obtenus avec les deux techniques. Celle-ci est de  $[\% \text{ Hématimètre}] = 0,86 [\% \text{ Cytomètre}] + 0,076$  pour  $n = 50$ . On observe une très bonne corrélation entre les deux méthodes,  $r = 0,98$  et  $r = 0,83$ , démontrant la grande fiabilité du procédé selon l'invention.

#### 20 **EXEMPLE 4. Activation des basophiles.**

La libération d'histamine par les basophiles activés a été réalisée sur des fractions aliquotes de 300  $\mu\text{l}$  de sang, déposées dans un tube et incubées en présence de différentes concentrations d'anti-IgE afin d'établir une courbe  
25 dose-réponse.

Les échantillons sont mélangés doucement et incubés à 37°C pendant 15 minutes. L'activation cellulaire est arrêtée par addition de 300  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate froid contenant 1mM d'EDTA. Les tubes sont centrifugés à +4°C durant 3 minutes à 1200 tours par minute. Le surnageant est récupéré  
30 pour quantifier l'histamine. Le culot cellulaire est remis en suspension dans 300  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate, 1mM EDTA et 100 $\mu\text{l}$  de cette suspension cellulaire sont analysés après immunomarquage.

La quantification de l'histamine libérée a été effectuée à l'aide d'un radio-immunodosage commercial ( Référence 1659, Immunotech, Marseille, France), suivant les instructions du fabricant. L'histamine totale est  
5 déterminée après lyse cellulaire par dilution de 50µl de sang dans 950 µl d'eau distillée suivie de deux cycles de congélation-décongélation. L'histamine libérée après activation cellulaire est exprimée en pourcentage d'histamine totale.

L'analyse par cytométrie de flux a été réalisée après triple marquage sur 100µl de culot cellulaire repris par du PBS, avec l'anticorps anti-RIL-5  
10 H17N-PE, l'anticorps anti-CD63-FITC et des anticorps anti-CD3, anti-CD16, anti-CD19, tous trois conjugués au PECy5. La procédure est identique à celle décrite précédemment. De la même façon, l'analyse de 100 000 cellules est acquise. Le pourcentage de cellules doublement marquées CD63+ et RIL-5+ a été déterminé après activation cellulaire.

15 Une expérience représentative est présentée sur la figure 5. On observe une augmentation de cellules doublement marqués (CD63 et RIL-5) en fonction de la concentration d'anti-IgE. Cette augmentation est parfaitement corrélée avec le profil d'histamine libérée comme cela est montré pour quatre donneurs différents sur la figure 6.

20

#### **EXEMPLE 5 . Activation des éosinophiles**

L'expression du marqueur d'activation CD69 a été réalisée sur des fractions aliquotes de 300 µl de sang, déposées dans un tube et incubées en présence de différentes concentrations de PMA (Phorbol Myristate Acetate)  
25 afin d'établir une courbe dose-réponse. Les échantillons sont mélangés doucement et incubés à 37°C pendant 6 heures. L'activation cellulaire est arrêtée en centrifugeant à +4°C durant 3 minutes à 1200 tours par minute. Le surnageant est récupéré pour quantifier l'histamine. Le culot cellulaire est remis en suspension dans 300 µl de PBS, 1 mM EDTA et 100 µl de cette suspension  
30 cellulaire sont analysés après immunomarquage.

La quantification de l'histamine libérée a été effectuée à l'aide d'un radioimmunodosage commercial (référence 1659, Immunotech, Marseille,

France), suivant les instructions du fabricant. L'histamine totale est déterminée après lyse cellulaire par dilution de 50 µl de sang dans 950 µl d'eau distillée suivie de deux cycles de congélation-décongélation. L'histamine libérée après activation cellulaire est exprimée en pourcentage d'histamine totale.

5 L'analyse par cytométrie de flux a été réalisée après triple marquage sur 100 µl de culot cellulaire repris par du PBS, avec l'anticorps anti-RIL-5 H17N-PE, l'anticorps anti-CD69-FITC ou l'anticorps anti-CD63-FITC et les anticorps anti-CD3, anti-CD16, anti-CD19, tous trois conjugués au PECy5. La  
10 l'analyse de 100.000 cellules est acquise. Le pourcentage de cellules doublement marquées CD69<sup>+</sup> et RIL-5<sup>+</sup> d'une part, CD63<sup>+</sup> et IL-5R<sup>+</sup> d'autre part a été déterminé après activation cellulaire.

Une expérience représentative est présentée sur la figure 7. On observe une augmentation de cellules doublement marquées (CD69<sup>+</sup> et RIL-5<sup>+</sup>)  
15 en fonction de la concentration de PMA. De façon intéressante le marquage avec l'anticorps anti-CD63 sur les éosinophiles n'a pas donné de fluorescence démontrant que le CD63 est spécifique des basophiles.

#### 20 **EXEMPLE 6. Kit de détection ou de quantification des éosinophiles ou des basophiles.**

On a préparé un kit répondant à la composition :

- un flacon contenant un anticorps anti-RIL-5 H17N conjugué à la phycoérythrine
- un flacon contenant un mélange d'anticorps :  
25           Anti-CD3 conjugué au PECy5  
            Anti-CD16 conjugué au PECy5  
            Anti-CD19 conjugué au PECy5
- un flacon contenant un anticorps « contrôle isotypique » conjugué à la phycoérythrine
- 30           - un flacon contenant un anticorps « contrôle isotypique » conjugué au PECy5

**EXEMPLE 7. Kit de détection ou de quantification des éosinophiles ou des basophiles activés.**

On a préparé un kit répondant à la composition :

- un flacon contenant un anticorps anti-RIL-5 H17N conjugué à la phycoérythrine
- un flacon contenant un mélange d'anticorps :
  - Anti-CD3 conjugué au PECy5
  - Anti-CD16 conjugué au PECy5
  - Anti-CD19 conjugué au PECy5
- un flacon contenant un anticorps Anti-CD63 conjugué au FITC
- un flacon contenant un anticorps « contrôle isotypique » conjugué à la phycoérythrine
- un flacon contenant un anticorps « contrôle isotypique » conjugué au PECy5
- un flacon contenant un anticorps « contrôle isotypique » conjugué au FITC

**EXEMPLE 8. Kit de détection ou de quantification des éosinophiles ou des basophiles**

On a préparé un kit répondant à la composition :

- un flacon contenant un anticorps anti-RIL-5 H17N conjugué à la phycoérythrine
- un flacon contenant un mélange d'anticorps :
  - Anti-CD3 conjugué au PECy5
  - Anti-CD16 conjugué au PECy5
  - Anti-CD19 conjugué au PECy5
- un flacon contenant un anticorps « contrôle isotypique » conjugué au PECy5
- un flacon contenant du diacétate de dichlorofluorescéine

