



MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1006974A3

NUMERO DE DEPOT : 09300413

Classif. Internat. : G01N

Date de délivrance le : 07 Février 1995

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 23 Avril 1993 à 24H00 à l'Office de la Propriété Industrielle

## ARRETE:

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

représenté(e)s par : VAN MALDEREN Michel, OFFICE VAN MALDEREN, Place Reine  
Fabiola 6/1 - B 1080 BRUXELLES.

un brevet d'invention d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : PROCEDE DE DETECTION ET/OU DE QUANTIFICATION DE DIFFERENTES CLASSES D'IMMUNOGLOBULINES SPECIFIQUES D'UNE PATHOLOGIE COMPORTANT UNE REPONSE AUTO-IMMUNITAIRE.

INVENTEUR(S) : Maes Roland, Bildhauerhof 34, Rosheim, F-67190 Mutzig (FR);Causse Jean-Etienne, Lotissement Arrivets, rue Baudelaire 16, F-65430 Soues (FR);Labrousse Hossein, rue des Arrouates, F-65100 Ade (FR)

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

Bruxelles, le 07 Février 1995  
PAR DELEGATION SPECIALE :

WUYTS L  
Directeur

5

10            Procédé de détection et/ou de quantification de  
différentes classes d'immunoglobulines spécifiques d'une  
pathologie comportant une réponse auto-immunitaire  
Objet de l'invention

                  L'invention concerne un nouveau procédé de détec-  
15    tion et/ou de quantification de différentes classes d'immuno-  
                  globulines spécifiques d'une pathologie comportant une  
                  réponse auto-immunitaire, notamment les maladies auto-immunes  
                  et/ou les infections entraînant une perturbation du système  
20    immunitaire telles que la sclérose en plaques, la sclérose  
                  amyotrophique latérale, l'hyperthyroïdie, l'arthrite, la  
                  cirrhose, les lupus, les syndromes antiphosphatides (accident  
                  thrombotique, dermatite bulleuse,...), les syndromes néphro-  
                  tiques, les accidents vasculaires cérébraux, la myasthénie,  
                  le cancer, etc.

25            L'invention concerne également une nouvelle trousse  
                  de détection et/ou de quantification de ces différentes  
                  classes d'immunoglobulines.

Arrière-plan technologique à la base de l'invention

                  De nombreuses pathologies comportant une réponse  
30    auto-immunitaire ont une étiologie incertaine ou inconnue et  
                  peuvent avoir une origine multifactorielle. Apparemment, un  
                  dérèglement ou une stimulation du système immunitaire des  
                  patients constitue un élément important de la progression de  
                  ces maladies.

35            Dans le cas de la sclérose en plaques (SEP), l'évo-  
                  lution de la pathologie est très similaire à celle observée  
                  dans d'autres maladies où intervient un composant immunitaire  
                  et peut se résumer ainsi:

- rencontre d'un organisme prédisposé avec un facteur potentiellement pathogène tel une bactérie, un virus ou une toxine;
- longue phase de latence;
- 5 - apparition des symptômes. Ceux-ci sont variables et reflètent tous une altération du système nerveux;
- disparition ou atténuation des symptômes avec réapparition aggravée, ultérieurement.

L'étiologie de la sclérose en plaques (SEP) est  
10 inconnue et il n'existe pas, pour l'instant, de test diagnostique fiable. Apparemment, des processus auto-immuns sont impliqués dans la genèse des lésions histopathologiques mais il n'est pas possible de dire quels sont les antigènes en cause ni de préciser si la dysfonction immunitaire observée  
15 est le résultat ou la cause d'un autre mécanisme, par exemple de type viral, bactérien ou toxique.

#### Etat de la technique

La recherche de marqueurs immunologiques dans la  
20 SEP a porté ces dernières années essentiellement sur les constituants antigéniques de la myéline: la protéine basique, la protéine associée à la myéline, la protéolipide et les glycolipides.

##### 1. Protéine basique (PMB)

Des anticorps anti-PMB ont été retrouvés chez des  
25 malades atteints de sclérose mais ils ne sont pas spécifiques de l'infection. La protéine libre a été retrouvée dans le liquide céphalo-rachidien de malades mais le taux de PMB et celui des anticorps anti-PMB n'est pas corrélé.

##### 2. Protéine associée à la myéline (MAG)

30 Certains auteurs trouvent une relation entre la production intrathécale d'IgG et celle d'anticorps anti-MAG dans les scléroses en plaques (SEP) tandis que d'autres retrouvent ces anticorps uniquement dans certaines neuropathies périphériques.

##### 35 3. Protéolipides et glycolipides

Dans tous les cas, la présence des anticorps est soit observée de façon épisodique chez les malades souffrant de SEP, soit se retrouvent également au cours d'autres

atteintes neurologiques tels les accidents vasculaires cérébraux et les traumatismes crâniens ainsi qu'au cours d'autres maladies telles que les lupus érythémateux.

