

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle

Bureau international



(43) Date de la publication internationale
26 novembre 2009 (26.11.2009)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2009/141458 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C07K 16/18 (2006.01) G01N 33/564 (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01) C12P 21/00 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2009/056334

(22) Date de dépôt international :
25 mai 2009 (25.05.2009)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0853362 23 mai 2008 (23.05.2008) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
COVALAB [FR/FR]; 11 avenue Albert Einstein,
F-69100 Villeurbanne (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : EL
ALAOUI EL BALRHITI, Saïd [FR/FR]; 14 rue
Philippe Chat, F-69720 Saint Bonnet de Mure (FR).
CEYLAN, Ismaïl [FR/FR]; 180 rue Marcel Mérieux,
F-69007 Lyon (FR). THOMAS, Vincent [FR/FR]; 7 rue
du Jardin des Plantes, F-69001 Lyon (FR).

(74) Mandataire : CABINET PLASSERAUD; 52 rue de la
Victoire, F-75440 PARIS Cedex 09 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

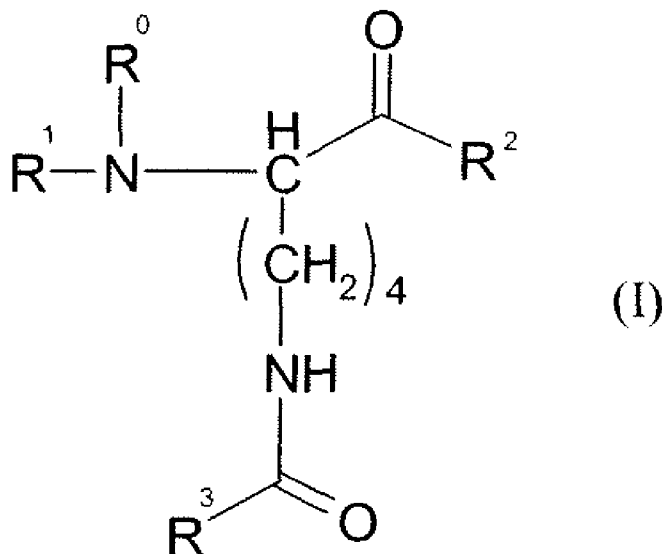
Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : ANTIBODY SPECIFIC FOR PROPIONYLATED/BUTYRYLATED LYSINE, METHOD FOR OBTAINING SAME AND USES THEREOF

(54) Titre : ANTICORPS SPECIFIQUE DE LA LYSINE PROPIONYLEE/BUTYRYLEE, SON PROCÉDE D'OBTENTION ET SES APPLICATIONS



(57) Abstract : The invention relates to a novel antibody or at least one functional fragment thereof, which is specific, comprising at least one lysyl unit of formula (I), in which R⁰ is H, an alkyl, an aryl, an alkylaryl or an aralkyl, R¹ is H, an alkyl, an aryl, an alkylaryl, an aralkyl, a sugar, a lipid, a nucleotide or an entity comprising at least one amino acid unit, wherein said amino acid unit is linked to the lysyl unit by a peptide bond, R² is OH, an alkyl, an aryl, an alkylaryl, an aralkyl, a sugar, a lipid, a nucleotide or an entity comprising at least one amino acid unit, wherein said amino acid unit is linked to the lysyl unit by a peptide bond, or OR⁴ where R⁴ is an alkyl, an aryl, a sugar or a lipid, and R³ is (CH₂)_n-CH₃ where n is 1 or 2. The invention also relates to a method for producing this novel antibody and to a composition containing same. In addition, for uses in research, diagnosis and therapeutics, the invention relates to methods and kits for detection of the epitopes of formula (I) and of autoantibodies which recognize said epitopes of formula (I).

(57) Abrégé :

[Suite sur la page suivante]



WO 2009/141458 A1



-
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h))

L'invention concerne un nouvel anticorps ou au moins l'un de ses fragments fonctionnels spécifique comprenant au moins un motif lysyl de formule (I), dans laquelle R^0 équivaut à H, un alkyle, un aryle, un alkylaryle ou un aralkyle, R^1 équivaut à H, un alkyle, un aryle, un alkylaryle, un aralkyle, un sucre, un lipide, un nucléotide ou une entité constituée d'au moins un motif acide aminé, ledit motif acide aminé étant relié au motif lysyl par une liaison peptidique, R^2 équivaut à OH, un alkyle, un aryle, un alkylaryle, un aralkyle, un sucre, un lipide, un nucléotide ou une entité constituée d'au moins un motif acide aminé, ledit motif acide aminé étant relié au motif lysyl par une liaison peptidique, ou OR^4 où R^4 est un alkyle, un aryle, un sucre, un lipide, R^3 équivaut à $(CH_2)_n-CH_3$ où n vaut 1 ou 2. L'invention concerne également un procédé de fabrication de ce nouvel anticorps et une composition le renfermant. En outre, pour des utilisations en recherche, diagnostic et thérapeutique, l'invention concerne des procédés et nécessaires de détections des épitopes de formule (I) et d'auto-anticorps reconnaissant lesdits épitopes de formule (I).

ANTICORPS SPECIFIQUE DE LA LYSINE PROPIONYLEE/BUTYRYLEE, SON PROCEDURE D'OBTENTION ET SES APPLICATIONS

Domaine technique de l'invention :

5

La présente invention concerne le domaine des modifications des protéines appelées modifications post-traductionnelles et en particulier, le domaine des protéines portant des radicaux acyles. Plus précisément, l'invention porte sur de nouveaux anticorps spécifiques à ces protéines portant des radicaux acyles (en particulier des radicaux propionyle et butyryle) ainsi que sur leur procédé d'obtention et leurs applications.

10

Art antérieur et problème technique :

Transcription et traduction sont des mécanismes piliers pour les cellules et les modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles ont des impacts fondamentaux dans le fonctionnement cellulaire. Les protéines restant à leur état natif et les protéines ayant subi ces modifications chimiques post-traductionnelles montrent de grandes différences tant au niveau de leurs localisations cellulaires, de leurs demi-vies, de leurs propriétés physico-chimiques ainsi que de leurs actions intra ou intercellulaires. Ainsi, la connaissance et la compréhension des mécanismes régulant ces modifications peuvent s'avérer fort intéressantes dans les domaines non seulement de la recherche fondamentale mais aussi et surtout le domaine thérapeutique. Il est donc indispensable pour cela de disposer d'outils maîtrisés pour identifier, détecter, localiser voire quantifier et induire ou éviter ces modifications.

15

La demande de brevet US 2008/0241862 (Zhao et al.) décrit des moyens d'identifier les lysines propionylées et butyrylées dans les protéines. Ces moyens d'identification sont des anticorps polyclonaux qui reconnaissent spécifiquement des lysines acétylées et reconnaissent par réaction croisée, des lysines propionylées et des lysines butyrylées du fait de leur structure proche. Des anticorps spécifiques des lysines propionylées ou butyrylées sont obtenus par purification en utilisant des techniques longues et coûteuses d'épuisement. .

20

Aussi, il apparaît donc nécessaire de fournir des moyens et méthodes de détection mis en œuvre plus facilement et directement, fiables, sensibles, reproductibles et de trouver des outils d'identification/ localisation de ces modifications (propionylation et/ou butyrylation de motif lysyls) permettant également d'améliorer la recherche, le diagnostic, le suivi, le pronostic et le traitement des pathologies y étant associées. Aussi, l'inventeur a-t-il développé des anticorps monoclonaux capables de reconnaître et de se lier spécifiquement

25

30

35

R^1 équivaut à H, un alkyle, un aryle, un alkylaryle, un aralkyle, un sucre, un lipide, un nucléotide ou une entité constituée d'au moins un motif acide aminé, ledit motif acide aminé étant relié au motif lysyl par une liaison peptidique,

R^2 équivaut à OH, un alkyle, un aryle, un alkylaryle, un aralkyle, un sucre, un lipide, un nucléotide, une entité constituée d'au moins un motif acide aminé, ledit motif acide aminé étant relié au motif lysyl par une liaison peptidique, ou OR^4 où R^4 est un alkyle, un aryle, un sucre, un lipide,

R^3 équivaut à $-(CH_2)_n-CH_3$ où n vaut 1 ou 2.

Ces anticorps ne sont pas spécifiques d'un épitope contenant au moins un motif lysyl de formule (I) dans laquelle R^0 , R^1 , R^2 sont tels que définis ci-dessus et R^3 équivaut à $-CH_3$.

La présente invention concerne également un procédé de fabrication desdits anticorps ou de l'un de leurs fragments fonctionnels consistant, en premier lieu, à fabriquer un synthon de formule (I) ci-dessus, puis à utiliser ce synthon, en tant qu'épitope antigénique pour permettre la production des anticorps grâce à au moins une injection d'au moins cet épitope à un animal approprié.

La présente invention concerne également une composition comportant des anticorps ou des fragments fonctionnels des anticorps selon la présente invention, ladite composition pouvant être utilisée dans au moins l'une des applications suivantes : recherche, diagnostic, analyse, pronostic de pathologie, thérapeutique, test d'efficacité ou de toxicité d'un médicament.

La présente invention concerne également un procédé et un nécessaire de détection des molécules contenant au moins l'épitope de formule (I), dans un échantillon biologique, in vitro ou in vivo.

La présente invention concerne également un procédé et un nécessaire de détection des auto-anticorps dirigés contre l'épitope de formule (I) dans un échantillon biologique ou in vivo.

Description détaillée de l'invention :

L'anticorps

Pour détecter des modifications moléculaires comme les modifications post-traductionnelles in vitro et in vivo, comprendre leurs implications cellulaires et éventuellement avoir un effet sur elles particulièrement dans le cadre thérapeutique de pathologies induites par ces modifications, il est particulièrement intéressant de disposer d'outils spécifiques, aptes à reconnaître des cibles précises directement. C'est pourquoi, il est du mérite de l'inventeur d'avoir développé des anticorps isolés ou au moins des fragments fonctionnels de ceux-ci,

Par « spécifique », on entend par exemple que les anticorps sont aptes à reconnaître et à se lier à un épitope donné, à savoir l'épitope comprenant au moins un motif lysyl de formule (I), via leur paratope selon les principes connus de l'immunologie. En particulier, les anticorps selon la présente invention sont par exemple aptes à reconnaître et se lier à un épitope comprenant au moins un motif lysyl propionylé ou butyrylé mais ne sont pas aptes par exemple à reconnaître et se lier de manière spécifique à un épitope comprenant au moins un motif lysyl acétylé. En effet, l'antigène reconnu est défini par son épitope particulier et ceci selon la structure ou la conformation de celui-ci.

Dans la présente demande, le terme « épitope » désigne par exemple une molécule ou une région de celle-ci qui peut être reconnue par la partie de reconnaissance spécifique d'un anticorps (le paratope). Un antigène est caractérisé par ses épitopes. Il s'agit donc dans la présente demande d'une molécule contenant au moins un motif lysyl de formule (I) tel que défini ci-dessus.

Par « peptide » formant l'épitope pour la génération d'anticorps spécifiques selon l'invention, on entend par exemple un peptide comprenant au moins un motif lysyl substitué par un radical propionyl et/ou butyryl, et plus précisément une séquence peptidique comprenant entre 2 et 50 acides aminés, au moins l'un des acides aminés étant un motif lysyl substitué par un radical propionyl et/ou butyryl. On préférera une séquence peptidique de 2 à 25 acides aminés et tout particulièrement de 2 à 15 acides aminés.

Par « protéine » formant l'épitope pour la génération d'anticorps spécifiques selon la présente invention, on entend par exemple une protéine immunogène comprenant au moins un motif lysyl substitué par un radical propionyl et/ou butyryl, et plus précisément une séquence peptidique supérieure à 50 acides aminés, au moins l'un desdits acides aminés étant un motif lysyl substitué par un radical propionyl et/ou butyryl. De préférence, ladite protéine a un poids moléculaire de 5 kDaltons à 100 kDaltons et plus particulièrement un poids moléculaire entre 5 à 20 kDa.

On peut citer par exemple les protéines comme p53 ou les histones et plus particulièrement les histones H3, H4, H2A et H2B. Plus particulièrement, l'histone H3 humaine, de poids moléculaire d'environ 15kDa, peut être propionylée et/ou butyrylée sur les lysines en position 4, 9, 14, 18, 23,...et en général sur au moins une lysine (représentée par K). On peut citer également l'histone H4 humaine de poids moléculaire d'environ 11 kDa dont au moins une lysine en position 5, 8, 12, 16, 20,.. peut être propionylée et/ou butyrylée. De même pour l'histone H2B humaine de poids moléculaire d'environ 14 kDa peut être propionylée et/ou butyrylée sur les lysines en position 5, 11, 12, 15, 16,.. ainsi que l'histone H2A humaine de poids moléculaire d'environ 14 kDa peut être propionylée et/ou butyrylée sur les lysines 5, 9, 13, 15,..

Ces lysines propionylées et/ou butyrylées répondent à la formule (I) ci-dessus et peuvent représenter ainsi des antigènes induisant la formation et la reconnaissance spécifique des anticorps selon l'invention.

