Office de la Propriété Intellectuelle du Canada
Un organisme d'Industrie Canada

Canadian Intellectual Property Office
An agency of Industry Canada

CA 2450937 A1 2003/01/16

(21) 2 450 937

(12) DEMANDE DE BREVET CANADIEN
CANADIAN PATENT APPLICATION

(13) A1

(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2002/07/02
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2003/01/16
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2003/12/16
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2002/002292
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2003/005037
(30) Priorité/Priority: 2001/07/03 (01/08797) FR

(51) Cl.Int.$^{7}$/Int.Cl.$^{7}$ G01N 33/68, C12Q 1/37, G01N 33/566

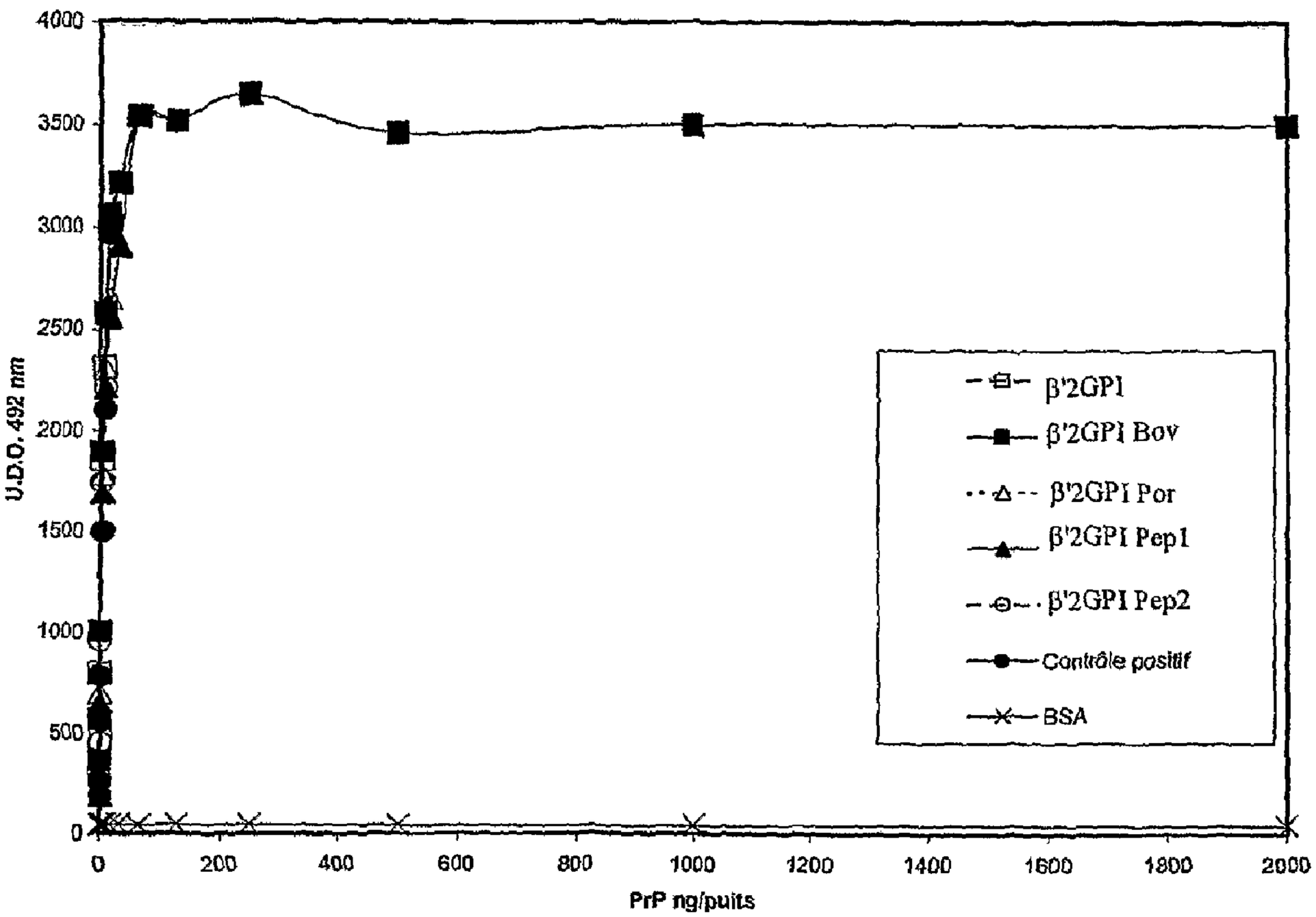
(71) Demandeur/Applicant:
APOH TECHNOLOGIES SA, FR

(72) Inventeur/Inventor:
STEFAS, ELIE, FR

(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : PROCEDE DE SEPARATION ET/OU DETECTION ET/OU IDENTIFICATION ET/OU QUANTIFICATION DE PROTEINES PRIONS

(54) Title: METHOD FOR SEPARATING AND/OR DETECTING AND/OR IDENTIFYING AND/OR QUANTIFYING PRION PROTEINS




(57) Abrégé/Abstract:
La présente invention concerne un procédé de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification dans un matériau biologique d'au moins une protéine prion (PrP), caractérisé par le fait qu'il comprend une étape de séparation et/ou

(21) 2 450 937

(13) A1

(57) Abrégé(suite)/Abstract(continued):
de détection et/ou d'identification et/ou de quantification d'un complexe (PrP/β2GPI) formé d'au moins une protéine prion liée à au moins une forme de β2GPI.

(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
16 janvier 2003 (16.01.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/005037 A1

(51) Classification internationale des brevets[7] :
G01N 33/68, C12Q 1/37, G01N 33/566

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/02292

(22) Date de dépôt international : 2 juillet 2002 (02.07.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
01/08797 3 juillet 2001 (03.07.2001) FR

(71) Déposant *(pour tous les États désignés sauf US)* : **APOH TECHNOLOGIES SA** [FR/FR]; 911, avenue Agropolis, F-34000 Montpellier (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant *(pour US seulement)* : **STEFAS, Elie** [FR/FR]; 94, allée des Fauvettes, F-34280 La Grande-Motte (FR).

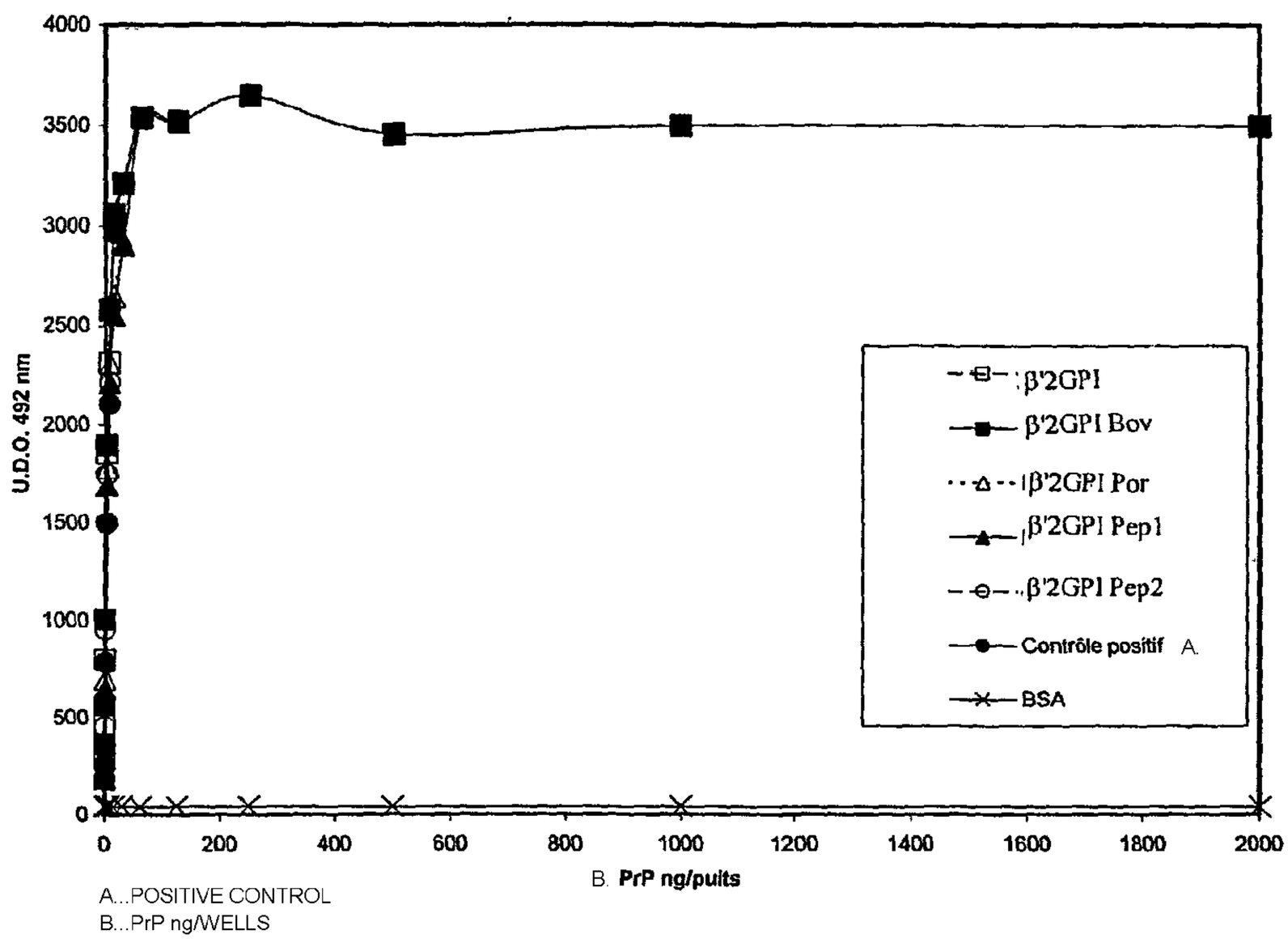
(74) Mandataire : **ABELLO, Michel**; Cabinet Peuscet, 78, avenue Raymond Poincaré, F-75116 Paris (FR).

