



MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1009230A6

NUMERO DE DEPOT : 09500316

Classif. Internat. : G01N A61

Date de délivrance le : 07 Janvier 1997

**Le Ministre des Affaires Economiques,**

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l'arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

Vu le procès verbal dressé le 05 Avril 1995 à 24H00 à l'Office de la Propriété Industrielle

## ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : ANDA BIOLOGICALS S.A.  
rue de la Course 37, F-67067 STRASBOURG CEDEX(FRANCE)

représenté(e)s par : VAN MALDEREN Eric, OFFICE VAN MALDEREN, Place Reine Fabiola  
6/1 - B 1083 BRUXELLES.

un brevet d'invention d'une durée de 6 ans, sous réserve du paiement des taxes  
annuelles, pour : CONJUGUE IMMUNOACTIF.

INVENTEUR(S) : Maes Roland, Chemin du Rosenmeer, F-67190 Mutzig (FR)

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité  
de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de  
la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeurs s.

Bruxelles, le 07 Janvier 1997  
PAR DELEGATION SPECIALE :

  
WUYTS L

Directeur

BAD ORIGINAL

5

10

**CONJUGUE IMMUNOREACTIF.****Objet de l'invention.**

15 La présente invention concerne un conjugué immunoréactif, les anticorps dirigés contre le conjugué immunoréactif ainsi que les anticorps dirigés contre lesdits anticorps.

20 La présente invention concerne également la trousse de diagnostic ainsi que la composition pharmaceutique comprenant ledit conjugué et/ou les dits anticorps, ainsi que leur utilisation.

**Arrière-plan technologique à la base de l'invention.**

25 De nombreuses maladies ont une étiologie inconnue ou incertaine, où l'intervention d'une composante immunologique n'est pas à exclure. Ainsi, l'arthrite rhumatoïde ou le SIDA peuvent présenter une composante infectieuse (d'origine virale ou bactérienne) et/ou une composante immunologique, mais la relation entre ces deux  
30 manifestations pathologiques n'est pas élucidée.

De même, la migraine pourrait éventuellement être caractérisée par une composante immunologique semblable.

35 Cependant, il est à l'heure actuelle impossible de concevoir la possibilité d'existence d'auto-anticorps qui puissent avoir l'effet dévastateur que présente le syndrome d'immunodéficience acquise ou encore engendrer les céphalées

intolérables observées dans certaines migraines ou les atrophies musculaires incapacitantes observées dans l'arthrite rhumatoïde et il est également difficile de concevoir comment un agent infectieux peut être l'agent  
5 étiologique capable de provoquer une telle synthèse d'auto-anticorps.

Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est une conséquence de l'infection par le HIV mais le syndrome apparaît avec un décalage de plusieurs mois ou même plusieurs  
10 années après le début de l'infection, sans qu'on sache quel est l'élément causal qui a provoqué ce passage de l'état latent vers le syndrome. Une composante auto-immune n'est pas envisagée, et d'ailleurs les méthodes nécessaires pour entreprendre une telle recherche n'existent pas.

15 L'arthrite rhumatoïde est expérimentalement provoquée dans l'animal (le rat) par injection de concentrés de mycobactéries sans qu'on sache quel rôle ces produits mycobactériens jouent dans l'apparition de cette arthrite expérimentale. Une composante auto-immune est soupçonnée dans  
20 l'arthrite rhumatoïde humaine parce que la gestation réduit ou supprime, pour la durée de la grossesse, l'évolution de la maladie, mais les méthodes nécessaires pour entreprendre une telle recherche au niveau de l'auto-immunité des malades ne sont pas disponibles et par ailleurs, on ne saurait que  
25 chercher.

La tuberculose est chronique chez beaucoup de malades, sans qu'on sache quel est le motif de cette persistance mycobactérienne ni la cause du réveil de la maladie. La tuberculose s'accompagne d'une immunodépression  
30 chez les patients qui se présentent pour un traitement spécifique mais les auto-anticorps potentiellement débilissants qui pourraient accompagner les phénomènes d'immunosuppression ne sont ni soupçonnés ni, a fortiori, recherchés.

35 La migraine est d'étiologie inconnue, mais la douleur de la migraine est d'origine vasculaire. Aucun modèle

de pathogenèse de la migraine ne se base sur une théorie auto-immune.

La démonstration que les indolamines (tryptamine, sérotonine, méthoxytryptamine, etc.) présents dans le cerveau peuvent être rendus immunogènes par leur couplage à des molécules porteuses, que les anticorps induits artificiellement par vaccination peuvent être détectés (Antisera against the Indolealkylamines : tryptophan, 5-hydroxytryptophan, 5-hydroxytryptamine, 5-methoxytryptophan and 5-méthoxytryptamine tested by an ELISA method, M. Geffard et al., J. Neurochemistry, 44, 1221-1228 (1985)) et que la sérotonine a été impliquée comme médiatrice de la migraine rend plausible l'hypothèse que des auto-anticorps anti-indoles peuvent être impliqués chez tous ou du moins une partie des migraineux souffrant de maux de tête.

Si la possibilité de créer expérimentalement des anticorps contre la sérotonine, la tryptamine et autres dérivés indoliques chez l'animal par injection de conjugués de ces haptènes à de l'albumine et analyse subséquente du sérum par un test ELISA pour la détection des anticorps créés, a été décrite il y a une décennie, les tests diagnostiques suffisamment sensibles pour prouver leur hypothétique existence chez des migraineux souffrant de maux de tête n'existent pas.

Cependant, pour arriver à obtenir artificiellement des anticorps dirigés contre de tels acides aminés ou des dérivés d'acides aminés, il est nécessaire de préparer un conjugué constitué par ledit acide aminé ou le dérivé d'acide aminé couplé à une protéine porteuse telle que la sérum-albumine bovine.