- 5 Selon un mode particulier de réalisation de la présente invention, dans la formule (I) ci-dessus, le radical R^0 de l'épitope reconnu par l'anticorps est un H.
Selon un autre mode particulier de réalisation de la présente invention, R^0 est un alkyle choisi parmi les alkyles linéaires, ramifiés ou cycliques, substitués ou non par un hétéroatome et comportant de 1 à 20 atomes de carbone.
- 10 Selon encore un autre mode particulier de réalisation de la présente invention, R^0 est un aryle choisi parmi les aryles substitués ou non par un hétéroatome et comportant 3 à 20 atomes de carbone.
 R^0 peut également être un aralkyle substitué ou non par un hétéroatome et comportant 4 à 20 atomes de carbone, un alkylaryle substitué ou non par un hétéroatome et comportant 4 à 20
- 15 atomes de carbone.
Selon un mode particulier de réalisation de la présente invention, le radical R^1 de l'épitope reconnu par l'anticorps est un H.
Selon un autre mode particulier de réalisation de la présente invention, R^1 est un alkyle choisi parmi les alkyles linéaires, ramifiés ou cycliques, substitués ou non par un hétéroatome et
- 20 comportant de 1 à 20 atomes de carbone.
 R^1 est un aryle choisi parmi les aryles substitués ou non par un hétéroatome et comportant 3 à 20 atomes de carbone.
 R^1 peut également être un aralkyle substitué ou non par un hétéroatome et comportant 4 à 20 atomes de carbone, un alkylaryle substitué ou non par un hétéroatome et comportant 4 à 20
- 25 atomes de carbone.
Dans un autre mode particulier de l'invention, R^1 est un sucre choisi parmi les restes saccharide, monosaccharide, disaccharide (saccharose, maltose e.g.) ou polysaccharide hydrogéné ou non, et leurs mélanges.
Dans un autre mode particulier de l'invention, R^1 est un lipide choisi parmi les acides gras,
- 30 leurs dérivés et leurs esters.
Dans un mode particulier de réalisation de l'invention, R^1 peut être un nucléotide choisi parmi les nucléotides connus.
Dans un autre mode particulier de réalisation de l'invention, R^1 est une entité constituée d'au moins un acide aminé lequel forme, via son extrémité C terminale, une liaison peptidique
- 35 avec le motif lysyl. Il peut ainsi s'agir par exemple d'un acide aminé simple, d'un peptide, de préférence un peptide contenu dans la séquence d'une histone et plus particulièrement les histones H3, H4 ou H2A, d'une protéine, de préférence une protéine histone et plus particulièrement les histones H3, H4 ou H2A, d'une glycoprotéine, d'une lipoprotéine...

L'acide aminé impliqué dans la liaison peptidique avec le motif lysyl est peut être n'importe quel acide aminé choisi parmi les 22 acides aminés connus. Au moins un acide aminé est un acide aminé naturel ou non naturel, D ou L.

- 5 Selon un mode particulier de réalisation de la présente invention, le radical R^2 de l'épitope reconnu par l'anticorps est un OH.
Selon un autre mode particulier de réalisation de la présente invention, R^2 est un alkyle choisi parmi les alkyles linéaires, ramifiés ou cycliques, substitués ou non par un hétéroatome et comportant de 1 à de 1 à 20 atomes de carbone.
- 10 Selon encore un autre mode particulier de réalisation de la présente invention, R^2 est un aryle choisi parmi les aryles substitués ou non par un hétéroatome et comportant 3 à 20 atomes de carbone
 R^2 peut également être un aralkyle substitué ou non par un hétéroatome et comportant 4 à 20 atomes de carbone, un alkylaryle substitué ou non par un hétéroatome et comportant 4 à 20
- 15 atomes de carbone.
Dans un autre mode particulier de l'invention, R^2 est un sucre choisi parmi les restes saccharide, monosaccharide, disaccharide (saccharose, maltose e.g.) ou polysaccharide hydrogéné ou non, et leurs mélanges.
Dans un autre mode particulier de l'invention, R^2 est un lipide choisi parmi les acides gras,
- 20 leurs dérivés et leurs esters.
Dans un mode particulier de réalisation de l'invention, R^2 peut être un nucléotide choisi parmi les nucléotides connus.
Dans un autre mode particulier de réalisation de l'invention, R^2 est une entité constituée d'au moins un acide aminé lequel forme, via son extrémité N terminale, une liaison peptidique
- 25 avec le motif lysyl. Il peut ainsi s'agir par exemple d'un acide aminé simple, d'un peptide, de préférence un peptide contenu dans la séquence d'une histone et plus particulièrement les histones H3, H4, H2A ou H2B, d'une protéine, de préférence une protéine histone et plus particulièrement les histones H3, H4, H2A ou H2B, d'une glycoprotéine.... L'acide aminé impliqué dans la liaison peptidique avec le motif lysyl est peut être n'importe quel acide
- 30 aminé choisi parmi les 22 acides aminés connus dont au moins un acide aminé est un acide aminé naturel ou non naturel, D ou L.
Dans un mode particulier de réalisation de l'invention, R^2 équivaut à OR^4 où R^4 est un alkyle, un aryle, un sucre, un lipide tel que défini et/ou exemplifié ci-dessus.
- 35 L'épitope contient au moins un site propionylé ou butyrylé. En effet, selon un mode particulier de réalisation de la présente invention, le radical R^3 de l'épitope reconnu par l'anticorps selon l'invention est un radical $-(CH_2)_n-CH_3$ où n vaut 1 ou 2. Lorsque n correspond à 1, l'unité lysyl est substituée par un acide propionique. Par convention dans la

présente demande, on pourra parler alors de résidu propionyl lié au motif lysyl, ainsi l'épitope de formule (I) selon la présente invention contient un motif lysyl propionylé. Lorsque n correspond à 2, l'unité lysyl est substituée par un acide butyrique (ou par convention un butyryl) formant ainsi un épitope de formule (I) contenant un motif lysyl butyrylé.

5

Comme on le comprend de la présente formule (I) et de l'exposé ci-dessus, l'épitope reconnu spécifiquement par les anticorps, ou au moins l'un de leurs fragments fonctionnels, selon la présente invention, peut être constitué d'un simple acide aminé substitué, à savoir la lysine substituée par un radical propionyl ($n=1$) ou un radical butyryl ($n=2$), c'est le cas où R^0 , R^1 10 sont des H et R^2 est un OH mais R^0 , R^1 et R^2 de cet épitope peuvent être identiques ou différents. Ainsi, l'épitope peut être constitué d'une molécule faite d'au moins deux acides aminés dont l'un est une lysine propionylée ou butyrylée, d'un peptide tel que la séquence N terminale des histones, d'une protéine telle qu'une histone, une glycoprotéine ou toute autre molécule contenant au moins un motif lysyl substituée par R^3 tel que défini ci-dessus. Ces 15 protéines peuvent être des protéines naturelles, cellulaires, tissulaires ou plasmatiques, ou des protéines réalisées artificiellement, des protéines recombinantes produites par génie génétique. Elles sont de préférence des protéines histones et tout particulièrement les histones H3, H4, H2A et H2B. De façon préférentielle, l'épitope de formule (I) correspond à un polypeptide d'une centaine d'acides aminés.

20 Dans la forme de réalisation préférée de l'invention, R^0 correspond à H et R^1 et R^2 correspondent à des acides aminés quelconques identiques ou différents.

Lorsque R^3 est différent de $-(CH_2)_n-CH_3$ où n vaut 1 ou 2, les anticorps selon l'invention ne se lient pas à la molécule de façon spécifique. Ceci est particulièrement le cas, lorsque R^3 est un acétyl.

25

Dans un mode préféré de l'invention, on utilise des peptides riches en lysine pour générer l'anticorps. Il est connu de l'homme de l'art qu'un site antigénique contient généralement 5 à 20 acides aminés mais selon un mode préféré de l'invention l'épitope antigénique spécifique reconnu par l'anticorps peut contenir un nombre inférieur d'acides aminés, 30 c'est-à-dire de un seul acide aminé, la lysine substituée par un radical propionyl ou butyryl elle-même, à 5 acides aminés sans se limiter à ce nombre. En effet, l'épitope peut contenir jusqu'à 10 acides aminés et de préférence 5 acides aminés.

Dans sa forme préférée, le motif lysyl substitué par un radical propionyl ou butyryl est placé de façon la plus centrale possible au sein dudit site antigénique générant l'anticorps 35 selon l'invention.

Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, le peptide ou la protéine comprenant un épitope de formule (I), contient plusieurs lysines propionylées et/ou butyrylées. Ces

peptides sont réalisés par des méthodes classiques de synthèse peptidiques connues de l'homme de l'art.

Ainsi, par le biais de ces anticorps, l'état de la propionylation et/ou butyrylation des protéines cellulaires impliquées dans les métabolismes et les fonctions cellulaires peut être déterminé, caractérisé et quantifié. En effet, l'outil anticorps selon la présente invention permet une
5 détection qualitative mais également quantitative des molécules portant l'épitope de formule (I) dans des échantillons biologiques, in vitro et in vivo. De plus, on peut obtenir une localisation cellulaire des molécules, de préférence les protéines contenant ledit épitope de
10 formule (I) reconnu de façon spécifique par les anticorps selon la présente invention ainsi qu'une localisation de cet épitope de formule (I) lui-même dans une molécule particulière, de préférence une protéine. Ceci est particulièrement important dans la compréhension de mécanismes cellulaires et par conséquent dans le traitement de pathologies impliquant la propionylation/butyrylation des molécules, de préférence protéines et particulièrement la propionylation de la lysine, telles que le cancer, les maladies neurodégénératives, le diabète et
15 l'inflammation.

Les anticorps selon la présente invention peuvent être présents in vivo et générés soit :

- naturellement dans l'organisme, lors de processus pathologiques, il s'agit alors des auto-anticorps exposés plus bas,
20 - artificiellement, c'est-à-dire par activation volontaire du système immunitaire d'un organisme donné via l'introduction d'un antigène comportant ledit épitope de formule (I). Ainsi l'organisme concerné produit des anticorps spécifiques de l'épitope, reconnu comme non-soi.

25 Les anticorps selon la présente invention peuvent être définis par leur immunoréactivité vis-à-vis d'épitopes choisis dans le groupe comprenant :

- i. les épitopes comprenant au moins un résidu lysyl acétylé ($n=0$ dans la définition de R^3 de la formule (I));
- ii. les épitopes comprenant au moins un résidu lysyl propionylé ($n=1$ dans la définition
30 de R^3 de la formule (I));
- iii. les épitopes comprenant au moins un résidu lysyl butyrylé ($n=2$ dans la définition de R^3 de la formule (I)).

Conformément à la présente invention cette immunoréactivité est reflétée par un test T de
35 mesure de l'immuno-réactivité de sérums contenant les épitopes (i) et/ou (ii) et/ou (iii). Ce test T est défini e.g. comme suit :

- adsorber, sur une plaque 96 puits en polystyrène (EIA/RIA, High Binding, Corning Costar), 100 µl par puits d'une solution d'antigènes (BSA-propionylée, BSA butyrylée, BSA acétylée) à 10µg/ml en tampon bicarbonate 0,1 M pH 9,5,
- incuber pendant 2 heures à 37°C,
- 5 - vider les puits et déposer 150 µl/puits d'une solution de BSA 0.5% dans du tampon PBS pour saturer les sites d'adsorption excédentaires sur le plastique, et laisser incubé une heure à 37°C,
- déposer les sérums aux dilutions indiquées en tampon PBS contenant du tween-20 à 0.1%. Ces solutions sont déposées puis diluées de deux en deux directement sur la plaque
- 10 (1/500, 1/1000, 1/2000 ...) de façon à obtenir 100 µl/ puits de volume final,
- incubé une heure à 37°C, puis laver 3 fois avec du PBS tween,
- ajouter 100µl/puits d'un anticorps de mouton anti IgG (H+L) de lapin marqué à la peroxydase et laisser 30 min. à 37°C,
- laver 3 fois successivement pour éliminer l'excédent de réactif,
- 15 -révéler l'activité peroxydase en utilisant le réactif eau oxygénée/tetraméthylbenzidine (TMB) (Covalab),
- stopper la réaction avec 100µl de H₂ SO₄ (2N),
- mesurer à 450 nm l'absorbance sur lecteur de plaque (Multiskan Ascent, Labsystems).

Le test T est un test ELISA.

20

La présente invention couvre également les anticorps ou au moins l'un de leurs fragments fonctionnels spécifiques d'un épitope contenant au moins un motif lysyl de formule (I) telle que définie précédemment, caractérisés en ce que leur immuno-réactivité pour les antigènes BSA-propionylée ou BSA-butyrylée, mesurée dans un test T défini précédemment, est telle

25 qu'elle répond à au moins l'une des caractéristiques suivantes :

- pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/500, la DO à 450 nm est ≥ 1 , de préférence est $\geq 1,5$;
- pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/1000, la DO à 450 nm est $\geq 0,5$, de préférence est $\geq 0,9$;
- 30 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/2000, la DO à 450 nm est $\geq 0,5$, de préférence est $\geq 0,6$;
- pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/4000, la DO à 450 nm est $\geq 0,2$, de préférence est $\geq 0,3$;
- pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/8000, la DO à 450 nm est \geq
- 35 0,2, de préférence est $\geq 0,25$.