## REVENDICATIONS

1. Un procédé pour la détection ou la quantification des éosinophiles et des basophiles, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact d'un échantillon contenant éventuellement lesdits éosinophiles ou basophiles avec un anticorps monoclonal anti-récepteur de l'IL-5 (chaîne alpha) qui n'interfère pas avec la fixation de l'IL5 à son récepteur et qui n'inhibe pas l'activité biologique de l'IL-5 pour détecter et si désiré procéder à la quantification des éosinophiles et des basophiles.
2. Un procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'anticorps monoclonal anti-récepteur de l'IL-5 est un anticorps qui n'interfère pas avec les IgE
3. Un procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'anticorps monoclonal anti-récepteur de l'IL-5 est un anticorps qui n'interfère pas avec l'activation cellulaire des éosinophiles ou des basophiles.
4. Un procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la détection et si désiré la quantification des éosinophiles ou des basophiles utilise un cytomètre de flux ou à balayage optique.
5. Un procédé selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que en outre l'on met en contact l'échantillon avec d'autres anticorps monoclonaux dirigés contre d'autres marqueurs des types cellulaires éosinophile ou basophile.
6. Un procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que les autres anticorps monoclonaux sont dirigés contre les marqueurs CD3, CD16 et CD19.
7. Un procédé selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce que l'on procède à la détection ou la quantification des basophiles activés en mettant en outre en contact l'échantillon avec un ou plusieurs autres anticorps monoclonaux dirigés contre des marqueurs d'activation des basophiles.
8. Un procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que le marqueur d'activation est l'antigène CD 63.

9. Un procédé selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce que l'on procède à la détection ou la quantification des éosinophiles activés en mettant en outre en contact l'échantillon avec un ou plusieurs autres anticorps monoclonaux dirigés contre des marqueurs d'activation des éosinophiles.

5 10. Un procédé de détection et de quantification des éosinophiles activés selon la revendication 9 caractérisé en ce que le marqueur d'activation est l'antigène CD 69.

11. Un anticorps anti-RIL-5 caractérisé par :

- 10
- l'absence d'interférence avec la fixation de l'IL5 à son récepteur
  - l'absence d'interférence avec les IgE
  - l'absence d'interférence avec l'activation cellulaire des éosinophiles ou des basophiles
  - l'absence d'inhibition de l'activité biologique de l'IL-5.

15 12. Un kit pour la détection ou la quantification des éosinophiles et des basophiles contenant

- un anticorps monoclonal anti-RIL-5 selon la revendication 11 couplé à un premier fluorochrome,
- un mélange d'anticorps marqueurs des lymphocytes, monocytes et neutrophiles, couplés à un deuxième fluorochrome.

20 13. Un kit pour la détection et la quantification des éosinophiles et des basophiles activés contenant

- un anticorps monoclonal anti-RIL-5 selon la revendication 11 couplé à un premier fluorochrome,
- un mélange d'anticorps marqueurs des lymphocytes, monocytes et neutrophiles, couplés à un deuxième fluorochrome et
- des anticorps dirigés contre des marqueurs d'activation et couplés à un troisième fluorochrome.

14. Un kit pour la détection ou la quantification de l'activité oxydative des éosinophiles ou des basophiles contenant

- 30
- anticorps monoclonal anti-RIL-5 selon la revendication 11 couplé à un premier fluorochrome

- un mélange d'anticorps marqueurs des lymphocytes, monocytes et neutrophiles conjugués à un second fluorochrome

- un substrat marqueur de l'activité oxydative des éosinophiles ou des basophiles.

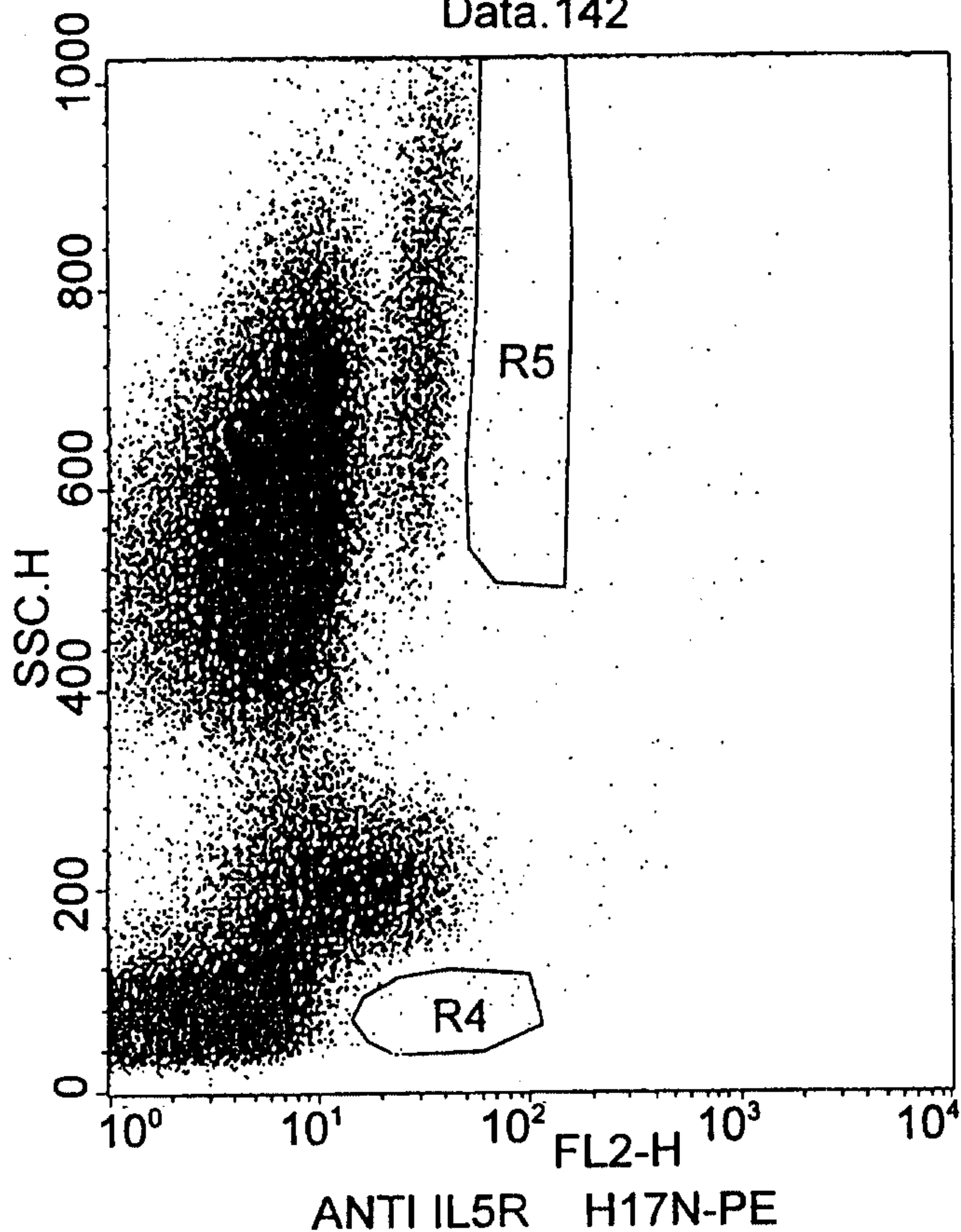
5           15 Un kit selon l'une des revendications 12 à 14 appliqué à l'étude de pathologies allergiques, parasitaires et leucémiques.