#### 4. Phospholipides et acides gras

5 Les phospholipides et acides gras ne sont normalement pas antigéniques. Le rôle que peuvent jouer les acides gras dans l'étiologie de la SEP a été mis en question depuis vingt ans mais les résultats obtenus sont contradictoires. Les problèmes essentiels résident dans leur absence d'activité antigénique à l'état libre, dans leur faible solubilité  
10 en phase aqueuse et dans les interférences que des molécules de structure chimique très voisine peuvent présenter dans des réactions immunologiques. L'utilisation du phosphatidylinositol libre en tant que marqueur immunologique pour le  
15 dépistage de neuropathies démyélinisantes est connue par la demande de brevet FR-90 12578.

Cette molécule peut provoquer dans certaines situations la formation d'auto-anticorps détectables dans des tests où le phosphatidylinositol est utilisé comme haptène  
20 de capture.

Cependant, les résultats obtenus apparaissent extrêmement variables dans des analyses d'homogénéité intrasais. En effet, l'utilisation de cette molécule libre est très difficile en raison de son insolubilité en phase  
25 aqueuse, de la difficulté de son application à l'état libre pour la sensibilisation de phases solides et aussi en raison des interférences immunologiques qui peuvent se produire avec les autres phosphoinositides, le phosphatidylinositol cycliques, les autres phospholipides tels la phosphatidylamine  
30 sérine, la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylcholine.

Cette demande de brevet FR-90 12578 divulgue également que seuls les anticorps anti-phosphatidylinositol de classe IgG, séparés des autres classes d'immunoglobulines par  
35 chromatographie sur Sephadex 200, sont présents.

Les anticorps IgM sont normalement synthétisés seulement au début d'une infection bactérienne ou virale et leur recherche se justifie pour établir une primo-infection

ou une infection récente, tel que cela est pratiqué avec la rubéole chez les femmes enceintes. Cette classe d'anticorps ne se retrouve pas et n'est généralement pas recherchée, dans les maladies chroniques, dont la sclérose en plaques fait  
5 partie. Dans ces cas, il est universellement assumé que la recherche d'anticorps de classe IgM est vaine. De leur côté, les anticorps IgA sont communément associés à des processus sécrétoires et se retrouvent essentiellement au niveau des muqueuses et des parois intestinales internes. Une participa-  
10 tion des anticorps de type IgA n'a pas été, jusqu'à présent, mise en évidence dans les maladies auto-immunes. Il n'y a donc aucune raison de soupçonner leur intérêt dans des mala-  
dies chroniques affectant le système nerveux central.

Une séroanalyse globale, où les anticorps détectés  
15 sont supposés être de classe IgG, est donc l'approche considérée comme évidente et suffisante pour le diagnostic des neuropathies démyélinisantes, a fortiori lorsqu'elle est techniquement plus aisée.

L'échec relatif des recherches portant sur le rôle  
20 joué par les protéines de la myéline dans l'étiologie de la sclérose en plaques conduit à l'élaboration d'une nouvelle hypothèse.

Une formulation nouvelle d'un modèle physiopathologique de la sclérose en plaques considère que le système  
25 immunitaire est constamment stimulé par les auto-antigènes. Les auto-anticorps ne sont pas des éléments aberrants produits de façon extraordinaire par un organisme immunologiquement dérégulé mais font partie du répertoire immun: les auto-  
anticorps existent dans tout sérum normal en petites quanti-  
30 tés et leur taux s'accroît dans certaines situations pathologiques. Comme les protéines de la myéline ne semblent pas jouer de rôle décisif dans l'étiologie de la sclérose en plaques, on pourrait envisager d'autres agents perturbateurs, capables de provoquer une montée d'auto-anticorps.

35 Il a été montré que des phospholipides pouvaient être dégradés par peroxydation au moyen d'oxyhémoglobine, avec production de résidus d'acide azélaïque. Il était dès lors possible de concevoir le processus démyélinisant observé

durant la sclérose comme une maladie auto-immune: un agent perturbateur neurotrope d'origine virale, bactérienne ou toxique, agissant sur un terrain génétiquement favorable, activerait localement des enzymes capables de couper la double liaison en C9 que présentent la vaste majorité des acides gras insaturés. Les résidus créés pourraient ensuite acyler des protéines membranaires. De cette façon, la myéline serait acidifiée et désorganisée. Les modifications membranaires entraînées par la peroxydation lipidique conduiraient à la formation de néo-antigènes capables d'induire des réponses immunes spécifiques. Cette réponse pourrait être assez intense pour pouvoir être mesurée dans le sérum et liquides biologiques des malades atteints de sclérose en plaques. Ces réponses immunes augmenteraient la déstabilisation des membranes et provoqueraient un nouveau processus d'acylation, accompagné de l'exposition d'acides gras non-modifiés, normalement inaccessibles parce qu'enfouis à l'intérieur des bicouches lipidiques. Ces acides gras conjugués à la protéine basique de la myéline, maintenant exposés, seraient capables à leur tour de provoquer une réponse immunitaire, ce qui expliquerait le caractère cyclique et aggravant de la maladie.