La présente invention concerne également des anticorps ou au moins l'un de leurs fragments fonctionnels tels que définis ci-dessus, caractérisés

- en ce que leur immuno-réactivité pour les antigènes BSA-propionylée, mesurée dans un test T, est telle qu'elle répond à au moins l'une des caractéristiques suivantes :
 - 5 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/500, la DO à 450 nm est supérieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,6; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 2,7 ;
 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/1000, la DO à 450 nm est supérieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,3; 0,6 ; 0,8 ; 1,0 ;
10 1,5 ; 2,0 ; 2,2 ;
 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/2000, la DO à 450 nm est supérieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,25 ; 0,4 ; 0,6 ; 1,0 ;
 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/4000, la DO à 450 nm est supérieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ;
15 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/8000, la DO à 450 nm est supérieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,2 ; 0,4 ;
 - et en ce que leur immuno-réactivité pour les antigènes BSA-acétylés, mesurée dans un test T, est telle qu'elle répond à au moins l'une des caractéristiques suivantes :
 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/500, la DO à 450 nm est
20 inférieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 1,5; 1,0; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6 ;
 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/1000, la DO à 450 nm est inférieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 1,2; 1,0; 0,9; 0,8; 0,5; 0,4 ;
 - 25 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/2000, la DO à 450 nm est inférieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 1,0; 0,8; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3 ;
 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/4000, la DO à 450 nm est inférieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,8; 0,6; 0,7; 0,5; 0,3;
30 0,2 ;
 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/8000, la DO à 450 nm est inférieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,7, 0,6; 0,5; 0,4; 0,25; 0,15.
- 35 La présente invention concerne des anticorps ou au moins l'un de leurs fragments fonctionnels tels que définis ci-dessus, caractérisés
- en ce que leur immuno-réactivité pour les antigènes BSA-butyrylée, mesurée dans un

test T, est telle qu'elle répond à au moins l'une des caractéristiques suivantes :

- pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/500, la DO à 450 nm est supérieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 1,0 ; 1,5 ;
- 5 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/1000, la DO à 450 nm est supérieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,16 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,9 ;
- pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/2000, la DO à 450 nm est supérieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,14 ; 0,3 ; 0,5 ; 0,6 ;
- pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/4000, la DO à 450 nm est
- 10 supérieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,1 ; 0,15 ; 0,2 ; 0,3 ;
- pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/8000, la DO à 450 nm est supérieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,1 ; 0,15 ; 0,2 ; 0,25 ;
- et en ce que leur immuno-réactivité pour les antigènes BSA-acétylés, mesurée dans un test T, est telle qu'elle répond à au moins l'une des caractéristiques suivantes :
- 15 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/500, la DO à 450 nm est inférieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,8; 0,7 ; 0,6 ; 0,4 ; 0,3; 0,2 ;
- pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/1000, la DO à 450 nm est inférieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,7; 0,6; 0,5; 0,3; 0,20;
- 20 0,15 ;
- pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/2000, la DO à 450 nm est inférieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,15; 0,1 ;
- pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/4000, la DO à 450 nm est
- 25 inférieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,15; 0,1 ;
- pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/8000, la DO à 450 nm est inférieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,15; 0,1.

30

La présente invention concerne un anticorps tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que dans un test T, son immuno-réactivité vis-à-vis des la BSA-acétylée (BA) ou la BSA propionylée (BP) est telle que la mesure de la DO à 450 nm correspond à l'une des caractéristiques suivantes :

35

Dilution de sérum	Absorbance à 450 nm	
	BA	BP
1/500	0,559	2,916
1/1000	0,362	2,357
1/2000	0,250	1,647
1/4000	0,181	1,085
1/8000	0,144	0,679
1/16000	0,141	0,444

La présente invention concerne un anticorps tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que dans un test T, son immunoréactivité vis-à-vis des la BSA-acétylée (BA) ou la BSA butyrylée (BB) est telle que la mesure de la DO à 450 nm correspond à l'une des

5 caractéristiques suivantes :

Dilution de sérum	Absorbance à 450 nm	
	BA	BB
1/500	0,158	1,558
1/1000	0,114	0,965
1/2000	0,096	0,664
1/4000	0,082	0,384
1/8000	0,080	0,278
1/16000	0,064	0,148

Procédé de fabrication de l'anticorps

- 10 Les résidus de l'épitope de la formule (I), à savoir R^0 , R^1 , R^2 et R^3 , sont greffés au résidu lysyl soit naturellement, par exemple in vivo, soit artificiellement in vitro par simple réaction des résidus ou molécules entre elles ou bien par des réactions forcées connues de l'homme du métier. Ainsi, il est possible de produire des anticorps grâce à des antigènes endogènes portant l'épitope de formule (I) ou par la synthèse de ces antigènes.
- 15 La présente invention concerne ainsi un procédé de fabrication des anticorps ou de leurs fragments fonctionnels tels que définis ci-dessus, caractérisé en ce qu'il consiste à :
- a) mettre en œuvre un synthon de formule (I),
 - b) coupler ledit synthon à une molécule porteuse,
 - c) récupérer du plasma/sérum dudit animal auquel le coupe synthon – molécule
- 20 porteuse a été préalablement injecté,

d) sélectionner les anticorps spécifiques dudit synthon utilisé à l'étape a) à l'aide d'un ou plusieurs épitopes de formule (I) telle que définie ci-dessus,

e) éventuellement purifier les anticorps par les méthodes connues de l'homme de l'art.

5

Le synthon correspond à la formule (I). Plus précisément, ledit synthon correspond au moins à un acide aminé substitué : une lysine propionylée ou une lysine butyrylée. Le synthon selon la présente invention et tel que défini ci-dessus est réalisé par le procédé décrit par M. Bashir Uddin Surfraz et al dans J. Med. Chem. 2007, 50, 1418-1422 et par Takeshi M. et al dans
10 Biomacromolécules, 2007, 8, 318-321.

Un tel synthon est particulièrement intéressant dans la production des anticorps selon l'invention et particulièrement dans la réalisation de l'antigène constitué par ledit synthon ou le comportant.

15 Une fois le synthon produit et soit couplé directement à une protéine porteuse, soit inséré dans une séquence peptidique, il peut être utilisé dans la fabrication des anticorps spécifiques dirigés contre lui ou être stocké, de préférence congelé à -20°C pour être utilisé ultérieurement.

Par le terme « couplé », on entend par exemple lié ou conjugué. Cette liaison ou conjugaison
20 peut se faire chimiquement, par exemple par une liaison covalente, adsorption ou un autre mode de fixation connu de l'homme de l'art. De préférence, le couplage se fait par un agent de couplage comme par exemple le cardodiimide ou la glutaraldéhyde.

La molécule porteuse à laquelle est couplé le synthon est une molécule de poids moléculaire suffisamment important pour induire une réaction immunitaire et la production d'anticorps
25 circulants. Cette molécule peut être une protéine, un polypeptide, un polymère naturel ou synthétique. Elle est de préférence une protéine et en particulier une protéine de poids moléculaire supérieur ou égal à 5 kDaltons telle que l'albumine ou l'hémocyanine de patelle (KLH pour Keyhole Limpet Haemocyanin). Dans une forme préférée de l'invention, on utilise la KLH en tant que protéine porteuse.

30 Le couple synthon-molécule porteuse est injecté à un animal à immuniser. Il est de préférence en suspension et mélangé avec une solution d'adjuvant de Freund (complet ou incomplet). L'animal auquel est injecté ledit couple synthon-molécule porteuse en suspension peut être le lapin, la souris, le rat, la chèvre, le mouton, le cheval ou le cobaye, de préférence le lapin, le rat et la souris. L'injection dudit couple peut se faire en une ou plusieurs fois selon les
35 méthodes classiques et connues d'immunisation. Les principales voies d'administration sont des injections sous-cutanées, intradermiques, ou intramusculaires; les injections intraveineuses et intrapéritonéales ne sont employées que dans des cas particuliers. S'il y a plusieurs injections du couple synthon-molécule porteuse, les types d'anticorps produits,

spécifiques du synthon, sont différents. En effet, il peut s'agir d'immunoglobulines de type G ou M. Ainsi, on injecte de préférence en intramusculaire environ 1 ml dudit couple antigénique à un lapin et environ 100µl à une souris. La concentration en synthon dans le mélange d'injection est d'environ 50µg/ml.

5

Le sang de l'animal contenant, entre autres, lesdits anticorps spécifiques du synthon injecté est récupéré par prélèvement ou par exsanguination. De préférence, on prélève du plasma ou du sérum contenant également, entre autres, les anticorps spécifiques du synthon tel que défini ci-dessus. Le sérum contenant les anticorps recherchés, dirigés contre ledit synthon, 10 contient normalement plusieurs espèces d'anticorps différents dirigés contre plusieurs épitopes du même antigène, on appelle cette préparation polyclonale. On peut également mettre en œuvre des techniques permettant d'isoler et de cloner des lymphocytes ne produisant qu'une espèce moléculaire (i.e. clonotype) d'anticorps : les anticorps qui ne reconnaissent qu'un seul épitope de l'antigène.

15

L'étape de sélection des anticorps spécifiques dudit synthon tel que défini ci-dessus se fait à l'aide de la technique ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). Cette technique de sélection est largement décrite dans la littérature. Pour résumer, ce principe connu de l'homme de l'art, on procède comme suit :

- 20 - le synthon décrit ci-dessus ou un épitope de formule (I) est fixé à un support classiquement utilisé dans les techniques d'ELISA
- au moins un lavage est effectué,
 - on ajoute sur le support le plasma ou le sérum de l'animal ayant été immunisé,
 - au moins un lavage est effectué,
- 25 - on ajoute une solution contenant des anticorps, de préférence de chèvre ou de mouton, reconnaissant spécifiquement les anticorps issus de l'animal ayant été immunisé, de préférence le lapin, le rat ou la souris, lesdits anticorps ajoutés étant couplés à une molécule utiles pour leur détection, de préférence une enzyme dégradant un substrat comme la peroxydase dégradant le TMB ou la DAB,
- 30 - au moins un lavage est effectué,
- on ajoute le substrat de la molécule utile à la détection (le TMB ou la DAB),
 - on effectue une lecture de la densité optique révélatrice de la présence des anticorps souhaités et ainsi sélectionnés.

35 Dans cette technique de sélection, on utilise de préférence la BSA propionylée et/ou butyrylée telle que définie dans la présente demande mais le synthon tel que défini ci-dessus couplé à une protéine porteuse ou un peptide contenant au moins un motif lysyl propionylé et/ou butyrylé couplé à une protéine porteuse peuvent également être utilisés.

Lorsqu'une étape de purification des anticorps est réalisée, cette dernière peut être faite en phase liquide ou solide et de différentes façons à savoir la chromatographie d'affinité en utilisant soit des colonnes de séparation, des billes magnétiques ou des résines portant ledit synthon en tant que ligand. On préfère un support solide tel qu'une colonne de sépharose sur
5 laquelle les synthons ont été fixés, de préférence par liaison covalente.

La présente invention vise également des anticorps isolés ou au moins l'un des fragments fonctionnels de ceux-ci, caractérisés en ce qu'il sont obtenus à partir d'un antigène consistant en un synthon de formule (I) dans laquelle R^0 équivaut à H, un alkyle, un aryle, un alkylaryle ou un aralkyle, R^1 équivaut à H, un alkyle, un aryle, un alkylaryle, un aralkyle, un sucre, un
10 lipide, un nucléotide, R^2 équivaut à OH, un alkyle, un aryle, un alkylaryle, un aralkyle, un sucre, un lipide, un nucléotide ou OR^4 où R^4 est un alkyle, un aryle, un sucre, un lipide, R^3 équivaut à $-(CH_2)_n-CH_3$ où n vaut 1 ou 2.

Ainsi, les anticorps selon la présente invention, obtenus à partir dudit synthon, sont spécifiques de leur épitope directement après leur production, sans nécessiter l'utilisation
15 d'autres techniques telles que l'épuisement d'anticorps polyclonaux pour obtenir leur haute spécificité vis-à-vis des lysines propionylées ou butyrylées. Ceci présente un avantage majeur. Dans une variante de réalisation, l'invention concerne également un procédé de fabrication des anticorps ou de l'un de leurs fragments fonctionnels tels que définis ci-dessus, caractérisé en ce qu'il consiste à :

20 a1) faire réagir une molécule de formule $CH_3-(CH_2)_n-CO-O-CO-(CH_2)_n-CH_3$ où n vaut 1 ou 2 avec une molécule porteuse afin de substituer les motifs lysyl de ladite molécule porteuse,

b1) récupérer du plasma/sérum dudit animal auquel ladite molécule porteuse ainsi substituée a été préalablement injecté,

25 c1) sélectionner les anticorps spécifiques des motifs lysyl substitués réalisés à l'étape a1) à l'aide d'un ou plusieurs épitopes de formule (I) tels que définis ci-dessus,

d1) éventuellement purifier les anticorps selon les méthodes classiques.

L'étape a1 est réalisée comme suit :

30 La molécule porteuse, de préférence BSA ou KLH est mise à réagir avec l'anhydride propionique ou butyrique, de formule $CH_3-(CH_2)_n-CO-O-CO-(CH_2)_n-CH_3$ où n vaut respectivement 1 ou 2, afin que les lysines de cette molécule porteuse réagissent pour former une molécule contenant des lysines substituées et plus précisément des lysines propionylées et/ou butyrylées.