10           16. Un procédé, anticorps ou kit selon l'une des revendications 1 à 15 caractérisé en ce que l'anticorps monoclonal anti-récepteur de l'IL-5 est un anticorps de type IgG1 dont l'hybridome correspondant a été déposé à la Collection Nationale de Culture de Micro-organismes (CNCM) sous le N° I-2068.

1 / 9

ISOTYPIC CONTROL IgG1 PE

Data.142



Data.145

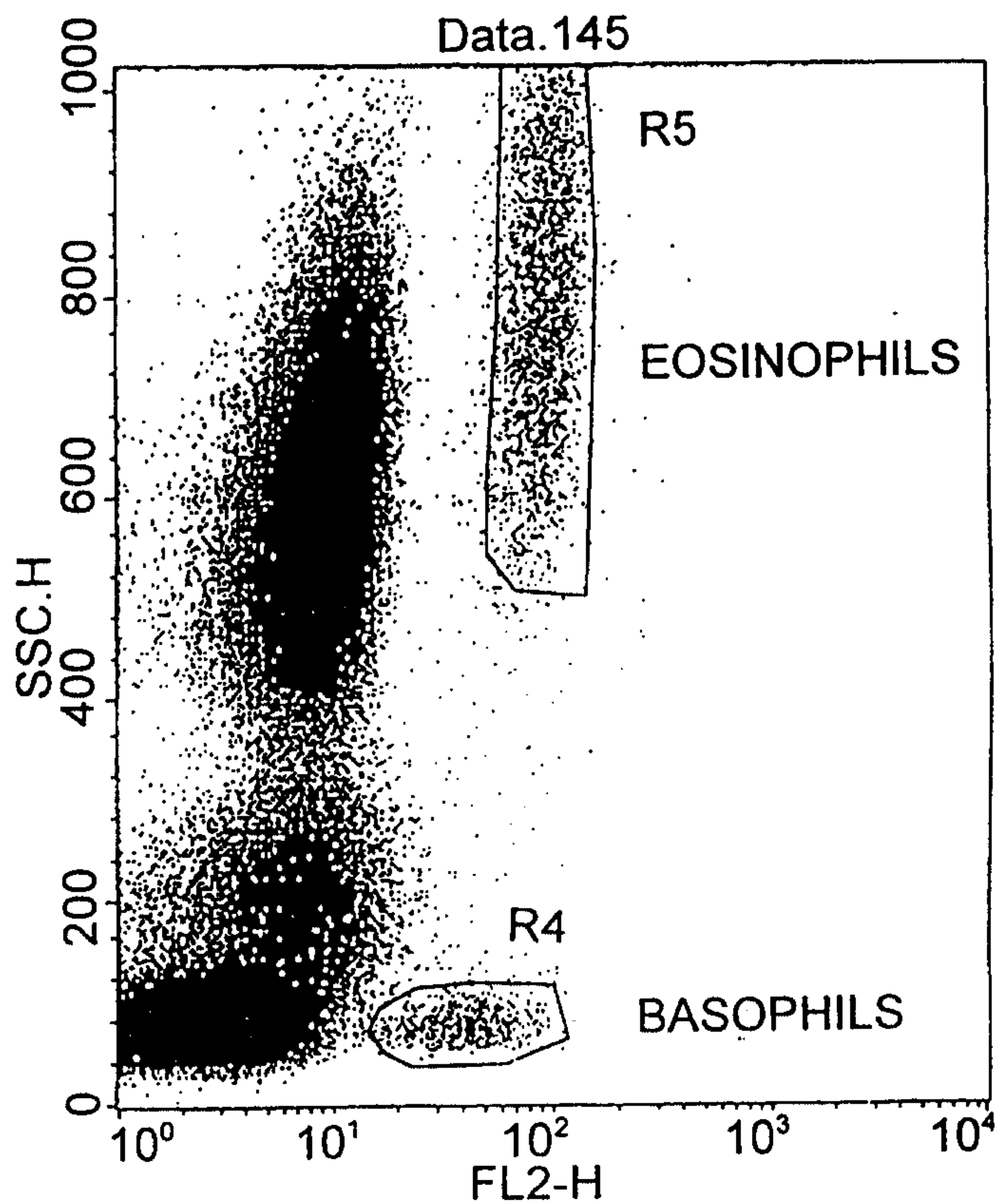


Fig. 1

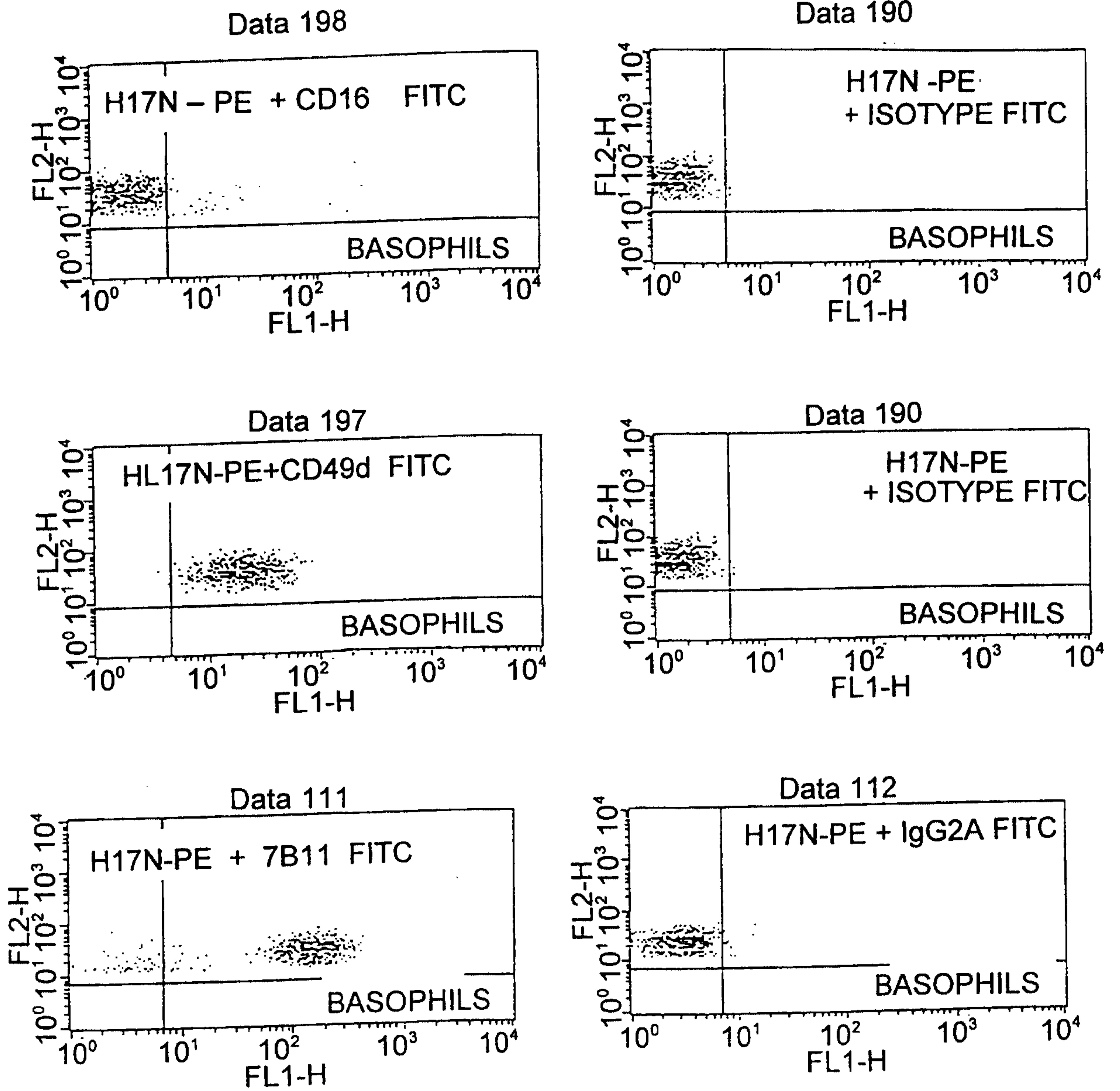


Fig. 2A

