

(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
11 mai 2006 (11.05.2006)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2006/048576 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C07K 16/26 (2006.01) **G01N 33/74** (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/050913

(22) Date de dépôt international :
28 octobre 2005 (28.10.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0452498 2 novembre 2004 (02.11.2004) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
BIOMERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280
Marcy l'Etoile (FR). **COMMISSARIAT A L'ENERGIE**
ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33 rue de la Fédération,
F-75752 PARIS 15ème (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
DUBREUIL, Olivier [FR/FR]; 203 rue de Charen-
ton, F-75012 PARIS (FR). **DUCANCEL, Frédéric**
[FR/FR]; 30 rue d'Alsace, F-91160 LONGJUMEAU (FR).

(74) Mandataire : **BITAUD, Valérie**; bioMérieux, Chemin de
l'Orme, F-69280 Marcy L'Etoile (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,

AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, 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), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues
— avec la partie réservée au listage des séquences de la des-
cription publiée séparément sous forme électronique et dis-
ponible sur demande auprès du Bureau international

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR PREPARING SPECIFIC AFFINITY ANTI-PROGESTERONE ANTIBODIES, THE OBTAINED AN-
TIBODIES AND THE USE THEREOF FOR IN VITRO DIAGNOSIS

(54) Titre : PROCEDE DE PREPARATION D'ANTICORPS ANTI-PROGESTERONE SPECIFIQUES ET AFFINS,
ANTICORPS OBTENUS ET LEUR UTILISATION EN DIAGNOSTIC IN VITRO

(57) Abstract: The invention relates to a method for preparing anti-progesterone antibodies consisting in introducing in the VL
domain thereof (iii) a proline or a basic amino acid at an amino acid level (94) and (iv) an amino acid different from the proline at
the amino acid level (95). Antibodies obtainable by the inventive method and the use thereof for determining a progesterone level
in a progesterone-containing biological sample are also disclosed.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé de préparation d'anticorps anti- progestérone, caractérisé en ce qu'il com-
prend l'étape consistant à introduire au niveau de leur domaine VL : (iii) une proline ou un acide aminé basique au niveau de l'acide
aminé 94 et (iv) un acide aminé différent d'une proline au niveau de l'acide aminé 95. Elle concerne également les anticorps suscep-
tibles d'être obtenus par le procédé de l'invention, ainsi que leur utilisation pour la détermination du taux de progestérone dans un
échantillon biologique susceptible de contenir de la progestérone.



WO 2006/048576 A1

Procédé de préparation d'anticorps anti-progestérone spécifiques et affins, anticorps obtenus et leur utilisation en diagnostic *in vitro*

La présente invention concerne le domaine du diagnostic à travers le dosage de l'hormone stéroïde humaine progestérone. Plus particulièrement, l'invention a pour objet un nouveau procédé de préparation d'anticorps anti-progestérone présentant une diminution des réactions croisées pour au moins un analogue de la progestérone choisi parmi les dérivés C-5 α et les dérivés C-5 β , ainsi que leur utilisation en diagnostic.

La détermination des taux d'hormones stéroïdes humaines est une préoccupation quotidienne en biologie clinique. Ainsi le diagnostic *in vitro* et le suivi des manifestations cliniques liées à la modification et/ou au dysfonctionnement du métabolisme des hormones stéroïdes nécessitent le développement de dosages immunologiques performants.

Parmi ces hormones stéroïdes, l'œstradiol et la progestérone font partie du bilan hormonal effectué dans les cas d'infertilité et le suivi des cycles stimulés au cours des différents protocoles d'assistance médicale à la procréation (AMP), ainsi que lors du suivi de grossesses. Ce bilan est complété par le dosage d'autres hormones de la reproduction comme la FSH (Hormone Folliculo-Stimulante) et la LH (Hormone Lutéinisante), notamment.

La progestérone est une hormone stéroïde synthétisée à partir du cholestérol essentiellement par l'ovaire (corps jaune) et, à moindre degré, par les glandes surrénales, le placenta et le testicule. Une synthèse non endocrine existe également au niveau des neurones. Chez la femme, la progestérone n'est présente dans le sang que pendant la deuxième partie du cycle menstruel (phase lutéale) ou lors de la grossesse. Pendant la première phase du cycle menstruel (phase folliculaire), sa concentration est faible, du même ordre que celle que l'on trouve chez l'homme. La fonction essentielle de cette hormone est de préparer l'utérus à la nidation - implantation du blastocyte - et le maintien de la gestation. Ainsi, dans les cas d'hypofertilité ou d'avortements à répétition, l'évaluation de la progestéronémie (associée aux dosages des autres hormones, œstradiol, FSH et LH) permet d'apprécier l'ovulation et la qualité de la phase lutéale. Par ailleurs, lors du suivi des grossesses, la détermination de la progestéronémie (associée au dosage de l'hormone hCG, Gonadotrophine Chorionique

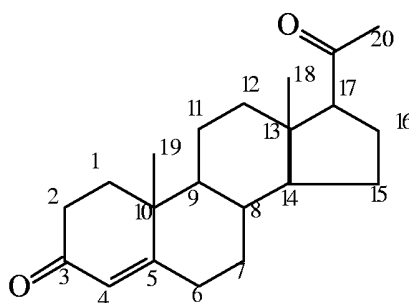
humaine) permet de différencier une grossesse normale d'une GEU (Grossesse Extra-Uterine). Ce dosage est d'ailleurs demandé en urgence pour le diagnostic et la surveillance de ces GEU et la concentration en progestérone est un élément décisionnel important dans la conduite d'un traitement médical ou chirurgical. Outre son importance pour le suivi de l'évolution des grossesses, le dosage de la progestérone présente également un intérêt clinique important pour le suivi des cycles induits (AMP). Ainsi, en vue d'une fécondation *in vitro*, la progestéronémie en fin de phase folliculaire permet de prévoir d'éventuels échecs d'implantation. En effet, les élévations prématurées des concentrations plasmatiques en progestérone à ce stade du cycle sont systématiquement associées à une diminution des taux de grossesse.

Le développement de dosages immunologiques des hormones stéroïdes présentent des difficultés liées aux caractéristiques physico-chimiques particulières de ces molécules. En effet, en raison de leur faible poids moléculaire, elles ne sont pas directement immunogènes. L'obtention d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux nécessite donc le couplage à des protéines porteuses de haut poids moléculaires (Sérum Albumine de bœuf ou BSA, thyroglobuline ou hémocyanine). De plus, dans certains cas, les anticorps obtenus peuvent présenter une affinité plus importante pour le stéroïde couplé chimiquement que pour le stéroïde naturel non couplé (effet "bras", Monnet C., et al., 2002, J. Mol. Biol., 315 : 699-712). Par ailleurs, la faible variabilité des structures chimiques adoptées par les différentes hormones d'une même famille, sont responsables des difficultés rencontrées pour obtenir des anticorps très spécifiques d'un composé en particulier.

Des études comparatives concernant la validité des dosages immunochimiques de la progestérone dans le sang ont été réalisées en comparant les performances des douze trousses de dosage de la progestérone commercialisées en France qui utilisent chacune des anticorps anti-progestérone différents (Patricot MC, et al., 1998, Annales de Biologie Clinique, 57(2) : 201-210 et Boudou P, et al., 2001, Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 78 : 97-104). Plusieurs paramètres analytiques ont été évalués : la limite de détection, la précision et l'exactitude des mesures, et les valeurs obtenues ont été comparées à celles obtenues avec une méthode de référence, la CPG-SM (Chromatographie

en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse). Les conclusions de ces études sont équivoques, à savoir que les différentes méthodes utilisées dans ces trousse de dosage, comprenant des anticorps polyclonaux ou monoclonaux différents, présentent des limites de détection et une précision acceptables, mais qu'une dispersion des résultats est observée en fonction des trousse et des méthodes de dosage. De plus, toutes ces stratégies de dosage immunologique présentent, de façon plus ou moins prononcée, des problèmes d'exactitude par rapport à la CPG-SM. Selon les auteurs, cette discordance serait principalement due à la présence dans le sang de composés structuralement similaires à la progestérone et notamment deux métabolites de la progestérone : la 5 α - et la 5 β -prégnane-3,20-dione (appelée également 5 α - et la 5 β -dihydroprogestérone et nommées par la suite 5 α et 5 β -DHP). Ainsi, des efforts doivent être entrepris pour améliorer la spécificité des anticorps anti-progestérone utilisés dans ces trousse de dosages afin de diminuer les réactions croisées vis-à-vis des dérivés C-5 α et C-5 β de la progestérone que peuvent présenter les anticorps anti-progestérone utilisés.

La progestérone peut être représentée selon la formule développée suivante :



Les dérivés C-5 α de la progestérone comprennent l'ensemble des dérivés dépourvus de double liaison entre les carbone 4 et 5 et qui présentent par ailleurs un atome d'hydrogène supplémentaire orienté dans la direction inverse de celle des deux groupements méthyle présents aux positions C₈ et C₉ situés sur la face β du stéroïde. Ces différents dérivés peuvent présenter divers groupements aux positions 3, 11 et 17.

Les dérivés C-5 α de la progestérone comprennent par exemple la 5 α -DHP, le 5 α -prégnane-3 β -hémisuccinate, la 5 α -prégnane-3 α -ol-20-one et la 5 α -androstane-3,17-dione.

Les dérivés C-5 β de la progestérone comprennent l'ensemble des dérivés dépourvus de double liaison entre les carbone 4 et 5 et qui présentent par ailleurs un atome d'hydrogène

supplémentaire orienté du même côté que les deux groupements méthyle présents aux positions C₁₈ et C₁₉. Ces différents dérivés peuvent présenter divers groupements aux positions 3, 11 et 17.