(81) États désignés *(national)* : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,

*[Suite sur la page suivante]*

(54) Title: METHOD FOR SEPARATING AND/OR DETECTING AND/OR IDENTIFYING AND/OR QUANTIFYING PRION PROTEINS

(54) Titre : PROCEDE DE SEPARATION ET/OU DETECTION ET/OU IDENTIFICATION ET/OU QUANTIFICATION DE PROTEINES PRIONS




A...POSITIVE CONTROL
B...PrP ng/WELLS

(57) **Abstract:** The invention concerns a method for separating and/or detecting and/or identifying and/or quantifying in a biological material at least a prion protein (PrP), characterised in that it comprises a step which consists in separating and/or detecting and/or identifying and/or quantifying a (PrP/β2GPI) complex consisting of at least a prion protein bound to at least a form of β2GPI.

*[Suite sur la page suivante]*

WO 03/005037 A1

WO 03/005037 A1

LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

**(84) États désignés** *(régional)* **:** brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée :**

— *avec rapport de recherche internationale*

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

**(57) Abrégé :** La présente invention concerne un procédé de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification dans un matériau biologique d'au moins une protéine prion (PrP), caractérisé par le fait qu'il comprend une étape de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification d'un complexe (PrP/β2GPI) formé d'au moins une protéine prion liée à au moins une forme de β2GPI.

# PROCÉDÉ DE SÉPARATION ET/OU DÉTECTION ET/OU IDENTIFICATION ET/OU QUANTIFICATION DE PROTÉINES PRIONS

La présente invention concerne un procédé de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification de protéines prions, responsables de maladies neurodégénératives, dans divers matériaux biologiques.

Les prions font partie des "agents transmissibles non conventionnels" (ATNC) et sont impliqués dans des maladies rencontrées chez l'homme et les animaux. Il s'agit d'agents responsables de maladies neurodégénératives regroupées sous le nom d'encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST). Ces encéphalopathies, reliées aux prions, incluent la tremblante du mouton et de la chèvre, l'encéphalopathie bovine ou maladie de la vache folle, la maladie du dépérissement chronique des ruminants sauvages, les encéphalopathies des visons et des chats, chez l'animal, la maladie de Creutzfeld-Jacob (MJC), le syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS), le kuru et l'insomnie familiale fatale, chez l'homme (Les virus transmissibles de la mère à l'enfant, Ed. John Libbey Eurotext, 1999, Ermias D. Belay, Annu. Rev. Microbiol., 1999, 53: 283-314).

Ces maladies, toujours mortelles, posent un grave problème de santé publique notamment du fait des difficultés que l'on rencontre pour l'identification et la détection précoce de ces agents. Il y a donc une forte demande relative à des procédés fiables de diagnostic et de mesures thérapeutiques efficaces, de ces agents transmissibles non conventionnels.

Ces maladies semblent être causées par la transition post-traductionnelle et conformationnelle d'une protéine prion cellulaire, normale, ci-après désignée $PrP^{C}$, en une forme pathogénique, anormale, ci-après désignée $PrP^{SC}$ (Cohen F.E. and Prusiner S.B., Annu. Rev. Biochem., 1998, 67: 793-819).

La forme cellulaire normale de la protéine prion est une glycoprotéine de surface cellulaire, hautement conservée et exprimée par un large spectre de cellules, en particulier par des cellules neuronales. Sa présence est indispensable pour que la maladie puisse se produire. Dans les encéphalopathies spongiformes transmissibles, cette molécule est

convertie en une forme modifiée, du point de vue conformationnel, présentant une résistance partielle à la protéolyse. Ainsi, dans le cerveau des animaux ou des humains présentant des ESST, on observe une accumulation de $PrP^{SC}$ anormale sous forme de fibrilles et dans certains cas sous forme de dépôts amyloïdes dans les cellules. Cette $PrP^{SC}$ anormale a un poids moléculaire compris entre 33 et 35 kDa avant protéolyse et a un poids moléculaire compris entre 27 et 30 kDa après action de la protéinase K : cette résistance à la protéinase K permet de différencier la $PrP^{SC}$ de la $PrP^{C}$ qui est détruite par l'action de ladite protéinase. Des études biophysiques ont également démontré que la $PrP^{C}$ contient un nombre élevé d'hélices α (42%) et très peu de feuillets β, alors qu'au contraire la forme $PrP^{SC}$ contient moins d'hélices α (30%) et un nombre élevé de feuillets β (43%) et a une tendance à se polymériser sous forme de fibrilles amyloïdes (Cohen F.E. and Prusiner S.B., Annu. Rev. Biochem., 1998, 67: 793-819). La protéine prion, désignée d'une manière générale par PrP, est également caractérisée par son affinité pour les polyanions polysulfatés tels que l'héparine sulfate et le dermatan sulfate (Brimacombe B. et al., Biochem. J., 1999, 342: 605-613).

On sait que la β2-glycoprotéine I, ci-après en abrégé β2GPI, est une glycoprotéine plasmatique, dont la séquence a été notamment indiquée dans les articles de J. LOZIER et coll., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 81, pages 3640-3644, Juillet 1984 et de T. KRISTENSEN et coll., FEBS Letters, Vol. 289, 1991, pages 183-186. La β2GPI est également appelée Apolipoprotéine H (APOH). Il a été constaté que cette protéine présente un polymorphisme structural : la dénomination β2GPI sera ci-après considérée comme générique pour toutes les formes.

Ce polymorphisme structural est sous contrôle génétique comme ceci a été notamment indiqué dans l'article de DK. SANGHERA et coll., Hum. Genet., Vol. 100, 1997, pages 57-62. Il est dû à la présence de quatre allèles: trois allèles fréquents (APOH*1, APOH*2 et APOH*3) et un allèle rare (APOH*4). L'allèle APOH*3 a été par la suite sous-typé en $APOH*3^{W}$ et $APOH*3^{D}$ en se basant sur sa réactivité avec un anticorps monoclonal 3D11. Ce polymorphisme est dû à plusieurs substitutions dans la région ADN codant pour l'APOH telles que Ser88Asn (DK. SANGHERA et coll., Hum. Genet., Vol. 100, 1997, pages 57-62), Val247Leu (A. STEINKASSERER et coll., Hum. Genet.,

Vol. 91, 1993, pages 401-402), Cys306Gly (DK. SANGHERA et coll., Hum. Mol. Genet., Vol. 6, 1997, pages 311-316), et Trp316Ser (DK. SANGHERA et coll., Hum. Genet., Vol. 100, 1997, pages 57-62 et DK. SANGHERA et coll., Hum. Mol. Genet., Vol. 6, 1997, pages 311-316). Les mutations Ser88Asn et Trp316Ser correspondent aux allèles APOH*1 et APOH*3$^{W}$ respectivement. La forme β2'GPI décrite dans FR-2 701 260 B1 résulte de la mutation Thr318Ser.

La β2GPI est connue comme une glycoprotéine ayant une forte affinité pour les phospholipides anioniques tels que la cardiolipine (H. WURM, Int. J. Biochem., Vol. 16, 1984, pages 511-515).

Dans la demande internationale WO 94/18569, on a indiqué que des composés viraux se fixaient de façon spécifique sur une forme de β2GPI, à savoir celle décrite dans la demande de brevet français 2 701 263, que cette forme de β2GPI soit à l'état pur ou dans une composition protéinique la contenant ; cette forme de β2GPI est isolée à partir du résidu fixé sur la (les) colonne(s) de chromatographie d'affinité utilisée(s) dans le procédé de purification de l'albumine du plasma sanguin décrit dans FR-A-2 690 444 ; elle a un poids moléculaire de 50 000 ± 3 000 daltons.

On a formulé l'hypothèse que la liaison de la β2GPI à des composés viraux pourrait impliquer les phospholipides présents sur ces composés (H. MEHDI et coll., J. Virol., Vol. 68 (4), 1994, pages 2415-2424, AR.NEURATH et coll., Virology, Vol. 204 (1), 1994, pages 475-477, E. STEFAS et coll., AIDS Res. Hum. Retr., Vol. 13 (1), 1997, pages 97-104, E. STEFAS et coll., Hepatology, Vol. 33 (1), 2001, pages 207-217). Il a également été décrit que la β2GPI sert de cofacteur pour la liaison des anticorps anti-phospholipides aux phospholipides anioniques (M. GALLI et coll., Lancet, Vol. 335 (8705), 1990, pages 1544-1547, HP. McNEIL et coll., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 87 (11), 1990, pages 4120-4124). On a aussi émis l'hypothèse, dans la littérature, que les résidus lysine de la β2GPI étaient responsables de la liaison de cette dernière aux phospholipides anioniques (Steinkasserer A. et coll., Biochemical Journal, 1991, 277 (Pt 2) : 387-391) ; cette hypothèse était confortée par le fait que la modification desdits résidus lysine par carbamylation abolissait sa liaison aux phospholipides (Arvieux J. et

coll., Thrombosis and Haemostasis, 70 (2), 1993: 336-341, Kertesz Z. et coll., Biochemical Journal, 310, 1995 : 315-321).

Il semble, en conséquence, que la liaison entre un composé infectieux et la β2GPI fait intervenir des interactions protéine-phospholipide, ainsi que d'autres types de liaison, notamment basés sur des interactions protéine-protéine.

Il apparaît clairement, à partir des données de la littérature médicale, qu'il y a un besoin urgent de développer des méthodes d'isolement, d'identification et de diagnostic d'agents pathogènes tels que des protéines prions anormales $PrP^{SC}$, causant des maladies connues ainsi que des maladies émergentes, et des méthodes d'isolement, d'identification de protéines prions normales $PrP^{C}$ dont les $PrP^{SC}$ dérivent Ces méthodes permettront à terme de mieux connaître ces agents pathogènes ainsi que les mécanismes qu'ils mettent en jeu pour infecter des organismes vivants.

Par conséquent, le but de la présente invention est de fournir :

- un procédé de séparation de protéine prion d'un matériau biologique, et/ou
- un procédé d'isolement et purification de protéine prion, et/ou
- un procédé de détection de protéine prion dans un matériau biologique, et/ou
- un procédé d'identification de protéine prion dans un matériau biologique, et/ou
- un procédé de quantification de protéine prion dans un matériau biologique.