35 Cette molécule porteuse dont les lysines sont substituées est utilisée comme immunogène comportant les épitopes de formule (I) décrite ci-dessus.

Les étapes b1) à d1) sont identiques aux étapes c) à e) du procédé de fabrication d'anticorps ou de l'un de leurs fragments fonctionnels décrit ci-dessus.

La présente invention concerne également un procédé de fabrication des anticorps, ou d'un de leurs fragments fonctionnels, tels que définis ci-dessus, caractérisé en ce qu'il consiste à :

- a2) mettre en oeuvre un épitope de formule (I) dans laquelle au moins un des résidus R^0 , R^1 est différent de H ou R^2 est différent de OH,
- 5 b2) coupler ledit épitope à une molécule porteuse,
- c2) récupérer du plasma/sérum dudit animal auquel ledit couple épitope-molécule porteuse a été préalablement injecté,
- d2) sélectionner les anticorps spécifiques dudit épitope utilisé à l'étape a) à l'aide d'un ou plusieurs épitopes tels que définis dans la revendication 1,
- 10 e2) éventuellement purifier les anticorps selon les méthodes classiques.

Les étapes b2) à e2) sont identiques aux étapes b) à e) décrites ci-dessus dans le procédé de réalisation des anticorps spécifiques du synthon lui-même et ne seront donc pas rappelées.

La mise en œuvre d'un épitope tel que défini ci-dessus se fait par la réalisation, la fabrication extemporanée dudit épitope ou par l'utilisation d'un épitope répondant à la formule (I) déjà
15 synthétisé selon les méthodes classiques de synthèse connues, de préférence les synthèses peptidiques ou protéiques.

Composition

La présente invention concerne également une composition comprenant des anticorps, ou au
20 moins l'un de leurs fragments fonctionnels, tels que définis ci-dessus, ou obtenus selon le procédé tel que défini précédemment.

Ladite composition peut avantageusement comprendre des réactifs tels que des anticorps secondaires marqués ou non et des solutions de révélation ou de visualisation permettant de mettre en évidence les réactions anticorps-antigènes. Ladite composition peut également
25 comprendre des excipients de différentes natures de type de ceux classiquement utilisés dans des compositions contenant des anticorps.

Ladite composition, tout comme les anticorps selon l'invention, peuvent avantageusement être utilisés dans le domaine de la recherche, pour expliquer des phénomènes biologiques et tester l'efficacité desdits anticorps ou de la composition telle que définie ci-dessus.

30 Par ailleurs, cette composition comprenant au moins des anticorps spécifiques de l'épitope de formule (I) exposée ci-dessus, peut être utilisée dans au moins l'une des applications suivantes : recherche, diagnostic, analyse, pronostic de pathologie, thérapeutique, test d'efficacité ou de toxicité d'un médicament.

Parmi les pathologies liées à la propionylation et/ou la butyrylation de résidus lysine, on
35 peut citer par exemple le cancer, les maladies neurodégénératives, le diabète et les pathologies inflammatoires.

Procédé et nécessaire de détection des épitopes

Selon un autre mode de réalisation, la présente invention concerne un procédé de détection, dans un échantillon biologique, in vitro ou in vivo, de l'épitope de formule (I) tel que défini précédemment, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 5 A) éventuellement fixer sur un support approprié les anticorps ou au moins l'un de leurs fragments fonctionnels tels que définis ci-dessus ou compris dans une composition telle que définie ci-dessus,
- B) mettre en contact un échantillon biologique contenant potentiellement ledit épitope de formule (I) avec les anticorps ou au moins l'un de leurs fragments fonctionnels
- 10 tels que définis précédemment ou tels que compris dans une composition telle que définie ci-dessus,
- C) éventuellement effectuer au moins un lavage,
- D) détecter/révéler les complexes anticorps-épitope(s) de formule (I).
- 15 De préférence, au préalable, les anticorps selon la présente invention sont fixés sur un support essentiellement solide ou tout support réactionnel permettant de réaliser un test immunologique. La fixation au support est réalisée, de préférence, par adsorption ou liaison covalente. Une éventuelle étape de lavage permet de supprimer après ladite fixation les anticorps non fixés audit support le cas échéant. L'échantillon biologique concerné, à
- 20 mettre en œuvre avec les anticorps selon l'invention, peut être toute substance susceptible de contenir ledit épitope en question de formule (I) telle qu'une substance solide ou liquide, comme par exemple un animal, un organe complet ou non, des cellules de tissus, des extraits nucléaires de cellules données, des extraits cytoplasmiques de cellules données, du sang, du plasma, du sérum, de la lymphe, de l'urine, de la salive. De
- 25 préférence, on utilise du sérum. Lorsque l'échantillon contient des molécules contenant au moins un motif lysyl substitué répondant à la formule (I) et constituant un épitope, ces molécules via cet épitope vont se lier spécifiquement aux anticorps préalablement fixés sur support adapté. Un éventuel lavage permettra d'éliminer les anticorps non fixés au support et les complexes molécules-anticorps non spécifiques. Selon des méthodes connues de
- 30 l'homme de l'art, l'anticorps spécifique peut être utilisé en phase liquide, en solution.

Dans le cadre du procédé et du nécessaire de détection des épitopes de formule (I) de la présente demande, les supports de réactions immunologiques utilisés peuvent être de nature différentes et sont choisis parmi : les lames, les microplaques, les latex fluorescents,

35 les latex magnétiques, les membranes d'immuno-filtration ou les membranes d'immuno-migration, les biochips, les billes, les ailettes, les tubes mais également les liposomes, les vésicules lipidiques, les microparticules biologiques ou obtenues à partir de polymères, les émulsions.... et la méthode de détection de l'étape D) peut être déclinée en plusieurs

technologies telles que les tests ELISA, l'immunoturbidimétrie, l'agglutination de latex sur lame, la néphélogétrie, la turbidimétrie, la turbidimétrie ou néphélogétrie amplifiée par particules de latex, immunofluorescence (sur lame, microplaque, latex fluorescent, latex magnétique, test, sur membrane, biochips etc... et de façon générale peut être utilisé tout
5 procédé permettant d'identifier et/ou de quantifier une réaction entre un antigène et plus particulièrement un épitope et un anticorps, quelque soit l'isotype.

Dans une variante, on peut utiliser des techniques permettant la détection directe des anticorps en tant que complexes anticorps-épitope telle que la réfractométrie, la diffraction de rayons lumineux par la surface réactionnelle, des méthodes de modification de la
10 conductivité électrique ou du champ magnétique, etc...

De préférence, la réaction immunologique, à savoir la reconnaissance de l'anticorps ou d'au moins l'un de ses fragments fonctionnels selon l'invention avec l'épitope de formule (I), est suivie par une réaction indicatrice qui permet la détection photométrique de
15 l'activité enzymatique liée au complexe anticorps-épitope de formule (I).

Ces méthodes de détection du complexe anticorps-épitope de formule (I) permettent non seulement de détecter les épitopes de formule (I) présents dans un échantillon biologique donné in vitro ou in vivo mais elles permettent aussi de localiser et/ou quantifier ledit
20 épitope au niveau subcellulaire ou moléculaire ainsi que d'estimer les rôles biologiques potentiels de ces modifications post-traductionnelles détectées.

La présente invention concerne également un nécessaire de détection, dans un échantillon biologique in vitro ou in vivo, de molécule contenant au moins l'épitope de formule (I) tel
25 que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend :

- au moins un anticorps ou au moins l'un de ses fragments fonctionnels tels que définis ci-dessus, de préférence fixé sur un support et
- le matériel approprié et nécessaire pour détecter les complexes anticorps-épitopes de formule (I).

30 Ce nécessaire permet de détecter de façon rapide et fiable la présence ou non de molécule comprenant au moins un épitope de formule (I)

Procédé et nécessaire de détection des auto-anticorps

Ces modifications post-traductionnelles de propionylation et/ou butyrylation des lysines ont
35 pu être observées in vitro. Grâce à la présente invention, il est désormais possible d'observer ces modifications in vivo. Elles peuvent engendrer des pathologies comme les pathologies inflammatoires, le cancer, des maladies neurodégénératives et le diabète. Une propionylation/butyrylation inadaptée d'un résidu lysine peut devenir un antigène in vivo et

donc induire une réaction immunitaire, la protéine défectueuse étant identifiée comme du non-soi. L'organisme développe alors des anticorps contre son propre organisme appelés auto-anticorps. En effet, dans la présente demande, le terme «auto-anticorps» désigne par exemple une immunoglobuline dirigée contre un constituant de l'organisme qui produit
5 l'immunoglobuline (ou anticorps) en question. Selon la présente invention, il s'agit d'un anticorps dirigé contre un épitope de formule (I) telle que définie précédemment.

Ces auto-anticorps produits induisent donc des pathologies auto-immunes et il peut s'avérer être très important de pouvoir diagnostiquer rapidement la présence ou non d'auto-anticorps in vivo chez un patient, pouvoir réaliser une analyse, un suivi de
10 préférence sérologique et un pronostic vis-à-vis de pathologies. L'invention porte donc également sur un procédé de détection des auto-anticorps spécifiques des épitopes de formule (I) tels que définis ci-dessus, dans un échantillon biologique in vitro ou in vivo, de préférence un plasma ou un sérum, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

A1) éventuellement fixer sur un support approprié au moins un épitope de formule
15 (I),

B1) mettre en contact ledit épitope de formule (I), de préférence fixé sur un support approprié avec un échantillon biologique,

C1) éventuellement effectuer au moins un lavage,

D1) détecter/révéler lesdits (éventuels) complexes auto-anticorps-épitopes de
20 formule (I) par des moyens de détections appropriés.

De préférence, le support est solide mais il peut s'agir de tout support réactionnel permettant de réaliser un test immunologique. L'épitope de formule (I) est fixé sur un support adapté. Comme exposé plus haut, de préférence la fixation se fait par adsorption
25 mais elle peut également être réalisée par liaison covalente sur un support adapté. On veillera à ce que la quantité d'épitope de formule (I) fixée ne soit pas un facteur limitant afin que tous les auto-anticorps de l'échantillon à tester puissent ainsi s'y fixer spécifiquement.

30 Les différents supports utilisables sont identiques à ceux utilisables et détaillés ci-dessus pour la mise en œuvre du procédé et du nécessaire de détection des épitopes de formule (I).

L'échantillon biologique à tester peut être toute substance biologique susceptible de contenir cesdits auto-anticorps spécifiques de l'épitope (I) comme des cellules des tissus,
35 du sang, plasma, du sérum, de l'urine, de la salive De préférence, l'échantillon à tester est du plasma ou du sérum, dilué ou non, d'un patient contenant potentiellement des auto-anticorps dirigés contre l'épitope de formule (I).

Les éventuels lavages ont pour but d'éliminer d'une part les épitopes non fixés sur le support, mais également et surtout d'éliminer les auto-anticorps libres ou fixés de façon non spécifique à leur épitope spécifique. Selon la présente invention, les différentes méthodes de détections utilisées sont qualitatives et/ou quantitatives. Ces méthodes de
5 détection des complexes auto-anticorps-épitopes sont connues de l'homme du métier. Elles peuvent être déclinées en plusieurs technologies telles que celles exposées précédemment pour le procédé et le nécessaire de détection des épitopes de formule (I).

La présente invention porte également sur un nécessaire de détection des auto-anticorps
10 spécifiques des épitopes de formule (I) tels que définis ci-dessus, dans un échantillon biologique in vitro ou in vivo, de préférence un plasma ou un sérum, caractérisé en ce qu'il comprend :

- au moins un épitope de formule (I) tel que défini ci-dessus
- et
- 15 - le matériel approprié et nécessaire pour détecter/révéler les complexes anticorps-épitopes de formule (I).

Dans le cadre de la mise en œuvre du procédé et du nécessaire de détection des auto-anticorps selon l'invention, est utilisée l'une des différentes méthodes de détection citées
20 ci-dessus dans le cadre de la mise en œuvre du procédé ou du nécessaire de détection des épitopes de formule (I).

Grâce audit nécessaire de détection des auto-anticorps, il est ainsi plus simple, plus facile et plus rapide d'établir un diagnostic d'éventuelles pathologies induites par les lysines
25 substituées par un résidu propionyl ou butyryl, de réaliser un suivi et une analyse de la pathologie et surtout de la sérologie du patient à surveiller, d'évaluer l'efficacité et la toxicité d'un médicament ou d'une composition ciblant par exemple ces auto-anticorps ou d'utiliser ces auto-anticorps en recherche.

30 **Exemples**

Les exemples qui suivent illustrent la présente demande.

L'invention sera mieux comprise si l'on se réfère aux figures annexées dans lesquels :

- la figure 1 représente deux courbes de titration de sérum de lapin anti-lysine
35 propionylée.
- la figure 2 représente deux courbes de titration de sérum de lapin anti-lysine butyrylée.

- la figure 3 représente une photographie d'une analyse en western blot de la réaction d'acétylation des histones H3 et H4 révélée grâce à des anticorps anti-acétyl.

- la figure 4 représente une photographie d'une analyse en western blot de la réaction de propionylation des histones H3 et H4 révélée grâce aux anticorps objet de
5 l'invention.