Des exemples de tels dérivés C-5 β de la progestérone comprennent la 5 β -DHP, l'aetiocholanolone, la 5 β -prégnane-3 α -ol-20-one et la 5 β -androstane-3,17,20-dione.

Les dérivés C-5 α et C-5 β pour lesquels les réactions croisées doivent être améliorées sont en particulier la 5 α -DHP et la 5 β -DHP.

De façon surprenante, la Demanderesse a mis au point un nouveau procédé de préparation d'anticorps permettant d'obtenir des anticorps anti-progestérone présentant une telle diminution des réactions croisées avec les dérivés C-5 α et C-5 β de la progestérone, tandis que l'affinité de liaison à la progestérone de ces anticorps reste très satisfaisante et notamment inférieure au nanomolaire.

Ce procédé repose sur la préparation d'anticorps modifiés pour présenter en positions 94 et 95 de leur domaine variable léger (VL) certains acides aminés bien déterminés, la position des acides aminés étant donnée selon la numérotation Kabat (Kabat EA, 1991, Sequences of proteins of immunological interest, NIH publication n°91-3242).

Ainsi, la présente invention a pour objet un procédé de préparation d'anticorps anti-progestérone, caractérisé en ce qu'il comprend l'étape consistant à introduire au niveau de leur domaine VL :

- (i) une proline ou un acide aminé basique au niveau de l'acide aminé 94 et
- (ii) un acide aminé différent d'une proline au niveau de l'acide aminé 95.

Comme les anticorps ainsi obtenus présentent des propriétés jamais obtenues avec d'autres anticorps anti-progestérone, l'invention a également pour objet les anticorps susceptibles d'être obtenus par le procédé de l'invention.

Enfin, du fait que ces anticorps ont également conservé une bonne affinité pour la progestérone, l'invention concerne également leur utilisation en diagnostic *in vitro*.

Par anticorps anti-progestérone au sens de l'invention, on entend tant un anticorps entier qu'un fragment d'anticorps.

Par anticorps entier, on entend un anticorps sous sa forme complète et d'origine recombinante ou monoclonale.

Les anticorps recombinants peuvent être obtenus selon des procédés classiques connus de l'homme du métier, à partir d'organismes procaryotes, tels que bactéries, ou à
5 partir d'organismes eucaryotes, tels que levures, cellules de mammifères, de plantes, d'insectes ou d'animaux, ou par des systèmes de production extra-cellulaire.

La préparation de ces anticorps recombinants sera telle que la séquence nucléique utilisée pour préparer l'anticorps comprendra les codons des acides aminés visés en positions 94 et 95.

10 Les anticorps monoclonaux peuvent être préparés selon les techniques classiques connues de l'homme du métier telles que la technique des hybridomes dont le principe général est rappelé ci-après.

Dans un premier temps, on immunise un animal, généralement une souris, (ou des cellules en culture dans le cadre d'immunisations *in vitro*) avec un antigène cible d'intérêt,
15 dont les lymphocytes B sont alors capables de produire des anticorps contre ledit antigène. Ces lymphocytes producteurs d'anticorps sont ensuite fusionnés avec des cellules myélomateuses "immortelles" (murines dans l'exemple) pour donner lieu à des hybridomes. A partir du mélange hétérogène des cellules ainsi obtenu, on effectue alors une sélection des cellules capables de produire un anticorps particulier et de se multiplier indéfiniment. Chaque
20 hybridome est multiplié sous la forme de clone, chacun conduisant à la production d'un anticorps monoclonal dont les propriétés de reconnaissance vis-à-vis de l'antigène d'intérêt pourront être testées par exemple en ELISA, par immunotransfert en une ou deux dimensions, en immunofluorescence, ou à l'aide d'un biocapteur. Les anticorps monoclonaux ainsi sélectionnés, sont par la suite purifiés notamment selon la technique de chromatographie
25 d'affinité.

Pour obtenir les acides aminés appropriés aux positions 94 et 95, le procédé de l'invention peut être mis en œuvre en soumettant ces anticorps monoclonaux anti-progesterone à une mutagénèse dirigée, par exemple en utilisant des kits commerciaux tels que le kit *Quick Change Site Directed Mutagenesis* de la société Stratagene, ainsi qu'à tout

autre procédé connu de l'homme du métier permettant de modifier des acides aminés dans une chaîne peptidique.

Par fragment d'anticorps, on entend dans la présente demande tout fragment d'anticorps présentant une diminution des réactions croisées pour les dérivés C-5 α de la progestérone et/ou les dérivés C-5 β de la progestérone, et étant affins pour la progestérone. De préférence, ces fragments d'anticorps présentent une affinité de liaison à la progestérone inférieure au nanomolaire.

Ces fragments d'anticorps peuvent par exemple être obtenus par protéolyse. Ainsi, ils peuvent être obtenus par digestion enzymatique, résultant en des fragments de type Fab (traitement à la papaïne ; Porter RR, 1959, Biochem. J., 73 : 119-126) ou de type F(ab')₂ (traitement à la pepsine ; Nisonoff A. et al., 1960, Science, 132 : 1770-1771). Ils peuvent également être préparés par voie recombinante (Skerra A., 1993, Curr. Opin. Immunol., 5 : 256-262).

Un autre fragment d'anticorps qui convient aux fins de l'invention comprend un fragment Fv qui est un dimère constitué de l'association non covalente du domaine variable léger (VL) et du domaine variable lourd (VH) du fragment Fab, donc de l'association de deux chaînes polypeptidiques. L'obtention de ce type de fragment Fv est relativement difficile par traitement enzymatique et en général les méthodes de production par voie recombinante sont préférées par l'homme du métier.

Afin d'améliorer la stabilité du fragment Fv due à la dissociation des deux chaînes polypeptidiques, ce fragment Fv peut être modifié par génie génétique en insérant un lien peptidique adapté entre le domaine VL et le domaine VH (Huston P. et al., 1988, Proc. Natl.Acad. Sci.USA, 85 : 5879-5883). On parle alors de fragment scFv (« single chain Fragment variable ») car il est constitué d'une seule chaîne polypeptidique. L'utilisation d'un lien peptidique composé préférentiellement de 15 à 25 acides aminés permet de relier l'extrémité C-terminale d'un domaine à l'extrémité N-terminale de l'autre domaine, constituant ainsi une molécule monomérique dotée de propriétés de liaison similaires à celles de l'anticorps sous sa forme complète. Les deux orientations des domaines VL et VH

conviennent (VL-lien-VH et VH-lien-VL) car elles présentent des propriétés fonctionnelles identiques.

Bien entendu, tout fragment connu de l'homme du métier et présentant les caractéristiques de réactions croisées et d'affinité telles que définies ci-dessus conviennent aux
5 fins de l'invention.

Les anticorps préparés selon le procédé de l'invention, lesquels présentent une diminution des réactions croisées pour les dérivés C-5 β et C-5 α de la progestérone, possèdent donc au niveau de leur domaine VL les acides aminés suivants : une proline ou un acide aminé basique en position 94 et un acide aminé différent d'une proline en position 95, la
10 position des acides aminés étant donnée selon la numérotation Kabat.

De façon générale, les acides aminés sont classés en 4 familles, à savoir (1) les acides aminés acides tels que l'aspartate et le glutamate, (2) les acides aminés basiques tels que la lysine, l'arginine et l'histidine, (3) les acides aminés non polaires tels que l'alanine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la phénylalanine, la méthionine et le tryptophane et (4) les acides
15 aminés non chargés polaires tels que l'asparagine, la glutamine, la cystéine, la sérine, la thréonine et la tyrosine. La phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine sont parfois classés en acides aminés aromatiques.

L'acide aminé en position 94 particulièrement approprié aux fins de l'invention est choisi parmi la lysine, l'arginine et la proline, ce dernier acide aminé étant particulièrement
20 préféré.

Ainsi, selon un mode de réalisation de l'invention, l'acide aminé en position 94 est une proline, une arginine ou une lysine, de préférence une proline.

L'acide aminé en position 95 sur le domaine VL des anticorps de l'invention doit être différent de la proline. De préférence, l'acide aminé en position 95 n'est pas un acide aminé
25 acide et est choisi parmi les acides aminés basiques, les acides aminés non polaires et les acides aminés non chargés polaires. Les acides aminés en position 95 particulièrement appropriés aux fins de l'invention sont choisis parmi l'arginine, l'histidine, la leucine et la tyrosine, ce qui constitue un mode de réalisation particulier de l'invention.

Pour améliorer davantage les caractéristiques de spécificité, les anticorps peuvent également présenter des acides aminés particuliers en positions 58, 31 et 32 au niveau du domaine VH.

Ainsi, selon un mode de réalisation de l'invention, le procédé de l'invention est tel qu'il comprend au moins l'une des étapes suivantes :

- une étape consistant à introduire au niveau de leur domaine VH une lysine en position 31,
 - une étape consistant à introduire au niveau de leur domaine VH une histidine en position 32,
 - une étape consistant à introduire au niveau de leur domaine VH en position 58 un acide aminé choisi parmi l'alanine, l'acide aspartique, l'histidine et l'arginine, de préférence l'histidine ou l'arginine, et
 - une étape consistant à introduire au niveau de leur domaine VL un acide aminé basique et de préférence une lysine en position 27^e,
- les positions des acides aminés étant données selon la numérotation Kabat.

L'obtention de ces acides aminés particuliers peut être mise en œuvre selon les procédés décrits précédemment, comme par exemple par mutagenèse dirigée.

Les anticorps anti-progestérone obtenus par le procédé de l'invention sont nouveaux en ce sens qu'ils présentent les caractéristiques d'affinité et de réactions croisées jamais obtenues par les anticorps anti-progestérone, comme suit :

- une affinité pour la progestérone, de préférence inférieure au nanomolaire, et
- une diminution des réactions croisées pour les dérivés C-5 α et C-5 β .