Selon l'invention, on a constaté que, de façon surprenante et inattendue, des protéines prions PrP peuvent être séparées et/ou détectées et/ou identifiées et/ou quantifiées par l'intermédiaire de leur liaison aux différentes formes de β2GPI. Le terme de "liaison" indique que ces PrP sont physiquement connectées à, et interagissent avec, les différentes formes de β2GPI. Cette liaison peut être démontrée par n'importe quel procédé ou essai connu en la matière tels que les essais utilisant la biotine et l'avidine ou la streptavidine, de type immunoenzymatique, de type ELISA ou Immunoblot, de type radioimmunologique, de type RIA, des essais de compétition, des essais d'agglutination, des essais

d'immunoprécipitation, des essais de chromatographie... De façon générale, on appellera ici "complexe" une association directe ou indirecte, entre au moins une PrP, normale ou anormale, et au moins une forme de β2GPI ; ces complexes seront, de façon générale, désignés ci-après par la notation "PrP/β2GPI".

Dans la présente demande de brevet, on entend, de façon générique, par PrP aussi bien les composés protéiniques, constitutifs d'une PrP, que des particules de type PrP. Les particules de type PrP sont, soit des PrP complètes ou incomplètes, soit des parties de PrP, soit des assemblages contenant des composés constitutifs de PrP, qui présentent certaines propriétés des PrP ou des composés PrP, en particulier, celles d'être détectées par certains anticorps spécifiques de composés PrP.

Selon la présente invention, on entend par "matériau biologique", un tissu biologique, une préparation ou un extrait issu du tissu biologique, liquide ou solide, ou un milieu naturel, liquide ou solide, susceptible de contenir ou porter une PrP au sens ci-dessus défini. Le matériau peut ainsi être un mélange d'au moins deux matériaux tels que ci-dessus définis. Un tel matériau biologique peut donc être, notamment, soit préparé à partir de tissus, d'organes, de selles ou de liquides biologiques d'un malade atteint d'une infection due à une $PrP^{SC}$, soit obtenu à partir de cultures "in vitro"; un tel matériau biologique peut aussi être un sérum, du plasma, de l'urine, du liquide céphalo-rachidien, du liquide synovial, du liquide péritonéal, du liquide pleural, du liquide séminal, de la salive, des sécrétions gastriques, du mucus, du liquide ascitique ou autres.

La présente invention a donc pour objet un procédé de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification dans un matériau biologique d'au moins une protéine prion (PrP), caractérisé par le fait qu'il comprend une étape de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification d'un complexe (PrP/β2GPI) formé d'au moins une protéine prion liée à au moins une forme de β2-glycoprotéine I (β2GPI).

Selon une particularité, le procédé comprend une étape de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification d'un complexe ($PrP^{SC}$/β2GPI) formé d'au moins une protéine prion

anormale ($PrP^{SC}$) liée à au moins une forme de β2GPI, ledit procédé constituant un procédé de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification dans un matériau biologique d'au moins une protéine prion anormale. En particulier on peut utiliser pour former un complexe ($PrP^{SC}$/β2GPI) au moins une protéine prion anormale $PrP^{SC}$ provenant de la tremblante du mouton ou de la chèvre, de l'encéphalopathie bovine, de la maladie du dépérissement chronique des ruminants sauvages, des encéphalopathies des visons ou des chats, de la maladie de Creutzfeld-Jacob (MJC), du syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS), du kuru ou de l'insomnie familiale fatale. En outre, on peut utiliser, pour former un complexe (PrP/β2GPI), au moins une β2GPI d'origine humaine, ou d'origine animale, une β2GPI recombinante, ou une β2GPI obtenue par synthèse chimique ou une forme modifiée de β2GPI.

Avantageusement, avant l'étape de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification du complexe ($PrP^{SC}$/β2GPI), on soumet le matériau biologique à l'action de détergents et/ou d'enzymes, en particulier à l'action de la protéinase K.

Selon une première mise en œuvre de l'invention, on réalise une étape de fixation de PrP contenue dans un matériau biologique à au moins une forme de β2GPI intentionnellement rajoutée audit matériau biologique pour former ledit complexe, suivie d'une étape de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification du complexe (PrP/β2GPI).

Selon un mode de réalisation, on réalise une étape de fixation sur un support, d'au moins une forme de β2GPI ou de ladite (ou desdites) PrP, avant ou après l'étape de fixation de ladite (ou desdites) PrP à ladite (ou auxdites) forme(s) de β2GPI pour former ledit complexe, une étape de séparation consistant à séparer le matériau biologique du support sur lequel est fixé le complexe, une étape de détection et/ou d'identification et/ou de quantification consistant, après ladite étape de séparation, à détecter et/ou à identifier et/ou à quantifier le complexe fixé au support par sa partie qui n'est pas liée au support. Avantageusement, on utilise, comme support, un support solide.

Selon une variante de réalisation, la fixation sur le support est réalisée par l'intermédiaire d'un composé se liant à l'une des parties

PrP ou β2GPI du complexe, ladite étape de détection et/ou d'identification et/ou de quantification consistant à détecter et/ou à identifier et/ou à quantifier le complexe par sa partie qui n'est pas liée au support. Avantageusement, le composé se liant à la β2GPI ou à la PrP est un anticorps reconnaissant respectivement la β2GPI ou la PrP, ou bien une autre protéine, un composé biologique, un composé chimique ou un détergent se fixant à la PrP ou à la β2GPI.

On peut réaliser l'étape de fixation d'au moins une forme de β2-GPI ou de la (ou des) PrP sur un support, par réaction de groupes réactifs de la (ou des) forme(s) de β2GPI ou de la (ou des) PrP avec des sites réactifs du support, ladite (ou lesdites) forme(s) étant mise(s) en solution dans un tampon ayant un pH compris entre 2,5 et 10,5, de préférence entre 5,5 et 7,5, pour obtenir une solution ayant une concentration comprise entre 0,01 et 100g/l de forme(s) de β2GPI ou de PrP, le support étant maintenu en contact avec la solution à une température comprise entre 0° et 40°C pendant un temps d'incubation compris entre 10 secondes et 24 heures, puis la séparation du support et de la solution par lavage du support.

L'étape de fixation d'au moins une PrP à au moins une forme de β2GPI pour former un complexe peut être réalisée par mise en contact d'au moins une forme de β2GPI, avec le matériau biologique susceptible de contenir des PrP à une température comprise entre 0° et 50°C, avantageusement voisine de 37°C, pendant une période de temps comprise entre 10 secondes et 24 heures, le matériau biologique étant dilué à l'aide d'un tampon donnant un pH compris entre 3,5 et 10, de préférence compris entre 5,6 et 7,6.

On peut effectuer la détection et/ou l'identification et/ou la quantification de la (ou des) PrP du complexe par des anticorps spécifiques de la (ou des) PrP, ou par des procédés d'infection de cellules ou d'organismes susceptibles à l'infection des PrP ; avantageusement, on effectue la détection et/ou l'identification et/ou la quantification de la (ou des) PrP du complexe par un anticorps reconnaissant spécifiquement un antigène, de préférence de nature protéique, de la (ou des) PrP.

On peut aussi, selon une autre façon d'opérer, effectuer la détection et/ou l'identification et/ou la quantification de la β2GPI du complexe par des anticorps spécifiques de la β2GPI.

Avantageusement, on couple l'anticorps utilisé à un marqueur enzymatique, de l'or colloïdal, à un traceur radioactif, fluorescent ou luminescent. On peut coupler l'anticorps à un marqueur enzymatique, dont l'enzyme est mise en contact avec un substrat spécifique apte à se transformer en un produit coloré.

Quand on fixe le complexe au support par l'intermédiaire de sa partie β2GPI, l'étape de séparation comprend l'isolement de la PrP du complexe fixé au support par un procédé d'élution de chromatographie d'affinité. Avantageusement, ledit isolement est réalisé par élution de la PrP fixée au support solide à l'aide d'un tampon ayant un pH compris entre 2 et 10,5, une concentration en NaCl comprise entre 0 et 5M, de préférence à l'aide d'un tampon glycine-HCl 0,1 mole/litre ayant un pH de 2,5.

Selon une particularité de l'invention, la séparation du support et de la solution est suivie d'une étape de saturation des sites actifs du support, en faisant réagir sur les sites actifs une solution d'albumine sérique bovine ou de caséine.

Selon une autre mise en œuvre de l'invention, le procédé de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification d'au moins une PrP dans un matériau biologique qui contient naturellement au moins une forme de β2GPI, comprend une étape de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification d'un complexe (PrP/β2GPI) formé d'au moins une PrP liée à au moins une forme de β2GPI naturellement présente dans ledit matériau.

Les formes de β2GPI utilisées selon la présente invention, pour former les complexes (PrP/β2GPI), peuvent, comme ci-dessus indiqué, être d'origine humaine, animale, recombinante, ou obtenues par voie chimique ou des formes modifiées de β2GPI.

Le terme "d'origine humaine" se réfère à n'importe quelle forme naturelle de β2GPI trouvée chez l'homme ou obtenue après culture de cellules humaines, ou à des fragments (combinaison de quelques acides aminés, tels que des polypeptides ou peptides) de celle-ci, obtenus soit en cours de purification, par coupure(s) enzymatique(s) provoquée(s) par des enzymes déjà présentes dans les liquides biologiques, soit après purification à l'aide d'enzymes spécifiques ou non de sites présents sur ces formes naturelles humaines.

Le terme "d'origine animale" se réfère à n'importe quelle forme naturelle de β2GPI trouvée chez l'animal, ou obtenue après culture de cellules animales, ou à des fragments (combinaison de quelques acides aminés, tels que des polypeptides ou peptides) de celle-ci, obtenus soit en cours de purification, par coupure(s) enzymatique(s) provoquée(s) par des enzymes déjà présentes dans les liquides biologiques, soit après purification à l'aide d'enzymes spécifiques ou non de sites présents sur ces formes naturelles animales.