- La figure 5 représente une photographie d'une analyse en western blot de la réaction de propionylation des histones H3 et H4 en présence ou non de différents cofacteurs et révélée grâce aux anticorps objet de l'invention.

- La figure 6 représente une photographie d'une analyse en western blot de la
10 détection de la propionylation naturelle des histones H2A révélée grâce aux anticorps objet de l'invention.

Exemple 1 : Procédé de préparation des anticorps polyclonaux spécifiques de l'épitope de formule (I)

15

1.1 Préparation des épitopes de formule (I) (étape a1) pour la production des immunogènes et des antigènes.

1.1.a/ Préparation des immunogènes (KLH) contenant les motifs lysyl acylés (propionylés et/ou butyrylés) pour l'immunisation des animaux.

20

Cette préparation a été décrite dans l'article suivant : Thomas V et al, dans J Immunol Methods. 2004 Sep;292(1-2):83-95.

Brièvement, les antigènes KLH propionylé et KLH butyrylé ont été préparés comme suit :

25 *KLH propionylée* : 2mg de KLH solubilisée dans 1 ml de tampon bicarbonate 0.1 M pH 9,5 ont été mis en contact avec 0,7 mmoles d'anhydride propionique ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)-CO-O-CO-(CH}_2\text{)-CH}_3$). Après une incubation de 2 heures à 22°C, la protéine modifiée, substituée par des radicaux propionyl sur les motifs lysyl est dialysée 3 fois contre 2 litres de tampon PBS.

30 *KLH butyrylée* : 2mg de KLH solubilisée dans 1 ml tampon bicarbonate 0.1 M pH 9,5 ont été mis en contact avec 0,7 mmoles d'anhydride butyrique ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-CO-O-CO-(CH}_2\text{)}_2\text{-CH}_3$). Après une incubation de 2 heures à 22°C, la protéine modifiée, substituée par des radicaux butyryl sur les motifs lysyl est dialysée 3 fois contre 2 litres de PBS.

35 1.1.b/ Préparation des antigènes (BSA) contenant les motifs lysyl acylés (propionylés et/ou butyrylés) pour le test ELISA.

Pour obtenir la protéine BSA propionylée (BP), la même procédure et les mêmes proportions que pour KHL propionylée ci-dessus sont utilisées.

Pour obtenir la protéine BSA butyrylée (BB), la même procédure et les mêmes proportions que pour KLH butyrylée ci-dessus sont utilisées.

Pour obtenir la protéine BSA acétylée (BA), la même procédure et les mêmes proportions que décrite dans Thomas V. et al dans J Immunol Methods. 2004 Sep;292(1-2):83-95 sont
5 utilisées.

1.1.c/ Contrôle du degré d'acylation par dosage spectrophotométrique des amines primaires.

A 50 μ l des solutions de BSA native et de BSA acylée (BP, BB) (2mg/ml) sont ajoutés 50
10 μ l d'une solution de tétraborate de sodium saturée et 50 μ l d'acide 2, 4, 6-trinitrobenzène sulfonique (0.1mM). L'acide 2, 4, 6-trinitrobenzène sulfonique est un réactif qui permet le dosage colorimétrique des amines primaires. L'acylation consiste à former sur les amines primaires et notamment sur les résidus ϵ NH₂ de la lysine de la BSA des liaisons amides. Les résidus amidés ne sont pas réactifs avec l'acide 2, 4, 6-trinitrobenzène sulfonique, il
15 s'ensuit qu'une diminution d'absorbance est proportionnelle au degré d'acylation, cette technique de dosage permet donc de calculer le pourcentage d'amines acylées. Après 30 minutes de réaction, l'absorbance à 420 nm est mesurée par spectrophotométrie. La diminution d'absorbance par rapport à celle obtenue avec la BSA native est exprimée en
20 pourcentage.

	BSA (B)	BSA propionylée (BP)	BSA butyrylée (BB)
Amine acylée (%)	0	>90	>90

Tableau 1 : Degré d'acylation des protéines par dosage spectro-photométrique des amines primaires.

25 Le tableau 1 montre que pour les 2 antigènes synthétisés (BSA propionylée et BSA butyrylée), l'acylation est pratiquement totale, il en résulte que la quasi totalité des groupements ϵ NH₂ accessibles de la lysine présents sur la BSA sont acylés.

1.2 Immunisation des animaux

30 4 lapins femelles New Zealand de 2,5 Kg ont reçu 4 injections par voies intra-dermique et sous-cutanée aux jours J0, J14, J28 et J74 de 1ml d'un mélange (50%/50%) d'une solution contenant 100 μ g de l'immunogène KLH-propionylé (2 lapins) et KLH-butyrylé (2 lapins) et de l'adjuvant de Freund selon le protocole d'immunisation dans le tableau ci-dessous.

Des prélèvements réguliers (à J53, J74 et J90) de sang ont été effectués pour contrôler la réponse immunitaire (étape c1). Ce sang est laissé à coaguler pendant 30 minutes puis est centrifugé pendant 10 minutes à 2500 tours par min afin de récupérer le sérum et tester l'immuno-réactivité des anticorps (étape b1).

5

Jour	Protocole
0	Prélèvement de sérum contrôle (4 - 5 ml) et conservation à +4°C
0	Injection intradermique (1 ml / lapin) 0,5 ml Antigène + 0,5 ml Adjuvant Freund Complet
14	Injection sous-cutanée (1 ml / lapin) 0,5 ml Antigène + 0,5 ml Adjuvant Freund Incomplet
28	Injection sous-cutanée (1 ml / lapin) 0,5 ml Antigène + 0,5 ml Adjuvant Freund Incomplet
53	Prélèvement de sérum test (4-5 ml) et conservation à +4°C
74	Injection sous-cutanée (1 ml / lapin) 0,5 ml Antigène + 0,5 ml Adjuvant Freund Incomplet
90	Prélèvement final et conservation à +4°C

1.3- Sélection des anticorps spécifiques de l'épitope dans les sérums (étape c1)

Les anticorps spécifiques des motifs lysyl substitués ont été sélectionnés dans le sérum avec l'épitope de formule (I) produits ci-dessus grâce à la détermination de l'immunoréactivité du sérum de lapin par la technique ELISA (étape c1).

Les antigènes BP ou BB sont adsorbés sur des plaques 96 puits en polystyrène. Pour ce faire, 100µl d'une solution 10µg/ml de chaque antigène en tampon bicarbonate 0.1 M pH 9,5 sont distribués par puits. Après une incubation de 2 heures à 37°C, les puits sont vidés et un dépôt de 150 µl/puits d'une solution de BSA 0.5% dans du tampon PBS est réalisé dans le but de saturer les sites d'adsorption excédentaires sur le plastique. Cette étape de saturation nécessite une incubation d'une heure à 37°C. A ce stade, les plaques sont prêtes pour le dépôt des sérums. Pour ce test, les sérums sont utilisés à partir de la dilution de 1/500 en tampon PBS contenant du tween-20 à 0.1%.

Ces solutions sont déposées puis dilués de deux en deux directement sur la plaque (1/500, 1/1000, 1/2000 ...) de façon à obtenir 100 µl/ puits de volume final.

Après une heure d'incubation à 37°C, les plaques sont lavées 3 fois avec du PBS tween.

Un anticorps de mouton anti IgG (H+L) de lapin marqué à la peroxydase et déposé à raison de 100 µl/puits et laissé 30 min. à 37°C. Les plaques sont alors lavées comme précédemment par 3 lavages successifs pour éliminer l'excédent de réactif.

L'activité peroxydase est révélée en utilisant le réactif eau oxygénée/tetraméthylbenzidine (TMB) (Covalab). La réaction est stoppée avec 100µl de H₂ SO₄ (2N). L'absorbance est mesurée sur lecteur de plaque à 450 nm.

1.4-purification des anticorps (étape e1)

Les étapes d'immuno-purification des anticorps sont réalisées suivant les protocoles décrits dans la publication Thomas V et al dans J Immunol Methods. 2004 Sep;292 (1-2):83-95.

5 1.5- Résultats : Détermination de l'immunoréactivité des sérums de lapin par ELISA

5.1- Sélection des anticorps de lapin anti N- ϵ -propionyl-L-Lysine avec la BSA acétylée (BA) ou la BSA propionylée (BP).

Dilution de sérum	Absorbance à 450 nm	
	BA	BP
1/500	0.559	2.916
1/1000	0.362	2.357
1/2000	0.250	1.647
1/4000	0.181	1.085
1/8000	0.144	0.679
1/16000	0.141	0.444

10 Tableau 2 : Mesures de densité optique suivant les dilutions des sérums.

Le tableau 2 reflète l'immunoréactivité des sérums de lapin contenant les anticorps spécifiques des lysines propionylées et/ou butyrylées, vis-à-vis de la BSA acétylée et de la BSA propionylée. La BSA propionylée forme un complexe avec les anticorps spécifiques de la lysine propionylée (absorbance élevée).

15

La figure 1 illustre l'immunoréactivité des sérums vis-à-vis de deux antigènes : BSA acétylée et BSA propionylée. L'axe des ordonnées représente les valeurs de densités optiques mesurées à 450 nm et l'axe des abscisses représente les différentes dilutions du sérum. Cette figure 1 illustre le fait que les sérums contiennent des anticorps spécifiques

20

des lysines propionylées. En effet, les anticorps obtenus et contenus dans le sérum réagissent fortement avec le motif lysyl propionylé contenu dans l'antigène BP (absorbance de 1.647 à la dilution 1/2000 du sérum) alors qu'ils ne réagissent pas ou très peu avec le motif lysyl acétylé contenu dans l'antigène BA (absorbance de 0.250 à la dilution 1/2000 du sérum). Ces anticorps permettent de différencier la N- ϵ -propionyl-L-

25

lysine de la N- ϵ -acétyl-L-lysine et sont donc hautement spécifiques des lysines propionylées.

5.2-Sélection des anticorps de lapin anti N-ε-butyryl-L-lysine avec la BSA acétylée (BA) ou la BSA butyrylée (BB).

Dilution de sérum	Absorbance à 450 nm	
	BA	BB
1/500	0.158	1.558
1/1000	0.114	0.965
1/2000	0.096	0.664
1/4000	0.082	0.384
1/8000	0.080	0.278
1/16000	0.064	0.148

5 Tableau 3 : Mesures de densité optique suivant les dilutions des sérums.

Le tableau 3 reflète l'immunoréactivité des sérums de lapin contenant les anticorps spécifiques des lysines propionylées et/ou butyrylées, vis-à-vis de la BSA acétylée et de la BSA butyrylée. La BSA butyrylée forme un complexe avec les anticorps spécifiques de la lysine butyrylée (absorbance élevée).

10 La figure 2 illustre l'immunoréactivité des sérums vis-à-vis de deux antigènes : BSA acétylée et BSA butyrylée. L'axe des ordonnées représente les valeurs de densités optiques mesurées à 450 nm et l'axe des abscisses représente les différentes dilutions du sérum. Cette figure 2 illustre le fait que les sérums contiennent des anticorps spécifiques des lysines butyrylées. En effet, les anticorps obtenus et contenus dans le sérum réagissent
15 avec le motif lysyl butyrylé contenu dans l'antigène BB (absorbance de 1.558 à la dilution 1/500 du sérum) alors qu'ils ne réagissent pas avec le motif lysyl acétylé contenu dans l'antigène BA (absorbance de 0.158 à la dilution 1/500 du sérum). Ces anticorps permettent de différencier la N-ε-butyryl-L-Lysine de la N-ε-acétyl-L-lysine et sont donc hautement spécifiques des lysines butyrylées.

20

Exemple 2. Procédé de production des anticorps

Le synthon est obtenu selon les méthodes décrites par M. Bashir Uddin Surfraz et al dans J. Med. Chem. 2007, 50, 1418-1422 et par Takeshi M. et al dans Biomacromolecules, 2007, 8,
25 318-321.

5 mg de synthon lysyl propionylée et/ou butyrylée est couplé à 2 mg de BSA ou KLH en utilisant le carbodiimide comme agent de couplage pour conjuguer les synthons par les domaines alpha acide carboxylique laissés libres pour la réalisation dudit couplage selon la technique décrite par Thomas V et al dans J Immunol Methods. 2004 Sep;292 (1-2):83-95.

L'immunogène ainsi préparé est injecté aux animaux dans les mêmes conditions et modes opératoires décrits dans l'exemple 1.

Exemple 3. Etude de la spécificité des anticorps anti propionyl et anti butyryl sur les histones modifiés in vitro et in vivo et procédé de détection de l'épitope de formule (I)

La préparation des histones, les électrophorèses en gel de polyacrylamide et les western-blots ont été réalisés selon la méthode référencée dans Bannister AJ et Kouzarides T, Nature. 1996 Dec 19-26;384 (6610):641-3. Les anticorps appropriés utilisés sont l'anticorps monoclonal anti acétyl lysine (clone 11A1 mab0019-Covalab) et les anticorps polyclonaux de lapin anti propionyl et anti butyryl (objet de l'invention).

Les réactions enzymatiques des histones acétyl transférases P/CAF et PCB ont été réalisées selon la méthode décrite par Bannister AJ et Kouzarides T dans Nature. 1996 Dec 19-26;384 (6610):641-3 en ajoutant dans le milieu réactionnel les cofacteurs acétyl CoA, propionyl CoA ou le butyryl-CoA à la concentration finales de 100µM.