Ainsi, un autre objet de l'invention concerne les anticorps anti-progestérone susceptibles d'être obtenus par le procédé de l'invention.

L'affinité pour la progestérone des anticorps anti-progestérone de l'invention est déterminée selon la méthode décrite par Nieba et al., 1996, Anal. Biochem., 234 : 155-165.

Par diminution des réactions croisées pour les dérivés C-5 α et C-5 β des anticorps anti-progestérone, on entend une diminution de leur capacité à se lier soit aux dérivés C-5 α , soit aux dérivés C-5 β , soit aux deux, ce qui permet d'améliorer leur spécificité.

La diminution de la capacité à se lier aux dérivés C-5 α et/ou aux dérivés C-5 β peut être mise en évidence de différentes façons.

Ainsi, elle peut être mise en évidence par la détermination des pourcentages des réactions croisées selon un protocole précis. Une telle détermination peut être mise en œuvre
5 selon l'équation suivante (P=pourcentage) :

$$P = [CI_{50} \text{ de la progestérone} / CI_{50} \text{ du dérivé C-5}\alpha \text{ ou C-5}\beta \text{ de la progestérone}] \times 100,$$

étant entendu que la concentration à 50% d'inhibition (CI_{50}) est déterminée par des tests de compétition et correspond à la concentration en compétiteur (progestérone ou dérivé C-5 α
10 ou dérivé C-5 β) entraînant une diminution du signal de 50% par rapport au contrôle réalisé en l'absence de compétiteur (100% de signal est alors obtenu).

Selon ce type de détermination, les anticorps anti-progestérone de l'invention présentent, outre une haute affinité telle que définie précédemment, au moins l'une des caractéristiques suivantes :

- 15 - au plus 10 %, de préférence au plus 4% et de préférence encore au plus 2 %, de réaction croisée pour les dérivés C-5 α de la progestérone et
- au plus 23 %, de préférence au plus 15 %, de préférence au plus 10 %, et de préférence encore au plus 4% de réaction croisée pour les dérivés C-5 β de la progestérone.

20 Le calcul de pourcentage de réactions croisées et du seuil est bien entendu fonction du protocole utilisé.

La diminution de la capacité à se lier aux dérivés C-5 α et/ou aux dérivés C-5 β peut également être mise en évidence par détermination d'un facteur de diminution en prenant comme référence un anticorps anti-progestérone connu. La détermination de ce facteur est
25 alors fonction de l'anticorps de référence et est indépendant du protocole de détermination utilisé.

Selon ce type de détermination, si on prend l'anticorps anti-progestérone 15G12C12G11 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) comme anticorps de référence, les

anticorps anti-progestérone de l'invention présentent, outre une haute affinité telle que définie précédemment, au moins l'une des caractéristiques suivantes :

- une diminution des réactions croisées pour les dérivés C-5 α de la progestérone selon un facteur d'au moins 2, de préférence d'au moins 4,9 et de préférence encore d'au moins 10, et
- une diminution des réactions croisées pour les dérivés C-5 β de la progestérone selon un facteur d'au moins 1,7, de préférence d'au moins 4,5 et de préférence encore d'au moins 6,5.

Les anticorps de l'invention peuvent être utilisés dans toutes les applications où la liaison spécifique et de manière affine entre un anticorps anti-progestérone et la progestérone est une caractéristique importante. Les anticorps de l'invention sont particulièrement appropriés pour le diagnostic *in vitro* du taux de progestérone dans un échantillon biologique susceptible de contenir de la progestérone.

Ainsi, l'invention a également pour objet l'utilisation des anticorps anti-progestérone de l'invention pour le diagnostic *in vitro* du taux de progestérone dans un échantillon biologique susceptible de contenir de la progestérone.

Par échantillon biologique, on entend un échantillon biologique d'origine humaine ou animale susceptible de contenir de la progestérone tel qu'un échantillon de sang, de plasma ou de sérum.

Le diagnostic *in vitro* du taux de progestérone en utilisant les anticorps ou fragments d'anticorps de l'invention peut être mis en œuvre par le procédé de détermination du taux de progestérone dans un échantillon biologique susceptible de contenir de la progestérone selon les étapes consistant à :

- (i) mettre en contact ledit échantillon biologique avec un anticorps anti-progestérone de l'invention,
- (ii) révéler la liaison entre ledit anticorps anti-progestérone et la progestérone contenue dans ledit échantillon et
- (iii) déterminer le taux de progestérone.

La première étape du procédé est une étape classiquement connue de l'homme du métier.

La deuxième étape du procédé de l'invention, qui consiste à révéler la liaison entre ledit anticorps ou fragment d'anticorps de l'invention, peut être réalisée par tout moyen de
5 détection connu dans le domaine des dosages immunologiques de très petites molécules, tel que la détection directe, c'est-à-dire sans l'intermédiaire de partenaire(s) de liaison, et la détection indirecte, c'est-à-dire par l'intermédiaire de partenaire(s) de liaison.

La détection directe de la liaison entre l'anticorps ou fragment d'anticorps de l'invention et la progestérone peut être mise en œuvre par exemple par résonance
10 plasmonique de surface ou par voltamétrie cyclique sur une électrode portant un polymère conducteur. Dans ce cas, l'anticorps de l'invention sert à immunocapturer la progestérone, la progestérone immunocapturée étant ensuite éluee.

L'élution de la progestérone immunocapturée par ledit anticorps ou fragment d'anticorps de l'invention peut être mise en œuvre par tout procédé d'élution connu de
15 l'homme du métier, tel qu'un choc de pH.

Dans le cas de la détection indirecte, la deuxième étape du procédé de l'invention peut être mise en œuvre selon la technique classique ELISA de dosage par compétition. L'anticorps de l'invention sert alors de partenaire de liaison servant à la capture de la progestérone dans l'échantillon. La détection peut alors être mise en œuvre par compétition
20 entre la progestérone susceptible d'être contenue dans l'échantillon à tester et une quantité connue de progestérone préalablement marquée. L'anticorps anti-progestérone de l'invention peut être préalablement lié à un support solide, ce qui constitue un mode de réalisation particulier de l'invention.

Par marquage, on entend la fixation d'un marqueur capable de générer directement ou
25 indirectement un signal détectable. Une liste non limitative de ces marqueurs consiste en :

- les enzymes qui produisent un signal détectable par exemple par colorimétrie, fluorescence, luminescence, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, l'acétylcholine estérase, la β -galactosidase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase,
- les chromophores comme les composés luminescents, colorants,

- les molécules radioactives comme le ^{32}P , le ^{35}S ou le ^{125}I ,
- les molécules fluorescentes telles que la fluorescéine, la rhodamine, l'alexa ou les phycocyanines, et
- les particules telles que les particules en or, en latex magnétique, les liposomes.

5 Des systèmes indirects de marquage peuvent être aussi utilisés, comme par exemple par l'intermédiaire d'un autre couple ligand/anti-ligand. Les couples ligand/anti-ligand sont bien connus de l'homme du métier, et on peut citer par exemple les couples suivants : biotine/streptavidine, biotine/avidine, haptène/anticorps, antigène/anticorps, peptide/anticorps, sucre/lectine, polynucléotide/complémentaire du polynucléotide. Dans ce cas, c'est le ligand
10 qui est lié au partenaire de liaison. L'anti-ligand peut être détectable directement par les marqueurs décrits au paragraphe précédent ou être lui-même détectable par un ligand/anti-ligand.

Ces systèmes indirects peuvent conduire, dans certaines conditions, à une amplification du signal. Cette technique d'amplification du signal est bien connue de l'homme
15 du métier, et l'on pourra se reporter aux demandes de brevet antérieures FR98/10084 ou WO95/08000 de la Demanderesse ou à l'article J. Histochem. Cytochem., (1997), 45 : 481-491.

Le marquage de molécules est largement connu de l'homme du métier et est décrit par exemple par Greg T. Hermanson dans Bioconjugate Techniques, 1996, Academic Press
20 Inc, 525B Street, San Diego, CA92101 USA.

Selon le type de marquage utilisé, comme par exemple en utilisant une enzyme, l'homme du métier ajoutera des réactifs permettant la visualisation du marquage.

De tels réactifs sont largement connus de l'homme du métier et sont décrits notamment dans Principles and Practice of Immunoassay, 2nd Edition, Edited by C. Price,
25 D.J. Newman Stockton Press, 1997, 345 Park Avenue South, New York.

La dernière étape du procédé de l'invention, qui consiste à déterminer le taux de progestérone, peut être mise en œuvre par tout procédé connu de l'homme du métier à cette fin. Ainsi, par exemple, il est possible d'utiliser une courbe d'étalonnage obtenue selon les

mêmes conditions opératoires que le procédé de l'invention, à ceci près que l'échantillon est remplacé par des quantités connues de progestérone.

Les supports solides sur lesquels sont liées un anticorps de l'invention sont nouveaux et constituent un autre objet de l'invention.

5 Les supports solides sur lesquels sont liés les anticorps de l'invention peuvent être tout support sur lequel on peut fixer des protéines. A titre de support de capture, on peut citer les micropuits, les microplaques, les supports polymères, les membranes, les lames de microscopie, les supports inorganiques fonctionnalisés ou non, tels que silice, verre, mica ou quartz, les supports métalliques telles que d'or et d'argent, et les particules et microparticules,
10 notamment magnétiques.

Par liaison de l'anticorps de l'invention au support solide, on entend une liaison par adsorption ou une liaison par covalence. De telles liaisons sont largement connues de l'homme du métier.

Ainsi, dans le cas de la liaison par adsorption où l'anticorps de l'invention est juste
15 déposé, on peut procéder au dépôt par exemple selon le procédé décrit dans la demande de brevet FR2 816 711 qui est un procédé de dépôt sans contact particulièrement adapté au format de microplaque 96 puits. Ce procédé consiste à éjecter des nanogouttes calibrées à travers une buse, sous l'effet d'un choc mécanique, sur le fond des puits de la microplaque. On obtient ainsi à chaque choc une goutte dont le diamètre varie selon celui de la buse, de 50
20 à 500 μm environ.