Le terme "d'origine recombinante" se réfère ou bien à n'importe quelle forme recombinante de β2GPI obtenue selon les techniques de recombinaison d'ADN telles que décrites par Maniatis (MANIATIS T. et coll., Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1982), après insertion du gène, modifié ou non, et recombinaison génétique, ou après modification du gène déjà exprimé par des procédés connus en la matière chez les bactéries ou autres cellules utilisées dans la production de protéines recombinantes, ou bien à des fragments (combinaison de quelques acides aminés, tels que des polypeptides ou peptides) de telles formes recombinantes, obtenus soit en cours de purification, par coupure(s) enzymatique(s) provoquée(s) par des enzymes déjà présentes dans les liquides biologiques, soit après purification à l'aide d'enzymes spécifiques ou non de sites présents sur ces formes recombinantes.

Le terme "modifié" se réfère à n'importe quelle forme naturelle de β2GPI trouvée chez l'homme ou l'animal, à n'importe quelle forme d'origine recombinante, à n'importe quelle forme obtenue après culture de cellules humaines ou animales, ou encore à des fragments (combinaison de quelques acides aminés, tels que des polypeptides ou peptides) de ces formes, obtenus soit en cours de purification, par coupure(s) enzymatique(s) provoquée(s) par des enzymes déjà présentes dans les liquides biologiques, soit après purification à l'aide d'enzymes spécifiques ou non de sites présents sur lesdites formes, après que toutes les formes susmentionnées aient subi des modifications, par exemple par voie chimique, de certains de leurs acides aminés, comme par exemple la carbamylation des résidus lysine.

Le terme "obtenue par voie chimique" se réfère à n'importe quelle forme de β2GPI d'origine humaine, animale ou recombinante telle

que définie ci-dessus obtenue par une synthèse chimique. En particulier, les polypeptides et peptides provenant desdites formes de β2GPI peuvent être préparés selon n'importe quel procédé connu en la matière notamment par synthèse chimique classique comme décrit par Atherton et Shepard dans "Solid phase peptide synthesis", IRL Press, Oxford, 1989. Il est clair que les termes "polypeptides" et "peptides" se réfèrent à un polymère d'acides aminés comprenant moins d'acides aminés que la séquence de la protéine naturelle, mais n'exclut pas les modifications post-traductionnelles des polypeptides et peptides, telles que la glycosylation, l'acylation, la phosphorylation, les modifications avec des acides gras ou autres. Sont également inclus dans la définition, des polypeptides et des peptides avec des substitutions au niveau des acides aminés, des versions mutées ou des variations de la séquence naturelle de ces polypeptides et peptides, des polypeptides et peptides avec des liaisons substituées, des polypeptides et peptides contenant des résidus cystéine reliés par des ponts disulfure, des résidus cystéine sans ponts disulfure, aussi bien que d'autres modifications connues en la matière.

Selon la présente invention, on peut utiliser, comme forme de β2GPI, la β2GPI pure ou sous forme de composition protéinique contenant, en particulier, d'autres glycoprotéines. Elle peut ainsi être obtenue :

- à partir du plasma ou autre liquide biologique, par exemple sérum, urine, liquide céphalo-rachidien, humain ou animal, en mettant en œuvre des procédés de purification déjà décrits dans la littérature ou dans le brevet français 2 701 263 ; ou
- à partir du commerce ; ou
- à partir de surnageants de cellules immortalisées qui l'expriment ; ou
- par expression du gène qui la code dans des bactéries ou autres cellules utilisées dans la production de protéines recombinantes ; ou
- par synthèse chimique.

Les formes de β2GPI peuvent être caractérisées et séquencées selon n'importe quel procédé connu en la matière.

Pour mettre en oeuvre le procédé selon l'invention, on peut ou bien effectuer la détection et/ou l'identification et/ou la quantification de PrP sans fixation préalable du complexe (PrP/β2GPI) sur un support ou bien effectuer la séparation et/ou détection et/ou identification et/ou

quantification de PrP avec fixation dudit complexe sur un support par un élément constitutif du complexe ; dans le premier cas, la détection et/ou l'identification et/ou la quantification s'effectue dans le milieu où le complexe s'est formé, soit après fixation dudit milieu par une méthode physique, chimique ou biochimique, par exemple sur une surface, soit sans fixation dudit milieu ; dans le deuxième cas, le support peut, avantageusement, être un support solide, la séparation consistant à séparer le support sur lequel est fixé le complexe, la détection et/ou l'identification et/ou la quantification consistant à détecter et/ou identifier et/ou quantifier le complexe fixé au support après avoir séparé ledit support du matériau biologique.

Le terme "support solide" se réfère à n'importe quel support solide connu en la matière tel qu'un de ceux décrits dans "Current Protocols in Immunology" aux Editions Coligan J., Kruisbeek A., Margulies D., Shevach E et Strober W., Wiley Interscience, 1992. Ce support peut, par exemple, être une plaque de microtitration type ELISA, une membrane, notamment de nitrocellulose, un gel de chromatographie, des billes, notamment en polystyrène, des tubes, notamment en polystyrène ou polypropylène, ou des cellules vivantes, humaines ou animales ou bactériennes ou virales.

Selon un premier mode de mise en œuvre de l'invention dans le cas où l'on fixe le complexe sur un support, on retient le complexe (PrP/β2GPI) sur le support par l'intermédiaire de la partie β2GPI du complexe ; ensuite, la partie du complexe correspondant à la PrP est détectée/identifiée/quantifiée ou isolée par tout moyen approprié. La fixation de la partie β2GPI sur le support peut être effectuée après la formation du complexe ou, de préférence, avant la formation du complexe. Si la fixation de la partie β2GPI est effectuée avant la formation du complexe, ladite fixation sur le support solide se fait par réaction de groupes réactifs de la (ou des) forme(s) de la β2GPI avec des sites réactifs du support selon n'importe quel procédé connu en la matière, tel que décrit dans "Current Protocols in Immunology" aux Editions Coligan J., Kruisbeek A., Margulies D., Shevach E et Strober W., Wiley Interscience, 1992. Cette réaction est, de préférence, effectuée à une température comprise entre 0° et 40°C, la (ou les) forme(s) de β2GPI étant, de préférence, mise(s) dans un tampon ayant un pH

compris entre 2,5 et 10,5, avantageusement entre 5,5 et 7,5. On utilise, de préférence, un tampon isotonique ou presque isotonique. Le tampon peut être du type phosphate ou acétate. La solution obtenue a avantageusement une concentration comprise entre 0,01 et 100 g/l de forme(s) de β2GPI. Le support est avantageusement maintenu en contact avec le tampon contenant la (ou les) forme(s) de β2GPI à une température comprise entre 0 et 40°C et pendant un temps d'incubation compris entre 10 secondes et 24 heures. Après incubation, on sépare du support le tampon contenant la (ou les) forme(s) de β2GPI n'ayant pas réagi et on effectue un lavage du support, de préférence, avec le même tampon que celui qui contenait la (ou les) forme(s) de β2GPI. Il peut être nécessaire de saturer les sites actifs du support, qui n'ont pas réagi, avec la (ou les) forme(s) de β2GPI. Dans ce cas, on fait réagir sur ces sites actifs d'autres groupes actifs choisis parmi les solutions d'albumine bovine, de sérum de veau fœtal, de caséine ou similaires. On utilise avantageusement, dans ce but, une solution d'albumine sérique bovine, en particulier une solution à 2% dans le tampon utilisé pour la (ou les) forme(s) de β2GPI. Après réaction, le support est, de préférence, rincé et séché.

La réaction du support solide portant une (ou des) forme(s) de β2GPI avec le matériau biologique se fait selon n'importe quel procédé connu en la matière tels que ceux décrits dans "Current Protocols in Immunology" aux Editions Coligan J., Kruisbeek A., Margulies D., Shevach E et Strober W., Wiley Interscience, 1992. Le support sur lequel est (sont) fixée(s) la (ou les) forme(s) de β2GPI est ensuite mis en contact avec un matériau biologique susceptible de contenir des PrP. On dilue, de préférence, le matériau biologique à l'aide d'un tampon donnant un pH compris entre 3,5 et 10, avantageusement compris entre 5,6 et 7,6. La réaction est, de préférence, effectuée à une température comprise entre 0° et 50°C, avantageusement voisine de 37°C, pendant une période de temps comprise entre 10 secondes et 24 heures. On peut séparer ensuite le matériau biologique du support portant la (ou les) forme(s) de β2GPI, qui a (ou ont) éventuellement fixé au moins une PrP. On effectue éventuellement ensuite un lavage avec une solution, tamponnée de préférence.

Les mêmes conditions de fixation de (ou des) forme(s) de β2GPI sur le support et de fixation de la (ou des) PrP sur la (ou les) forme(s) de β2GPI que celles décrites précédemment peuvent être utilisées lorsque la fixation de la (ou des) forme(s) de β2GPI sur le support est effectuée après la formation du complexe.

Lorsque le complexe est fixé sur le support par l'intermédiaire de sa partie β2GPI, il est alors possible d'isoler la PrP. L'isolement de la partie PrP du complexe fixé sur le support solide par sa partie β2GPI peut se faire selon n'importe quel procédé d'élution utilisé pour la chromatographie d'affinité, tels que ceux décrits dans "Guide to protein purification. Methods in enzymology", édité par Deutscher M., Academic Press, 1990. On sépare ou élue le matériau biologique du support solide contenant la (ou les) forme(s) de β2GPI à l'aide d'un tampon ayant un pH compris entre 2 et 10,5, ayant une concentration en NaCl comprise entre 0 et 5M, avantageusement avec un tampon glycine-HCl, 0,1 mole/litre, ayant un pH de 2,5.