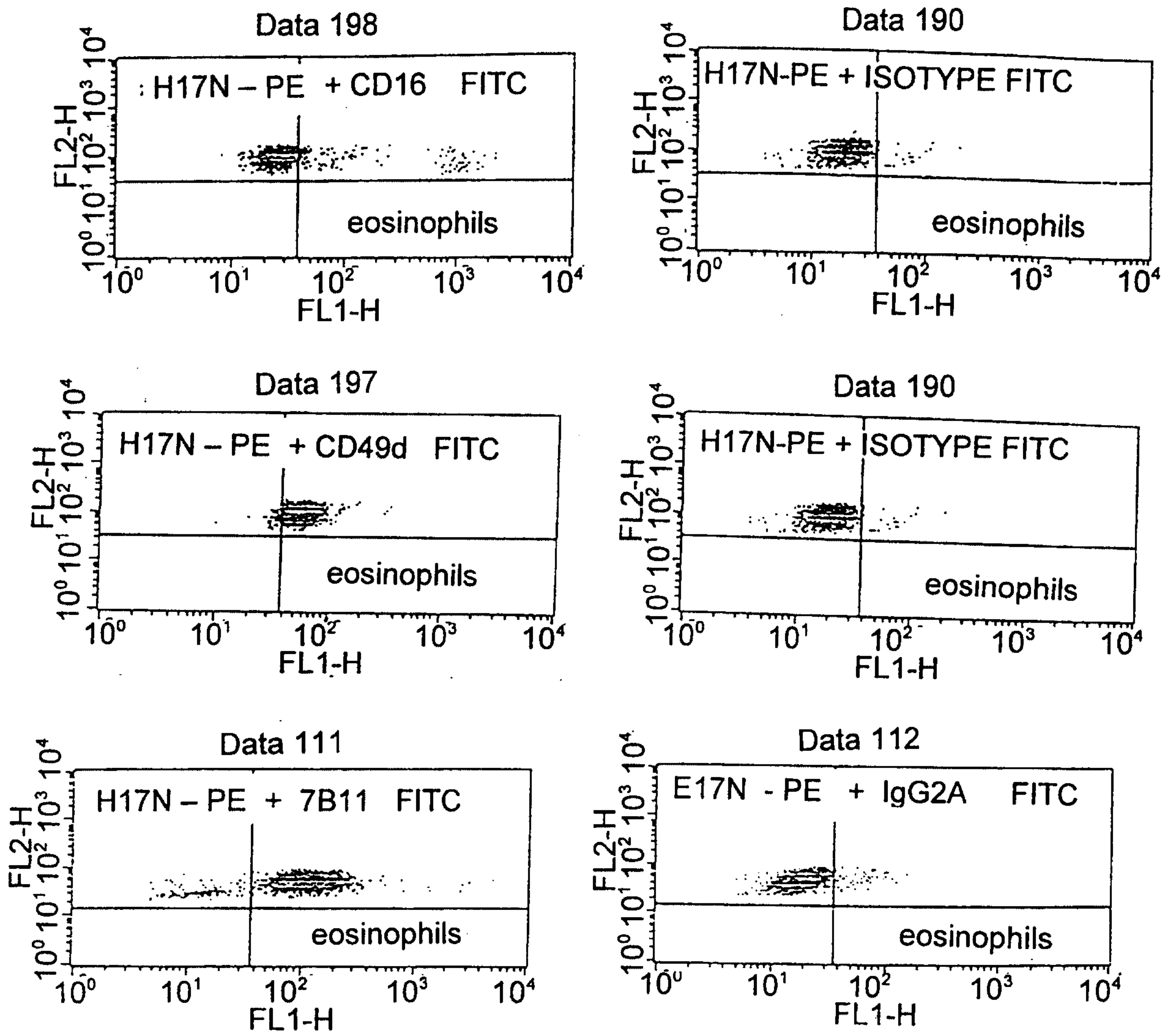


Fig. 2 B

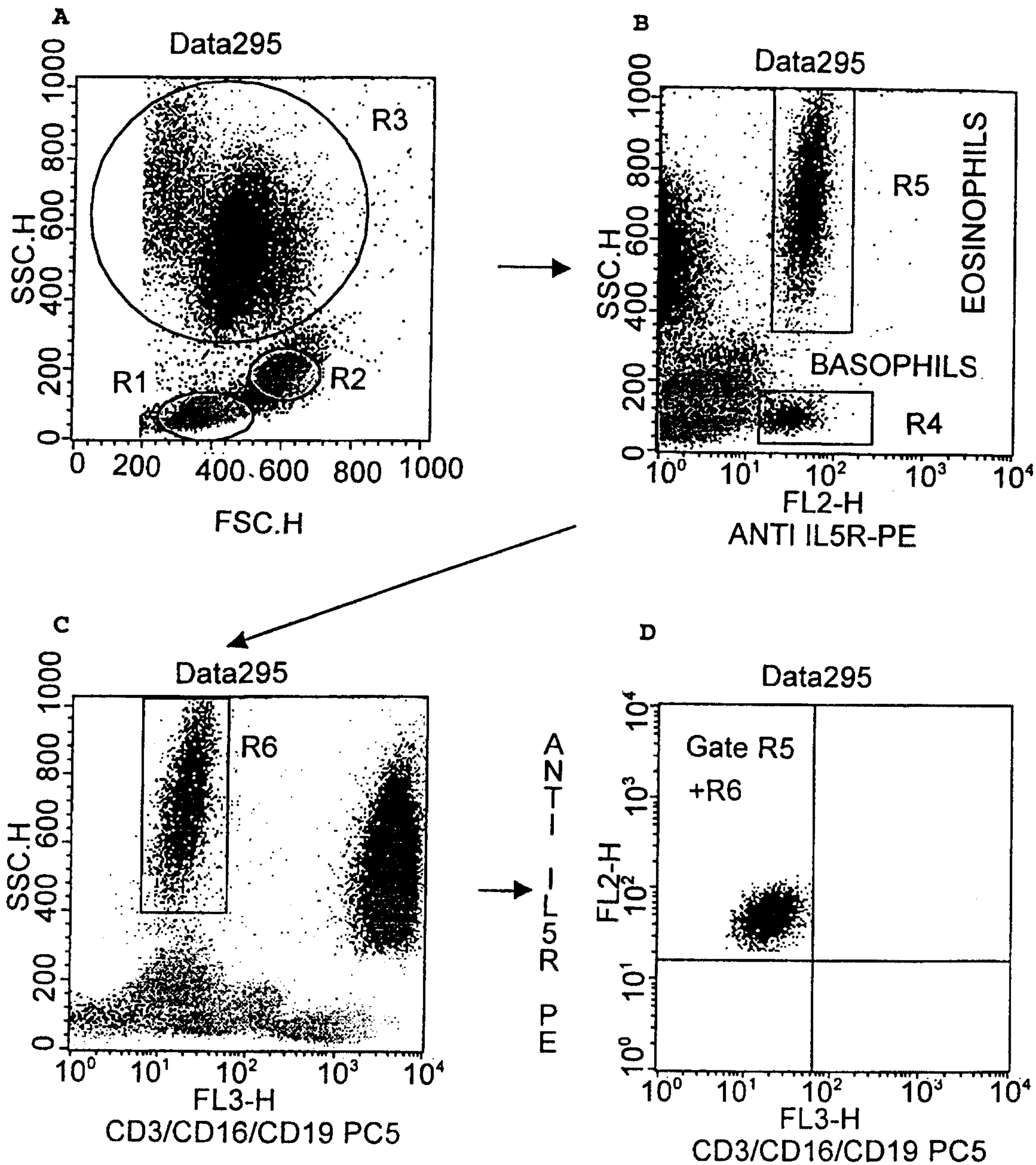


Fig. 3

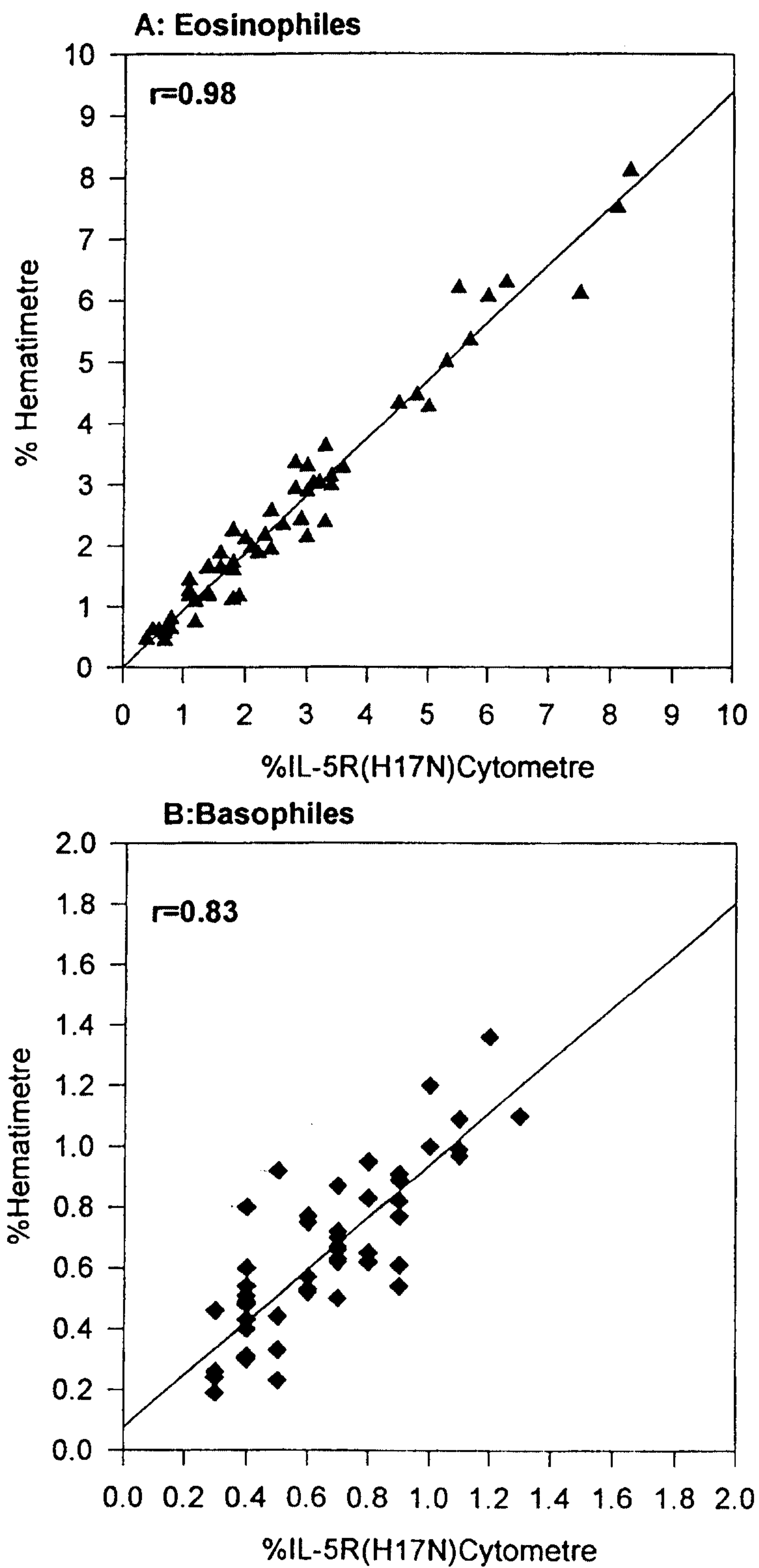


Fig. 4