Le dépôt des anticorps de l'invention peut être également effectué manuellement à l'aide de capillaires de verre dont le diamètre interne avoisine la centaine de microns. Dans ce cas, le capillaire doit entrer en contact avec la surface de dépôt pour que le dépôt ait lieu, ce qui entraîne un léger choc avec la surface de dépôt.

25 Pour la liaison covalente, le support solide peut être fonctionnalisé par une fonction susceptible de former une liaison avec une fonction portée par le partenaire de capture. Ainsi, par exemple, le support solide est fonctionnalisé par une liaison NHS (N-hydroxysuccinimide) ou par une fonction NH_2 . Cette fonction peut réagir avec une fonction portée sur le partenaire de capture, telle qu'une fonction NH_2 ou COOH .

La présente invention sera mieux comprise à l'aide des exemples suivants donnés uniquement à titre illustratif et non limitatif, ainsi qu'à l'aide des figures 1 et 2 annexées, sur lesquelles :

- la figure 1 donne le schéma des étapes permettant de préparer des fragments d'anticorps de l'invention de type scFv constitués de VL-lien-VH, les numéros 1 à 6 correspondant aux différents oligonucléotides utilisés et les astérisques correspondant aux positions mutées et
- la figure 2 donne deux graphes représentant le pourcentage de réactions croisées P soit vis-à-vis du dérivé 5 β -DHP (figure 2A), soit vis-à-vis du dérivé 5 α -DHP (figure 2B) obtenus avec un fragment de l'invention présentant une proline en position 94, une histidine en position 95 et une arginine en position 58 (appelé P94-H95-R58) et avec un fragment scFv de l'anticorps monoclonal 15G12C12G11 non muté selon le procédé de l'invention (appelé Sauvage) en fonction de la dose de compétiteur utilisé, ce compétiteur pouvant être soit la progestérone, soit le dérivé 5 β -DHP soit le dérivé 5 α -DHP.

Exemple 1 : Préparation des anticorps de l'invention

- Les anticorps anti-progestérone de l'invention ont été obtenus par la construction d'une banque d'un ensemble de variants de type phage-anticorps. La préparation de ces anticorps améliorés par rapport à l'anticorps monoclonal murin anti-progestérone initial, dans le cas présent l'anticorps monoclonal 15G12C12G11 (bioMérieux, Marcy, France), a nécessité la réalisation de plusieurs étapes successives. Les séquences en acides aminés pour le domaine VL et VH sont données dans le listage de séquences respectivement en SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2.

1. Construction d'une banque de fragments d'anticorps.

- Les fragments d'anticorps de l'invention ont été obtenus selon un procédé de réalisation particulier. Une banque de mutants de l'ADN codant pour le fragment d'anticorps scFv (*single chain Fragment variable*) anti-progestérone a été construite *via* trois amplifications par PCR. La matrice d'ADN utilisée correspond à la séquence sauvage du fragment d'anticorps anti-progestérone de type scFv obtenu à partir de l'anticorps 15G12C12G11 et modifié pour être incorporé dans le phagemide pAK100 selon la méthode de Krebber A, et al. (1997, J. Immunol. Methods, 201 : 35-55).

Les principales étapes nécessaires à la construction de la banque sont indiquées sur la figure 1 sur laquelle les numéros 1 à 6 correspondent aux différents oligonucléotides utilisés et tels que définis ci-après, les astérisques correspondent aux positions mutées, l'annotation L94-L95 signifie les positions des acides aminés mutés 94 et 95 sur la chaîne légère, l'annotation H58 signifie la position de l'acide aminé muté en position 58 de la chaîne lourde et l'indication *Sfi*I correspond aux sites de coupure par l'enzyme de restriction *Sfi*I.

Les amplifications par PCR ont été réalisées à l'aide des oligonucléotides 1 à 6 dont certains présentaient, entre autre, les positions mutées relatives à l'invention : positions 94 et 95 sur le VL et position 58 sur le VH. À ces positions notamment, a été introduit l'ensemble des vingt acides aminés naturels par mutagenèse à saturation (Barbas CF, et al., 2001, Phage Display A Laboratory Manual, CSHL Press). Les oligonucléotides ont été construits de façon à présenter une extrémité chevauchante permettant de reconstituer, *in fine*, l'ADN complet codant pour les mutants de fragments d'anticorps de type scFv. Les oligonucléotides sont présentés dans le tableau I, leur localisation par rapport à la séquence du fragment d'anticorps étant indiquée sur la figure 1.

Tableau I

Nom des oligonucléotides	Position sur la fig.1	Séquences
<i>Lac2</i>	1	5'-GTTGTGTGGAATTGTGAGCGG-3'
<i>Nter gIIIp2</i>	6	5'-CATCGGCATTTTCGGTCATAGCC-3'
<i>L3 deg comp 1</i>	2	5'-GCTTGGTCCCAGCACCGAACGTMNNCGG-MNNATGTGTACTTTGAGAGCAGAAATAG-3'
<i>L3 deg comp 2</i>	2	5'-GCTTGGTCCCAGCACCGAACGTMNNMNN-MNNATGTGTACTTTGAGAGCAGAAATAG-3'
<i>L3 codant</i>	3	5'-TTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAA-ACG-3'
<i>H2 deg comp</i>	4	5'-GTTCTCCGTTGTAGGTGTTTATMNNGCCCAT-CCACCTTAAATCC-3'
<i>FR3 deg codant</i>	5	5'-ATAAACACCTACAACGGAGAACCANNKAT-GTCGATGACCTCAGAGGAC-3'

N=A, G, T, C

M=A, C

K=G, T

5 Les codons mutés ont été soulignés.

Les réactions de PCR suivantes ont été réalisées.

Tableau II

	PCR A	PCR B	PCR C
Matrice ADN (40ng/μl)	1 μl	1 μl	1 μl
Oligo <i>Lac2</i> (10pmol/μl)	10 μl	-	-
Oligo <i>L3 deg comp1</i> (10pmol/μl)	7 μl	-	-
Oligo <i>L3 deg comp2</i> (10pmol/μl)	3 μl	-	-
Oligo <i>L3 cod</i> (10pmol/μl)	-	10 μl	-
Oligo <i>H2 deg comp</i> (10pmol/μl)	-	10 μl	-
Oligo <i>FR3 deg cod</i> (10pmol/μl)	-	-	10 μl
Oligo <i>Nter gIIIp2</i> (10pmol/μl)	-	-	10 μl
Tampon 10X (Stratagene)	2 μl	2 μl	2 μl
<i>Pfu</i> HOT start (Stratagene)	1 μl	1 μl	1 μl
H ₂ O	qsp 100 μl	qsp 100 μl	qsp 100 μl

Les mélanges ont été incubés dans un thermocycleur Applied Biosystems Gene Amp PCR system 2700, selon le programme suivant : (95°C, 5 min) - [(95°C, 1 min) ; (50°C, 1 min) ; (72°C, 1 min)] x 30 – (72°C, 10 min).

Les milieux réactionnels ont ensuite été mélangés à raison de 0,7 pmol de chaque et
5 10 cycles d'élongation sans oligonucléotide ont été réalisés dans les mêmes conditions que précédemment citées. A l'issue de ces 10 cycles, 1/50^{ème} du milieu réactionnel a été utilisé pour l'étape d'amplification finale *via* l'utilisation des oligonucléotides *Lac2* et *Nter gIIIp2* dans les mêmes conditions que précédemment citées.

Le mélange réactionnel a ensuite été soumis à une digestion enzymatique par 10 unités
10 de l'endonucléase *SfiI* (biolabs) dans des conditions adaptées pendant 4 heures à 50°C. Le phagemide pAK100 a également été digéré dans les mêmes conditions. Après purification par électro-élution (Biotrap, Schleicher & Schull), les fragments d'ADN obtenus après coupure (le phagemide et les fragments amplifiés) ont été insérés dans le phagemide pAK100 à l'aide de 400 unités de T4 Ligase (Roche). Les produits de ligation (à raison de 110 ng) ont
15 été électroporés dans des bactéries XL1-Blue à l'aide d'un électroporateur (*E.coli* pulser, Biorad). Après plusieurs séries d'électroporation, la banque était constituée de 8,6 x 10⁶ clones bactériens indépendants.

2. Production des phages-anticorps constituant la banque.

La production des phages-anticorps constituant la banque a été réalisée en Erlen-
20 Meyer. Pour cela, 50 ml de milieu 2YT (Difco), chloramphenicol 25 µg/ml (Sigma), glucose 1% (Prolabo) ont étéensemencés avec 10⁹ bactéries XL1-Blue issues de la banque, puis mis en culture à 37°C sous agitation jusqu'à obtention d'une DO_{550nm} de 0,5-0,6. Les phages auxiliaires (10¹¹ pfu, plaque forming unit, M13KO17, Biorad) et 0,5 mM d'IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, Sigma) ont alors été ajoutés. Après 15 min de contact sans
25 agitation, entre les bactéries et les phages auxiliaires, 100 ml de milieu 2YT (Difco), chloramphenicol 25 µg/ml (Sigma), glucose 1% (Prolabo), IPTG 0,5 mM (Sigma) ont été ajoutés, puis la culture a été mise à incuber à 26°C sous agitation pendant deux heures. A l'issue de cette étape, 450 µl de kanamycine 30 µg/ml (Sigma) ont été ajoutés et la culture a de nouveau été mise à incuber à 26°C sous agitation, pour la production des particules

phagiques pendant une nuit.

