



NUMERO DE PUBLICATION : 1003316A5

NUMERO DE DEPOT : 9001128

Classif. Internat.: C12P G01N

MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

Date de délivrance : 25 Février 1992

Le Ministre des Affaires Economiques,

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

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

Vu le procès verbal dressé le 27 Novembre 1990 à 15h05
à l' Office de la Propriété Industrielle

ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : L.F. WILL & CIE S A.
rue Joseph Stallaert 2, 1060 BRUXELLES(BELGIQUE)

représenté(e)(s) par : PLUCKER Guy, OFFICE KIRKPATRICK, Square de Meeus, 4
- B 1040 BRUXELLES.

un brevet d' invention d' une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : ANTICORPS MONOCLONAL UTILE POUR LE DIAGNOSTIC DE LA MALADIE D'ALZHEIMER, HYBRIDOME SECRETEUR D'UN TEL ANTICORPS MONOCLONAL ET PROCEDE POUR SA PREPARATION.

INVENTEUR(S) : Octave Jean-Noël, chaussée de Louvain 418, B-1380 Ohain (BE), Maloteaux Jean-Marie, chaussée de Bruxelles 633, B-6310 Les Bons Villers (BE)

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

Bruxelles, le 25 Février 1992
PAR DELEGATION SPECIALE :

WUYTS L
Directeur

Anticorps monoclonal utile pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer, hybridome sécréteur d'un tel anticorps monoclonal et procédé pour sa préparation.

L'invention concerne un anticorps monoclonal dirigé contre une partie du domaine extracellulaire du précurseur du peptide amyloïde, et son utilisation pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

5 L'invention concerne également l'hybridome capable de produire un tel anticorps ainsi qu'un procédé pour la préparation de cet hybridome.

La maladie d'Alzheimer est responsable de plus de la moitié des cas de démence sénile. Selon certaines
10 statistiques, on estime actuellement que 10 à 15% de la population âgée de plus de 65 ans et 20 à 40% de la population âgée de plus de 80 ans sont atteints de la maladie d'Alzheimer.

Les symptômes de la maladie d'Alzheimer sont des
15 troubles de la mémoire et une diminution progressive des capacités intellectuelles.

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par la perte de neurones et la présence de lésions cérébrales. Ces lésions consistent d'une part en des dépôts extracellulaires
20 de substance amyloïde présents sous forme de plaques séniles et de dépôts cérébro-vasculaires. D'autre part, il existe des altérations neurofibrillaires qui conduisent à la formation de lésions intraneuronales.

De nombreux travaux ont été réalisés pour mieux
25 comprendre le mécanisme de formation des lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.

A partir des plaques séniles, un peptide de 42 acides aminés a été isolé et appelé peptide A4 (C.L. Masters & Al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4245-4249 (1985))

30 A partir des dépôts cérébrovasculaires, un petit peptide très proche du peptide A4 a été isolé et appelé peptide β (G. Glenner & Al., Bioch. Bioph. Res. Com. 120:885-890 (1984)). Actuellement, on préfère regrouper ces

deux appellations sous le terme A β P (Amyloid β Peptide).

A l'aide d'une sonde moléculaire (sonde ADN_c), les ARN messagers correspondant au précurseur du peptide A β P ont été découverts et séquencés.

5 Le précurseur du peptide A β P une glycoprotéine transmembranaire, est appelé APP (Amyloid Peptide Precursor). Jusqu'à présent 4 versions différentes de ce précurseur ont été découvertes, elles comprennent respectivement 695 acides aminés (J. Kang & Al., Nature 325,
10 733-736 (1987), 751 acides aminés (P. Ponte & Al., Nature 331, 525-527 (1988); R. Tanzi & Al., Nature 331, 528-530 (1988), 770 acides aminés (N. Kitaguchi & Al., Nature 331, 530-532 (1988) et 563 acides aminés (F. de Sauvage & Al., Science 245, 651-653 (1989)).