Pour obtenir un conjugué immunoréactif, c'est-à-dire un conjugué contre lequel il est possible d'obtenir une synthèse importante d'anticorps, il est nécessaire d'arriver à obtenir le couplage de nombreux acides aminés ou de dérivés d'acides aminés sur ladite protéine porteuse.

Cependant, à ce stade, il n'a pas été possible

d'obtenir un tel conjugué qui soit immunoréactif et qui pourrait être utilisé dans un procédé de détection et/ou de quantification d'anticorps ou utilisé comme une composition pharmaceutique susceptible de garantir une réaction immunitaire humorale et/ou cellulaire.

En outre, le concept d'auto-anticorps contre des acides aminés et leurs dérivés, associés à des maladies auto-immunes, n'est pas d'actualité et représente une déviation intolérable qui gouverne ce domaine de la recherche médicale.

#### 10 Buts de l'invention.

La présente invention vise à obtenir un nouveau conjugué comprenant un ou plusieurs ligands choisis parmi le groupes des acides aminés et/ou les dérivés d'acides aminés couplés à une protéine porteuse, ledit conjugué étant immunoréactif.

La présente invention vise également à obtenir les anticorps dirigés contre ledit conjugué immunoréactif.

Un autre aspect de la présente invention vise à mettre au point un procédé de détection et/ou de quantification d'anticorps présents dans un fluide corporel d'un patient, comprenant l'utilisation du conjugué et/ou des anticorps selon l'invention.

Un but complémentaire de la présente invention vise à obtenir une trousse de diagnostic et/ou une composition pharmaceutique comprenant ledit conjugué et/ou lesdits anticorps selon la présente invention.

#### Eléments caractéristiques de la présente invention.

La présente invention concerne un conjugué immunoréactif comprenant un ou plusieurs ligand(s) choisis parmi le groupe constitué par les acides aminés et/ou les dérivés d'acides aminés comportant un groupe sulfhydryl, ledit ligand étant lié à une protéine porteuse hydrosoluble d'un poids moléculaire supérieur à 8000 KD, par un agent couplant susceptible de se fixer au groupement sulfhydryl desdits ligands.

Selon la présente invention, on entend par acide

aminé et dérivé d'acide aminé comportant un groupement sulfhydryl, un acide aminé tel que la cystéine ou un dérivé d'un tel acide aminé tel que la N-acétyl-N-cystéine comprenant de manière native ledit groupement sulfhydryl.

5 Des dérivés d'acides aminés comportant un groupe sulfhydryl peuvent être des acides aminés modifiés par des produits réactionnels qui substituent un groupement -SH au groupement NH<sub>2</sub> selon des méthodes bien connues de l'Homme de l'Art.

10 Cette substitution peut par exemple être obtenue au moyen du réactif de Traut (2-iminothiolane-HCl) ou encore le N-succinimidyl S-acétylthioacétate. L'agent couplant utilisé dans le procédé selon l'invention est donc susceptible de se fixer au groupement -SH desdits ligands.

15 De préférence, le ligand est choisi parmi le groupe constitué par la cystéine, la N-acétyl-L-cystéine, la cystéine-NO ou la N-acétyl-L-cystéine-NO.

Selon l'invention, le ligand peut également être constitué par une indolamine telle que le tryptophane, le 5-  
20 hydroxytryptophane, la 5-hydroxytryptamine, la tryptamine, le 5-méthoxytryptophane, l'acide indoléacétique, le tryptophol, la 6-hydroxytryptamine, la 5-méthoxytryptamine, la 5,6-dihydroxytryptamine, la N-acétylsérotonine, l'acide 5-méthoxyindoléacétique, l'acide 5-hydroxyindoléacétique, la  
25 mélatonine, le 5-méthoxytryptophol ou le 5-hydroxytryptophol.

Les indolamines sont des métabolites présents dans le tissu mammalien issus du métabolisme de la sérotonine et sont le résultat d'actions d'enzymes telles que la monoamine  
30 oxydase et la N-acétyltransférase.

Avantageusement, dans le conjugué immunoréactif selon la présente invention, la protéine porteuse est choisie parmi le groupe constitué par la gélatine, l'histone, l'albumine, la polysérine ou la thyroglobuline.

35

D'autres protéines bien connues de l'Homme de l'Art susceptibles d'être couplées au ligand pour former le conjugué immunoréactif selon la présente invention peuvent également être utilisées.

5           Avantageusement, dans le conjugué immunoréactif selon la présente invention, l'agent couplant est choisi parmi le groupe constitué par la parabenzoquinone, la P-toluquinone, la dichloroquinone, la chinhydrone ou la toluquinone.

10           Cependant, d'autres agents couplants capables d'être fixés à une protéine et susceptibles de se fixer au groupement -SH des ligands peuvent être utilisés.

          De tels agents couplants peuvent être le N,N'-O-phénylènedimaléimide ou le N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate, le succinimidyl-4-(N-maléimido-15 méthyl)cyclohexane-1-carboxylate ou son sulfo-dérivé.

          Un autre aspect de la présente invention concerne l'anticorps dirigé contre le conjugué immunoréactif selon la présente invention.

20           En effet, la Demanderesse a démontré qu'il est possible d'obtenir un conjugué immunoréactif, c'est-à-dire qu'il a une structure antigénique et/ou immunogénique, et qu'il est possible d'obtenir une réaction croisée entre ledit conjugué et un anticorps dirigé contre ledit conjugué.

25           La présente invention concerne également l'anticorps dirigé contre ledit anticorps.

          Un autre aspect de la présente invention concerne la trousse de diagnostic comprenant le conjugué et/ou les anticorps selon l'invention.