La culture de nuit a été mise à centrifuger à 10750 g à 4°C pendant 40 min. Les surnageants contenant les phages-anticorps ont été récupérés, 30 ml de PEG/NaCl (PEG pour polyéthylèneglycol) (respectivement Prolabo 200 g/l, Sigma 146 g/l) ont été ajoutés et
5 cette solution a été mise à incuber pendant 2 heures à 4°C (précipitation des phages). Après centrifugation à 10750 g à 4°C pendant 40 min, le culot de phages-anticorps a été repris dans 15 ml de PBS pH 7.4 (*Phosphate Buffer Saline*, Eurobio) et 3 ml de PEG/NaCl. Après incubation d'au moins 1 heure à 4°C, le culot a finalement été repris dans 1,5 ml de PBS. Cette solution de phages est conservée à 4°C.

10 3. Obtention des fragments d'anticorps de l'invention par une procédure de criblage en phage display.

Le principe de sélection utilisé est dérivé de celui initialement décrit par Hawkins RE, et al. (1992, J. Mol. Biol., 234, 958-964). Il s'agit d'un système de sélection en solution reposant sur l'utilisation de billes magnétiques recouvertes de streptavidine permettant de fixer
15 de façon spécifique, dans notre cas, un dérivé biotinylé de la progestérone. A l'aide de ce système, une méthode de criblage par compétition dite méthode soustractive (Saviranta P, et al., 1998, Protein Eng., 11 : 143-152), a permis d'isoler au sein de la banque, les fragments d'anticorps de l'invention présentant les acides aminés particuliers aux positions 94 et 95 sur le domaine VL (et 58 sur le domaine VH) et possédant des réactions croisées diminuées pour
20 la 5 α -DHP et la 5 β -DHP.

Les billes magnétiques streptavidine (600 μ l, *Streptavidin Magnesphere Paramagnetic particles*, Promega) ont été lavées trois fois dans du PBS puis saturées avec 1 ml de PBS/lait écrémé 2% (Régilait) pendant 1 heure à 37°C sous agitation. 1 ml de la solution de phages (diluée à 10¹⁰ phages) a été ajouté à 1 ml de la solution de progestérone-
25 11 α -EMC-ODN-biotine (bioMérieux, 5 nM) (EMC pour Ethoxy-Méthyl-carboxylate). Pour les tours de sélection en compétition, les analogues non biotinylés, 5 α et 5 β -dihydroprogestérone à 5 μ M (5 α et 5 β -DHP, Steraloids), ont été ajoutés à la solution de progestérone-11 α -EMC-ODN-biotine. Ces différentes solutions de phages et d'antigènes ont été préparées en PBS - Tween 0,1% (Sigma) - lait écrémé 4%. Après 1 heure

d'incubation sous agitation douce et à température ambiante, ce mélange a été mis en contact 15 min avec les billes magnétiques streptavidine préalablement saturées. A l'aide d'un portoir magnétique, les billes ont ensuite été séparées du surnageant contenant les phages-anticorps non liés. Dix lavages de 3 ml ont été effectués : cinq lavages en PBS-Tween 0,05%-lait 5 écrémé 1% puis cinq lavages en PBS. Les billes ont finalement été récupérées dans 1 ml de PBS.

La solution contenant les phages-anticorps liés à la progestérone biotylée (celle-ci étant complexée par les billes magnétiques streptavidines) a été utilisée directement pour infecter des bactéries XL1-Blue en phase exponentielle de croissance. Ces bactéries infectées 10 ont ensuite été étalées sur boîtes 24,5x24,5 cm². Après incubation sur la nuit à 37°C, les clones ont été récupérés dans du milieu 2YT, chloramphenicol 25 µg/ml, glucose 1% et soumis à un nouveau tour de sélection. Au final, cinq tours de sélection successifs ont permis d'isoler les fragments d'anticorps de l'invention.

Les fragments d'anticorps de l'invention peuvent présenter également au niveau de 15 leur domaine VH des mutations au niveau des positions 31 et 32 du domaine VH et avantageusement une lysine en position 31 et une histidine en position 32. Ces mutations ont été introduites à l'aide de la méthode de mutagenèse dirigée *Quick Change Site Directed Mutagenesis* (Stratagene) en utilisant les oligonucléotides présentés dans le tableau III et en suivant les recommandations du fournisseur.

20

Tableau III

Nom des oligonucléotides	Séquences
<i>K31H32 aller</i>	5' -CTGGGTCTACCTTCAGAAACATGGAGTGAAGTGGGTG-3'
<i>K31H32 retour</i>	5' -CACCCAGTTCACTCCATGTTTTCTGAAGGTAGACCCAG-3'

L'introduction de la totalité des mutations identifiées au niveau des positions 94, 95 et 27° sur le VL et 31, 32 et 58 sur le VH peut être effectuée par les techniques de mutagenèse dirigée connues de l'homme du métier.

4. Production par voie recombinante des fragments d'anticorps de l'invention (ou sauvage) exposés en surface de phages.

Les fragments d'anticorps de l'invention peuvent être produits de façon recombinante dans la bactérie *E.coli* et caractérisés par des tests ELISA compétitifs sous une forme ancrée à la surface de bactériophages M13. Le phagemide pAK100 contenant les séquences d'ADN codant pour les fragments d'anticorps de l'invention permet d'exprimer les dits fragments de type scFv fusionnés à la protéine mineure de capsid pIII et de les exposer ainsi en surface des phages (bactériophages M13).

La production des phages individuels a été effectuée dans des microplaques 48 puits (puits de 5 ml, plaque stérile, MATRIX Technologies Corporation). Pour cela, 500 µl de milieu 2YT (Difco), chloramphenicol 25 µg/ml (Sigma), glucose 1% (Prolabo) ont été ensemencés avec une colonie de bactéries XL1-Blue contenant l'ADN codant pour des fragments d'anticorps de l'invention et mis en culture à 37°C sous agitation. Lorsque la DO à 550nm a atteint une valeur de 0,6, du phage auxiliaire M13KO7 (Biorad, 10⁹pfu, plaque forming unit) ainsi que 25 µl d'IPTG 0,5 mM ont été ajoutés. Après 15 min de contact sans agitation, 1 ml de milieu 2YT, chloramphenicol 25 µg/ml, glucose 1%, IPTG 0,5 mM, sont ajoutés puis la culture est mise à incuber à 26°C sous agitation pendant 2 heures. A l'issue de cette étape, 4,5 µl de kanamycine 30 µg/ml (Sigma) ont été ajoutés et la culture a de nouveau été mise à incuber à 26°C sous agitation pendant 1 nuit.

Les plaques de culture ont ensuite été centrifugées à 3300g pendant 1 heure à 4°C. Les surnagants contenant les particules de phages ont été récupérés et 515 µl de glycérol 15% ont été ajoutés.

Exemple 2 : Caractérisation des fragments d'anticorps de l'invention exposés en surface de phages.

1. Détermination des pourcentages de réactions croisées vis-à-vis des dérivés 5α-DHP et 5β-DHP par des tests ELISA compétitifs.

Les tests ELISA compétitifs ont été réalisés dans des microplaques de 96 puits (Nunc-Immuno Plate Maxisorb). Une solution de progestérone-11α-EMC-ODN

(bioMérieux) à 0,2 µg/ml en PBS (eurobio) a été déposée à raison de 100 µl par puits. Après adsorption passive pendant 1 nuit à 4°C, les puits ont été lavés avec une solution de Tris-HCl 10 mM pH 8 Tween 0,05%, puis deux étapes de saturation ont été effectuées. La première a été réalisée en distribuant 200 µl de PBS-lait écrémé 2% et en incubant 2 heures à 37°C. Pour la seconde étape de saturation, 200 µl de PBS-gélatine 2% (Sigma) ont été ajoutés et la plaque a été mise à incuber de nouveau pendant 2 heures à 37°C.

Les surnageants obtenus lors de l'étape précédente contenant les phages ont été testés de la façon suivante : 50 µl de ces surnageants auxquels ont été ajoutés des concentrations croissantes de compétiteur (progestérone et analogues, et notamment la 5α- et la 5β-DHP) ont été mis à incuber sur la microplaque pendant 1 heure à 37°C. Après cette étape d'incubation, suivie de trois lavages (en PBS-Tween 0,1%), 200 µl par puits d'un anticorps biotinylé anti-phages M13 ont été ajoutés (*Anti-fd bacteriophages-Biotin Conjugate*, Sigma, dilué au 1/2000 en PBS-Tween 0,1%), puis les plaques ont été mises à incuber 1 heure à 37°C. Après lavage, 200 µl par puits du conjugué streptavidine-HRP ont été ajoutés (*Streptavidin-horseradish peroxydase conjugué*, Amersham, dilué au 1/2000 en PBS-Tween 0,1%). Après incubation d'une heure à 37°C suivie de trois lavages, la révélation a été effectuée avec 100 µl de solution d'ABTS (2,2'azino bis(3-ethylbenzathiazoline 6-sulphonate), Sigma) préparée à 0,55 mg/ml en acétate de sodium 0,1 M pH 4,3, H₂O₂ 0,01%. La lecture des plaques a été réalisée à 410nm sur un lecteur de plaque ASYS Hitech Expert 86.

La spécificité de liaison des fragments d'anticorps de l'invention a été évaluée en considérant le pourcentage P de réactions croisées, vis-à-vis des analogues, défini de la façon suivante : $P = [CI_{50} \text{ de la progestérone} / CI_{50} \text{ du dérivé C-5}\alpha \text{ ou C-5}\beta] \times 100$. Les pourcentages P des fragments d'anticorps de l'invention ont été comparés aux pourcentages P du fragment d'anticorps sauvage (dérivé de l'anticorps monoclonal murin initial 15G12C12G11) produit selon le même format.