La détection et/ou l'identification et/ou la quantification des PrP fixées sur la (ou les) forme(s) de β2GPI peuvent se faire par tout moyen connu utilisant la détection et/ou l'identification et/ou la quantification par des anticorps, tel que décrit dans "Current Protocols in Immunology" aux Editions Coligan J., Kruisbeek A., Margulies D., Shevach E et Strober W., Wiley Interscience, 1992. Le terme "anticorps" ci-dessus utilisé se réfère à des anticorps polyclonaux ou monoclonaux. Le terme "anticorps monoclonal" se réfère à une composition d'anticorps consistant en une population homogène d'anticorps ; ce terme n'est pas limité en regard de l'espèce productrice de cet anticorps ni de la source de sa provenance, ni de la manière dont il a été produit. La détection et/ou l'identification et/ou la quantification des PrP fixées sur la (ou les) forme(s) de β2GPI se font, de préférence, à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement des antigènes, de préférence de nature protéique, des PrP. De façon connue, cet anticorps peut être conjugué à un marqueur enzymatique, à de l'or colloïdal, à un traceur radioactif, fluorescent ou luminescent. L'excès d'anticorps peut être éliminé par lavage. On peut ajouter ensuite, de façon connue, dans le cas où l'anticorps est couplé à un marqueur enzymatique, un substrat spécifique de l'enzyme conjuguée à l'anticorps, substrat qui se transforme, dans des

conditions fixées, en un produit coloré. La formation dudit composé coloré indique la présence de la PrP et permet son identification ainsi que sa quantification.

La détection et/ou l'identification et/ou la quantification des PrP fixées sur la (ou les) forme(s) de β2GPI peuvent se faire par tout moyen connu utilisant la détection et/ou l'identification et/ou la quantification par des procédés d'infection de cellules ou d'organismes susceptibles à l'infection par des PrP, tel que décrit dans "Fields Virology", Third Edition, Lippincott - Raven Publishers, 1996, ou "Virology Methods Manual", édité par Mahy B., Kangro H., Academic Press, 1996.

Selon un deuxième mode de mise en œuvre de l'invention, dans le cas où l'on fixe le complexe sur un support, on retient le complexe PrP/β2GPI sur le support par l'intermédiaire de la partie PrP dudit complexe ; ensuite, on détecte la partie β2GPI dudit complexe par tout moyen approprié, avantageusement à l'aide d'anticorps spécifiques de la β2GPI, conjugués notamment à un marqueur enzymatique, à de l'or colloïdal, à un traceur radioactif, fluorescent ou luminescent. La présence native ou le rajout de détergent(s) et/ou de lipide(s) peut aider la fixation de ces anticorps. La fixation de la PrP sur le support peut être réalisée, avant ou après la formation du complexe, dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment pour la fixation de β2GPI sur le support, et la fixation de la β2GPI sur la PrP pour former le complexe peut être réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment pour fixer la PrP sur la β2GPI.

Dans une première variante des deux modes de mise en œuvre précités, on retient indirectement le complexe PrP/β2GPI par l'intermédiaire de la partie β2GPI du complexe, en munissant le support d'un composé se liant à ladite partie de la β2GPI ; ensuite la partie PrP du complexe est détectée comme ci-dessus décrit. Le composé se liant à la β2GPI peut être, par exemple, un anticorps reconnaissant la β2GPI ou une autre protéine, par exemple d'origine virale ou cellulaire, procaryote ou eucaryote, ou un composé biologique, par exemple un acide gras ou un lipide, ou un composé chimique, par exemple le dextran sulfate, l'héparine sulfate ou un détergent, tel que celui connu sous le nom commercial "TRITON X 100".

Dans une deuxième variante, on retient indirectement le complexe PrP/β2GPI par l'intermédiaire de la partie PrP dudit complexe en munissant le support d'un composé se liant à ladite partie PrP du complexe; ensuite on détecte et/ou identifie et/ou quantifie la partie β2GPI dudit complexe comme décrit ci-dessus. Le composé se liant à la PrP peut être, par exemple, un anticorps reconnaissant la PrP ou une autre protéine, par exemple d'origine virale ou cellulaire, procaryote ou eucaryote, ou un composé biologique, par exemple un acide gras ou un lipide, ou un composé chimique, par exemple le dextran sulfate, l'héparine sulfate ou un détergent, tel que celui connu sous le nom commercial "TRITON X 100".

Dans ces deux variantes, la fixation indirecte de la (ou des) forme(s) de β2GPI ou de la (ou des) PrP sur le support par l'intermédiaire d'un composé peut être effectuée, après ou avant la formation du complexe, dans des conditions similaires à celles décrites dans le cas d'une fixation directe.

Selon une autre mise en œuvre de l'invention, on utilise la (ou les) forme(s) de β2GPI naturellement présente(s) dans un matériau biologique. Dans ce cas, on se propose de détecter et/ou d'identifier et/ou de quantifier des PrP lorsque ces PrP sont en quantité telle, par rapport à la β2GPI naturellement présente dans le matériau biologique, qu'elles sont majoritairement complexées ou complexables à au moins une des formes de β2GPI naturellement présentes. Dans ce cas, les formes de β2GPI comprennent toutes formes de β2GPI animale ou humaine naturellement présentes dans le matériau biologique. Le complexe naturellement formé dans le matériau biologique peut alors être fixé sur un support, directement ou indirectement, soit par sa partie PrP, soit par sa partie β2GPI, la détection et/ou identification et/ou quantification du complexe étant réalisée par la partie du complexe non liée directement ou indirectement au support. Ce procédé peut permettre de détecter éventuellement un état initial de la pathologie, alors que le procédé selon la première mise en œuvre est plus approprié à l'étude d'un état de pathologie déclarée correspondant.

La description donnée ci-après, à titre d'exemples purement illustratifs et non limitatifs, permettra de mieux comprendre l'invention. Les exemples sont décrits en se référant au dessin annexé sur lequel :

- la figure 1 représente les résultats obtenus dans l'exemple 1 ;
- la figure 2 représente les résultats obtenus dans l'exemple 2 ; et
- la figure 3 représente les résultats obtenus dans l'exemple 4.

## Obtention des formes de β2GPI

On utilise, comme matière première de départ, un plasma ou un sérum d'origine humaine ou animale ou une protéine recombinante. Le plasma ou sérum animal est d'origine soit bovine, soit porcine, soit ovine.

La purification des formes de β2GPI est réalisée soit selon le procédé décrit dans le brevet français 2 701 263 soit selon des procédés déjà décrits dans la littérature, notamment "Gambino R, Ruiu G, Pagano G, Cassader M. Chem Phys Lipids, 1999 ; 103(1-2) : 161-74", "Regnault V, Arvieux J, Vallar L, Lecompte T. J Immunol Methods, 1998 ; 211(1-2):191-7", "Klaerke DA, Rojkjaer R, Christensen L, Schousboe I. Biochim Biophys Acta, 1997 ; 1339(2) : 203-16", "Cai G, Guo Y, Shi J. Protein Expr Purif, 1996 ; 8(3) : 341-6", "Gambino R, Ruiu G, Cassader M, Pagano G. J Lipid Res, 1996 ; 37(4) : 902-4", "Williams SC, Sim RB. J Immunol Methods, 1993 ; 157(1-2) : 25-30", "McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Proc Natl Acad Sci U S A 1990 ; 87(11) : 4120-4", "Lozier J, Takahashi N, Putnam FW. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984 ; 81(12) : 3640-4", ou "Lambin P, Burstein M. Biochimie, 1982;64(11-12) : 1065-71".

La séquence des 20 premiers acides aminés de la région N-terminale des formes de β2GPI obtenues après purification ou après purification et fragmentation en polypeptides à l'aide d'enzymes protéolytiques a été déterminée par microséquençage à l'aide d'un appareil "Applied Biosystems Inc, modèle 470" couplé à un analyseur de phénylrhéohydantoïne modèle 120 A (ABI). Les séquences obtenues correspondent avec celles décrites dans la littérature et trouvées dans les banques de données.

Pour des raisons de commodité les formes de β2GPI seront ci-après désignées par :

- **β2GPI N** : β2GPI native dont la séquence correspond à celle publiée par "T. KRISTENSEN et coll., FEBS Letters, Vol. 289, 1991, pages 183-186",

- **β'2GPI** : β2GPI dont la séquence a été donnée dans le brevet français 2 701 263. Cette forme de β2GPI porte la substitution Thr318Ser ;
- **β'2GPI carb.** : β'2GPI dont les résidus lysine ont été modifiés par carbamylation avec du cyanate de potassium à pH 5,8 pendant 4 heures à 37°C selon le procédé décrit par Means GE et Feeney RE, dans "Chemical modification of proteins, Holden-Day Inc, San Francisco, 1971: 215-216" ;
- **β2GPI Bov** : β2GPI purifiée à partir de sérum bovin ;
- **β2GPI Por** : β2GPI purifiée à partir de plasma de porc ;
- **β2GPI Rec** : β2GPI recombinante produite chez des cellules d'insectes après infection avec du baculovirus servant de vecteur du gène de la β2GPI N ;
- **β2GPI Pep1** : peptide correspondant à la séquence CKNEKKC de la β2GPI et obtenu par synthèse chimique. Les deux cystéines sont reliées par un pont disulfure ;
- **β2GPI Pep2** : peptide correspondant à la séquence CKNEKKC de la β2GPI et obtenu par synthèse chimique. Les deux cystéines sont libres.

## EXEMPLE 1

Des préparations tissulaires d'animaux infectés par l'agent de l'encéphalite spongiforme bovine (ESB) ont été réalisées comme décrit dans "Maignien T. et coll., Journal of General Virology, 1999, 80 : 3035-3042".

La $PrP^{SC}$ (protéine du prion responsable de la transmission de l'encéphalite spongiforme) a été purifiée, selon la référence précédente, par centrifugation en présence de détergents, après digestion par la protéinase K. Lors de ce traitement, la $PrP^{C}$ est détruite par la protéinase K et le(s) détergent(s). Les échantillons purifiés ont par la suite été séparés sur un gel d'éléctrophorèse à 12% de polyacrylamide, en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS), puis transférés sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuell). La membrane a ensuite été saturée avec de l'albumine bovine à 2%, pendant 1 heure à température ambiante puis découpée en plusieurs bandelettes.

De la β'2GPI, β2GPI N, β2GPI carb. et β'2GPI Rec, couplées à de la phosphatase alcaline, ont été déposées sur ces bandelettes (essais 1, 3, 5, 7 respectivement) et, à titre de comparaison,

sur des bandelettes obtenues à partir de préparations tissulaires d'animaux non-infectés par l'agent de l'encéphalite spongiforme bovine (ESB) (essais 2, 4, 6, 8 respectivement).