30           Il est donc possible de réaliser un procédé de détection et/ou de quantification d'anticorps présents dans un fluide corporel d'un patient, lesdits anticorps étant spécifiques d'une pathologie comportant une réponse auto-immune. Selon ce procédé, on prélève le fluide corporel du patient, on fait réagir les anticorps présents dans le fluide 35 corporel avec le conjugué selon l'invention et on détecte

et/ou quantifie la réaction croisée entre ledit conjugué et lesdits anticorps dirigés contre ledit conjugué.

La présente invention concerne également la composition pharmaceutique comprenant la conjugué et/ou les anticorps selon l'invention.

Un dernier aspect de la présente invention concerne l'utilisation de la composition pharmaceutique selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement des pathologies comportant une réponse auto-immune.

On entend par pathologie présentant une réponse auto-immune, les maladies auto-immunes et/ou les maladies caractérisées par une infection entraînant une perturbation du système immunitaire.

De préférence, lesdites pathologies comportant une réponse auto-immune sont choisies parmi le groupe constitué par la sclérose en plaque, la sclérose amyotrophique latérale, l'hyperthyroïdie, l'arthrite, la cirrhose, les lupus, les syndromes antiphosphatides (accidents thrombotiques, dermatites bulleuses, ...), les syndromes néphrotiques, les accidents vasculaires cérébraux, la myasthénie, le cancer et/ou le syndrome d'immuno-déficience acquis.

Il est également possible d'inclure dans la définition d'une pathologie comportant une réponse auto-immune, la migraine.

**Description d'une forme d'exécution préférée de l'invention.**

L'invention repose sur l'observation, connue depuis longtemps, que les agents infectieux induisant des désordres immunitaires ou des maladies telles que le syndrome d'immuno-déficience acquise ou la tuberculose, infectent les macrophages des personnes infectées et peuvent y résider longtemps.

Pourtant, la mission principale de ces macrophages est l'élimination de ces agents infectieux.

Il a été également pris en considération que les radicaux libres oxydants, entre autres l'oxyde nitrique (NO), synthétisés dans les macrophages en première réponse à une infection, sont très nocifs pour les cellules elle-mêmes et que ces radicaux sont rapidement séquestrés par un acide aminé particulier (la cystéine).

La cystéine est le récepteur naturel de l'oxyde nitrique et forme de la cystéine-NO.

De façon inattendue, la Demanderesse a découvert qu'il est possible de former des immunoconjugués de cystéine et de cystéine-NO en les couplant à une protéine porteuse telle que de la gélatine, une histone, de l'albumine ou toute autre protéine porteuse bien connue de l'Homme de l'Art, et qu'il était possible qu'un patient souffre d'affections diverses avec des anticorps qui réagissent contre cet immunoconjugué comprenant la cystéine-NO ainsi que l'acide aminé naturel cystéine. Ceci a été observé dans un test ELISA où les puits étaient sensibilisés par le conjugué selon l'invention. Il est même apparu que les anticorps de ces patients étaient caractérisés par une réaction beaucoup plus efficace avec le conjugué selon l'invention comprenant l'acide aminé naturel (cystéine n'ayant pas fixé l'oxyde nitrique).

De manière inattendue, il est donc possible d'obtenir des conjugués immunoréactifs comprenant un ou plusieurs ligands choisis parmi le groupe constitué par les acides aminés et/ou les dérivés d'acides aminés comprenant un groupe sulfhydryl, ledit ligand étant lié à une protéine porteuse par un agent couplant susceptible de se fixer au groupement -SH dudit ligand.

La fixation des acides aminés ou des dérivés d'acides aminés est particulièrement efficace, c'est-à-dire qu'il est possible sur une seule protéine porteuse de fixer un grand nombre d'acides aminés ou de dérivés d'acides aminés, lorsqu'on utilise comme agent couplant la parabenzoquinone (PBQ).

La parabenzoquinone est une molécule qui fut proposée comme agent couplant pour la synthèse d'immunoconjugués constitués d'un enzyme et d'un anticorps. L'action couplante de PBQ porte sur une variété de radicaux présents dans les protéines et polysaccharides (groupes aminés, sulfhydryl, -OH et -H) mais son usage a été rapidement abandonné en raison de l'inactivation de l'activité enzymatique et immunologique des conjugués obtenus (Coupling of enzymes to antibodies and antigens, Avrameas S. et al., Scand. J. Immunol. Vol 8, Suppl.7. 7-23 (1978)).

L'activation d'acides aminés, entre autre la cystéine, en vue de leur conjugaison avec des protéines ou autres molécules, est réalisée communément par l'intermédiaire :

- 1) du carbodiimide qui active la fonction carboxylique (-COOH) d'une molécule et réagit ensuite ou en même temps avec une fonction amine (-NH<sub>2</sub>) d'une autre (ou de la même) molécule,
- 2) de la glutaraldéhyde qui réagit avec la fonction -NH<sub>2</sub> d'une molécule et une fonction -NH<sub>2</sub> d'une autre (ou de la même) molécule, ou encore
- 3) de l'anhydride succinique ou glutarique, maléique etc. qui attaque la fonction -NH<sub>2</sub> libre des molécules et la prolonge en une fonction carboxylique, laquelle est ensuite activée par la carbodiimide.

Si une activation des fonctions carboxyliques en phase organique est envisagée, ceci est possible par l'éthylchloroformate.