Les résultats sont présentés sur la figure 2, laquelle montre deux graphes représentant le pourcentage de réactions croisées P soit vis-à-vis du dérivé 5β-DHP (figure 2A), soit vis-à-vis du dérivé 5α-DHP (figure 2B), obtenus avec un fragment de l'invention présentant une

proline en position 94, une histidine en position 95 (VL) et une arginine en position 58 (VH) (appelé P94-H95-R58) tel que préparé dans l'exemple 1 ci-dessus et avec un fragment scFv de l'anticorps monoclonal 15G12C12G11 non muté selon le procédé de l'invention (appelé Sauvage), en fonction de la dose de compétiteur utilisé, ce compétiteur pouvant être soit la

5 progestérone, soit le dérivé 5 β -DHP soit le dérivé 5 α -DHP.

Les résultats mettent en évidence une amélioration des réactions croisées dans le cas du fragment de l'invention.

Le tableau IV ci-après donne les résultats obtenus pour plusieurs fragments d'anticorps de l'invention présentant une spécificité de liaison améliorée (diminution des

10 réactions croisées pour des dérivés C-5 α et C-5 β) par rapport au sauvage (fragment scFv de l'anticorps monoclonal initial), l'affinité pour la progestérone étant comparable à celle du sauvage (cette dernière étant appréciée en considérant la variation de CI₅₀ pour la progestérone : CI₅₀ progestérone pour le fragment d'anticorps de l'invention (muté) / CI₅₀ progestérone du fragment d'anticorps sauvage). Dans chaque cas, les fragments de l'invention

15 sont indiqués avec les acides aminés particuliers mutés au niveau des positions 94 et 95 sur le domaine VL, et le cas échéant des positions 58, 31 et/ou 32 sur le domaine VH.

Tableau IV

Fragments d'anticorps	Variation Cl_{50} progestérone	Réaction croisée (P)		Facteur d'amélioration*	
		5 α -DHP	5 β -DHP	5 α -DHP	5 β -DHP
Sauvage	1,0	19,0%	26,0%	-	-
R94-H95-A58	1,8	3,9%	10,0%	4,9	2,6
P94-L95-A58	1,4	3,3%	11,4%	5,8	2,3
P94-L95-A31-H32-A58	2,0	1,9%	7,6%	10,0	3,4
P94-Y95-H58	2,5	2,4%	8,2%	7,9	3,2
P94-H95-D58	1,3	2,9%	7,0%	6,6	3,7
P94-H95-K31-H32-D58	2,2	1,9%	5,1%	10,0	5,1
P94-H95-A58	1,3	2,5%	7,3%	7,6	3,6
P94-H95-K31-H32-A58	1,6	1,7%	4,3%	11,2	6,0
P94-H95-R58	2,7	2,2%	5,8%	8,6	4,5
P94-H95-K31-H32-R58	1,0	1,6%	3,4%	11,9	7,6
P94-R95-R58	2,0	2,8%	7,0%	6,8	3,7
P94-R95-K31-H32-R58	0,7	1,9%	4,7%	10,0	5,5

* Le facteur d'amélioration est calculé de la façon suivante (P du dérivé C-5 α ou C-5 β pour le sauvage / P du dérivé C-5 α ou C-5 β pour le fragment de l'invention considéré).

5 2. Détermination des pourcentages de réactions croisées pour deux autres dérivés C-5 α et C-5 β de la progestérone.

L'allopregnanolone et la pregnanolone sont deux analogues de la progestérone. Ils peuvent être retrouvés dans les sérums à des concentrations non négligeables. L'allopregnanolone est un dérivé C-5 α tandis que la pregnanolone est un dérivé de type C-
10 5 β . Ces deux composés se distinguent de la progestérone par la présence d'un groupement hydroxyle en position 3 au lieu d'un groupement céto.

Les résultats présentés dans le tableau V ci-dessous mettent en évidence que les fragments d'anticorps préparés selon le procédé de l'invention présentent également une diminution des réactions croisées vis-à-vis de ces deux analogues : allopregnanolone et
15 pregnanolone.

Tableau V

Fragments d'anticorps	Variation CI ₅₀ progestérone	Réactions croisées (P)		Facteur d'amélioration*	
		Allopregnanolone	Pregnanolone	Allopregnanolone	Pregnanolone
Sauvage	1	3,40%	0,18%	-	-
P94-H95-R58	2,7	0,30%	0,05%	11,3	3,6
P94-R95-R58	2	0,63%	0,06%	5,4	3,0

Exemple 3 : Détermination de l'affinité de liaison pour la progestérone et pour les analogues des anticorps ou fragments d'anticorps de l'invention.

- 5 1. Production par voie recombinante des fragments d'anticorps de l'invention (ou sauvage) en fusion à une séquence peptidique de six histidines.

Les fragments d'anticorps préparés selon le procédé de l'invention peuvent être produits par voie recombinante, sous une forme fusionnée à une séquence composée de six acides aminés histidines (scFv-His₆). Ces fragments d'anticorps particuliers sont produits
10 dans le périplasme d'*E. coli* à l'aide d'un vecteur d'expression dérivé du pLIP6GN (Muller BH, et al., 1999, J. Immunol Methods., 257 : 177-185).

Une préculture de nuit à 37°C sous agitation a été réalisée en ensemencant 3 ml de milieu LB (Difco), Chloramphenicol 25 µg/ml, avec une colonie de bactéries W3110 transformées par le vecteur d'expression. A l'issue de cette préculture, 50 ml de milieu LB
15 (Difco), Chloramphenicol 25 µg/ml, ont été ensemencés avec 1 ml de la culture de nuit et mis à incuber à 37°C sous agitation. Lorsque la DO_{550nm} a atteint une valeur de 0,5-0,6, l'induction a été réalisée pendant 4 heures à 30°C sous agitation après ajout d'IPTG 0,5 mM.

Après la période d'induction, la culture a été mise à centrifuger à 3500 g pendant 15 min à 4°C. Après élimination du surnageant, les culots cellulaires ont été repris dans 1/10 du
20 volume de la culture initiale dans du TSE (Tris-HCL 300 mM, pH 8, Sigma, Saccharose 20%, Fisher Scientific, EDTA 1 mM, Sigma), puis du lysozyme à 100 µg/ml (Sigma), et un mélange d'anti-protéases (*Complete, Protease Inhibitor Cocktail Tablets*, Roche) ont été ajoutés. La solution a été placée à 4°C sous agitation lente pendant 20 min, puis centrifugée pendant 30 min à 16000 g et à 4°C. Les surnageants correspondants aux extraits

périplasmiques ont été conservés à -20°C.

La purification des scFv-His₆ a été réalisée par chromatographie d'affinité sur colonne d'ions nickel (IMAC, *Immobilized Metal Affinity Chromatography*) grâce à la séquence de six histidines.

5 Les extraits périplasmiques contenant les scFv-His₆ ont été dialysés contre du tampon Tris-HCl 20 mM pH 7.9, NaCl 500 mM, imidazole 5 mM (Sigma), à l'aide de membranes de dialyse (Spectra Por N°1 MWCO 6-8000). Les extraits dialysés ont ensuite été filtrés sur membrane 0,22 mm (unité de filtration Millipore).

La colonne d'ions nickel (*HIS-Select*TM, Sigma) a été préalablement lavée à l'eau
10 distillée et équilibrée avec du tampon de dialyse. Après passage de l'échantillon sur la colonne, celle-ci a été lavée par au moins 30 ml de tampon Tris-HCl 10 mM pH 7.9, NaCl 250 mM, Imidazole 30 mM. L'élution a été réalisée avec 5 ml de tampon Tris-HCl 10 mM pH 7.9, NaCl 250 mM, imidazole 500 mM. La colonne a ensuite été régénérée avec du tampon de dialyse puis stockée à 4°C dans un mélange tampon de dialyse/30% éthanol.

15 L'éluat contenant les scFv-His₆ a été concentré cinq fois en tampon Tris-HCL 10 mM pH 7.8 à l'aide des systèmes Vivaspin (MWCO 10000, Vivascience), puis les solutions contenant les scFv-His₆ ont été stockées à 4°C.

2. Détermination de l'affinité par résonance plasmonique de surface pour la
progestérone et pour les analogues 5α-DHP et 5β-DHP, des fragments d'anticorps
20 fusionnés à une séquence peptidique composée de six histidines.

Les constantes apparentes de dissociation K_D ont été déterminées en utilisant la méthode de résonance plasmonique de surface à l'aide de l'appareil BIAcore 3000 biosensor optical (BIAcore). Des biocapteurs (supports métalliques recouverts d'une fine particule d'or) de type carboxyméthyle CM5 pré-adsorbés avec de la streptavidine (BIAcore) ont été
25 utilisés pour immobiliser des dérivés biotinylés de progestérone, de 5α-DHP et de 5β-DHP (200 RU). Les fragments d'anticorps (mutés) issus du procédé de préparation de l'invention et le fragment d'anticorps sauvage ont été dilués à différentes concentrations (0,5 nM à 25 nM) dans un tampon HEPES 10 mM pH 7.4 (Sigma), NaCl 150 mM, EDTA 3,4 mM

(Merck), 0,05% de surfactant (BIAcore). Ces mélanges ont été injectés sur les biocapteurs à un flux constant de 60 µl/min à 25°C.

Les données cinétiques ont été traitées à l'aide du logiciel BIAevaluation 3.2 et les constantes d'association k_{ass} et de dissociation k_{diss} déterminées simultanément à partir du modèle de liaison pour des interactions de type monovalente entre deux molécules ($dR_t/dt = k_{ass} \times C \times R_{max} - (k_{ass} \times C + k_{diss}) \times R_t$, où C est la concentration en fragment d'anticorps, R_{max} la réponse maximal en RU (Resonance Unit), R_t le signal mesuré au temps t).

Les résultats obtenus pour certains des fragment d'anticorps de l'invention et le fragment d'anticorps sauvage sont présentés dans le tableau VI.