L'expérience montrée par la figure 1 a été réalisée comme suit : les bandelettes ont été rincées trois fois avec du tampon acétate 50 mM, pH 5,6, Triton X100 0,05%. Un millilitre à 1 µg/ml des différentes formes de β2GPI, dans du tampon acétate 50 mM, pH 5,6, gélatine 0,1%, Triton X 100 0,5%, a été ajouté sur chaque bandelette. Après une incubation d'une heure à température ambiante et sous agitation, les bandelettes ont été lavées 6 fois avec du PBS (tampon phosphate salin) contenant 0,05% de Triton X 100. La révélation des formes de β2GPI fixées a été réalisée avec un mélange liquide de substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate / nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT).

La figure 1 montre qu'avec les différentes formes de β2GPI, il est possible de détecter les $PrP^{SC}$ dans le cas d'animaux infectés par l'agent de l'encéphalite spongiforme bovine (ESB).

**EXEMPLE 2**

De la protéine bovine recombinante PrP a été obtenue de la Société "Prionics". Le support solide utilisé est une plaque de microtitration de type "C8 Starwell Maxisorp" à 96 puits et à fond plat, commercialisée par la société "NUNC". L'expérience de fixation sur support solide sur lequel une des formes de β2GPI a été fixée a été réalisée comme suit. La PrP bovine recombinante a été utilisée sur une gamme de concentrations allant de 0 à 2000 ng/puits. La dilution est effectuée à l'aide d'un tampon (Tris/HCl) ayant une concentration en Tris de 0,05 mole/l et un pH de 7,6 ± 0,05. On dépose 100 µl de solution au fond de chaque puits de la plaque. La plaque est incubée à +37°C pendant une période de 90 minutes. Après cette incubation, on effectue un lavage en introduisant 300 µl de tampon phosphate dans chaque puits, on laisse en contact pendant 2 minutes et on aspire la solution de tampon ; on renouvelle cette opération de lavage 4 fois.

La révélation de la PrP fixée sur les différentes formes de β2GPI a été effectuée en utilisant une solution d'anticorps monoclonal 6H4, obtenue de la Société "Prionics". Cet anticorps monoclonal 6H4 est spécifique à la PrP.

On ajoute par puits 100 µl d'une solution d'anticorps monoclonal 6H4 dilué 5000 fois en tampon phosphate salin (PBS). On laisse la plaque incuber à 37°C pendant 60 minutes. A la suite de cette incubation, le contenu des puits de la plaque est aspiré. On introduit 300 µl de tampon phosphate dans chaque puits et après un temps de contact de 2 minutes, on aspire le tampon : cette opération de lavage est renouvelée 4 fois.

On ajoute par puits 100 µl d'une solution d'anticorps de lapin spécifique des IgG de souris, conjugué à la péroxidase. On laisse la plaque incuber à 37°C pendant 60 minutes. A la suite de cette incubation, le contenu des puits de la plaque est aspiré. On introduit 300 µl de tampon phosphate dans chaque puits et après un temps de contact de 2 minutes, on aspire le tampon : cette opération de lavage est renouvelée 6 fois.

On ajoute par puits 100 µl d'une solution d'o-phénylène-diamine, 2HCl dans un tampon citrate de sodium. On laisse incuber pendant 30 minutes à température ambiante, puis on arrête la réaction en rajoutant à chaque puits 50 µl de $H_2SO_4$, 2N. On mesure l'absorbance à 492 nm obtenue en fin de réaction à l'aide d'un robot lecteur de plaque.

Le tableau 1 et la figure 2 correspondante montrent que la PrP recombinante, dont la séquence est celle des deux formes de protéine prion $PrP^C$ et $PrP^{SC}$, peut être détectée avec les différentes formes de β2GPI. Le contrôle positif est de la PrP recombinante fixée sur support solide aux différentes concentrations notées dans le tableau 1 puis révélée avec la solution d'anticorps monoclonal 6H4. La BSA (albumine sérique bovine) sert de contrôle négatif démontrant que la liaison est spécifique aux formes de β2GPI.

TABLEAU 1

Valeurs de densité optique (UDO x 1000)

| Concentration PrP ng/puits | β'2GPI | β2GPI Bov. | β2GPI Por. | β2GPI Pep1 | β2GPI Pep2 | Témoin Positif | BSA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2000 | 3500 | 3500 | 3500 | 3500 | 3500 | 3500 | 42 |
| 1000 | 3500 | 3500 | 3500 | 3500 | 3500 | 3500 | 42 |
| 500 | 3458 | 3458 | 3458 | 3458 | 3458 | 3458 | 42 |
| 250 | 3648 | 3648 | 3648 | 3648 | 3648 | 3648 | 43 |
| 125 | 3521 | 3521 | 3521 | 3521 | 3521 | 3521 | 43 |
| 62.5 | 3542 | 3542 | 3542 | 3542 | 3542 | 3542 | 42 |
| 31.25 | 3215 | 3215 | 2915 | 2904 | 3215 | 3215 | 45 |
| 15.62 | 2985 | 3060 | 2650 | 2558 | 2965 | 2965 | 42 |
| 7.812 | 2315 | 2580 | 2310 | 2214 | 2212 | 2105 | 43 |
| 3.91 | 1856 | 1896 | 1782 | 1695 | 1746 | 1500 | 44 |
| 1.95 | 798 | 1005 | 698 | 649 | 956 | 785 | 43 |
| 0.98 | 463 | 564 | 369 | 322 | 452 | 256 | 42 |
| 0.49 | 286 | 365 | 195 | 188 | 298 | 185 | 42 |

## EXEMPLE 3

De la protéine bovine recombinante PrP, identique à celle utilisée dans l'exemple 2, a été ajoutée dans du sérum humain.

Le support solide utilisé est une plaque de microtitration de type "C8 Starwell Maxisorp" à 96 puits et à fond plat, commercialisée par la société "NUNC". Diverses solutions de composés ont été fixées sur le support, à savoir une solution de protéines recombinantes p26-HIV2 ROD reconnaissant la β2GPI, des anticorps monoclonaux reconnaissant la β2GPI, du dextran sulfate, de l'héparine sulfate reconnaissant la protéine prion PrP ainsi que la β2GPI, et des anticorps monoclonaux reconnaissant la protéine prion PrP. La β2GPI utilisée dans cet exemple est la β2'GPI. Le sérum contenant la PrP bovine recombinante a été dilué 50 fois. La dilution est effectuée à l'aide d'un tampon (Tris/HCl) ayant une concentration en Tris de 0,05 mole/l et un pH de 7,6 ± 0,05. On dépose 100 µl de solution au fond de chaque puits de la plaque. La plaque est incubée à +37°C pendant une période de 90 minutes. Après cette incubation, on effectue un lavage en introduisant 300 µl de tampon phosphate dans chaque puits, on laisse en contact pendant 2 minutes et on aspire la solution de tampon ; on renouvelle cette opération de lavage 4 fois.

La révélation de la partie PrP du complexe a été effectuée en utilisant une solution d'anticorps monoclonal 6H4, obtenue de la Société "Prionics". La révélation de la partie β2GPI du complexe a été effectuée en utilisant une solution d'anticorps monoclonal 8C3.

On ajoute par puits 100 µl d'une solution d'anticorps monoclonal 6H4 ou 8C3 dilué 5000 fois en tampon phosphate salin (PBS). On laisse la plaque incuber à 37°C pendant 60 minutes. A la suite de cette incubation, le contenu des puits de la plaque est aspiré. On introduit 300 µl de tampon phosphate dans chaque puits et après un temps de contact de 2 minutes, on aspire le tampon : cette opération de lavage est renouvelée 4 fois.

On ajoute par puits 100 µl d'une solution d'anticorps monoclonal de souris spécifique des IgG de souris conjugué à la péroxidase. On laisse la plaque incuber à 37°C pendant 60 minutes. A la suite de cette incubation, le contenu des puits de la plaque est aspiré. On introduit 300 µl de tampon phosphate dans chaque puits et après un temps de contact de 2 minutes, on aspire le tampon : cette opération de lavage est renouvelée 6 fois.

On ajoute par puits 100 µl d'une solution d'o-phénylène-diamine, 2HCl dans un tampon citrate de sodium. On laisse incuber pendant 30 minutes à température ambiante, puis on arrête la réaction en rajoutant dans chaque puits 50 µl de $H_2SO_4$, 2N. On mesure l'absorbance à 492 nm obtenue en fin de réaction à l'aide d'un robot lecteur de plaque.

La moyenne des absorbances obtenues pour chaque solution de composé fixée sur le support est donnée par le tableau 2 (en unités de densité optique multipliées par 1000). Les résultats du tableau 2 démontrent que le complexe PrP/β2GPI peut être détecté selon le mode de la présente invention, et, en particulier, que la PrP recombinante peut être détectée.

TABLEAU 2

Valeurs de densité optique (UDO x 1000)

| Composé fixé sur le support | Révélation de la partie β2GPI du complexe | Révélation de la partie PrP du complexe |
|---|---|---|
| Héparine sulfate | 1896 | 1756 |
| P26-HIV2 ROD | - | 1615 |
| Dextran sulfate | 1752 | 1459 |
| Anticorps anti-β2GPI(1) | - | 1763 |
| Anticorps anti-$PrP^{SC}$ (2) | 1862 | - |

(1) anticorps monoclonaux 8C3
(2) anticorps monoclonaux 6H4

**EXEMPLE 4**

Les protéines d'un sérum provenant d'un sujet sain ont été séparées sur un gel d'électrophorèse à 12 % de polyacrylamide, en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS), puis transférées sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuell). La membrane a été saturée avec du lait écrémé à 2 % en PBS (tampon phosphate salin), pendant 1 heure à température ambiante puis découpée en plusieurs bandelettes. De la protéine bovine recombinante PrP, identique à celle utilisée dans l'exemple 2, a été déposée de la manière suivante sur des bandelettes numérotées de 1 à 5 :

- 1 µg de protéine bovine recombinante PrP, dans du PBS, a été déposé sur la bandelette 1 ;
- 1 µg de protéine bovine recombinante PrP, dans du Tris 0,05 mole/l, pH 7,6, NaCl 0,15 mole/l, a été déposé sur les bandelettes 2 et 5 ;
- 1 µg de protéine bovine recombinante PrP, dans du Tris 0,05 mole/l, pH 7,6, NaCl 0,15 mole/l, lysine 0,1 mole/l, a été déposé sur la bandelette 4 ;
- 1 µg de protéine bovine recombinante PrP, dans du Tris 0,05 mole/l, pH 7,6, NaCl 0,15 mole/l, a été déposé sur la bandelette 3, qui avait au préalable été préincubée pendant 1 heure avec un anticorps monoclonal, le 8C3, dirigé contre la β2GPI.