15 Le gène correspondant à ces 4 précurseurs est situé sur le chromosome 21.

 Le précurseur APP est aussi présent sous forme soluble dans le liquide céphalo-rachidien d'individus normaux et de patients atteints de la maladie d'Alzheimer.
20 Cette protéine soluble comprend le domaine extra-cellulaire du précurseur (fragment N-terminal) et a perdu le domaine transmembranaire et le domaine cytoplasmique (fragment C-terminal).

 En effet des anticorps dirigés contre le
25 précurseur APP 695 ont reconnu la forme soluble de l'APP alors que des anticorps dirigés contre le domaine cytoplasmique (fragment C-terminal de 43 acides aminés) n'ont pas reconnu la forme soluble de l'APP. (Weideman & Al., Cell. 57, 115-126 (1989)).

30 Les altérations neurofibrillaires, situées à l'intérieur des neurones se composent de filaments hélicoïdaux appariés deux à deux de manière caractéristique.

 En réalité le diagnostic n'est pas facile à établir, d'abord parce qu'il existe des affections qui
35 ressemblent à la maladie d'Alzheimer (démences vasculaires, syndromes dépressifs du sujet âgé), ensuite parce qu'il n'existe pas encore de test diagnostique spécifique qui soit

ante-mortem.

Jusqu'à présent, différentes voies de diagnostic sont ouvertes :

l'étude des fonctions intellectuelles supérieures
5 mettant en oeuvre des techniques de neuropsychologie, représente une première approche diagnostique.

Le scanner cérébral permet de visualiser l'atrophie du cortex cérébral et d'éliminer certaines autres affections, en particulier des affections curables.

10 La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) en tant que nouvelle technique d'imagerie permet une meilleure visualisation des petites lésions cérébrales vasculaires et peut améliorer le diagnostic différentiel entre démence vasculaire et maladie d'Alzheimer. Ces deux dernières
15 techniques réalisent en fait un diagnostic d'exclusion.

La caméra à positrons permet l'étude du métabolisme du cerveau en analysant la consommation cérébrale en glucose. Différentes recherches ont montré qu'au cours de la maladie d'Alzheimer, la consommation en
20 glucose est réduite, et ont pu localiser les zones préférentiellement atteintes. Bien qu'apportant de précieuses informations, cette technique ne constitue pas encore un moyen de diagnostic réel.

Actuellement, le seul diagnostic sûr est
25 l'analyse microscopique, post-mortem, du tissu cérébral, mettant en évidence la présence de dépôts de substance amyloïde.

Des recherches antérieures ont montré que les altérations neurofibrillaires étaient reconnues par des
30 anticorps préparés contre certaines protéines cérébrales normales (telles que la protéine MAP2 (K. Kosik & Al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7941-7945 (1984)) ou la protéine Tau (J.P. Brion & Al., Arch. Biol. (Brux.), 95, 229-235 (1985)); K. Kosik & Al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83,
35 4044-4048 (1986); A. Delacourte & Al., J. Neurol. Sci., 76, 173-186 (1986)).

Par contre ces altérations neurofibrillaires

n'ont jusqu'ici jamais été reconnues par des anticorps préparés contre le précurseur APP. Ceux-ci n'ont réussi qu'à reconnaître les neurites dégénérés qui entourent le dépôt amyloïde des plaques séniles.

5 La présente invention a pour but de préparer un anticorps monoclonal qui permette tant le diagnostic post-mortem de la maladie d'Alzheimer, en mettant en évidence à la fois les altérations neurofibrillaires et les plaques séniles, que le diagnostic ante-mortem (dosage de
10 la forme soluble de l'APP dans le liquide céphalo-rachidien et détection des lésions caractéristiques de la maladie dans les tissus périphériques, en particulier dans la muqueuse olfactive).