Traitement des cellules HL60: Les cellules HL60 ont été incubées avec 1.5µM de Trichostatin A (TSA) un inhibiteur des histones désacétylase, pendant 5 heures. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec du tampon PBS et centrifugées à 13 000g. Le culot cellulaire est ensuite resuspendu dans le tampon IPH (50mM Tris pH 8, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 5% NP-40, 1.5µM TSA) puis la suspension est laissée pendant 15 min à 4°C. Les tubes sont ensuite centrifugés à 13 000g pendant 10min. Le culot chromatinien est ensuite repris dans le tampon d'électrophorèse comme décrit précédemment pour réaliser les western blot.

25 Résultats:

- la figure 3 illustre la réaction d'acétylation des histones H3 et H4 des cellules HL60 par les Histone AcétylTransférases HATs (P/CAF & CBP) en présence (+) ou non (-) de l'inhibiteur TSA. La révélation est réalisée avec l'anticorps monoclonal anti acétyl lysine (mab0019).

30 Conclusion: La réaction de contrôle pour vérifier le modèle de modification post-traductionnelle des histones in vitro montre clairement une acétylation importante des histones H3 et H4. L'addition du TSA exerce un effet inhibiteur de l'enzyme HDAC puisque l'intensité du marquage est plus importante. Ces résultats sont en parfaite concordance avec la littérature et valide bien le système utilisé.

35 - la figure 4 illustre la réaction de propionylation des histones H3 et H4 des cellules HL60 par les Histones AcétylTransférases HATs (P/CAF & CBP) en présence (+) ou non (-) de l'inhibiteur TSA. La révélation est réalisée avec l'anticorps polyclonal de lapin anti lysine propionylée (objet de l'invention).

Conclusion : Dans les conditions de modification post-traductionnelles des cellules HL60 démontrées sur la figure 3, ces résultats montrent bien une propionylation des histones H3 et H4. L'addition de TSA montre que l'enzyme HDCA exerce un effet sur la propionylation, à savoir une dépropionylation des lysines des histones.

5 - la figure 5 illustre la réaction de propionylation des histones H3 et H4 des cellules HL60 par les Histones AcétylTransférases HATs (P/CAF & CBP) en présence de : acétyl-CoA (Ac), propionyl-CoA (Pr), butyryl-CoA (Bu) ou sans cofacteur (-). La révélation est réalisée avec l'anticorps polyclonal de lapin anti lysine propionylé (objet de l'invention).

Conclusion : Les anticorps polyclonaux anti lysine propionylée reconnaissent
10 spécifiquement les histones H3 et H4 propionylées par l'action des HATs (P/CAF et CBP). Il n'y a pas de réaction croisée des anticorps anti-lysine propionylée avec les histones acétylées ou butyrylées.

- la figure 6 illustre la détection des histones H2A naturellement propionylées des cellules HL60 en présence (+) ou non (-) de l'inhibiteur TSA. La révélation est réalisée avec
15 l'anticorps polyclonal de lapin anti lysine propionylée (objet de l'invention).

Conclusion : L'anticorps polyclonal de lapin anti lysine propionylée permet de détecter une propionylation naturelle de l'histone H2A dans les cellules HL60. La propionylation est légèrement affectée par l'action de l'HDAC comme le montre le résultat obtenu avec l'addition du TSA.

20 Les anticorps de l'invention peuvent également être utilisés en immunohistochimie ou immunocytologie pour la détection des épitopes de formule (I) selon la technique décrite dans Roch et al Int J Cancer. 1991 May 10;48(2):215-20.

25 **Exemple 4 : Procédé de détection des auto-anticorps spécifiques des épitopes de formule (I)**

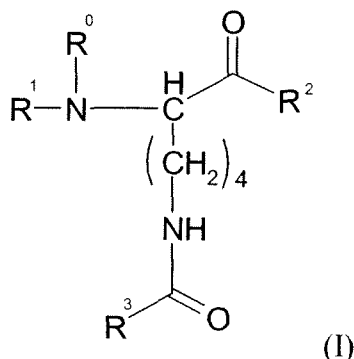
Le même procédé décrit dans l'exemple 1.3 ci-dessus est utilisé pour détecter les auto-anticorps dans un échantillon et en particulier dans un sérum.

Les antigènes BP ou BB sont adsorbés sur des plaques 96 puits en polystyrène. Pour ce
30 faire, 100µl d'une solution 10µg/ml de chaque antigène en tampon bicarbonate 0.1 M pH 9,5 sont distribués par puits. Après une incubation de 2 heures à 37°C, les puits sont vidés et un dépôt de 150 µl/puits d'une solution de BSA 0.5% dans du tampon PBS est réalisé dans le but de saturer les sites d'adsorption excédentaires sur le plastique. Cette étape de saturation nécessite une incubation d'une heure à 37°C. A ce stade, les plaques sont prêtes
35 pour le dépôt du sérum à tester. Pour ce test, le sérum à tester est un sérum humain prélevé puis utilisé à différentes dilutions en PBS tween 20 0.1%. Cette solution est déposée puis diluée de deux en deux directement sur la plaque (1/50,1/100, 1/200,) de façon à obtenir 100 µl/ puits de volume final. Après une heure d'incubation à 37°C, les plaques

sont lavées 3 fois avec du PBS contenant du tween-20 à 0.1%. Un anticorps de mouton anti IgG (H+L) humaine marqué à la peroxydase et déposé à raison de 100 µl/puits et laissé 30 min. à 37°C. Les plaques sont alors lavées par 3 lavages successifs pour éliminer l'excédent de réactif (anticorps de mouton). Lesdits éventuels complexes épitopes-auto-
5 anticorps sont révélés grâce au substrat de la peroxydase. L'activité peroxydase est révélée en utilisant le réactif eau oxygénée/tetraméthylbenzidine (TMB) (Covalab). La réaction est stoppée avec 100µl de H₂ SO₄ (2N). L'absorbance est mesurée sur lecteur de plaque à 450 nm.

REVENDEICATIONS

1. Anticorps isolés ou au moins l'un de leurs fragments fonctionnels,
 5 caractérisés en ce qu'ils sont spécifiques d'un épitope comprenant au moins un motif lysyl de formule (I) suivante :



- dans laquelle R⁰ équivaut à H, un alkyle, un aryle, un alkylaryle ou un aralkyle,
 R¹ équivaut à H, un alkyle, un aryle, un alkylaryle, un aralkyle, un sucre, un
 10 lipide, un nucléotide ou une entité constituée d'au moins un motif acide aminé, ledit motif acide aminé étant relié au motif lysyl par une liaison peptidique,
 R² équivaut à OH, un alkyle, un aryle, un alkylaryle, un aralkyle, un sucre, un lipide, un nucléotide, une entité constituée d'au moins un motif acide aminé, ledit motif acide aminé étant relié au motif lysyl par une liaison peptidique, ou OR⁴ où R⁴ est un alkyle, un
 15 aryle, un sucre, un lipide,
 R³ équivaut à -(CH₂)_n-CH₃ où n vaut 1 ou 2.

2. Anticorps isolés ou au moins l'un de leurs fragments fonctionnels, selon la revendication 1 caractérisés en ce qu'ils sont peu ou pas spécifiques d'un épitope contenant au
 20 moins un motif lysyl de formule (I) dans laquelle R⁰, R¹, R² sont tels que définis ci-dessus et R³ équivaut à -CH₃.

3. Anticorps ou au moins l'un de leurs fragments fonctionnels selon la revendication 1 ou 2, caractérisés
 25 • en ce que leur immuno-réactivité pour les antigènes BSA-propionylée, mesurée dans un test T, est telle qu'elle répond à au moins l'une des caractéristiques suivantes :
- pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/500, la DO à 450 nm est supérieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,6; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 2,7 ;

- pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/1000, la DO à 450 nm est supérieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,3; 0,6 ; 0,8 ; 1,0 ; 1,5 ; 2,0 ; 2,2 ;
- 5 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/2000, la DO à 450 nm est supérieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,25 ; 0,4 ; 0,6 ; 1,0 ;
- pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/4000, la DO à 450 nm est supérieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ;
- pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/8000, la DO à 450 nm est supérieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,2 ; 0,4 ;
- 10 • et en ce que leur immuno-réactivité pour les antigènes BSA-acétylés, mesurée dans un test T, est telle qu'elle répond à au moins l'une des caractéristiques suivantes :
 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/500, la DO à 450 nm est inférieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 1,5; 1,0; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6 ;
 - 15 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/1000, la DO à 450 nm est inférieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 1,2; 1,0; 0,9; 0,8; 0,5; 0,4 ;
 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/2000, la DO à 450 nm est inférieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 1,0; 0,8; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3 ;
 - 20 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/4000, la DO à 450 nm est inférieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,8; 0,6; 0,7; 0,5; 0,3; 0,2 ;
 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/8000, la DO à 450 nm est inférieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,7, 0,6; 0,5; 0,4; 0,25; 0,15.

4. Anticorps ou au moins l'un de leurs fragments fonctionnels selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisés

- 30 • en ce que leur immuno-réactivité pour les antigènes BSA-butyrylée, mesurée dans un test T, est telle qu'elle répond à au moins l'une des caractéristiques suivantes :
 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/500, la DO à 450 nm est supérieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 1,0 ; 1,5 ;
 - 35 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/1000, la DO à 450 nm est supérieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,16 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,9 ;
 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/2000, la DO à 450 nm est supérieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,14 ; 0,3 ; 0,5 ; 0,6 ;

- pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/4000, la DO à 450 nm est supérieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,1 ; 0,15 ; 0,2 ; 0,3 ;
- pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/8000, la DO à 450 nm est supérieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,1 ; 0,15 ; 0,2 ; 0,25 ;
- 5 • et en ce que leur immuno-réactivité pour les antigènes BSA-acétylés, mesurée dans un test T, est telle qu'elle répond à au moins l'une des caractéristiques suivantes :
 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/500, la DO à 450 nm est inférieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,8; 0,7 ; 0,6 ; 0,4 ; 0,3; 0,2 ;
 - 10 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/1000, la DO à 450 nm est inférieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,7; 0,6; 0,5; 0,3; 0,20; 0,15 ;
 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/2000, la DO à 450 nm est inférieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,15; 0,1 ;
 - 15 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/4000, la DO à 450 nm est inférieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,15; 0,1 ;
 - pour une dilution du sérum contenant lesdits anticorps à 1/8000, la DO à 450 nm est inférieure ou égale à, dans un ordre croissant de préférence : 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,15; 0,1.
 - 20

5. Procédé de fabrication des anticorps ou de au moins l'un de leurs fragments fonctionnels tels que définis dans l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il
25 consiste à :

- a) mettre en oeuvre un synthon de formule (I),
- b) coupler ledit synthon à une molécule porteuse,
- c) récupérer du plasma/sérum dudit animal auquel ledit couple synthon-molécule porteuse a été préalablement injecté,
- 30 d) sélectionner les anticorps spécifiques dudit synthon utilisé à l'étape a) à l'aide d'un ou plusieurs épitopes de formule (I) tels que définis dans la revendication 1,
- e) éventuellement purifier les anticorps selon les méthodes classiques.

6. Procédé de fabrication des anticorps ou de au moins l'un de leurs fragments
35 fonctionnels tels que définis dans l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il

consiste à :

a1) faire réagir une molécule de formule $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-\text{O}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ où n vaut 1 ou 2 avec une molécule porteuse afin de substituer les motifs lysyl de la molécule porteuse,

5 b1) récupérer du plasma/sérum dudit animal auquel ladite molécule porteuse ainsi substituée a été préalablement injectée,

c1) sélectionner les anticorps spécifiques des motifs lysyl substitués réalisés à l'étape a1) à l'aide d'un ou plusieurs épitopes de formule (I) tels que définis dans la revendication 1,

d1) éventuellement purifier les anticorps selon les méthodes classiques.

10

7. Procédé de fabrication des anticorps ou de au moins l'un de leurs fragments fonctionnels tels que définis dans l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il consiste à :

15 a2) mettre en œuvre un épitope de formule (I) dans laquelle au moins un des résidus R^0 , R^1 est différent de H ou R^2 est différent de OH,

b2) coupler ledit épitope à une molécule porteuse,

c2) récupérer du plasma/sérum dudit animal auquel ledit couple épitope-molécule porteuse a été préalablement injecté,

20 d2) sélectionner les anticorps spécifiques dudit épitope utilisé à l'étape a2) à l'aide d'un ou plusieurs épitopes de formule (I) tels que définis dans la revendication 1,

e2) éventuellement purifier les anticorps selon les méthodes classiques.

25 8. Composition comprenant des anticorps ou d'au moins l'un de leurs fragments fonctionnels tels que définis dans l'une des revendications 1 à 4, ou obtenus selon le procédé tel que défini dans l'une des revendications 5 à 7.

30 9. Composition selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle est utilisée dans au moins l'une des applications suivantes : recherche, diagnostic, analyse, pronostic de pathologie, thérapeutique, test d'efficacité ou de toxicité d'un médicament.