10

Tableau VI

Fragments d'anticorps	Constante de dissociation K_D			Facteur d'amélioration**		Pourcentage de réaction croisée***	
	Progestérone	5 α -DHP	5 β -DHP	5 α -DHP	5 β -DHP	5 α -DHP	5 β -DHP
Sauvage	19 pM	97 pM	28 pM			19	67
P94-H95-R58	68 pM	1,5 nM	0,7 nM	4,2	6,9	4,5	9,7
P94-R95-R58	67 pM	1,5 nM	2,3 nM	4,1	23	4,6	2,9
P94-H95-R58-K31-H32	70 pM	5,3 nM	2,4 nM	14,6	23	1,3	2,9

** Le facteur d'amélioration est calculé de la façon suivante :

$$\frac{[K_D \text{ Progestérone} / K_D \text{ dérivé C-5}\alpha \text{ ou C-5}\beta]_{\text{pour le fragment sauvage}}}{[K_D \text{ Progestérone} / K_D \text{ dérivé C-5}\alpha \text{ ou C-5}\beta]_{\text{pour un variant donné de l'invention}}}$$

*** Le pourcentage de réaction croisée est calculé comme suit : $[K_D \text{ Progestérone} / K_D \text{ dérivé C-5}\alpha \text{ ou C-5}\beta] \times 100$.

15

Les résultats mettent en évidence, comme indiqué précédemment dans le tableau IV, que les fragments de l'invention purifiés présentent une amélioration de la spécificité de reconnaissance avec des diminutions de réactions croisées vis-à-vis de la 5 α -DHP et de la 5 β -DHP, et ce tout en maintenant une affinité inférieure au nanomolaire pour la progestérone. En comparaison avec le fragment sauvage qui présente des affinités pour la 5 α -DHP et la 5 β -DHP respectivement de 97 pM et 28 pM, les fragments de l'invention présentent des pertes d'affinités importantes pour la 5 α -DHP et la 5 β -DHP, ce qui se traduit par des facteurs d'amélioration de la spécificité compris entre 4,2 et 23.

20

Exemple 4 : Préparation d'une autre famille d'anticorps de l'invention

L'anticorps monoclonal 10H3C2D4 (bioMérieux, Marcy, France), dont les séquences en acides aminés pour le domaine VL et VH sont données dans le listage de séquences respectivement en SEQ ID N°12 et SEQ ID N°13, a été utilisé.

5 Les séquences d'ADN codant pour les domaines variables ont été clonées comme indiqué dans l'exemple 1.

Les 3 mutants suivants ont été préparés à partir de l'anticorps monoclonal 10H3C2D4 :

- mutant présentant une proline en position 94 (VL), une histidine en position 95 (VL) et une
10 arginine en position 58 (VH) (appelé P94-H95-R58*),
- mutant présentant une proline en position 94 (VL), une histidine en position 95 (VL), une arginine en position 58 (VH), une lysine en position 31 (VH) et une histidine en position 32 (VH) (appelé P94-H95-R58-K31-H32*),
- mutant présentant une proline en position 94 (VL), une histidine en position 95 (VL), une
15 lysine en position 27^e (VL) une arginine en position 58 (VH), une lysine en position 31 (VH) et une histidine en position 32 (VH) (appelé P94-H95-R58-K31-H32-K27^e*).

Ces mutants ont été préparés par mutagénèse dirigée en utilisant comme ADN matrice le phagemide pAK100 dans lequel a été cloné l'ADN codant le scFv de l'anticorps 10H3C2D4, en présence des amorces oligonucléotidiques telles que décrites dans le tableau

20 VII suivant :

Tableau VII

Mutation(s) concernée(s)	Nom des oligonucléotides	Séquence
94 et 95	P94H95-COD P94H95-comp	tctcaaagtacacatCCGCACctcacgttcggtgct agcaccgaacgtgagGTGCGGatgtgtactttgaga
58	R58-COD R58-comp	tacactggagagacaCGTtatactgatgacttc gaagtcacagtataACGtgtctctccagtgtga
31 et 32	K31H32-COD K31H32-comp	gggtatacccttcacaAAACATggaatgaactgggtg caccagttcattccATGTTTtgtgaaggtataccc
27 ^c	K27-COD K27-comp	cagagccttgtacacAAAaatggaacacctat ataggtgtttccattTTTgtgtacaaggctctg

Le mutant P94-H95-R58* a été obtenu en deux temps, à partir de la matrice pAK100/scFv_{10H3C3D4} sauvage et des amorces de mutagenèse P94H95-COD et P94H95-comp pour donner la matrice pAK100/scFv_{10H3C3D4}/P^{L94} H^{L95}, qui elle-même a été traitée avec les amorces de mutagenèse R58-COD et R58-comp.

Le mutant P94-H95-R58-K31-H32* a été obtenu à partir de la matrice pAK100/scFv_{10H3C3D4}/P^{L94} H^{L95} R^{H58} et des amorces de mutagenèse K31H32-COD et K31H32-comp.

Le mutant P94-H95-R58-K31-H32-K27^c* a été obtenu à partir de la matrice pAK100/scFv_{10H3C3D4}/P^{L94} H^{L95} R^{H58} + K^{H31} H^{H32} et des amorces de mutagenèse K27-COD et K27-comp.

Les affinités relatives et les pourcentages de réactions croisées par rapport aux dérivés 5 α -DHP et 5 β -DHP, calculés comme indiqué dans l'exemple 2, sont donnés dans le tableau VIII ci-après :

Tableau VIII

		C12G11			10H3C2D4		
		Pg	5 α -DHP	5 β -DHP	Pg	5 α -DHP	5 β -DHP
IgG	sauvage	30-50 pg/ml	33,0%	24%	70 pg/ml	nd	22%
Phage scFv	sauvage	5+/-4.10 ⁻¹⁰ M	20,0%	30%	5+/-4.10 ⁻⁹ M	29%	19%
	P94-H95-R58	5+/-4.10 ⁻¹⁰ M	2,0%	6%	5+/-4.10 ⁻⁸ M	12%	15%
	P94-H95-R58-K31-H32	5+/-4.10 ⁻¹⁰ M	1,5%	3%	5+/-4.10 ⁻⁸ M	10%	10%
	P94-H95-R58-K31-H32-K27 ^c	5+/-4.10 ⁻¹⁰ M	1,0%	3%	5+/-4.10 ⁻⁸ M	8%	10%

nd= non déterminé

Pg = progestérone

Les résultats dans le tableau ci-dessus confirment bien l'effet bénéfique et progressif des mutations introduites quant à la spécificité de reconnaissance de l'anticorps 10H3C2D4. En effet, on passe successivement de 29, à 12, puis 10 et enfin 8% de réaction croisée pour la 5 α -DHP. Bien que moindre, on note également une amélioration de la spécificité vis-à-vis de la 5 β -DHP. Ces résultats confirment donc tout à fait, et ce dans le cas d'un second anticorps anti-progestérone, la pertinence et l'intérêt des mutations.

Les résultats mettent également en évidence l'effet bénéfique de la mutation en position 27^c, en particulier sur le dérivé C-5 α .

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'anticorps anti-progestérone, caractérisé en ce qu'il
5 comprend l'étape consistant à introduire au niveau de leur domaine VL :

- (i) une proline ou un acide aminé basique au niveau de l'acide aminé 94 et
- (ii) un acide aminé différent d'une proline au niveau de l'acide aminé 95.

2. Procédé de préparation d'anticorps anti-progestérone selon la revendication 1,
10 caractérisé en ce que l'acide aminé en position 94 est une proline, une arginine ou une lysine,
de préférence une proline.

3. Procédé de préparation d'anticorps anti-progestérone selon la revendication 1 ou
2, caractérisé en ce que l'acide aminé en position 95 est choisi parmi l'arginine, l'histidine, la
15 leucine et la tyrosine.

4. Procédé de préparation d'anticorps anti-progestérone selon l'une quelconque des
revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend également une étape consistant à
introduire au niveau de leur domaine VH une lysine en position 31.
20

5. Procédé de préparation d'anticorps anti-progestérone selon l'une quelconque des
revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend également une étape consistant à
introduire au niveau de leur domaine VH une histidine en position 32.

25 6. Procédé de préparation d'anticorps anti-progestérone selon l'une quelconque des
revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend également une étape consistant à
introduire au niveau de leur domaine VH en position 58 un acide aminé choisi parmi l'alanine,
l'acide aspartique, l'histidine et l'arginine.

7. Procédé de préparation d'anticorps anti-progestérone selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend également une étape consistant à introduire au niveau de leur domaine VL un acide aminé basique en position 27°.

- 5 8. Anticorps anti-progestérone susceptibles d'être obtenus par le procédé tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 7.

9. Utilisation des anticorps anti-progestérone tels que définis dans la revendication 8 pour le diagnostic *in vitro* du taux de progestérone dans un échantillon biologique susceptible
10 de contenir de la progestérone.

10. Procédé de détermination du taux de progestérone dans un échantillon biologique susceptible de contenir de la progestérone, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

- 15 (i) mettre en contact ledit échantillon biologique avec un anticorps anti-progestérone tel que défini dans la revendication 8
- (ii) révéler la liaison entre ledit anticorps anti-progestérone et la progestérone contenue dans ledit échantillon et
- (iii) déterminer le taux de progestérone.

20

11. Procédé de détermination du taux de progestérone dans un échantillon biologique susceptible de contenir de la progestérone selon la revendication 10, caractérisé en ce ledit anticorps anti-progestérone est lié à un support solide.

- 25 12. Support solide sur lequel est lié un anticorps anti-progestérone tel que défini dans la revendication 8.