D'autres méthodes de couplage consistent en la substitution des amines primaires de deux molécules par un groupement liant -S-S. Ceci s'effectue généralement par un agent hétérobifonctionnel dont une moitié succinimide s'implante au niveau des -NH<sub>2</sub> d'une molécule, habituellement les -NH<sub>2</sub> de la lysine, suivi de la libération du groupement thiol (-SH) constituant l'autre moitié de l'agent

hétérobifonctionnel couplant, par réduction (dithiothréitol ou mercaptoéthanol) d'une fonction S-S cachée, puis réaction du groupement thiol libéré dans cette molécule avec un groupe S-S caché d'une autre molécule activée par le même ou un  
5 autre agent hétérobifonctionnel de même nature, possédant encore une moitié réactionnelle S-S cachée non-réduite.

Le résultat de cette méthode de couplage, bien connue de l'Homme de l'Art, est la formation intermoléculaire d'un pont S-S couplant les deux molécules activées. L'agent  
10 hétérobifonctionnel couplant préférentiellement utilisé pour ce type de couplage est le SPDP (N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate. Si une des molécules destinées à la conjugaison possède déjà une fonction -SH, le processus d'activation et de couplage par le SPDP est simplifié de  
15 moitié.

Une grande variété de méthodes de couplage existe, soit comme variantes de celles décrites ici, soit comme systèmes différents (par exemple libération des fonctions aldéhydiques des sucres souvent présents dans les protéines,  
20 au moyen de  $\text{NaIO}_4$ , puis réaction des aldéhydes libérés avec des fonctions amines des protéines) mais la plupart, sinon toutes les méthodes décrites, incorporent d'une façon ou d'une autre un groupement  $-\text{NH}_2$ , présent sur une molécule ou l'autre, dans le processus de la conjugaison. Le plus  
25 souvent, l'amine primaire modifiée appartient à la lysine. Même des protéines porteuses (hémocyanine, albumine) activées par une maléimide réactive avec des sulfhydryls, portent les fonctions maléimide uniquement greffées sur les résidus lysine de ces protéines porteuses.

Le mérite d'un couplage par l'intermédiaire de la parabenzoquinone réside d'abord dans le très grand nombre de sites réactionnels greffés sur la protéine porteuse, non  
30 limités à la fonction epsilon-amine de la lysine ou aux groupes carboxyliques, ensuite dans la simplicité de la méthode, ensuite dans la réalisation que le groupement -SH, soit naturellement présent dans certaines protéines et acides  
35

aminés et dérivés aminés, soit introduit artificiellement dans les molécules destinées au couplage, n'est pas un groupement réactionnel parmi d'autres mais bien un groupement réactionnel préférentiel du PBQ, enfin dans la réalisation que  
5 l'attachement de la cystéine ou de la N-acétylcystéine au polymère porteur par l'intermédiaire du groupement thiol n'influe pas ou peu sur les qualités immunologiques de la cystéine ou N-acétylcystéine couplées. Les acides aminés non soufrés, et leurs dérivés possesseurs d'un groupement -NH<sub>2</sub>,  
10 peuvent être utilisés tels quels et greffés au polymère porteur activé par la PBQ par l'intermédiaire de leur fonction amine mais ils peuvent aussi avantageusement être modifiés par des produits réactionnels simples qui substituent un groupement -SH au groupement -NH<sub>2</sub>, selon des méthodes bien  
15 connues de l'Homme de l'Art, et être ensuite couplés avec une efficacité remarquable à la protéine porteuse par l'intermédiaire de la parabenzoquinone. Le SPDP déjà décrit peut être utilisé pour remplacer un groupement -NH<sub>2</sub> d'acide aminé par un groupement -SH mais des molécules plus simples et d'utilisation plus simple, telles le réactif de Traut (2-  
20 Iminothiolane-HCl) ou encore le N-succinimidyl S-Acetylthioacétate, peuvent également être utilisées, avec une grande simplicité dans la méthode de substitution. De même, outre la benzoquinone, on peut envisager la p-toluquinone,  
25 la dichlorquinone, la chinhydrone, la toluquinone et autres dérivés de la benzoquinone pour remplir le rôle d'agent couplant rempli par la benzoquinone.

Différents conjugués immunoréactifs selon la présente invention ont été préparés en activant différentes  
30 protéines porteuses telles que de l'albumine bovine délipidée, mais également de l'hémocyanine, des histones, de la poly-lysine ou de la polysérine, etc. par de la benzoquinone et en les couplant à de la cystéine, de la N-acétyl-L-cystéine, de la glutamine et de la glycine.

35 Les acides aminés possèdent par définition un groupement aminé qui peut servir à leur greffage à des

polymères porteurs mais dont la modification en groupement sulfhydryl est couramment pratiquée par l'Homme de l'Art. Les réactifs les plus communément utilisés sont le réactif de Traut (2-Iminothiolane-HCl) ou encore le N-succinimidyl S-Acéthylthioacétate (SATA). La réaction d'addition d'un groupement sulfhydryl à une amine primaire au moyen d'un de ces deux réactifs se réalise facilement à un pH supérieur à 7. Dans le cas du SATA, la terminaison sulfhydryl est protégée et peut être facilement libérée par traitement avec de l'hydroxylamine.

Il est possible de :

- soit activer l'acide aminé ou un dérivé d'acide aminé par de la benzoquinone, que cet acide soit modifié ou non par substitution d'un groupement sulfhydryl à la place de l'amine primaire, puis mettre l'acide aminé activé en contact avec le polymère porteur,
- soit d'activer la protéine porteuse par de la benzoquinone pour ensuite y coupler l'acide aminé ou un dérivé d'acide aminé, que cet acide soit modifié ou non par substitution d'un groupement sulfhydryl à la place de l'amine primaire.

Préférentiellement, la substitution des amines primaires d'un acide aminé par un groupement sulfhydryl est pratiquée systématiquement. Les deux approches décrites, l'activation de l'haptène (acide aminé naturel ou dérivé d'acide aminé naturel) et l'activation de la protéine porteuse, se sont révélées également valables.