Les acides gras, lipides, phospholipides, gangliosides et autres constituants normaux des organismes vivants supérieurs ne sont normalement pas immunogéniques mais peuvent, dans certaines circonstances, le devenir, notamment lorsque ces composés sont conjugués à d'autres molécules. Ces lipides et acides gras sont donc des haptènes qui peuvent être utilisés tels quels dans des tests de détection d'anticorps spécifiques qui les reconnaissent. Cependant, la préparation de tests diagnostiques où ces haptènes de capture sont accouplés à des membranes de cellules rouges, ou encore à du latex, du charbon actif, des gels de polysaccharides, des gels de polyacrylamide, des surfaces de polystyrène ou autres, est difficile en raison du fait de leur faible solubilité dans des milieux aqueux. Il est possible, et il a été initialement procédé de la sorte (brevet FR-90 12578), de dissoudre ou diluer les produits dans un solvant organique

(éthanol, acétone, diméthylformamide, trichloréthylène, etc.) et de sensibiliser des plaques de microtitration par recouvrement des puits des plaques par un solvant organique contenant des acides gras et lipides dissous, suivi de l'évaporation lente du solvant organique.

Comme ces méthodes sont peu fiables, dangereuses et donnent lieu à des résultats d'analyse où la variabilité est intolérable pour l'utilisation courante de ces tests en pratique médicale, cette technique a été abandonnée.

Le couplage de l'acide oléique et de l'acide azélaïque à des molécules porteuses et l'utilisation de ces produits dans un test de détection d'auto-anticorps ont été déjà décrits (Identification and Characterization of anti-conjugated Azelaic Acid Antibodies in Multiple Sclerosis, J. of Neuroimmunology, 22 (1989), 129-134; Natural seric antifatty acid antibodies in Multiple Sclerosis, Neuroscience Letters, 80 (1987), 235-239).

Cependant, ces publications ne mentionnent pas l'analyse séparée des différentes classes d'anticorps détectés mais effectuent une analyse globale où est déterminée la présence d'anticorps de toutes classes immunoglobulines (IgG, IgM et IgA confondus).

Un conjugué de phosphatidylinositol avec une molécule porteuse et la possibilité de son utilisation dans un test de détection d'immunoglobulines spécifiques pour le phosphatidylinositol n'a pas été elle décrite (brevet FR-90 12578; Antibodies against phosphatidylinositol in Multiple Sclerosis, Current Concepts in Multiple Sclerosis, H. Wietholter et al., Editors, 1991, 97-102, Elsevier Science Publishers, Amsterdam).

#### Buts de l'invention

La présente invention vise à mettre au point un procédé de détection et/ou de quantification de différentes classes d'immunoglobulines (de préférence des IgG, des IgM et/ou des IgA) spécifiques d'une pathologie comportant une réponse auto-immunitaire, permettant de caractériser les différents stades et de suivre l'évolution de cette pathologie.

Un autre but de la présente invention est d'obtenir une trousse de diagnostic permettant de détecter et/ou de quantifier ces différentes classes d'immunoglobulines.

Eléments caractéristiques de l'invention

5 L'invention concerne un nouveau procédé de détection et/ou de quantification de différentes classes d'immunoglobulines spécifiques d'une pathologie comportant une réponse auto-immune, présentes dans un fluide corporel (tel que le liquide céphalo-rachidien ou le sérum) d'un patient;  
10 dans lequel on prélève ledit fluide corporel du patient, l'on fait réagir les différentes classes d'immunoglobulines présentes dans le fluide corporel avec

- un conjugué antigénique spécifique de la pathologie et constitué d'un acide gras, de préférence l'acide oléique
- 15 ou l'acide azélaïque et/ou d'un phospholipide, de préférence le phosphatidylinositol, lié(s) à une protéine hydrosoluble, et avec
- un agent réactionnel marqué, spécifique d'une classe d'immunoglobuline,

20 et l'on détecte et/ou quantifie les différentes classes d'immunoglobulines.

L'invention concerne également une trousse de diagnostic et/ou de quantification des différentes classes d'immunoglobulines spécifiques d'une pathologie comportant  
25 une réponse auto-immune, caractérisée en ce qu'elle comprend un conjugué antigénique spécifique de la pathologie et constitué d'un acide gras, de préférence l'acide oléique ou l'acide azélaïque et/ou d'un phospholipide, de préférence le phosphatidylinositol, lié(s) à une protéine hydrosoluble, les  
30 immunoglobulines dirigées contre ce conjugué antigénique et/ou un agent réactionnel marqué, spécifique d'une classe d'immunoglobulines.

On entend par les termes "pathologie comportant une réponse auto-immune" les maladies auto-immunes et/ou les  
35 infections entraînant une perturbation du système immunitaire, telles que la sclérose en plaques, la sclérose amyotrophique latérale, l'hyperthyroïdie, l'arthrite, la cirrhose, les lupus, les syndromes antiphosphatides (accident

thrombotique, dermatite bulleuse,...), les syndromes néphrotiques, les accidents vasculaires cérébraux, la myasthénie, le cancer,...

Avantageusement, la protéine de préférence délipidée, du conjugué est choisie parmi le groupe constitué par la Protéine Basique de la Myéline (PBM), la Protéine Associée à la Myéline (MAG), l'albumine sérique bovine, l'albumine sérique humaine, la thyroglobuline porcine et/ou la polysérine.