 La présente invention a pour objet un anticorps
15 monoclonal dirigé contre la séquence d'acides aminés 81 à 406 de la partie extracellulaire du précurseur APP. Cette séquence est commune au précurseur transmembranaire ainsi qu'à sa forme sécrétée soluble. L'anticorps monoclonal suivant l'invention est capable de reconnaître les deux
20 types de lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (plaques séniles et altérations neurofibrillaires) ainsi que la forme soluble du précurseur APP présente dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien.

 Dans une forme préférée de l'invention,
25 l'anticorps monoclonal est dirigé contre une protéine de fusion entre ladite séquence d'acides aminés 81 à 406 et la β -galactosidase. Cette protéine est obtenue par expression du fragment d'ADN_c correspondant, par des cellules d'E. Coli transformées par le vecteur d'expression Puex I. Le dit
30 fragment d'ADN_c est inséré dans le site Pst 1 de ce vecteur.

 La synthèse de la β -galactosidase, est contrôlée par un promoteur bactérien puissant qui permet l'expression en grande quantité, de ladite protéine de fusion.

 La protéine de fusion, ainsi obtenue, constitue
35 un antigène exempt de toute contamination par d'autres protéines cérébrales qui pourraient être contenues, par exemple, dans les altérations neurofibrillaires.

L'anticorps monoclonal suivant l'invention fait partie de la classe des IgM et est produit par l'hybridome déposé à l'ECACC le 20 novembre 1990 sous le numéro d'accès 90112001.

5 La présente invention a également pour objet l'utilisation de l'anticorps monoclonal sus-décrit pour la détection immunologique des altérations neurofibrillaires et des plaques séniles. Ce test immunologique peut être réalisé sur des biopsies de muqueuses olfactives ainsi que
10 sur des échantillons de tissus cérébraux prélevés, post-mortem, chez des sujets atteints de la maladie d'Alzheimer.

De plus, la présente invention a pour objet l'utilisation de ce même anticorps pour le dosage de la
15 forme soluble du précurseur APP présente dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

La présente invention a également pour objet l'hybridome déposé à l'ECACC le 20 novembre 1990 sous
20 le numéro d'accès 90112001.

L'invention a également pour objet un procédé pour la préparation de l'hybridome suivant lequel on immunise un animal, avec une protéine obtenue par expression d'un fragment d'ADN_c codant pour la séquence d'acides aminés
25 81 à 406 du précurseur APP, on réalise une fusion entre les cellules spléniques de cet animal et les cellules myélomateuses appropriées en mettant en oeuvre une technique en soi connue (Milstein et Kohler, Nature 256 (1975)), on clone les cellules hybrides résultantes et on sélectionne
30 le clone qui produit l'anticorps monoclonal désiré.

Dans une forme préférée de l'invention, la protéine utilisée pour immuniser l'animal est une protéine de fusion entre ladite séquence et la β -galactosidase et est obtenue à partir de cellules d'E. Coli transformées par
35 le vecteur d'expression Puex I. Le fragment d'ADN_c codant pour la séquence d'acides aminés 81 à 406 est inséré dans

le site Pst 1 de ce vecteur.

Des caractéristiques supplémentaires de l'invention apparaîtront encore au cours de la description détaillée d'un exemple de fabrication de l'hybridome sécréteur de l'anticorps monoclonal défini ci-dessus.

1. Préparation de l'antigène

Pour éviter toute contamination de l'antigène par d'autres protéines, la protéine antigénique n'a pas été isolée de tissus pathologiques mais a été préparée par expression génétique, après transformation de cellules bactériennes par un plasmide adéquat.

1.1 Préparation du plasmide.

Le fragment de restriction Pst 1 codant pour la séquence en acides aminés 81 à 406 du précurseur APP 770 a été inséré dans le site Pst 1 du vecteur d'expression Puex I. Le plasmide résultant codait pour une protéine de fusion consistant en la β -galactosidase suivie de la séquence extracellulaire du précurseur APP (séquence 81 à 406).