Préférentiellement, on activera la protéine porteuse, qui permet par son poids moléculaire élevé une élimination simple et rapide de la PBQ en excès, par filtration, chromatographie ou dialyse.

Une activation de la protéine porteuse par la benzoquinone a été décrite (Coupling of enzymes to antibodies and antigens, Avrameas S. et al., Scand. J. Immunol. Vol 8, Suppl.7. 7-23 (1978)). L'activation et couplage préconisés sont : 4 mg de protéine (enzyme) plus 3 à 6 mg de PBQ à pH

6 (tampon phosphate) durant 1 heure, suivi de chromatographie d'exclusion (NaCl 0,9 %), recueil de la solution colorée éluant en tête, ajout de l'anticorps (0,5 à 4 mg), ajustement du pH à 8,1 (NaHCO<sub>3</sub>) ou 9,0 ( tampon carbonate-bicarbonate),  
5 couplage durant 48 heures à 4 °C suivi de blockage des sites réactionnels par de la lysine à pH 7,0, élimination de la lysine par une dialyse contre un tampon pH 7,0, suivie d'une centrifugation et enfin d'une filtration stérilisante. Ces conditions de couplage, telles que décrites, sont  
10 inapplicables pour la conjugaison d'acides aminés et leurs dérivés à une protéine porteuse.

De préférence, la protéine porteuse, telle que l'albumine sérique, humaine ou bovine, est solubilisée à une concentration de 10 mg / ml de solution dans une solution aqueuse tamponnée à un pH acide, préférentiellement aux environs  
15 de pH 6. Le PBQ solubilisé à raison de 5 à 10 mg / ml dans un liquide organique (alcool, acétone ou autre solvant miscible à l'eau) est introduit dans la solution de protéine, en proportion variable selon les besoins de la synthèse. Une  
20 quantité, en poids, de PBQ égale au 1/50<sup>ème</sup> à 1/200<sup>ème</sup> du poids de protéine est préférée lorsque la protéine est de l'albumine. La réaction a lieu à une température qui peut varier de 0 à 37 °C ou même plus, à l'obscurité, durant un minimum de 1 heure mais qui peut être prolongée aussi  
25 longtemps que désiré. Normalement la réaction est poursuivie durant 2 heures à température ambiante, après quoi la teinte rose acquise par la solution ne s'accroît plus.

Après activation de la protéine porteuse par le PBQ ou par un autre constituant de la famille des quinones, le  
30 pH de la solution est rendu basique, soit par filtration, soit par dialyse soit par chromatographie d'exclusion, ce qui élimine également le PBQ qui n'aurait pas réagi, soit par addition d'une base. Le pH est amené vers 8 à 11,5, dépendant de la constante de dissociation des groupements réactionnels  
35 de l'haptène destiné au couplage, pour ensuite procéder au couplage des acides aminés et de leurs dérivés, soit par leur

fonction  $-NH_2$  (pH de couplage compris préférentiellement entre 9,5 et 12) soit par la fonction  $-SH$  des acides sulfhydrylés ou de leurs dérivés sulfhydrylés (pH de couplage compris préférentiellement entre 8 et 10,5).

5 Les haptènes sulfhydrylés sont préférés. Les haptènes sulfhydrylés sont introduits dans la solution de polymère activé dans une proportion variable selon le couplage désiré, en fonction du poids moléculaire de l'acide aminé sulfhydrylé ou de son dérivé, par rapport au nombre de  
10 molécules de PBQ introduites sur la protéine. Un excès de molécules d'haptène est souhaitable par rapport au nombre de molécules d'agent couplant, préférentiellement le PBQ, introduites. Normalement, le poids de l'acide aminé ou de ses dérivés excède 4 à 5 fois le poids de PBQ introduit. La  
15 réaction de couplage est instantanée, et la coloration rose de la solution disparaît à l'ajout du dérivé sulfhydrylé.

L'excès de molécules hapténiques est éliminé par dialyse, chromatographie ou filtration et le conjugué est stocké à  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  jusqu'à son utilisation pour développer des  
20 trousseaux diagnostiques, développer un système d'isolation d'anticorps spécifiques par chromatographie d'affinité ou encore développer des vaccins.

#### 1. Synthèse de Nocystéine et de NO-N-acétyl-L-cystéine.

La cystéine et la N-acétyl-L-cystéine, couplées ou  
25 non à la protéine porteuse, sont associées au  $-NO$  de la façon suivante : les produits sont acidifiés, normalement par 0,5 N ou 1 N HCl (pour la cystéine), mais une solution de  $KH_2PO_4$  ou une solution d'acide succinique ou tout autre acide, peuvent également convenir pour la N-acétyl-L-cystéine, qui n'est pas  
30 précipitée par ces acides. Le nitrite de sodium ( $NaNO_2$ ) est pesé et dissous dans la solution contenant les molécules possédant un groupement sulfhydryl. Normalement, un excès de facteur 3 à 4 de molécules de nitrite est ajouté aux molécules de cystéine ou de dérivés de cystéine porteurs d'un  
35 groupement sulfhydryl, présents dans la solution. La solution acide est placée à  $37\text{ }^\circ\text{C}$  durant au moins 30 minutes,

préférentiellement 60 minutes, pour que la liaison avec le NO puisse avoir lieu. Le pH de la solution est ensuite ramené vers la neutralité par addition d'un tampon pH 7,0 Tris ou phosphate concentré.

5 2. Sensibilisation des plaques de microtitration.