Selon une première forme d'exécution préférée de l'invention, l'agent réactionnel est choisi parmi le groupe constitué par la protéine G, la protéine A et/ou un mélange d'entre elles.

Selon une autre forme d'exécution de l'invention, l'agent réactionnel est un anticorps anti-gammaglobulines de préférence choisi parmi le groupe constitué par les anticorps anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA et/ou un mélange d'entre eux.

#### Brève description des figures

- 20 - La figure 1 représente le sérodiagnostic ELISA® de la sclérose en plaques réalisé selon le procédé de l'invention avec l'acide azélaïque conjugué à de l'albumine bovine sérique.
- 25 - La figure 2 représente le sérodiagnostic ELISA® de la sclérose en plaques réalisé selon le procédé de l'invention avec l'acide oléique conjugué à de la thyroglobuline.
- 30 - La figure 3 représente le sérodiagnostic ELISA® de la sclérose en plaques réalisé selon le procédé de l'invention avec le phosphatidylinositol conjugué à de l'albumine bovine délipidée.
- 35 - Les figures 4 à 6 représentent l'analyse sérologique comparée d'une population saine et d'une population atteinte de sclérosé en plaques par le procédé selon l'invention. Le marqueur

- immunologique est l'acide oléique conjugué à la poly-sérine.
- 5 - Les figures 7 et 8 représentent l'analyse sérologique comparée d'une population saine et d'une population malade de sclérosé en plaques, par la présence d'anti-corps de type IgA et de type IgM anti-acide azélaïque. Le marqueur est l'acide azélaïque conjugué à la poly-sérine.
- 10 - Les figures 9 et 10 représentent l'analyse sérologique IgA et IgM phosphatidylinositol (PI) et acide azélaïque de malades sans affection grave et sans sclérose en plaques. Les marqueurs sont conjugués à la PBM.
- 15 - Les figures 11 et 12 représentent l'analyse sérologique IgA et IgM phosphatidylinositol (PI) et acide azélaïque de patients souffrant de sclérose en plaques.
- 20 - Les figures 13 et 14 représentent l'analyse sérologique IgA et IgM phosphatidylinositol (PI) et acide azélaïque de cancéreux en phase terminale de maladie.
- 25 - Les figures 15 et 16 représentent l'analyse sérologique IgA et IgM phosphatidylinositol (PI) et acide azélaïque de patients souffrant de lupus.

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

30 Le procédé de détection et/ou de quantification d'immunoglobulines selon la présente invention est basé sur l'utilisation d'un conjugué de l'acide azélaïque, de l'acide oléique et/ou du phosphatidylinositol avec des molécules hydrosolubles telles que la Protéine Basique de la Myéline  
35 (PBM), la Protéine Associée à la Myéline (MAG), l'albumine bovine sérique, l'albumine sérique humaine, la thyroglobuline porcine et/ou la poly-sérine. Cependant, d'autres protéines

et/ou polypeptides aptes à être conjugués à des acides gras et des phospholipides sont concevables pour l'homme de l'art.

Ce processus transforme les haptènes en antigènes et facilite en même temps leur manipulation. Avantageusement  
5 on utilise l'albumine bovine ou humaine, de préférence délipidée.

Ces conjugués sont utilisés dans un système ELISA® pour la détection d'auto-anticorps spécifiques chez les patients atteints de la sclérose en plaques. Parmi toutes les  
10 molécules testées, trois conjugués se sont révélés particulièrement adéquats pour la mise en évidence d'auto-anticorps spécifiques: le phosphatidylinositol, l'acide oléique et l'acide azélaïque qui est un résidu aliphatique en C9 résultant de la coupure et de l'hydrolyse des acides gras insaturés les plus répandus tels l'acide oléique, l'acide linoléique et l'acide linoléique et le phosphatidylinositol.  
15

D'autres acides gras tels que l'acide subérique (un groupement  $-CH_2$  en moins que l'acide azélaïque) et l'acide sébacique (un groupement  $-CH_2$  de plus que l'acide azélaïque),  
20 qui peuvent également réagir avec des anticorps spécifiques de l'acide azélaïque peuvent être également utilisés dans le procédé selon l'invention.

La grande variété de molécules lipophiles montrant entre elles des différences structurelles minimales (par exemple un groupement  $-CH_2$  de plus ou de moins dans une chaîne d'acide gras) induit un élément d'incertitude portant sur la  
25 spécificité des réactions immunologiques observées. De façon tout-à-fait inattendue, il a été observé que la conjugaison des trois principaux marqueurs lipophiles de la sclérose en plaques à des protéines hydrosolubles confère au produit de  
30 conjugaison des propriétés nouvelles: les marqueurs conjugués sont d'une part d'un emploi facile pour des procédés de sensibilisation de phases solides et, d'autre part, reproduisent l'état sous lequel se trouvent les marqueurs dans les  
35 tissus nerveux déstabilisés par une agression; ils sont reconnus de façon plus spécifique dans leurs réactions immunologiques avec des anticorps spécifiques naturels. Le résultat de cette observation fortuite est qu'il est possible