10. Procédé de détection, dans un échantillon biologique, de l'épitope de formule (I) tel que défini dans la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

35 A) éventuellement fixer sur un support approprié les anticorps ou l'un de leurs fragments fonctionnels tels que définis dans l'une des revendications 1 à 4 ou compris dans une composition telle que définie dans la revendication 8,

B) mettre en contact un échantillon contenant potentiellement ledit épitope de formule (I) avec les anticorps ou au moins l'un de leurs fragments fonctionnels tels que définis dans l'une des revendications 1 à 4 ou compris dans une composition telle que définie dans la revendication 8,

- 5 C) éventuellement effectuer au moins un lavage,
D) détecter/révéler les complexes anticorps-épitope(s) de formule (I).

11. Nécessaire de détection, dans un échantillon biologique, de molécule contenant au moins l'épitope de formule (I) tel que défini dans la revendication 1,
10 caractérisé en ce qu'il comprend :

- au moins un anticorps tel que défini dans la revendication 1, de préférence fixé sur un support et
- le matériel approprié et nécessaire pour détecter les complexes anticorps-épitopes de formule (I).

15

12. Procédé de détection des auto-anticorps spécifiques des épitopes de formule (I) tels que définis dans la revendication 1, dans un échantillon biologique, de préférence un plasma ou un sérum,
caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 20 A1) éventuellement fixer sur un support approprié au moins un épitope de formule (I),
B1) mettre en contact ledit épitope de formule (I), de préférence fixé sur un support approprié, avec un échantillon,
C1) éventuellement effectuer au moins un lavage,
25 D1) détecter/révéler lesdits (éventuels) complexes auto-anticorps-épitopes de formule (I) par des moyens de détections appropriés.

13. Nécessaire de détection des auto-anticorps spécifiques des épitopes de formule (I) tels que définis dans la revendication 1, dans un échantillon biologique, de
30 préférence un plasma ou un sérum,
caractérisé en ce qu'il comprend :

- au moins un épitope de formule (I) tel que défini dans la revendication 1
et
- le matériel approprié et nécessaire pour détecter/révéler les complexes anticorps-
35 épitopes de formule (I).

1/3

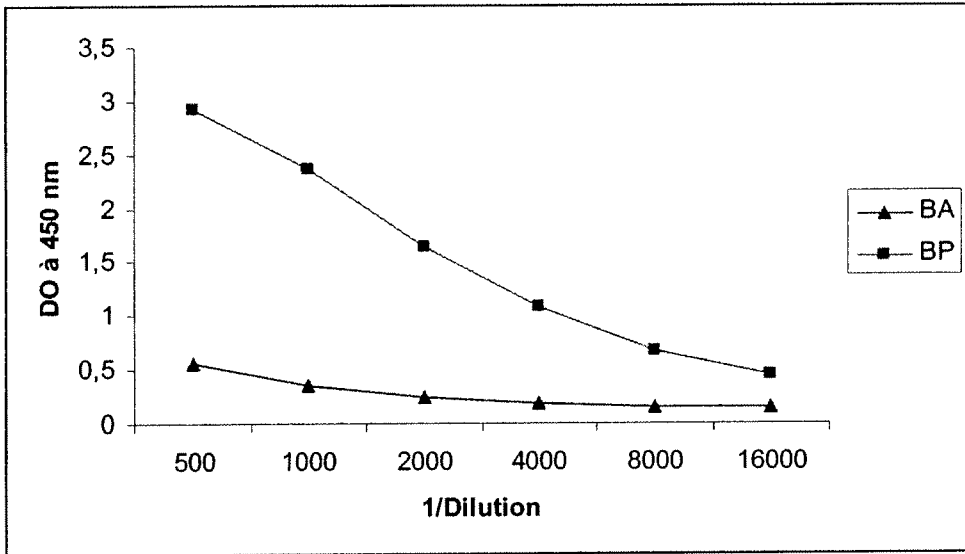


Figure 1

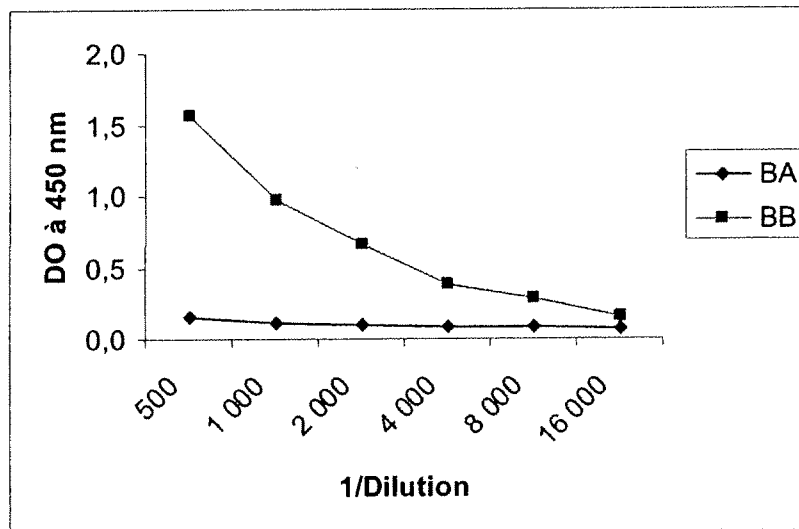


Figure 2

2/3

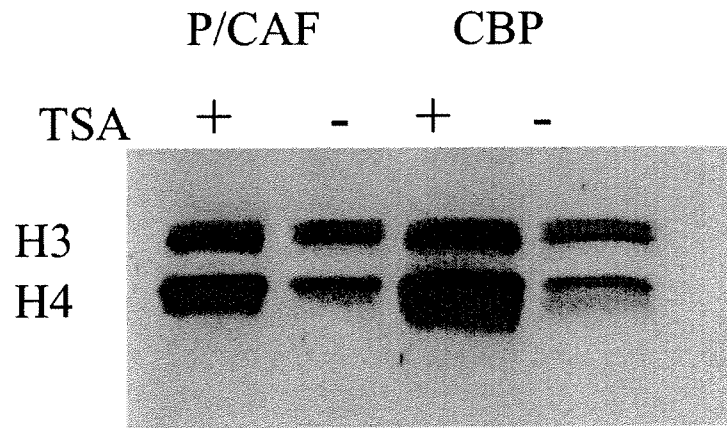


Figure 3

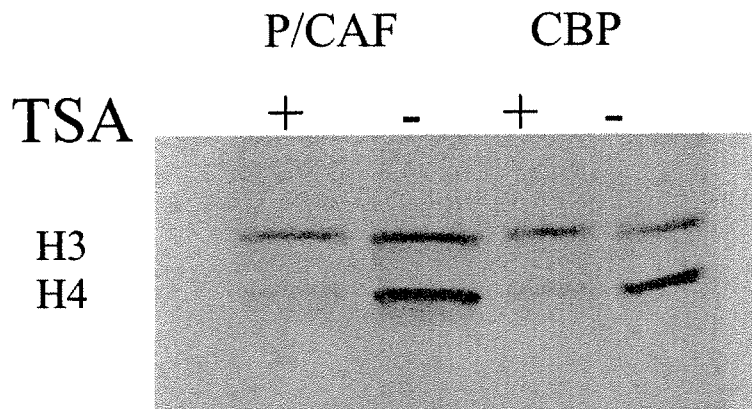


Figure 4

3/3

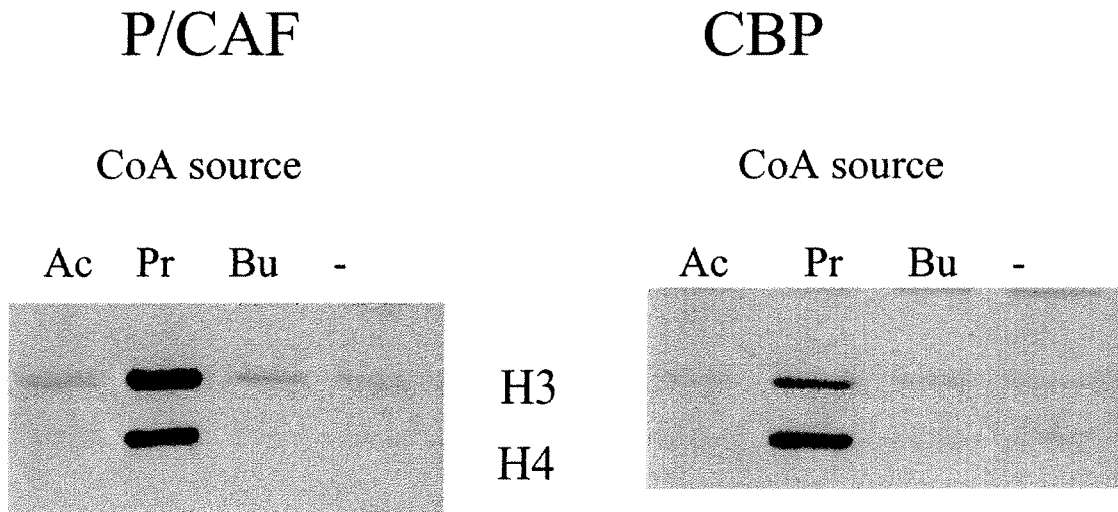


Figure 5

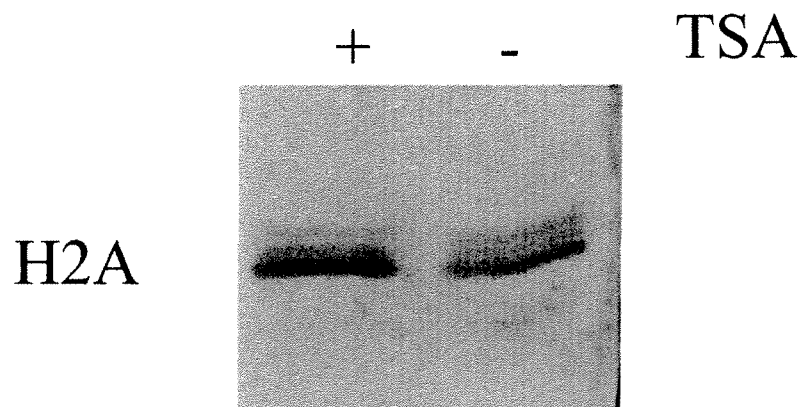


Figure 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/056334

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/18 C07K16/44 G01N33/68 G01N33/564 C12P21/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K G01N A61K

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

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

EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	THOMAS V ET AL: "Definition of the fine specificity of the monoclonal antibody 81D4: its reactivity with lysine and polyamine isopeptide cross-links" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 292, no. 1-2, 1 September 2004 (2004-09-01), pages 83-95, XP004550502 ISSN: 0022-1759 cited in the application	1,8-11
Y	" Results" et "differential screening of Mabs" Fig. 2 et premier du "discussion"	5-7, 12-13
X	EP 0 785 432 B (IMMUNOTECH SA [FR]) 13 September 2000 (2000-09-13) page 26; example 3	1,8-11
	----- -/--	

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

Date of the actual completion of the international search

25 août 2009

Date of mailing of the international search report

02/11/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Vadot, Pierre

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2009/056334

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BARTON MA ET AL: "Synthetic polypeptides antigens of defined geometry" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 99, no. 26, 1977, pages 8491-8498, XP008104608 page 8497, colonne de droite, dernier paragraphe : "immune response" -----	1
X	IWABATA HISAKO ET AL: "Proteomic analysis of organ-specific post-translational lysine-acetylation and -methylation in mice by use of anti-acetyllysine and -methyllysine mouse monoclonal antibodies." PROTEOMICS DEC 2005, vol. 5, no. 18, December 2005 (2005-12), pages 4653-4664, XP002522296 ISSN: 1615-9853 paragraphs [03.1], [03.3] -----	1,8-11
A	VILLAR-GAREA ANA ET AL: "The analysis of histone modifications." December 2006 (2006-12), BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA DEC 2006, VOL. 1764, NR. 12, PAGE(S) 1932 - 1939 , XP002522298 ISSN: 0006-3002 paragraph [0004] -----	1,8-11
X	EL ALAOUI S ET AL: "Transglutaminase activity and N epsilon (gamma glutamyl) lysine isopeptide levels during cell growth: an enzymic and immunological study." 10 May 1991 (1991-05-10), INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER. JOURNAL INTERNATIONAL DU CANCER 10 MAY 1991, VOL. 48, NR. 2, PAGE(S) 221 - 226 , XP008104787 ISSN: 0020-7136 preparation of Mabs -----	1,8-11
Y	CHEN YUE ET AL: "Lysine propionylation and butyrylation are novel post-translational modifications in histones." MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS : MCP MAY 2007, vol. 6, no. 5, May 2007 (2007-05), pages 812-819, XP002522297 ISSN: 1535-9476 page 812, colonne de droite, 2nd -----	5-7, 12-13
X,P	US 2008/241862 A1 (ZHAO YINGMING [US] ET AL) 2 October 2008 (2008-10-02) example 5 -----	1,3-13

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see extra sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1 (all); 3-13 (in part)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box III

The International Searching Authority has found that the international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 1 (entirely); 3 to 13 (in part)

Isolated antibodies or at least one of the functional fragments thereof, characterised in that they are specific to an epitope including at least one lysyl unit having formula (I) as described in the present claim 1;

A method for producing antibodies or at least one of the functional fragments thereof as defined in one of claims 1 to 4, characterised in that it consists in:

- (a) implementing a synthon having formula (I); or reacting a molecule having formula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-O-CO-(CH}_2\text{)}_n\text{-CH}_3$, where n is 1 or 2; or implementing an epitope having formula (I) in which at least one of the radicals R_0 , R_1 is other than H or R_2 is other than OH;
- (b) coupling said synthon with a carrier molecule;
- (c) recovering plasma/serum from said animal into which said combined synthon-carrier molecule coupling has previously been injected;
- (d) selecting the specific antibodies of said synthon used in step (a) using one or more epitopes having formula (I) as defined in claim 1;
- (e) optionally purifying the antibodies using conventional techniques;

A composition that includes antibodies or at least one of the functional fragments thereof, as defined in one of claims 1 to 4 or obtained according to the method as defined in one of claims 5 to 7;

A method for detecting the epitope having formula (I), as defined in claim 1, in a biological sample, which method is characterised in that it includes the following steps:

- (A) optionally attaching the antibodies or one of the functional fragments thereof, as defined in one of claims 1 to 4 or included in a composition as defined in claim 8, to a suitable medium;
- (B) bringing a sample that potentially contains said epitope having formula (I) into contact with the antibodies or at least one of the functional fragments thereof, as defined in one of claims 1 to 4 or included in a composition as defined in claim 8;
- (C) optionally performing at least one wash;
- (D) detecting/revealing the antibody-epitope complexes having formula (I);

A detection kit as described in claim 11;

A method for detecting auto-antibodies as described in claim 12;

A kit for detecting auto-antibodies as described in claim 13.