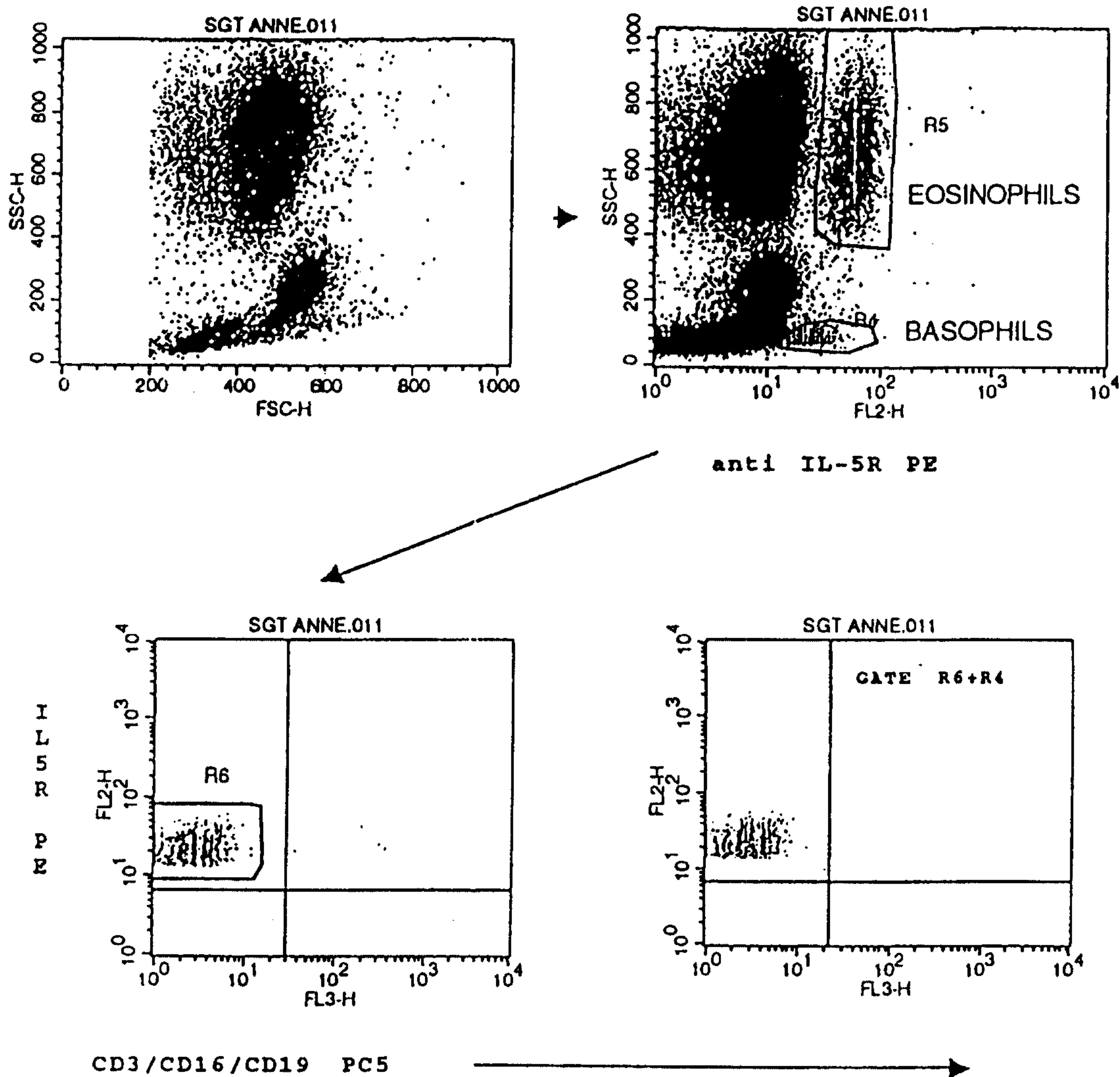


Fig. 5 A

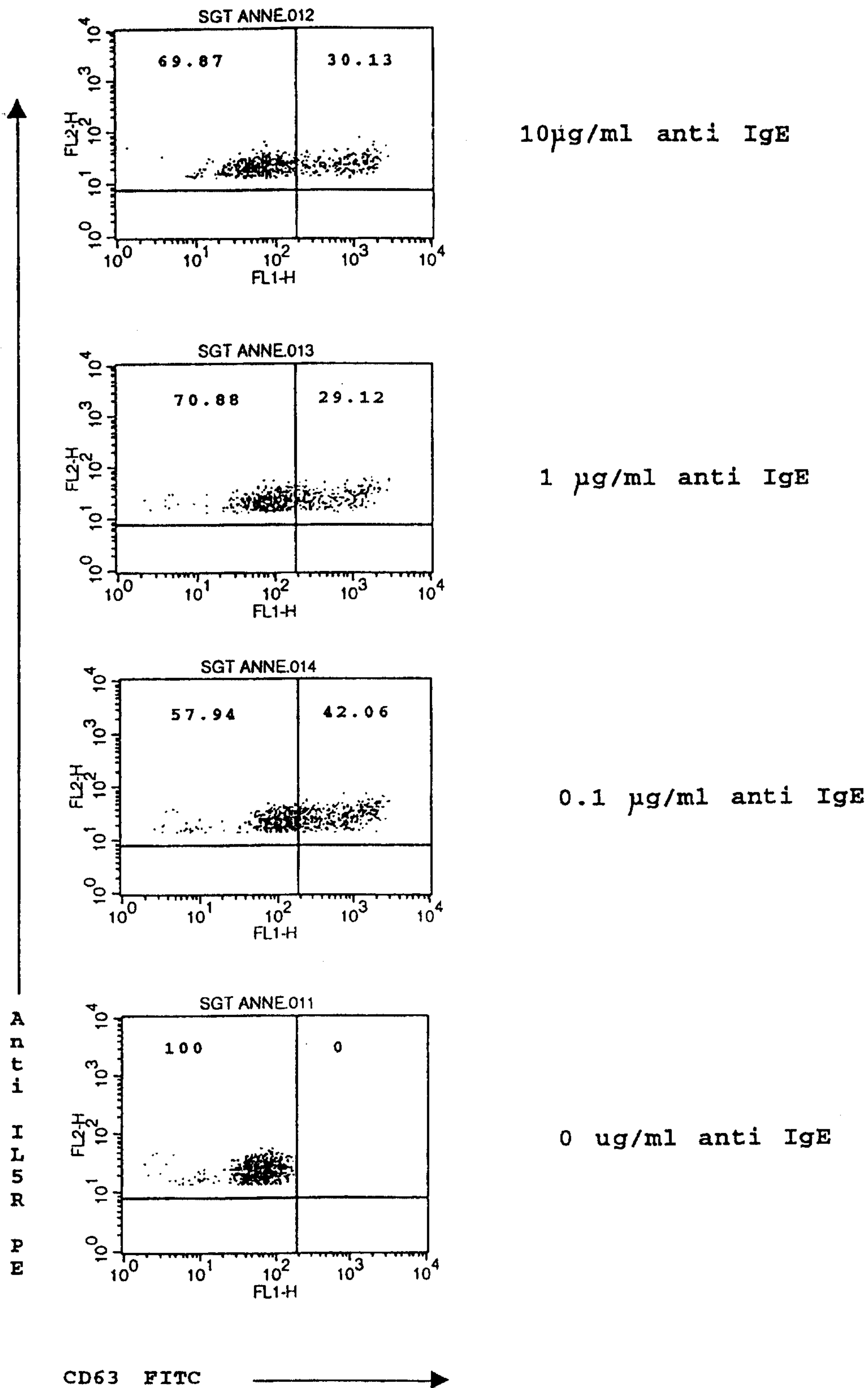


Fig. 5 B

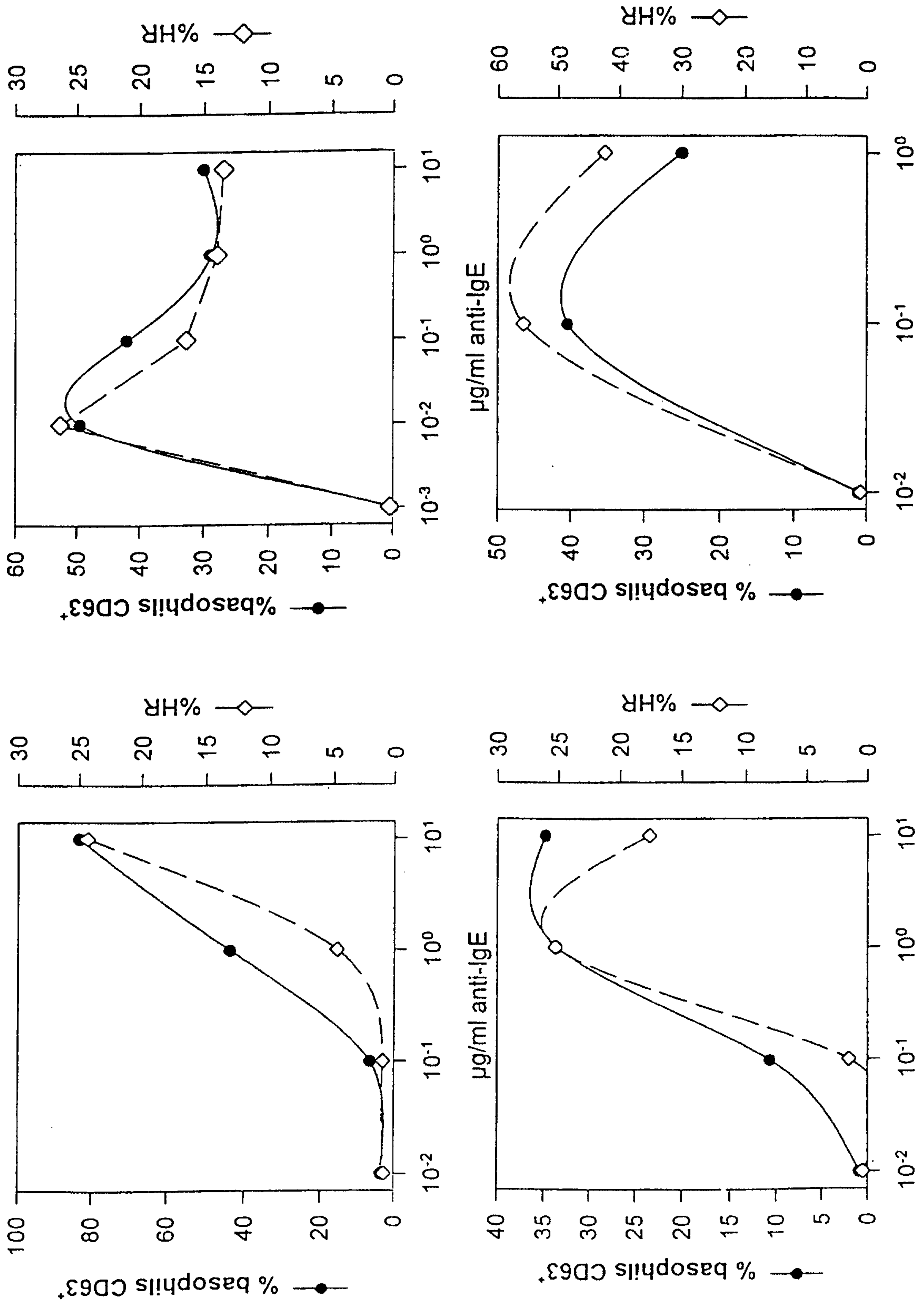


Fig. 6