Les puits de plaques de microtitration, préférentiellement NUNC maxisorb, sont couverts par une solution (100 µl / puits) de NaCl 0,9 % tamponnée à pH 7,2 contenant entre 2 et 40 µg de protéine conjuguée, 10 préférentiellement de l'albumine conjuguée durant 24 heures à 4 °C. Un tampon pH 9,6 est également adéquat, ou tout autre milieu de sensibilisation qui favorise l'adsorption de la protéine conjuguée sur le plastique des puits. Après 24 heures ou plus d'incubation, les puits sont lavés par une 15 solution 0,9% de NaCl ou par toute autre solution de lavage, et ensuite stockés à 4 °C avant leur utilisation dans un test ELISA de détection d'anticorps anti-haptènes.

3. Chromatographie d'affinité.

Du sépharose activé par du CNBr ou par tout autre 20 agent couplant est disponible commercialement (Pharmacia, Uppsala, Suède). Le procédé de couplage de protéines porteuses telles que de l'albumine à cette suspension de gel de sépharose activé est connue de l'Homme de l'Art : le gel est lavé par une solution acide sur un filtre en céramique 25 ou verre fritté, le pH de la solution de suspension du gel est basifié, généralement amené à pH 7,2 ou 8. La protéine porteuse d'haptènes destinée au couplage est mélangée au gel et la réaction de couplage a lieu durant 24 heures à température ambiante. Le gel est ensuite lavé et utilisé pour 30 l'adsorption d'anticorps anti-haptènes ou antigènes fixés de façon covalente sur le gel par l'intermédiaire de la protéine porteuse. La réaction immunologique d'adsorption des anticorps sur les haptènes liés au gel se fait soit en batch soit sur une colonne, à pH neutre en milieu normalement 0,9 % 35 NaCl. L'élution des anticorps spécifiques s'effectue soit par des chaotropes, soit par des solutions acides (glycine-HCl

pH 2) soit par de l'eau distillée basifiée par  $\text{NH}_4\text{OH}$  à pH 12. Ces méthodes sont toutes bien connues de l'Homme de l'Art.

#### 4. Vaccination.

5 Des oiseaux et des mammifères peuvent être vaccinés par une solution d'albumine originaire de la même espèce, à laquelle a été couplé un acide aminé ou un dérivé d'acide aminé. La solution vaccinante peut être complétée par des adjuvants qui amplifieront la réaction immunologique de production d'anticorps induite par le vaccin.

#### 10 5. Détection d'anticorps de classe IgG et de classe IgM anti-N-acétyl-L-cystéine.

100 mg d'albumine bovine délipidée ont été mis en solution dans 5 ml d'eau contenant 5 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . 5 mg de PBQ ont été mis en solution dans 1 ml de méthanol, dont 15 0,25 ml (1,25 mg) ont été ajoutés à la solution de protéine. Après 1 heure à température ambiante et à l'obscurité, 2 ml de la solution (40 mg ) ont été dilués par 2 ml d'une solution contenant 4 mg / ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  et 2,5 mg de N-acétyl-L-cystéine. Après 30 minutes d'attente, la solution 20 d'immunoconjugué a été amenée à pH 7,2 par addition d'un tampon phosphate concentré. Une deuxième préparation d'immunoconjugué, constituée également de 4 ml contenant 40 mg de protéine, a été complétée par 12,5 mg de nitrite de soude et par 13 mg d'acide succinique. Après dissolution des 25 ingrédients ajoutés, la solution d'immunoconjugué a été placée à 37 °C durant 1 heure. La solution a été ensuite ramenée vers la neutralité par addition de 110 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Une solution d'albumine traitée de façon identique mais avec de la glutamine au lieu d'acétyl- 30 cystéine, a également été préparée. Une solution d'albumine sans haptène traitée de la même façon que les immunoconjugués a également été préparée.

Les immunoconjugués ont servi à fabriquer des plaques de microtitration pour la détermination de la 35 présence d'anticorps dans un échantillon : 20  $\mu\text{g}$  d'immunoconjugué par ml de solution de sensibilisation ont

été préparés dans un milieu de sensibilisation constitué de NaCl 0,9%, amené à pH 7,2 par un tampon phosphate 0,05 M. Après 18 heures d'incubation dans des puits de plaques de microtitration Maxisorb de Nunc, les puits ont été lavés par 0,9 % NaCl puis incubés durant 60 minutes à 37 °C par 100 µl de divers sérums humains dilués au centième dans une solution NaCl 0,9 % pH 7,2 contenant 0,2 % de tween 20. Après lavage par une solution tamponnée de NaCl contenant 0,1% de tween, les puits ont été recouverts durant 30 minutes par trois anticorps anti-IgG, IgA et IgM humains, marqués à la peroxydase. Après lavage, la présence éventuelle de peroxydase, proportionnelle à la présence d'anticorps spécifiques pour les haptènes ou pour l'albumine sensibilisant les puits, a été déterminée par une réaction enzymatique colorée basée sur le peroxyde d'hydrogène en présence de tétraméthylbenzidine. La réaction enzymatique produit une coloration bleue qui vire au jaune après addition d'une solution d'arrêt acide (0,5 NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). L'absorbance obtenue est mesurée à 450 nm. Les résultats sont donnés dans le tableau 1, pour cinq sérums numérotés de 1 à 5.

**Tableau 1**

	Albumine			NO-N-acétyl-cystéine			N-acétyl-L-cystéine		
	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA
1	0,3	0,31	0,56	0,30	0,28	0,55	0,30	0,28	0,45
2	0,57	0,42	0,46	0,49	0,31	0,44	0,36	0,30	0,44
3	0,78	0,33	0,45	0,77	0,31	0,40	0,70	0,30	0,40
4	0,30	0,23	0,47	1,51	0,25	0,46	1,44	0,24	0,48
5	0,29	0,48	0,34	0,27	1,42	0,33	0,24	1,33	0,31

Les résultats obtenus avec le contrôle glutamine étaient similaires au contrôle albumine et ne sont pas donnés ici, par souci de clarté. On voit que le serum 4 est positif en IgG pour la N-acétyl-L-cystéine (NAC), légèrement plus positif en présence de NAC-NO, tandis que le serum 5 est positif en IgM, pour les mêmes haptènes.