2. Claims 2 (entirely); 3 to 13 (in part)

Isolated antibodies or at least one of the functional fragments thereof according to claim 1, characterised in that they are not specific or have a low degree of specificity with respect to an epitope containing at least one lysyl unit having formula (I) in which R0, R1, R2 are as defined above and R3 is -CH3;

A method for producing antibodies or at least one of the functional fragments thereof, as defined in one of claims 1 to 4, characterised in that it consists in:

- (a) implementing a synthon having formula (I); or reacting a molecule having formula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-O-CO-(CH}_2\text{)}_n\text{-CH}_3$, where n is 1 or 2; or implementing an epitope having formula (I) in which at least one of the radicals R0, R1 is other than H or R2 is other than OH;
- (b) coupling said synthon with a carrier molecule;
- (c) recovering plasma/serum from said animal into which said combined synthon-carrier molecule coupling has previously been injected;
- (d) selecting the specific antibodies of said synthon used in step (a) using one or more epitopes having formula (I) as defined in claim 1;
- (e) optionally purifying the antibodies using conventional techniques;

A composition that includes antibodies or at least one of the functional fragments thereof, as defined in one of claims 1 to 4 or obtained according to the method as defined in one of claims 5 to 7;

A method for detecting the epitope having formula (I), as defined in claim 1, in a biological sample, which method is characterised in that it includes the following steps:

- (A) optionally attaching the antibodies or one of the functional fragments thereof, as defined in one of claims 1 to 4 or included in a composition as defined in claim 8, to a suitable medium;
- (B) bringing a sample that potentially contains said epitope having formula (I) into contact with the antibodies or at least one of the functional fragments thereof as defined in one of claims 1 to 4 or included in a composition as defined in claim 8;
- (C) optionally performing at least one wash;
- (D) detecting/revealing the antibody-epitope complexes having formula (I);

A detection kit as described in claim 11;

A method for detecting auto-antibodies as described in claim 12;

A kit for detecting auto-antibodies as described in claim 13.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/EP2009/056334

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0785432	B	13-09-2000	AT 196362 T 15-09-2000
			AU 712896 B2 18-11-1999
			AU 1221497 A 31-07-1997
			CA 2193717 A1 19-07-1997
			DE 69610283 D1 19-10-2000
			DE 69610283 T2 29-03-2001
			DK 785432 T3 22-01-2001
			EP 0785432 A1 23-07-1997
			ES 2151646 T3 01-01-2001
			FR 2743891 A1 25-07-1997
			GR 3034962 T3 28-02-2001
			US 5817468 A 06-10-1998
US 2008241862	A1	02-10-2008	NONE

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2009/056334

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

INV. C07K16/18 C07K16/44 G01N33/68 G01N33/564 C12P21/00

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

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

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

C07K G01N A61K

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

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	THOMAS V ET AL: "Definition of the fine specificity of the monoclonal antibody 81D4: its reactivity with lysine and polyamine isopeptide cross-links" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 292, no. 1-2, 1 septembre 2004 (2004-09-01), pages 83-95, XP004550502 ISSN: 0022-1759 cité dans la demande	1,8-11
Y	" Results" et "differential screening of Mabs" Fig. 2 et premier du "discussion"	5-7, 12-13
X	EP 0 785 432 B (IMMUNOTECH SA [FR]) 13 septembre 2000 (2000-09-13) page 26; exemple 3	1,8-11
	----- -/--	

 Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

 Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

& document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

25 août 2009

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

02/11/2009

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Vadot, Pierre

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2009/056334

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BARTON MA ET AL: "Synthetic polypeptides antigens of defined geometry" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 99, no. 26, 1977, pages 8491-8498, XP008104608 page 8497, colonne de droite, dernier paragraphe : "immune response" -----	1
X	IWABATA HISAKO ET AL: "Proteomic analysis of organ-specific post-translational lysine-acetylation and -methylation in mice by use of anti-acetyllysine and -methyllysine mouse monoclonal antibodies." PROTEOMICS DEC 2005, vol. 5, no. 18, décembre 2005 (2005-12), pages 4653-4664, XP002522296 ISSN: 1615-9853 alinéas [03.1], [03.3] -----	1,8-11
A	VILLAR-GAREA ANA ET AL: "The analysis of histone modifications." décembre 2006 (2006-12), BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA DEC 2006, VOL. 1764, NR. 12, PAGE(S) 1932 - 1939 , XP002522298 ISSN: 0006-3002 alinéa [0004] -----	1,8-11
X	EL ALAOUI S ET AL: "Transglutaminase activity and N epsilon (gamma glutamyl) lysine isopeptide levels during cell growth: an enzymic and immunological study." 10 mai 1991 (1991-05-10), INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER. JOURNAL INTERNATIONAL DU CANCER 10 MAY 1991, VOL. 48, NR. 2, PAGE(S) 221 - 226 , XP008104787 ISSN: 0020-7136 preparation of Mabs -----	1,8-11
Y	CHEN YUE ET AL: "Lysine propionylation and butyrylation are novel post-translational modifications in histones." MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS : MCP MAY 2007, vol. 6, no. 5, mai 2007 (2007-05), pages 812-819, XP002522297 ISSN: 1535-9476 page 812, colonne de droite, 2nd -----	5-7, 12-13
X,P	US 2008/241862 A1 (ZHAO YINGMING [US] ET AL) 2 octobre 2008 (2008-10-02) exemple 5 -----	1,3-13

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2009/056334

Cadre n° II Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 2 de la première feuille)

Le rapport de recherche internationale n'a pas été établi en ce qui concerne certaines revendications conformément à l'article 17.2)a) pour les raisons suivantes :

1. Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration chargée de la recherche internationale n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir :

2. Les revendications n^{os} parce qu'elles se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier :

3. Les revendications n^{os} parce qu'elles sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre n° III Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 3 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. Comme toutes les taxes additionnelles exigées ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.

2. Comme toutes les revendications qui se prêtent à la recherche ont pu faire l'objet de cette recherche sans effort particulier justifiant des taxes additionnelles, l'administration chargée de la recherche internationale n'a sollicité le paiement d'aucunes taxes de cette nature.

3. Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}:

4. Aucune taxes additionnelles demandées n'ont été payées dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}:
1 (complètement); 3-13 (en partie)

- Remarque quant à la réserve**
- Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant et, le cas échéant, du paiement de la taxe de réserve.
 - Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant mais la taxe de réserve n'a pas été payée dans le délai prescrit dans l'invitation.
 - Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUIITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1(complètement); 3-13(en partie)

Anticorps isolés ou au moins l'un de leurs fragments fonctionnels, caractérisés en ce qu'ils sont spécifiques d'un épitope comprenant au moins un motif lysyl de formule (I) comme décrit dans la présente revendication 1;

Procédé de fabrication des anticorps ou de au moins l'un de leurs fragments fonctionnels tels que définis dans l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il consiste à :

a) mettre en oeuvre un synthon de formule (I); ou faire réagir une molécule de formule $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-\text{O}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ où n vaut 1 ou 2; ou encore mettre en oeuvre un épitope de formule (I) dans laquelle au moins un des résidus R0, RI est différent de H ou R2 est différent de OH,

b) coupler ledit synthon à une molécule porteuse,

c) récupérer du plasma/sérum dudit animal auquel ledit couple synthon-molécule porteuse a été préalablement injecté,

d) sélectionner les anticorps spécifiques dudit synthon utilisé à l'étape a) à l'aide d'un ou plusieurs épitopes de formule (I) tels que définis dans la revendication 1,

e) éventuellement purifier les anticorps selon les méthodes classiques;

Composition comprenant des anticorps ou d'au moins l'un de leurs fragments fonctionnels tels que définis dans l'une des revendications 1 à 4, ou obtenus selon le procédé tel que défini dans l'une des revendications 5 à 7;

Procédé de détection, dans un échantillon biologique, de l'épitope de formule (I) tel que défini dans la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

A) éventuellement fixer sur un support approprié les anticorps ou l'un de leurs fragments fonctionnels tels que définis dans l'une des revendications 1 à 4 ou compris dans une composition telle que définie dans la revendication 8,

B) mettre en contact un échantillon contenant potentiellement ledit épitope de formule (I) avec les anticorps ou au moins l'un de leurs fragments fonctionnels tels que définis dans l'une des revendications 1 à 4 ou compris dans une composition telle que définie dans la revendication 8,

C) éventuellement effectuer au moins un lavage,

D) détecter/révéler les complexes anticorps-épitope(s) de formule (I);

Nécessaire de détection comme décrit dans la revendication 11;

Procédé de détection des auto-anticorps tel que décrit en revendication 12;

Nécessaire de détection des auto-anticorps tel que décrit en revendication 13.

SUIITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

2. revendications: 2(complètement); 3-13(en partie)

Anticorps isolés ou au moins l'un de leurs fragments fonctionnels, selon la revendication 1 caractérisés en ce qu'ils sont peu ou pas spécifiques d'un épitope contenant au moins un motif lysyl de formule (I) dans laquelle R0, R1, R2 sont tels que définis ci-dessus et R3 équivaut à -CH3.

Procédé de fabrication des anticorps ou de au moins l'un de leurs fragments fonctionnels tels que définis dans l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il consiste à :

a) mettre en oeuvre un synthon de formule (I); ou faire réagir une molécule de formule $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-\text{O}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ où n vaut 1 ou 2; ou encore mettre en oeuvre un épitope de formule (I) dans laquelle au moins un des résidus R0, R1 est différent de H ou R2 est différent de OH,
 b) coupler ledit synthon à une molécule porteuse,
 c) récupérer du plasma/sérum dudit animal auquel ledit couple synthon-molécule porteuse a été préalablement injecté,

d) sélectionner les anticorps spécifiques dudit synthon utilisé à l'étape a) à l'aide d'un ou plusieurs épitopes de formule (I) tels que définis dans la revendication 1,
 e) éventuellement purifier les anticorps selon les méthodes classiques;

Composition comprenant des anticorps ou d'au moins l'un de leurs fragments fonctionnels tels que définis dans l'une des revendications 1 à 4, ou obtenus selon le procédé tel que défini dans l'une des revendications 5 à 7;

Procédé de détection, dans un échantillon biologique, de l'épitope de formule (I) tel que défini dans la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

A) éventuellement fixer sur un support approprié les anticorps ou l'un de leurs fragments fonctionnels tels que définis dans l'une des revendications 1 à 4 ou compris dans une composition telle que définie dans la revendication 8,

B) mettre en contact un échantillon contenant potentiellement ledit épitope de formule (I) avec les anticorps ou au moins l'un de leurs fragments fonctionnels tels que définis dans l'une des revendications 1 à 4 ou compris dans une composition telle que définie dans la revendication 8,

C) éventuellement effectuer au moins un lavage,

D) détecter/révéler les complexes anticorps-épitope(s) de formule (I);

Nécessaire de détection comme décrit dans la revendication 11;

Procédé de détection des auto-anticorps tel que décrit en revendication 12;

Nécessaire de détection des auto-anticorps tel que décrit en revendication 13.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2009/056334

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
EP 0785432	B	13-09-2000	AT	196362 T	15-09-2000
			AU	712896 B2	18-11-1999
			AU	1221497 A	31-07-1997
			CA	2193717 A1	19-07-1997
			DE	69610283 D1	19-10-2000
			DE	69610283 T2	29-03-2001
			DK	785432 T3	22-01-2001
			EP	0785432 A1	23-07-1997
			ES	2151646 T3	01-01-2001
			FR	2743891 A1	25-07-1997
			GR	3034962 T3	28-02-2001
			US	5817468 A	06-10-1998
<hr/>					
US 2008241862	A1	02-10-2008	AUCUN		
<hr/>					