1.2. Expression de la protéine de fusion.

Des cellules d'E. Coli ont été transformées par ce plasmide et cultivées pendant 2 h à 42°C. Cette température élevée est nécessaire pour induire l'expression car le plasmide contient le répresseur thermosensible CI 857.

1.3. Extraction et purification de la protéine de fusion.

Les cellules d'E. Coli ont été collectées par centrifugation à 2000 g pendant 15 minutes. Le culot a été remis en suspension dans 20 ml de tampon contenant du Tris-HCl 50 mM de pH 8, de l'EDTA 1 mM, du NaCl 50 mM, du fluorure de phénylméthylsulfonyl 1 mM et 8 mg de lysozyme. Après 20 minutes d'incubation de la suspension sur de la glace, 4 ml d'acide désoxycholique à 1% ont été ajoutés. La solution a été incubée à 37°C pour arriver à une viscosité élevée.

L'ADN bactérien a été digéré par addition de 200 μ l d'ADNase à une concentration de 1 mg/ml et de $MgCl_2$

jusqu'à atteindre une concentration finale de 10 mM.

Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, les corps d'inclusion ont été recueillis par centrifugation à 5000 g pendant 5 minutes, puis lavés trois
5 fois dans le tampon précédemment décrit additionné de 0,5% de Triton X-100.

Après électrophorèse préparatoire sur gel d'acrylamide et coloration du gel avec du bleu Coomassie à 0,1%, la bande correspondant à la protéine de fusion a été
10 excisée. Ce fragment de gel excisé a été homogénéisé dans un volume de solution physiologique salée, tamponnée au phosphate. L'homogénat a été incubé jusqu'au lendemain pour permettre la diffusion de la protéine, et centrifugé à 12.000 g pendant 5 minutes.

15 La protéine de fusion est alors recueillie dans le surnageant.

2. Immunisation.

50 µg de la protéine de fusion diluée dans de l'adjuvant complet de Freund ont été injectés par voie
20 intrapéritonéale à des souris Balb/C aux jours 0, 7, 18, 28 et 35. 42 jours après la dernière inoculation, une réponse immunitaire a été observée dans le sérum des souris.

3. Préparation des hybridomes.

Des cellules spléniques des souris immunisées ont
25 été isolées dans 10 ml du milieu de culture DMEM de Gibco additionné de 100 U/ml de pénicilline et de 100 U/ml de streptomycine.

La solution est centrifugée à 1200 g pendant 10 minutes et le culot est lavé 2 fois avec ce même milieu de
30 culture. Les cellules spléniques ainsi récoltées, ont été colorées au bleu trypan et comptées dans une cellule de Burker.

Les cellules spléniques et des cellules de myélome (SP2) ont été mélangées dans un rapport 5/1. Le
35 mélange de cellules a été centrifugé à 2500 g pendant 5 minutes et incubé en présence de 1 ml de polyéthylène glycol 1500 (PEG) à une concentration de 0,5 g/1500 ml de tampon

HEPES 75 mM.

Après dilution progressive dans le milieu de culture DMEM précédemment décrit, les cellules ont été recueillies par centrifugation à 1200 g pendant 10 minutes puis remises en suspension dans le milieu de sélection HAT de Gibco. Ce milieu ne permet la croissance que des cellules hybrides.

La suspension a été répartie dans des plaques à 96 cupules à raison de 200 μ l de suspension par cupule. Les cellules ont été maintenues en culture sous une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂.

Après 10 jours de culture les surnageants des cupules contenaient des colonies hybrides suffisamment développées.

4. Sélection de l'hybridome produisant l'anticorps monoclonal désiré.

Les surnageants de culture des cellules hybrides ont été testés pour la production de l'anticorps monoclonal désiré par réaction immunoenzymatique (ELISA).

L'antigène de référence (dont la préparation est décrite au point 1) à une concentration de 0,5 μ g/ml dans un tampon contenant de la glycine 50 mM de pH 9,2 a été fixé sur un support solide (par exemple une plaque de microtitrage).