maintenant d'élaborer des tests de détection immunologique basés sur des marqueurs conjugués où la précision des mesures effectuées est suffisante pour satisfaire des buts diagnostiques et pronostiques courants. En particulier, l'analyse  
5 séparée des auto-anticorps de type IgG, IgM et IgA est maintenant possible. Contrairement à l'opinion prévalente que la recherche des anticorps totaux est suffisante dans un but diagnostique et que seuls les auto-anticorps de type IgG sont synthétisés, nous avons mis en évidence la présence d'anti-  
10 corps de type IgM et de type IgA, tant pour l'acide azélaïque que pour l'acide oléique et le phosphatidylinositol, et montrons l'importance de leur analyse distincte pour le diagnostic et le pronostic des scléroses démyélinisantes. En fait, l'analyse et le suivi sérologique IgM et IgA des pa-  
15 tients est plus important et donne de meilleures indications que le suivi sérologique des auto-anticorps IgG.

Le couplage d'un acide gras à des protéines ou peptides peut se réaliser de plusieurs façons, connues de l'homme de l'art. Les diverses méthodes apparaissent égale-  
20 ment adéquates. Nous avons appliqué avec des résultats similaires la méthode de condensation par un carbodiimide insoluble (le dicyclohexyl-carbodiimide en phase aqueuse), un carbodiimide soluble en phase aqueuse (le 1-ethyl-3-(3 diméthyl-aminopropyl-carbodiimide) et la formation d'un anhydride  
25 mixte par l'iso-butyl-chloroformate. De façon préférentielle, l'activation des trois marqueurs immunologiques principaux (acide oléique, acide azélaïque et phosphatidylinositol) se réalise en phase organique par l'éthyl chloroformate.

La détection des auto-anticorps IgG, IgM et IgA  
30 spécifiques est réalisée par un test ELISA®: les marqueurs conjugués à des molécules porteuses sont dissous dans un tampon carbonate (0,05 M, pH 9,6) et introduits dans les cupules de plaques de microtitration. Après sensibilisation des plaques par les marqueurs conjugués durant 24 heures à  
35 4°C, celles-ci sont lavées puis couvertes durant deux heures à 37°C par les échantillons (sérum, liquide céphalo-rachidien) dilués dans de l'eau physiologique tamponnée contenant 0,05% de tween 20. Après que la réaction immunologique des

anticorps spécifiques contenus dans les échantillons soumis à analyse avec les marqueurs fixés sur la phase solide ait eu lieu, les plaques sont lavées avec de l'eau physiologique tamponnée à pH 7,2 pour éliminer tous les éléments non-spécifiques interférents. La révélation des complexes immuns d'anticorps immunologiquement attachés aux marqueurs immobilisés se réalise par l'incubation des alvéoles avec une solution d'agents de liaison capables de se lier aux gammaglobulines présentes dans le complexe immun. Comme agents réactionnels, on peut utiliser des anticorps anti-gammaglobulines d'espèce ou encore des agents dotés d'un spectre de liaison plus large, tels la protéine A ou la protéine G. Ces agents de liaison sont rendus reconnaissables par leur marquage au moyen d'un élément distinctif, tels une molécule fluorescente, un enzyme, un atome radioactif ou une molécule luminescente, qui permet la reconnaissance aisée de la présence de l'agent de liaison fixé sur le complexe immun que l'on désire reconnaître. De façon préférentielle, un anticorps anti-gammaglobulines humaines, marqué à la peroxydase, est utilisé pour la détection des anticorps humains. Après une étape de lavage, la présence de peroxydase est détectée par l'addition d'un substrat de réaction enzymatique et d'une substance qui change de couleur sous l'effet de la réaction (par exemple  $H_2O_2$  ou peroxyde d'urée avec l'orthophénylène diamine ou la tétraméthylbenzidine).

L'invention sera décrite de manière plus détaillée à l'aide des exemples d'exécution suivants en référence aux figures annexées.

#### Exemple 1

Dans les figures 1 et 2 apparaissent les résultats de l'analyse sérologique effectuée au moyen d'un test ELISA® analysant la présence d'auto-anticorps anti-acide azélaïque et anti-acide oléique.

Le test est pratiqué de la façon suivante: des cupules de plaques de microtitration (GREINER, NURTLINGEN, Allemagne) ont été sensibilisées par les 2 marqueurs immunologiques conjugués (acide azélaïque - albumine bovine: 28  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{l/puits}$ ; acide oléique - thyroglobuline:

5,5 µg/ml, 100 µl/puits). La conjugaison de ces marqueurs avec les molécules porteuses est réalisée selon des techniques déjà connues de l'homme de l'art.

Des sérums dilués (dilution 1:10000) sont incubés dans les cupules durant 2 heures à 37°C, puis les cupules sont lavées. Trois conjugués d'anticorps anti-humains (IgG, dilution 1:20000, IgM et IgA, dilutions 1:10000, dans un tampon phosphate-salin plus 0,05% de tween 20) couplés à de la peroxydase (Dako, Danemark) sont introduits dans les cupules et incubés à 37°C durant 60 minutes. Les cupules sont lavées par de l'eau physiologique puis incubées en présence d'une solution d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,03%) et de tétraméthylbenzidine (0,1%) dans un tampon acide citrique-phosphate 0,1 M à pH 5,5. La solution vire au bleu en présence de peroxydase. La réaction est bloquée par addition de 100 µl d'acide sulfurique (0,5 N) après 10 minutes d'incubation à 37°C dans l'obscurité. Les absorbances (A 450 nm) sont données en ordonnées.