Après 1 heure d'incubation, sous agitation et à température ambiante, les bandelettes 1 à 5 ont été rincées 4 fois avec du PBS. Une solution d'anticorps monoclonal 6H4, dirigé contre la PrP, diluée 5 000 fois en tampon Tris HCl 0,05 mole/l, pH 7,6, NaCl 0,15 mole/l, gélatine 0,2 %, Tween 20 0,05 %, a été ajoutée aux bandelettes.

Une solution d'anticorps monoclonal 8C3 dirigé contre la β2GPI, contenant 1 µg d'anticorps/ml en tampon Tris HCl 0,05 ml/l, pH 7,6, NaCl 0,15 mole/l, gélatine 0,2 %, Tween 20 0,05 %, a été ajoutée sur une bandelette 6.

Après 1 heure d'incubation, sous agitation et à température ambiante, les bandelettes 1 à 6 ont été rincées quatre fois avec du PBS.

Finalement, les bandelettes 1 à 6, ainsi qu'une bandelette 7 destinée à servir de témoin négatif, ont été incubées pendant 1 heure, à température ambiante et sous agitation, en présence d'une solution d'anticorps de lapin couplés à la phosphatase alcaline et dirigés contre les anticorps de souris, dans du tampon Tris HCl 0,05 mole/l, pH 7,6, NaCl 0,2 mole/l, gélatine 0,2 %, Tween 20 0,05 %, puis rincées 6 fois avec du tampon PBS contenant 0,05 % de Tween 20. La révélation des anticorps a été réalisée avec un mélange liquide de substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT). Les résultats obtenus sont présentés à la figure 3.

La bandelette 6 de la figure 3 montre l'emplacement de la β2GPI N avec une grosse tache au niveau des monomères et des taches plus faibles au niveau des dimères et polymères.

Les bandelettes 1, 2 et 5 montrent les protéines sériques liant la PrP recombinante. Ces protéines sont situées au même niveau que celles reconnues par l'anticorps monoclonal dirigé contre la β2GPI.

La bandelette 3 montre que les protéines liant la PrP recombinante sont celles qui sont reconnues par l'anticorps monoclonal dirigé contre la β2GPI (absence de signal après blocage de ces protéines).

Cette expérience montre que, parmi les protéines sériques, la β2GPI N reconnaît et fixe la PrP recombinante.

# REVENDICATIONS

1. Procédé de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification dans un matériau biologique d'au moins une protéine prion (PrP), caractérisé par le fait qu'il comprend une étape de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification d'un complexe (PrP/β2GPI) formé d'au moins une protéine prion liée à au moins une forme de β2-glycoprotéine I (β2GPI).

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il comprend une étape de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification d'un complexe ($PrP^{SC}$/β2GPI) formé d'au moins une protéine prion anormale ($PrP^{SC}$) liée à au moins une forme de β2GPI, ledit procédé constituant un procédé de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification dans un matériau biologique d'au moins une protéine prion anormale.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé par le fait que, pour former un complexe ($PrP^{SC}$/β2GPI), on utilise au moins une protéine prion anormale ($PrP^{SC}$) provenant de la tremblante du mouton ou de la chèvre, de l'encéphalopathie bovine, de la maladie du dépérissement chronique des ruminants sauvages, des encéphalopathies des visons ou des chats, de la maladie de Creutzfeld-Jacob (MJC), du syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS), du kuru ou de l'insomnie familiale fatale.

4. Procédé selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisé par le fait que, préalablement à l'étape de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification du complexe ($PrP^{SC}$/β2GPI), on soumet le matériau biologique à l'action de détergents et/ou d'enzymes.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé par le fait que, préalablement à l'étape de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification du complexe ($PrP^{SC}$/β2GPI), on soumet le matériau biologique à l'action de la protéinase K.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé par le fait que l'on utilise, pour former un complexe (PrP/β2GPI), au moins une β2GPI d'origine humaine, ou d'origine animale, une β2GPI recombinante, ou une β2GPI obtenue par synthèse chimique ou une forme modifiée de β2GPI.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé par le fait que l'on réalise une étape de fixation de PrP contenue dans un matériau biologique à au moins une forme de β2GPI intentionnellement rajoutée audit matériau biologique pour former ledit complexe, suivie d'une étape de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification du complexe (PrP/β2GPI).

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé par le fait que l'on réalise :

- une étape de fixation sur un support, d'au moins une forme de β2GPI ou de ladite (ou desdites) PrP, avant ou après l'étape de fixation de ladite (ou desdites) PrP à ladite (ou auxdites) forme(s) de β2GPI pour former ledit complexe,
- une étape de séparation consistant à séparer le matériau biologique du support, sur lequel est fixé le complexe,
- une étape de détection et/ou d'identification et/ou de quantification consistant, après ladite étape de séparation, à détecter et/ou à identifier et/ou à quantifier le complexe fixé au support par sa partie, qui n'est pas liée au support.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé par le fait que l'on utilise, comme support, un support solide.

10. Procédé selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisé par le fait que l'on effectue la fixation sur le support par l'intermédiaire d'un composé se liant à l'une des parties PrP ou β2GPI du complexe, ladite étape de détection et/ou d'identification et/ou de quantification consistant à détecter et/ou à identifier et/ou à quantifier le complexe par sa partie, qui n'est pas liée au support.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé par le fait que le composé se liant à la β2GPI ou à la PrP est un anticorps reconnaissant respectivement la β2GPI ou la PrP, ou bien une autre protéine, un composé biologique, un composé chimique ou un détergent se fixant à la PrP ou à la β2GPI.

12. Procédé selon l'une des revendications 8 à 11, caractérisé par le fait que l'on réalise :

- l'étape de fixation d'au moins une forme de β2GPI ou de la (ou des) PrP sur un support, par réaction de groupes réactifs de la (ou des) forme(s) de β2GPI ou de la (ou des) PrP avec des sites réactifs du

support, ladite (ou lesdites) forme(s) étant mise(s) en solution dans un tampon ayant un pH compris entre 2,5 et 10,5, de préférence entre 5,5 et 7,5, pour obtenir une solution ayant une concentration comprise entre 0,01 et 100g/l de forme(s) de β2GPI ou de PrP, le support étant maintenu en contact avec la solution à une température comprise entre 0° et 40°C pendant un temps d'incubation compris entre 10 secondes et 24 heures, puis

- la séparation du support et de la solution par lavage du support.

13. Procédé selon l'une des revendications 7 à 12, caractérisé par le fait que l'étape de fixation d'au moins une PrP à au moins une forme de β2GPI pour former un complexe est réalisée par mise en contact d'au moins une forme de β2GPI, avec le matériau biologique susceptible de contenir des PrP à une température comprise entre 0° et 50°C, avantageusement voisine de 37°C, pendant une période de temps comprise entre 10 secondes et 24 heures, le matériau biologique étant dilué à l'aide d'un tampon donnant un pH compris entre 3,5 et 10, de préférence compris entre 5,6 et 7,6.

14. Procédé selon l'une des revendications 7 à 13, caractérisé par le fait que l'on effectue la détection et/ou l'identification et/ou la quantification de la (ou des) PrP du complexe par des anticorps spécifiques de la (ou des) PrP, ou par des procédés d'infection de cellules ou d'organismes susceptibles à l'infection des PrP.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé par le fait que l'on effectue la détection et/ou l'identification et/ou la quantification de la (ou des) PrP du complexe par un anticorps reconnaissant spécifiquement un antigène, de préférence de nature protéique, de la (ou des) PrP.

16. Procédé selon l'une des revendications 7 à 13, caractérisé par le fait que l'on effectue la détection et/ou l'identification et/ou la quantification de la β2GPI du complexe par des anticorps spécifiques de la β2GPI.

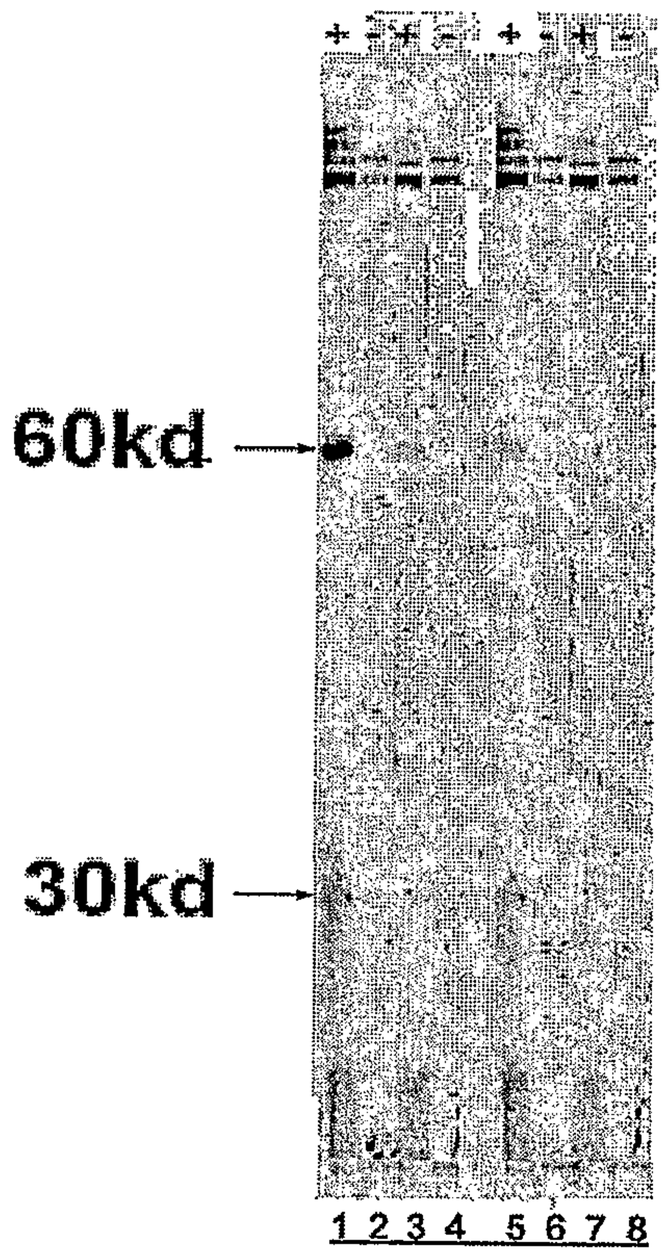
17. Procédé selon l'une des revendications 14 à 16, caractérisé par le fait que l'on couple l'anticorps à un marqueur enzymatique, à de l'or colloïdal, à un traceur radioactif, fluorescent ou luminescent.