L'antigène a ensuite été mis à incuber à 37°C pendant 2 h avec 50 μ l du surnageant des cultures d'hybridomes.

L'anticorps monoclonal capable de reconnaître l'antigène de référence est retenu par l'antigène fixé et sa présence a été détectée à l'aide d'un anti-sérum de lapin anti IgG de souris, cet anti-sérum étant mis en évidence par la protéine A marquée à la peroxydase.

Pour cela, après incubation des cupules avec le surnageant, celles-ci sont mises à incuber à température ambiante pendant 1 h avec 50 μ l de l'anti-sérum puis avec la protéine A. Après chaque incubation les plaques sont lavées 5 fois avec une solution de NaCl 0,25 mM contenant

0,2% de Tween 20.

L'activité enzymatique de la peroxydase a été développée au moyen de 0,04% d'ortho-phénylènediamine dans de l' H_2O_2 à 0,006% puis arrêtée par addition de 25 μ l par
5 cupule d' H_2SO_4 4M.

La lecture de l'absorbance à 425 et 620 nm a permis de localiser l'hybridome producteur de l'anticorps monoclonal reconnu par l'antigène de référence.

5. Production de l'anticorps monoclonal désiré.

10 L'anticorps monoclonal désiré est produit par injection intrapéritonéale à des souris, de l'hybridome adéquat (sélectionné au point 4).

Le liquide d'ascite prélevé de ces souris contient l'anticorps monoclonal désiré à une concentration
15 élevée.

6. Caractérisation de l'anticorps monoclonal.

La technique d'immunotransfert a permis d'étudier la spécificité de l'anticorps monoclonal, premièrement, par rapport à un antigène obtenu par expression génétique et
20 deuxièmement par rapport à l'antigène isolé des tissus cérébraux.

6.1. Caractérisation de l'anticorps monoclonal par rapport à un antigène obtenu par expression génétique.

Des cellules COS (lignée de cellules rénales de
25 singe) ont été transfectées par le vecteur de transfection pKCR 3 dans lequel le fragment d'ADN_c codant pour le précurseur APP 770 avait été préalablement introduit. Les cellules COS ont été choisies pour leur capacité à exprimer une protéine glycosilée c'est à dire très proche des
30 protéines natives.

Ces cellules COS ont été mises en culture dans du milieu DMEM de Gibco contenant 5% de sérum de veau foetal, puis incubées pendant 24 h dans un milieu de culture sans sérum.

35 Ces cellules, ainsi que leur milieu de culture ont alors été analysées conjointement par la technique d'immunotransfert.

En résumé, les cellules à analyser ont été lysées dans un tampon réducteur contenant du SDS. D'autre part les protéines provenant du milieu de culture sans sérum ont été désalées par chromatographie sur une colonne de séphadex
5 G25, puis concentrées par lyophilisation et enfin solubilisées dans le même tampon que les cellules COS.

Les protéines associées aux cellules COS et les protéines provenant du milieu de culture ont alors été soumises à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en
10 conditions dénaturantes.

Les protéines ont été transférées du gel sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec fourni par Biométra.

Pour éviter la fixation non spécifique des
15 protéines, la membrane a été incubée dans une solution contenant 5% de lait écrémé avant d'être incubée une nuit avec le fluide d'ascite, dilué à 1/1000, contenant l'anticorps monoclonal obtenu au point 5.

La réaction antigène-anticorps est décelée par
20 incubation de la membrane avec un deuxième anticorps anti-souris biotinylé produit chez la chèvre puis avec le complexe streptodivine-phosphatase alcaline.

Pour l'analyse des protéines associées aux cellules COS transfectées et l'analyse des protéines
25 provenant du milieu de culture, on obtient dans le gel des bandes majeures correspondant à des protéines d'environ 130 kDa. Ces différentes bandes correspondent aux précurseurs APP.

L'analyse des cellules COS non transfectées
30 montre de faibles bandes dans le gel, correspondant à un faible niveau d'expression endogène de la protéine APP par les cellules COS.