La figure 1 représente le résultat d'un sérodiagnostic ELISA® réalisé avec l'acide azélaïque conjugué à de l'albumine bovine sérique et utilisé comme antigène de capture dans une analyse sérologique portant sur cinq groupes de patients.

Les absorbances obtenues par mesure des trois classes d'anticorps (IgG, IgM et IgA) sont données en ordonnées. Les points représentent des valeurs individuelles.

1. SEP, en poussée
2. SEP, forme rémittente
3. SEP, forme progressive
4. SEP, forme progressive chronique
5. contrôles sains.

La figure 2 représente le résultat d'un sérodiagnostic ELISA® réalisé avec l'acide oléique conjugué à la thyroglobuline et utilisé comme antigène de capture dans une analyse sérologique sur quatre groupes de patients.

Les absorbances obtenues par mesure des trois classes d'anticorps (IgG, IgM et IgA) sont données en ordonnées. Les points représentent des valeurs individuelles.

1. SEP, en poussée
2. SEP, forme rémittente
3. SEP, forme progressive
4. contrôles sains.

5           Le marqueur immunologique acide azélaïque apparaît  
comme un témoin des processus inducteurs, dont le titre est  
le plus élevé lors des poussées tandis que la présence  
d'anticorps contre l'acide oléique témoignerait plutôt du  
processus actif de démyélinisation et de dysrégulation  
10 immunitaire.

L'analyse séparée des anticorps IgG, IgM et IgA  
synthétisés permet d'affiner de façon très importante la  
signification des titres observés. Pour l'acide azélaïque,  
les anticorps IgA sont très élevés chez les formes en poussée  
15 et les formes rémittentes. Les anticorps IgM sont relative-  
ment absents dans les formes progressives chroniques alors  
que les IgG sont encore très présents. Pour l'acide oléique,  
le niveau des IgM est très élevé dans les phases de SEP en  
poussée mais redescendent dans les formes rémittentes alors  
20 que les IgA sont toujours très élevées dans ces mêmes formes.

On voit l'utilité, pour le diagnostic et le pro-  
nóstico de l'analyse séparée des différentes classes d'anti-  
corps dirigés contre des marqueurs immunologiques  
spécifiques.

#### 25 Exemple 2

Cinq milligrammes de phosphatidylinositol (Sigma,  
pureté 90%) sont dilués dans 4 ml de diméthylformamide basi-  
fiés par 50  $\mu$ l de triéthylamine, et traités par 50  $\mu$ l  
d'éthylchloroformate à 4°C durant 3 minutes.

30           La suspension de phosphatidylinositol activée est  
mélangée à 4°C à une solution aqueuse d'albumine bovine  
délipidée (20 mg/5ml). Le produit de conjugaison est dialysé  
contre de l'eau physiologique contenant 0,001% de  $\text{CaCl}_2$   
durant 24 heures à 4°C, puis utilisé pour la sensibilisation  
35 de plaques de microtitration (Nunc, Danemark) (2 $\mu$ g/ml dans  
un tampon carbonate 0,05 M durant 18 heures à 4°C, 250  
 $\mu$ l/puits de plaque de microtitration).

Les sérums SEP sont analysés selon la technique décrite dans l'exemple 1.

La figure 3 représente une étude (sérodiagnostic ELISA®) portant sur 100 sujets séparés en 5 groupes égaux et analysés pour la présence d'anticorps totaux, c'est-à-dire IgG plus IgM plus IgA. Vingt sujets par groupe ont été testés:

1. SEP, en poussée
2. SEP, forme rémittente
- 10 3. SEP, forme progressive
4. SEP, forme progressive chronique
5. contrôles sains.

Il est clair que le marqueur immunologique phosphatidylinositol est particulièrement précieux pour dépister les SEP en poussée et les formes progressives.

#### Exemple 3

Une population de donneurs de sang (17 sujets) est analysée pour la présence d'anticorps de classe IgM, IgG et IgA anti-acide oléique et comparée à une population de malades (27 sujets) souffrant de sclérose en plaques. Les sérums sont analysés comme dans l'exemple 1, avec les résultats rapportés dans les figures 4 à 6.

On voit que le nombre de positifs est nettement plus élevé lorsque l'analyse porte sur la classe IgM d'anticorps, tandis qu'un seul malade conserve la présence d'anticorps anti-acide oléique de classes IgG et IgA.

#### Exemple 4

Les mêmes donneurs de sang et malades de sclérose en plaques, analysés dans l'exemple 3, sont analysés pour la présence d'auto-anticorps de classe IgM et de classe IgA contre l'acide azélaïque. Les résultats sont rapportés dans les figures 7 et 8.