6. Mesure de la spécificité de la réaction immunologique.

Une vérification de la spécificité de la réaction immunologique a été effectuée par une réaction de compétition. Le sérum 4, réagissant immunologiquement avec la N-acetyl-L-cystéine immobilisée mais pas avec l'albumine, a été mis en contact en solution avec le même haptène couplé à de l'albumine, en concentrations décroissantes. La concentration de l'immunoconjugué, basé sur le poids de l'albumine porteuse, a été variée de 100 µg / ml à zéro, par dilutions de moitié, puis diluées de moitié avec une solution contenant l'anticorps anti-N-acetyl-cystéine. Les mélanges réactionnels ont été placés à 37 °C. Après 30 minutes d'incubation à 37 °C, les différents échantillons de sérum adsorbé ont été analysés pour la présence d'anticorps anti-N-acetyl-cystéine résiduels. Les résultats sont assemblés dans le tableau 2.

Tableau 2

Immunoconjugué (µg / ml)	Absorbance 450 nm
50	0,42
25	0,68
12,5	0,98
6,75	1,22
3,375	1,42
1,65	1,55
0,825	1,60
0	1,75

On voit que l'incubation du sérum 4 en présence d'haptène durant 30 minutes à 37 °C avant l'analyse ELISA, réduit considérablement l'adsorbance obtenue, et ce de façon proportionnelle à la concentration de l'immunoconjugué en solution, indiquant une inhibition spécifique de la réaction immunologique par l'NAC en solution.

### 7. Interférence immunologique due à la cystéine libre.

Une analyse de la spécificité de la réaction immunologique de l'anticorps IgG anti-N-acétyl-L-cystéine a été effectuée avec de la cystéine libre, en suivant le même  
5 protocole que dans l'exemple 2. Les résultats sont assemblés dans le tableau 3.

**Tableau 3**

	Cystéine libre ( $\mu\text{g}$ / ml)	Absorbance 450 nm
10	10	1,51
	5	1,59
	2,5	1,65
	1,25	1,68
	0,625	1,72
15	0,312	1,73
	0,156	1,76
	0	1,77

On voit que le même phénomène d'inhibition de la  
20 réaction immunologique de l'anticorps avec l'haptène N-acétyl-L-cystéine fixé sur les plaques observé dans l'exemple 2 avec des serums incubés en présence d'NAC-albumine libre, s'observe également lorsque l'anticorps est incubé  
préalablement durant 30 minutes à 37 °C en présence de  
25 cystéine libre. La relation directe observée entre la dose de cystéine et l'inhibition provoquée plaide fortement en faveur d'une inhibition spécifique. L'inhibition observée est beaucoup moins prononcée que celle obtenue avec la N-acétyl-L-cystéine couplée à l'albumine, indiquant que les anticorps  
30 sont plus spécifiques pour la N-acétyl-L-cystéine mais présentent une interférence avec la cystéine. L'isolation et la purification de ces anticorps devraient permettre un traitement différent de sujets souffrant de syndrômes d'immunodéficience.

8. Analyse de la spécificité des anticorps IgG et IgM envers la cystéine et le -NO.

Il est connu que les gammaglobulines peuvent être dégradées par la cystéine à pH basique. Il est également  
5 connu que non seulement des agents réducteurs tels la cystéine mais également des oxydants dégradent les gammaglobulines. Il reste à exclure la possibilité que la cystéine et le NO interfèrent avec la réaction immunologique. Une analyse a été effectuée sur un sérum IgG et un serum IgM  
10 trouvés positifs dans un test ELISA pour le N-acétyl-L-cystéine-NO couplé à de l'albumine ainsi que sur un serum IgG positif pour un antigène tuberculeux. L'analyse sur un anticorps antituberculeux permet de vérifier de façon indépendante les possibles interférences dues à l'utilisation  
15 d'agents réducteurs (cystéine et NAC) et oxydants (NO). Le contrôle interne de la spécificité de la réaction immunologique a été réalisé en testant la réaction immunologique en présence de cystine (forme réduite de la cystéine) et de  $\text{NaNO}_2$  activé à pH acide de la même façon que  
20 la cystéine et le N-acétyl-cystéine (NAC) mais en l'absence de ces récepteurs. Une deuxième expérience a été ensuite effectuée pour confirmer et compléter les observations intéressantes acquises lors de la première analyse. Les deux analyses ont été conduites comme dans les  
25 exemples 2 et 3, c'est-à-dire que des haptènes libres présents dans une solution à des concentrations décroissantes ont été mis en contact avec des sérums trouvés positifs (en IgG ou en IgM) dans un test sérologique ELISA pour l'haptène NAC ou pour un antigène tuberculeux. Les haptènes compétitifs  
30 mis en contact en solution avec les anticorps IgG et IgM anti-N-acétyl-cystéine et IgG anti-tuberculeux étaient la cystine, le  $\text{NaNO}_2$  acidifié puis ramené à pH neutre, la cystéine, la cystéine-NO, l'acétyl-cystéine, l'acétyl-cystéine-NO, et l'acétyl-cystéine-NO couplé à de l'albumine.  
35 Après 30 minutes d'incubation à 37 °C, les solutions contenant les haptènes libres et les anticorps ont été

analysés pour la présence résiduelle d'anticorps anti-NAC ou anti-tuberculeux. Les résultats de ces deux analyses sont donnés dans le tableau 4.