Les résultats de cette analyse montrent donc que l'anticorps monoclonal suivant l'invention a reconnu
35 spécifiquement la protéine APP exprimée par des cellules COS transfectées par le fragment d'ADN_c codant pour l'APP 770.

6.2. Caractérisation de l'anticorps monoclonal par rapport

à un antigène contenu dans des tissus cérébraux.

Du tissu cérébral prélevé chez le rat et l'homme a été analysé par la technique d'immunotransfert à l'aide de l'anticorps monoclonal suivant l'invention.

5 Du cerveau total de rat et des échantillons de cortex frontal humain ont été homogénéisés (1 g/ml) dans du tampon MES 0,1 M de pH 6,8 contenant de l'EDTA 1 mM, de la leupeptine (25 µg/ml), de l'inhibiteur de trypsine (100 µg/ml) et du fluorure de phénylméthylsulfonyl (0,5 mM).

10 Les homogénats ont été centrifugés à 90.000 g pendant 60 minutes à 4°C et le surnageant a été retenu pour les expériences d'immunotransfert.

Les protéines du surnageant ont été analysées par immunotransfert de la même manière que les cellules COS (voir point 6.1).

Les résultats de l'analyse montrent des bandes à des PM situés entre 100 et 135 kDa. Ces bandes représentent les différentes versions du précurseur APP qui ont été reconnues par l'anticorps monoclonal suivant l'invention.

20 Des bandes à des PM inférieurs ont également été décelées par l'anticorps, celles-ci correspondent aux protéines Tau.

Ces résultats montrent que la protéine Tau et le précurseur APP sont antigéniquement très proches bien que leur séquence en acides aminés soit différente.

Ceci suggère que l'anticorps monoclonal suivant l'invention reconnaît des épitopes conformationnels.

7. Utilisation de l'anticorps monoclonal comme outil de diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

30 L'anticorps monoclonal suivant l'invention a été utilisé pour l'analyse immunohistochimique de coupes de cerveau humain normal et de cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. L'analyse a été réalisée suivant le procédé peroxydase-antiperoxydase.

35 Les échantillons de tissus de cerveau provenant de la région de l'hippocampe et du cortex temporal ont été prélevés, post-mortem, fixés dans le formol à 10% et enrobés

de paraffine. Des coupes d'une épaisseur de 10 μ m ont été réalisées.

Après élimination de la paraffine et réhydratation des coupes, l'activité de la peroxydase endogène a été bloquée par incubation pendant 30 minutes dans une solution d' H_2O_2 dans du méthanol à 70%. Les coupes de tissu ont été ensuite incubées pendant 1 h dans du sérum de chèvre normal dilué 10 fois dans une solution physiologique salée tamponnée au Tris 0,05 M (TBS) (pH 7,4).

Les coupes ont alors été incubées pendant 16 h à température ambiante avec le fluide d'ascite contenant l'anticorps monoclonal suivant l'invention, dilué à 1/250^e dans du TBS contenant 1,3 g/l d'azoture de sodium et 10% de sérum de chèvre normal. Les coupes préalablement lavées dans du TBS sont alors incubées successivement avec des anticorps anti-souris produit chez la chèvre pendant 30 minutes, puis avec le complexe peroxydase-antiperoxydase pendant 30 minutes.

La diaminobenzidine à 0,03% dans du Tris HCl 0,05 pH 7,6 avec 0,015% d' H_2O_2 permet de révéler la réaction de l'anticorps suivant l'invention avec l'antigène contenu dans les tissus cérébraux analysés.

Les résultats ne montrent aucune coloration des coupes de cerveau humain normal par l'anticorps suivant l'invention alors que celui-ci colore tant les altérations neurofibrillaires que les plaques séniles trouvées dans les tissus cérébraux pathologiques.

Le marquage des altérations neurofibrillaires a été confirmé par l'observation au microscope électronique de coupes de tissus incubées avec l'anticorps monoclonal suivant l'invention.