On voit que près de la moitié des malades sont positifs pour l'anticorps anti-acide azélaïque de classe IgA. Les mêmes malades ne sont pas nécessairement positifs pour les anticorps de classe IgM ni pour les anticorps anti-acide oléique.

Une analyse conjointe de la présence d'anticorps anti-acide oléique et anti-acide azélaïque des classes IgM, IgG et IgA permet de détecter 21/27 des malades souffrant de SEP.

5 Exemple 5

Une population de 220 sérums est étudiée pour la présence d'auto-anticorps IgM et IgA anti-acide azélaïque et anti-phosphatidylinositol. Le protocole d'analyse est identique à celui suivi dans les exemples précédents.

10 La population analysée se présente comme suit:

1. 36 sérums d'une population hétérogène de malades et de patients hospitalisés sans affection grave déclarée à l'exception d'une cirrhose décompensée.
2. 52 sérums d'une population de patients souffrant de sclérose en plaques. Toutes les phases de la maladie, y compris les cas de rémission, sont inclus dans le groupe.
- 15 3. 88 sérums d'une population hétérogène de cancers graves en phase terminale. Aucune sclérose en plaques n'était rapportée pour ce groupe de malades.
- 20 4. 44 sérums de lupus.

Les données (absorbances) sont réparties en 3 classes distinctes: une absorbance = 0,75 est considérée comme une valeur-seuil, au-dessus de laquelle les sérums sont positifs, c'est-à-dire possédant un niveau élevé d'anticorps, qui ne se retrouve pas dans les sérums de personnes saines. Entre 0,75 et 0,38 se situe la zone d'incertitude; 0,38 est une deuxième valeur-seuil sous laquelle les valeurs obtenues sont considérées refléter l'absence d'anticorps à un taux significatif.

30 Les figures 9 (phosphatidylinositol) et 10 (acide azélaïque) montrent les résultats obtenus chez une population "normale" de malades. Un seul malade montre une séropositivité en anticorps anti-phosphatidylinositol IgA. Il s'agit d'un malade souffrant d'une cirrhose décompensée. Un cas marginal d'anticorps anti-acide azélaïque IgM est également noté, qui est resté sans corrélation clinique.

Les figures 11 (PI) et 12 (acide azélaïque) montrent les résultats obtenus dans l'analyse de malades

atteints de sclérose en plaques (toutes phases de la maladie confondues). La fréquence d'anticorps à un titre supérieur à  $A = 0,75$  est élevée dans ce groupe. Les deux seuls cas où des anticorps anti-acide azélaïque de classe IgA sont détectés sont des formes de poussée invalidante. Ces deux sérums sont également positifs pour les auto-anticorps phosphatidylinositol IgM et IgA. Une telle corrélation ne se retrouve pas pour les autres sérums positifs.

Les figures 13 et 14 indiquent les résultats PI et acide azélaïque obtenus chez des cancéreux en phase terminale de maladie. Alors que les auto-anticorps anti-PI se retrouvent avec une fréquence supérieure à la normale, la dispersion des résultats d'une analyse anti-azélaïque est statistiquement identique à celle observée chez les contrôles "normaux".

Les figures 14 et 15 indiquent la présence d'anticorps anti-PI et anti-acide azélaïque chez des patients souffrant de lupus. Les anticorps anti-PI de classe IgM ne sont élevés que chez deux malades tandis que les IgA se retrouvent plus fréquemment. Les anticorps anti-azélaïque, par contre sont à un niveau similaire à celui trouvé dans une population "normale".

Les résultats globaux de cette analyse se trouvent assemblés dans le tableau I ci-dessous. Celui-ci donne le pourcentage de positifs, (c'est-à-dire au-dessus d'une valeur en absorbance égale à  $0,75$ ), de douteux (c'est-à-dire compris dans la zone d'incertitude délimitée par les valeurs en absorbance  $0,75$  et  $0,38$ ) et les négatifs (inférieurs à  $0,38$ ) par rapport à l'effectif total de chaque groupe.

TABLEAU I

<i>Anticorps</i>		<i>groupe</i>											
		<i>1. "normaux"</i>			<i>2. SEP</i>			<i>3. Cancers</i>			<i>4. Lupus</i>		
		<i>+</i>	<i>+/-</i>	<i>-</i>	<i>+</i>	<i>+/-</i>	<i>-</i>	<i>+</i>	<i>+/-</i>	<i>-</i>	<i>+</i>	<i>+/-</i>	<i>-</i>
5	PI												
	IgM	0	30	70	24	59	19	7	36	57	1	36	63
	IgA	2 <sup>1</sup>	30	68	39	59	2	7	21	72	20	50	30
	Az												
	IgM	3	25	72	19	33	48	0	20	80	2	0	98
10	IgA	0	0	100	2 <sup>2</sup>	0	98	0	5	95	0	0	100

1. Un cas de cirrhose décompensée.

2. Deux formes de poussée invalidante.

On voit, de par ces chiffres, l'intérêt d'analyser  
 15 de façon séparée les anticorps IgM et IgA, et également  
 l'intérêt de ces mesures pour le diagnostic de cancers et de  
 lupus.