18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé par le fait que l'on couple l'anticorps à un marqueur enzymatique, dont l'enzyme est mise en contact à un substrat spécifique apte à se transformer en un produit coloré.

19. Procédé selon l'une des revendications 8 à 15, caractérisé par le fait que l'on fixe le complexe au support par l'intermédiaire de sa partie β2GPI, l'étape de séparation comprenant l'isolement de la PrP du complexe fixé au support par un procédé d'élution de chromatographie d'affinité.

20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé par le fait que ledit isolement est réalisé par élution de la PrP fixée au support solide à l'aide d'un tampon ayant un pH compris entre 2 et 10,5, une concentration en NaCl comprise entre 0 et 5M, de préférence à l'aide d'un tampon glycine-HCl 0,1 mole/litre ayant un pH de 2,5.

21. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification d'au moins une PrP dans un matériau biologique qui contient naturellement au moins une forme de β2GPI, caractérisé par le fait qu'il comprend une étape de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification d'un complexe (PrP/β2GPI) formé d'au moins une PrP liée à au moins une forme de β2GPI naturellement présente dans ledit matériau.




- 1, 2: β'2GPI,
- 3, 4: β2GPI N,
- 5, 6: β2GPI carb.,
- 7, 8: β'2GPI Rec

FIGURE 1

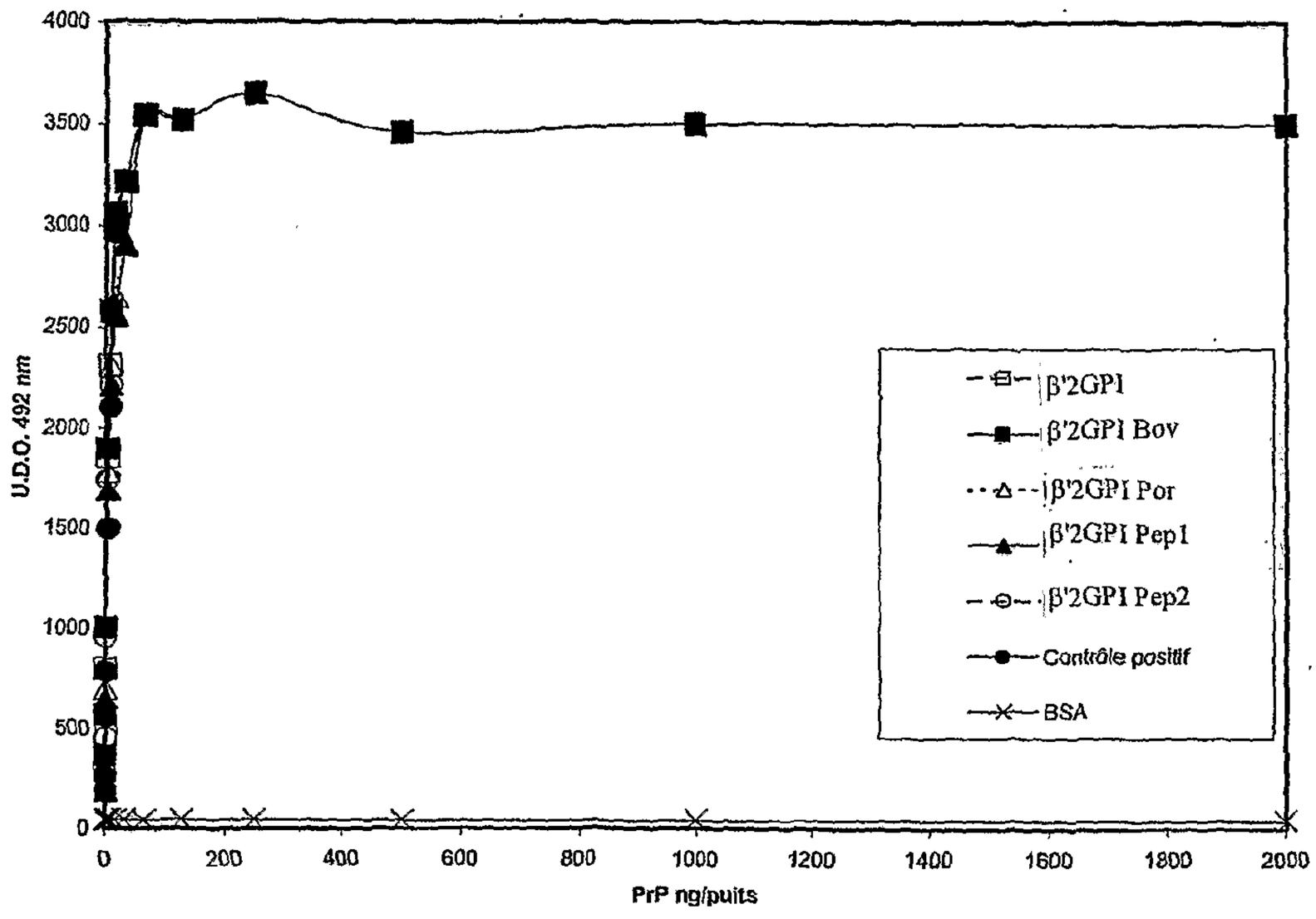
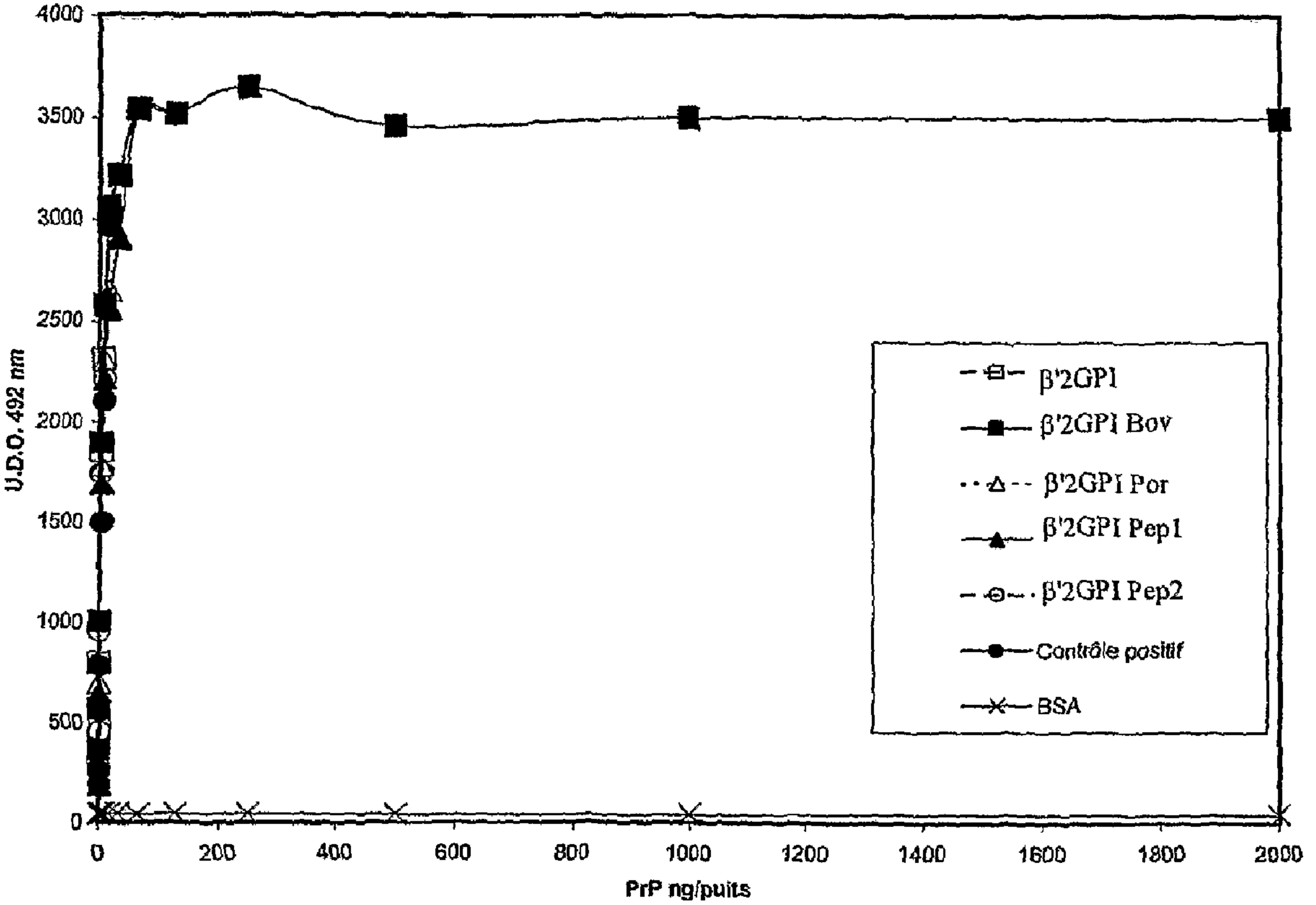



FIGURE 2




**FIGURE 3**


4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
D.O. 492 nm
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
PrP ng/puits
β'2GPI
β'2GPI Bov
β'2GPI Por
β'2GPI Pep1
β'2GPI Pep2
Contrôle positif
BSA