R E V E N D I C A T I O N S

1.- Anticorps monoclonal dirigé contre une séquence d'acides aminés 81 à 406 de la partie
5 extracellulaire du précurseur APP, capable de reconnaître les deux types de lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer et la forme soluble du précurseur APP.

2.- Anticorps monoclonal suivant la revendication 1, dirigé contre une protéine de fusion entre
10 ladite séquence et la β -galactosidase.

3.- Anticorps monoclonal suivant la revendication 2, caractérisé en ce que ladite protéine est obtenue par expression d'un fragment d'ADN_c codant pour
ladite séquence par des cellules d'E. Coli.

15 4.- Anticorps monoclonal suivant la revendication 3, caractérisé en ce que lesdites cellules d'E. Coli sont transformées par le vecteur d'expression Puex I.

5.- Anticorps monoclonal suivant la revendication 4, caractérisé en ce que ledit fragment d'ADN_c
20 est inséré dans le site Pst 1 dudit vecteur.

6.- Anticorps monoclonal suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est produit par l'hybridome déposé à l'ECACC sous le
25 numéro 90112001.

7.- Utilisation de l'anticorps monoclonal suivant l'une quelconque des revendications précédentes, pour la détection immunologique des altérations neurofibrillaires et des plaques séniles caractéristiques de la maladie
30 d'Alzheimer.

8.- Utilisation suivant la revendication 7, caractérisée en ce que ladite détection est réalisée, ante-mortem, sur des prélèvements de la muqueuse olfactive.

9.- Utilisation suivant la revendication 7, caractérisée en ce que ladite détection est réalisée,
35 post-mortem, sur des échantillons de tissus cérébraux.

10.- Utilisation de l'anticorps monoclonal suivant l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour le dosage de la forme soluble du précurseur APP présente dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

11.- Hybridome déposé à l'ECACC sous le numéro 90112001.

12.- Procédé pour la préparation de l'hybridome suivant la revendication 11, caractérisé en ce que :

10 1°) on immunise un animal avec une protéine obtenue par expression d'un fragment d'ADN_c codant pour la séquence d'acides aminés 81 à 406 du précurseur APP;

2°) on réalise une fusion entre les cellules spléniques de cet animal et les cellules myélomateuses appropriées;

3°) on clone les cellules résultant de ladite fusion, et

4°) on sélectionne les clones cellulaires qui s'avèrent produire les anticorps monoclonaux désirés.

20 13.- Procédé suivant la revendication 12, caractérisé en ce que ladite protéine est une protéine de fusion entre ladite séquence et la β -galactosidase.

14.- Procédé suivant l'une quelconque des revendications 12 et 13, caractérisé en ce que ladite protéine est exprimée par des cellules d'E. Coli transformées par le vecteur d'expression Puex I.

15.- Procédé suivant l'une quelconque des revendications 12 à 14, caractérisé en ce que ledit fragment d'ADN_c est inséré dans le site Pst 1 dudit vecteur.



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numero de la demande
nationale

BE 9001128
BO 2653

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
Y	EP-A-0 304 013 (ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI) * Page 7, ligne 25 - page 20, ligne 39 *	1-15	C 12 P 21/08 G 01 N 33/577
Y	EP-A-0 382 012 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANIZATION) * Colonne 22, ligne 25 - colonne 23, ligne 27 *	1-15	
A	WO-A-8 906 242 (THE McLEAN HOSPITAL CORP.)		
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, vol. 12, no. 258 (C-513), 20 juillet 1988; & JP-A-63 044 895 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD) 25-02-1988		
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
			C 07 K C 12 P
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
02-08-1991		REMPP G.L.E.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

**BE 9001128
B0 2653**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 12/08/91

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0304013	22-02-89	JP-A- 2138995	28-05-90
EP-A- 0382012	16-08-90	Aucun	
WO-A- 8906242	13-07-89	AU-A- 3287989	01-08-89