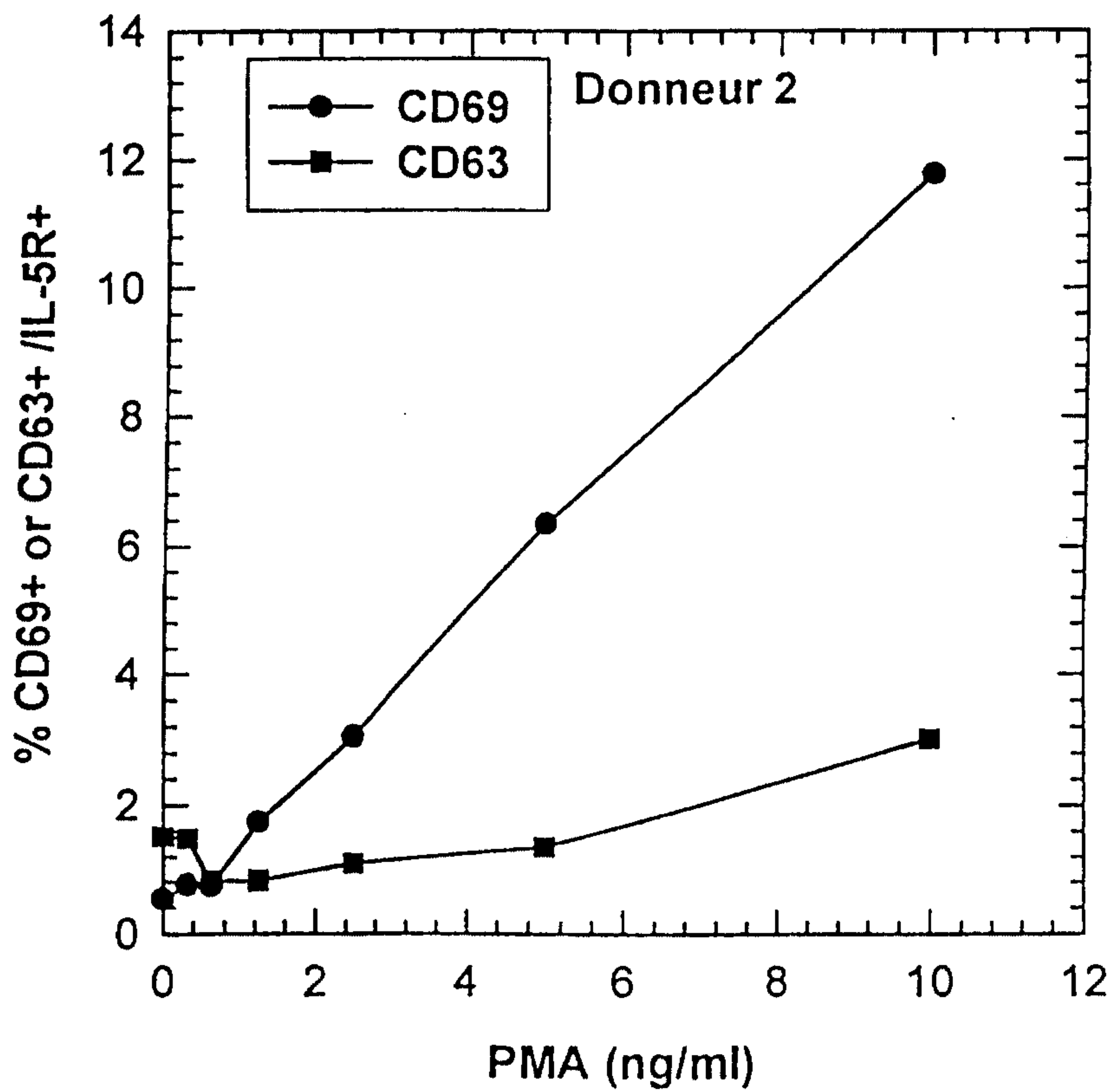
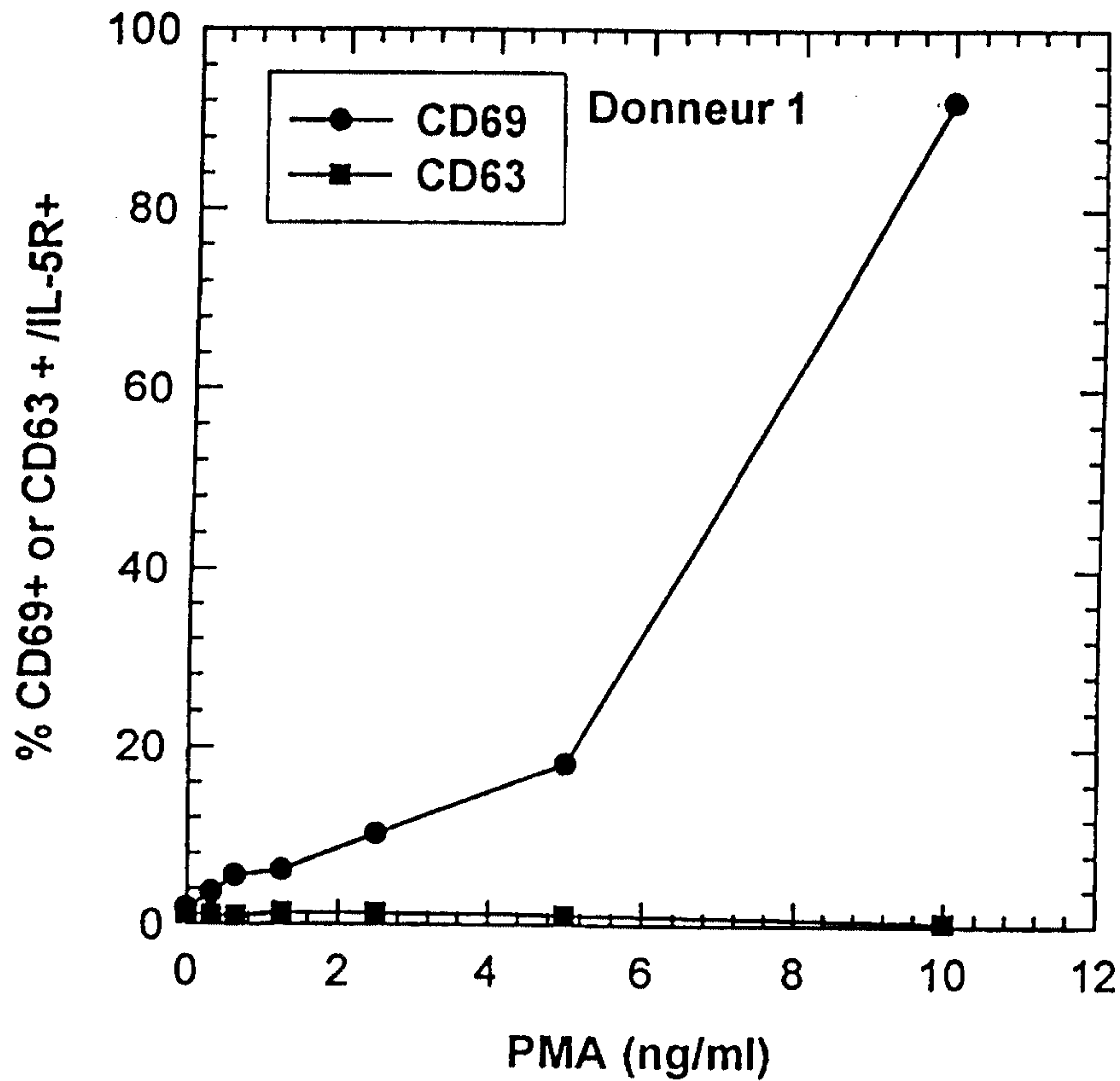
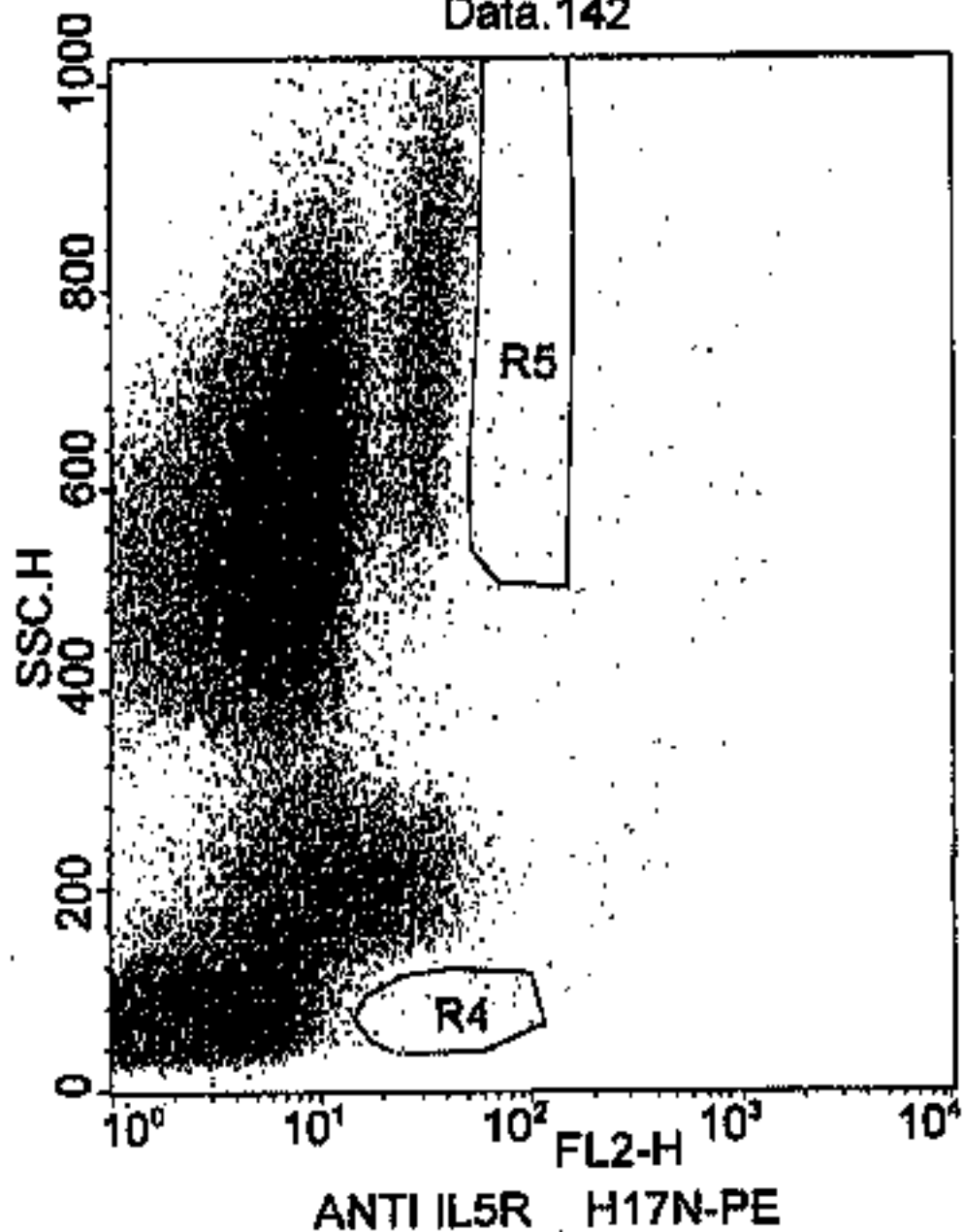


Fig. 7

ISOTYPIC CONTROL IgG1 PE

Data.142



Data.145