1/2

Figure 1

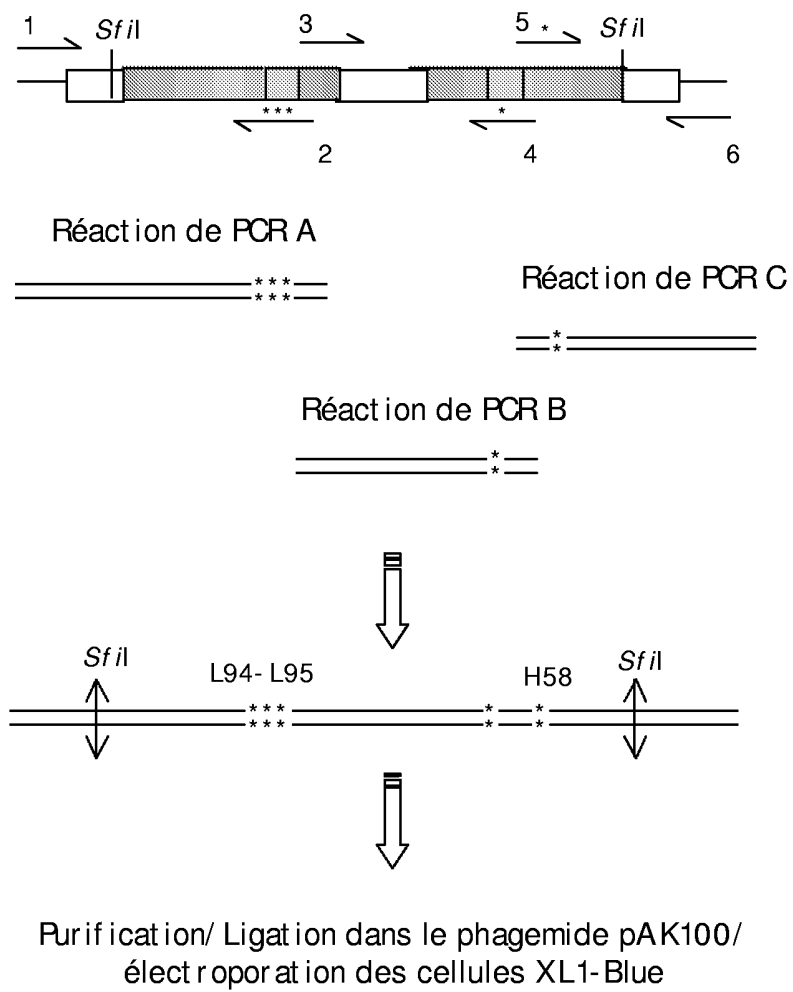


Figure 2

Figure 2A

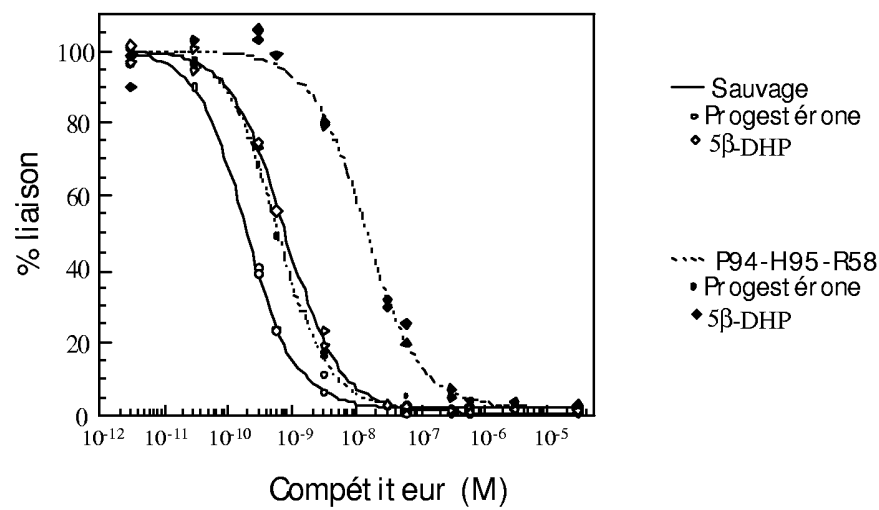
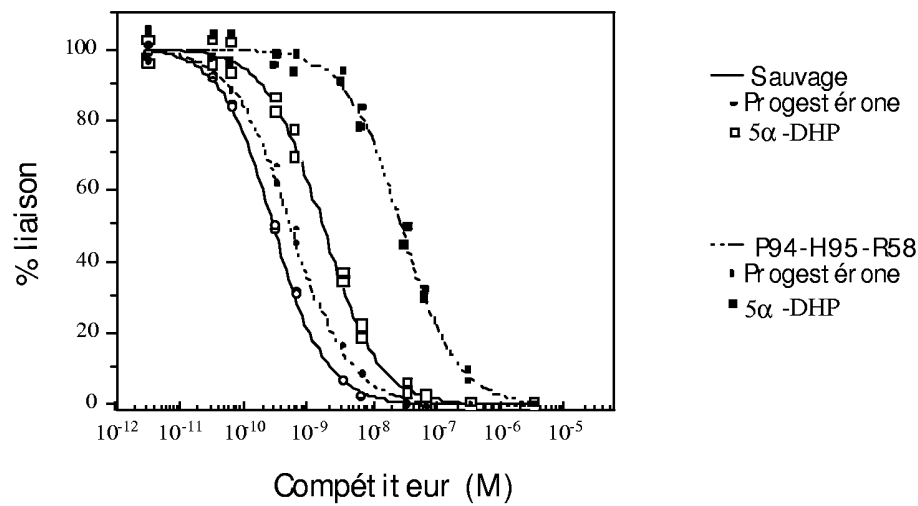


Figure 2B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2005/050913

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/26 G01N33/577 G01N33/74

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

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, BIOSIS, WPI Data, EMBASE, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WALDMANN A: "Monoclonal antibodies to progesterone: characterization and selection for enzyme immunoassay in bovine milk." HYBRIDOMA. JUN 1999, vol. 18, no. 3, June 1999 (1999-06), pages 289-296, XP002331903 ISSN: 0272-457X table 1 ----- -/--	1-12

☒ 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

14 March 2006

Date of mailing of the international search report

23/03/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Wagner, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2005/050913

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PERAKYLA MIKAEL ET AL: "Energetic analysis of binding of progesterone and 5beta-androstane-3,17-dione to anti-progesterone antibody DB3 using molecular dynamics and free energy calculations" PROTEIN ENGINEERING, vol. 14, no. 10, October 2001 (2001-10), pages 753-758, XP002331900 ISSN: 0269-2139 page 757; figure 2	1-12
A	AREVALO JAIRO H ET AL: "Three-dimensional structure of an anti-steroid Fab' and progesterone-Fab' complex" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 231, no. 1, 1993, pages 103-118, XP002331901 ISSN: 0022-2836 the whole document	1-12
A	DÖRSAM H ET AL: "Antibodies to steroids from a small human naive IgM library." FEBS LETTERS. 1 SEP 1997, vol. 414, no. 1, 1 September 1997 (1997-09-01), pages 7-13, XP002331902 ISSN: 0014-5793 the whole document	1-12
A	HE ET AL: "Characterization of a progesterone-binding, three-domain antibody fragment (VH/K) expressed in Escherichia coli" IMMUNOLOGY, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, GB, vol. 84, no. 4, April 1995 (1995-04), pages 662-668, XP002079233 ISSN: 0019-2805 the whole document	1-12
A	YOON D Y ET AL: "Influence of the conjugation site on the specificity of monoclonal antibodies to progesterone and on the performance of direct enzyme immunoassay." BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL. NOV 1993, vol. 31, no. 3, November 1993 (1993-11), pages 553-563, XP009049055 ISSN: 1039-9712 the whole document	1-12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2005/050913

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

C07K16/26 G01N33/577 G01N33/74

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

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, BIOSIS, WPI Data, EMBASE, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WALDMANN A: "Monoclonal antibodies to progesterone: characterization and selection for enzyme immunoassay in bovine milk." HYBRIDOMA. JUN 1999, vol. 18, no. 3, juin 1999 (1999-06), pages 289-296, XP002331903 ISSN: 0272-457X tableau 1 ----- -/--	1-12



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

14 mars 2006

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23/03/2006

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, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Wagner, R

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2005/050913

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	PERAKYLA MIKAEL ET AL: "Energetic analysis of binding of progesterone and 5beta-androstane-3,17-dione to anti-progesterone antibody DB3 using molecular dynamics and free energy calculations" PROTEIN ENGINEERING, vol. 14, no. 10, octobre 2001 (2001-10), pages 753-758, XP002331900 ISSN: 0269-2139 page 757; figure 2	1-12
A	AREVALO JAIRO H ET AL: "Three-dimensional structure of an anti-steroid Fab' and progesterone-Fab' complex" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 231, no. 1, 1993, pages 103-118, XP002331901 ISSN: 0022-2836 le document en entier	1-12
A	DÖRSAM H ET AL: "Antibodies to steroids from a small human naive IgM library." FEBS LETTERS. 1 SEP 1997, vol. 414, no. 1, 1 septembre 1997 (1997-09-01), pages 7-13, XP002331902 ISSN: 0014-5793 le document en entier	1-12
A	HE ET AL: "Characterization of a progesterone-binding, three-domain antibody fragment (VH/K) expressed in Escherichia coli" IMMUNOLOGY, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, GB, vol. 84, no. 4, avril 1995 (1995-04), pages 662-668, XP002079233 ISSN: 0019-2805 le document en entier	1-12
A	YOON D Y ET AL: "Influence of the conjugation site on the specificity of monoclonal antibodies to progesterone and on the performance of direct enzyme immunoassay." BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL. NOV 1993, vol. 31, no. 3, novembre 1993 (1993-11), pages 553-563, XP009049055 ISSN: 1039-9712 le document en entier	1-12