**Tableau 4**

Concentration finale ( $\mu\text{g/ml}$ ) en haptènes et en NAC-albumine compétitifs libres						
	50	25	12,5	6	0	
<b>Sérum positif IgG</b>						
<u>1<sup>ère</sup> expérience</u>						
10	L-cystine	0,90	0,88	0,83	0,87	0,84
	HNO <sub>2</sub>	0,77	0,85	0,84	0,86	0,84
	L-cystine	0,65	0,68	0,70	0,84	0,84
	L-cystéine-NO	0,84	0,84	0,85	0,86	0,84
	NAC	0,27	0,24	0,27	0,38	0,84
15	NAC-albumine	0,36	0,40	0,69	0,65	0,84
<u>2<sup>ème</sup> expérience</u>						
	NAC	0,23		0,38		1,15
	NAC-NO	0,22		0,37		1,07
	Cystine	0,81		1,12		1,29
20	Cystine-NO	1,22		1,21		1,29
<b>Sérum positif IgM</b>						
<u>1<sup>ère</sup> expérience</u>						
	L-cystine	1,49	1,52	-	1,44	1,61
	HNO <sub>2</sub>	1,55	1,45	1,49	1,51	1,50
25	L-cystine	1,45	1,43	1,42	-	1,37
	L-cystine-NO	1,54	1,55	1,50	1,48	1,59
	NAC	1,46	1,44	1,40	1,52	1,52
	NAC-albumine	1,45	1,47	1,50	1,55	1,50
<u>2<sup>ème</sup> expérience</u>						
30	NAC	1,61		1,76		1,88
	NAC-NO	1,51		1,77		1,89
	Cystine	1,53		1,58		1,84

Cystine-NO	1,70		1,74		1,83
<b>Sérum positif IgG TUB</b>					
L-cystine	1,12				1,07
HNO <sub>2</sub>	1,04				1,04
L-cystine	1,07				1,02
L-cystine-NO	1,07				1,02
NAC	1,11				1,00
NAC-albumine	1,06				1,00

10                    Cette analyse apporte plusieurs informations, entre  
autres : ni la cystine, ni le HNO<sub>2</sub> dans les conditions  
d'applications de l'analyse immunologique n'influent sur le  
résultat. Le NAC attaché à l'albumine est un inhibiteur  
efficace, compte tenu de sa concentration réduite, par  
15 rapport à la molécule NAC utilisée libre. L'anticorps IgG est  
plus susceptible à l'inhibition que l'anticorps IgM.  
L'inhibition provoquée par la molécule NAC libre est plus  
efficace que celle due à la molécule cystéine libre. Le NO  
réduit l'inhibition due à la cystéine mais n'atteint pas  
20 celle due à la NAC.

9. Analyse des IgM d'une population de malades souffrant de  
sclérose en plaques (SEP).

25                    Une analyse des IgM de personnes ne souffrant pas  
de maladies (tests de grossesse, accidents de la route, etc)  
versus malades souffrant de sclérose en plaque est donnée  
dans l'histogramme 1. Les absorbances observées pour la N-  
acétyl-L-cystéine sont normalisées versus les adsorbances  
observées dans la trousse contrôle (albumine-glutamine). On  
30 voit qu'un seul sujet sain possède des anticorps légèrement  
au dessus de la norme, que la moyenne (0,3) obtenue pour la  
population saine est significativement différente de la  
moyenne établie chez les SEP (0,5), avec un malade  
spectaculairement positif.

**REVENDEICATIONS.**

1. Conjugué imunoréactif comprenant un ou plusieurs ligand(s) choisi(s) parmi le groupe constitué par les acides aminés et/ou les dérivés d'acides aminés comprenant un groupe sulfhydryl, ledit ligand étant lié à une protéine porteuse hydrosoluble, d'un poids moléculaire supérieur à 8000 KD par un agent couplant susceptible de se fixer au groupement sulfhydryl desdits ligands.

2. Conjugué immunoréactif selon la revendication 1, caractérisé en ce que le ligand est constitué par la cystéine, la N-acétyl-L-cystéine, la cystéine-NO ou la N-acétyl-L-cystéine-NO.

3. Conjugué immunoréactif selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la protéine porteuse est choisie parmi le groupe constitué par la gélatine, l'histone, l'albumine, la polysérine ou la thyroglobuline.

4. Conjugué immunoréactif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'agent couplant est choisi parmi le groupe constitué par la parabenzoquinone, la P-toluquinone, la dichloroquinone, la chinhydrone ou la toluquinone.

5. Anticorps dirigé contre le conjugué immunoréactif selon l'une quelconque des revendications précédentes.

6. Anticorps dirigé contre l'anticorps selon la revendication 5.

7. Trousse de diagnostic comprenant le conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et/ou un anticorps selon la revendication 5 et/ou 6.

8. Composition pharmaceutique comprenant le conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et/ou un anticorps selon la revendication 5 et/ou 6.

9. Procédé de détection et/ou de quantification d'anticorps spécifiques d'une pathologie comportant une réponse auto-immune, présent dans un fluide corporel d'un patient, caractérisé en ce que l'on prélève le fluide

corporel du patient, en ce que l'on fait réagir les anticorps présents dans ce fluide corporel avec le conjugué immunoréactif selon les revendications 1 à 4 et en ce que l'on détecte et/ou quantifie la réaction croisée entre lesdits anticorps et le conjugué.

10. Utilisation de la composition pharmaceutique selon la revendication 8 pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement de pathologies comportant une réponse auto-immune.

10 11. Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que les pathologies comportant une réponse auto-immune sont choisies parmi le groupe constitué par la sclérose en plaque, la sclérose amyotrophique latérale, l'hyperthyroïdie, l'arthrite, la cirrhose, les lupus, les  
15 syndrômes antiphosphatides, les syndrômes néphrotiques, la myasthénie, le cancer et le syndrome d'immuno-déficience acquis.