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection et/ou de quantification de différentes classes d'immunoglobulines spécifiques d'une pathologie comportant une réponse auto-immune, présente dans  
5 un fluide corporel d'un patient, caractérisé en ce que l'on prélève le fluide corporel du patient, en ce qu'on fait réagir les différentes classes d'immunoglobulines présentes dans ce fluide corporel avec un conjugué antigénique spécifique de la pathologie et constitué d'un acide gras et/ou d'un  
10 phospholipide, lié(s) à une protéine hydrosoluble, et avec un agent réactionnel marqué spécifique d'une classe d'immunoglobuline et en ce que l'on détecte et/ou quantifie les différentes classes d'immunoglobulines.

2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en  
15 ce que l'acide gras du conjugué est l'acide oléique ou l'acide azelaïque.

3. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le phospholipide du conjugué est le phosphatidylinositol.

20 4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que la protéine, de préférence délipidée, du conjugué est choisie parmi le groupe constitué par la protéine basique de la myéline (PBM), la protéine associée à la myéline (MAG), l'albumine sérique  
25 bovine, l'albumine sérique humaine, la thyroglobuline porcine et/ou poly-sérine.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que l'agent réactionnel est choisi parmi le groupe constitué par la protéine G, la  
30 protéine A et/ou un mélange d'entre elles.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 4 caractérisé en ce que l'agent réactionnel est un anticorps anti-gammaglobuline.

7. Procédé selon la revendication 6 caractérisé en  
35 ce que l'anticorps anti-gammaglobuline est choisi parmi le groupe constitué par les anticorps anti IgG, anti IgM, anti IgA et/ou un mélange d'entre eux.

8. Trousse de détection et/ou de quantification de différentes classes d'immunoglobulines spécifiques d'une pathologie comportant une réponse auto-immune, caractérisée en ce qu'elle comprend un conjugué antigénique spécifique de la pathologie et constitué d'un acide gras et/ou d'un phospholipide, lié(s) à une protéine hydrosoluble, les immunoglobulines dirigées contre ce conjugué antigénique et/ou un agent réactionnel marqué, spécifique d'une classe d'immunoglobuline.
- 5
9. Trousse selon la revendication 8 caractérisée en ce que l'acide gras du conjugué est l'acide oléique ou l'acide azélaïque.
- 10
10. Trousse selon la revendication 8 caractérisée en ce que le phospholipide du conjugué est le phosphatidylinositol.
- 15
11. Trousse selon l'une quelconque des revendications 8 à 10 caractérisée en ce que la protéine, de préférence délipidée, du conjugué est choisie parmi le groupe constitué par la protéine basique de la myéline (PBM), la protéine associée à la myéline (MAG), l'albumine sérique bovine, l'albumine sérique humaine, la thyroglobuline porcine et/ou la poly-sérine.
- 20
12. Trousse selon l'une quelconque des revendications précédentes 8 à 11 caractérisée en ce que l'agent réactionnel est choisi parmi le groupe constitué par la protéine G, la protéine A et/ou un mélange d'entre elles.
- 25
13. Trousse selon l'une quelconque des revendications précédentes 8 à 11 caractérisée en ce que l'agent réactionnel est un anticorps anti-gammaglobuline.
- 30
14. Trousse selon la revendication 13 caractérisée en ce que l'anticorps anti-gammaglobuline est choisi parmi le groupe constitué par les anticorps anti IgG, anti IgM, anti IgA et/ou un mélange d'entre eux.

FIG. 1

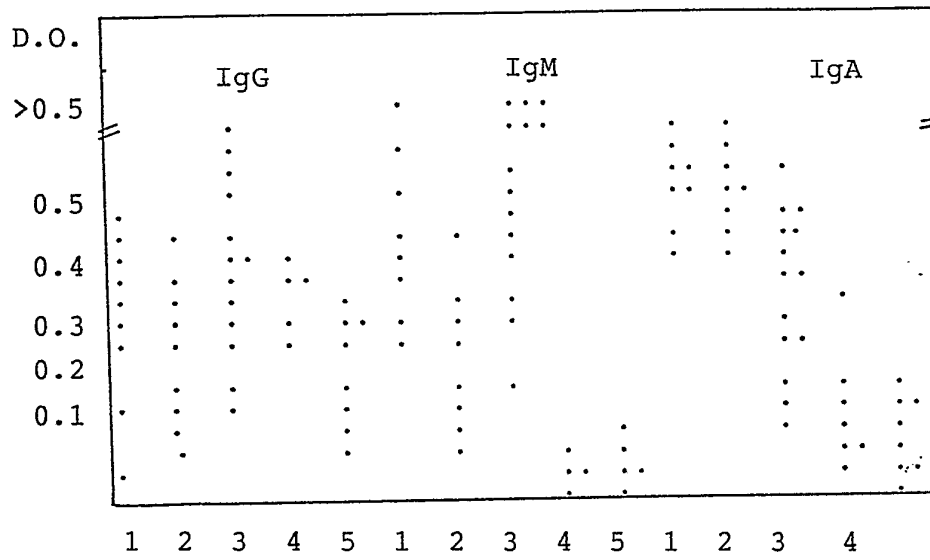


FIG. 2

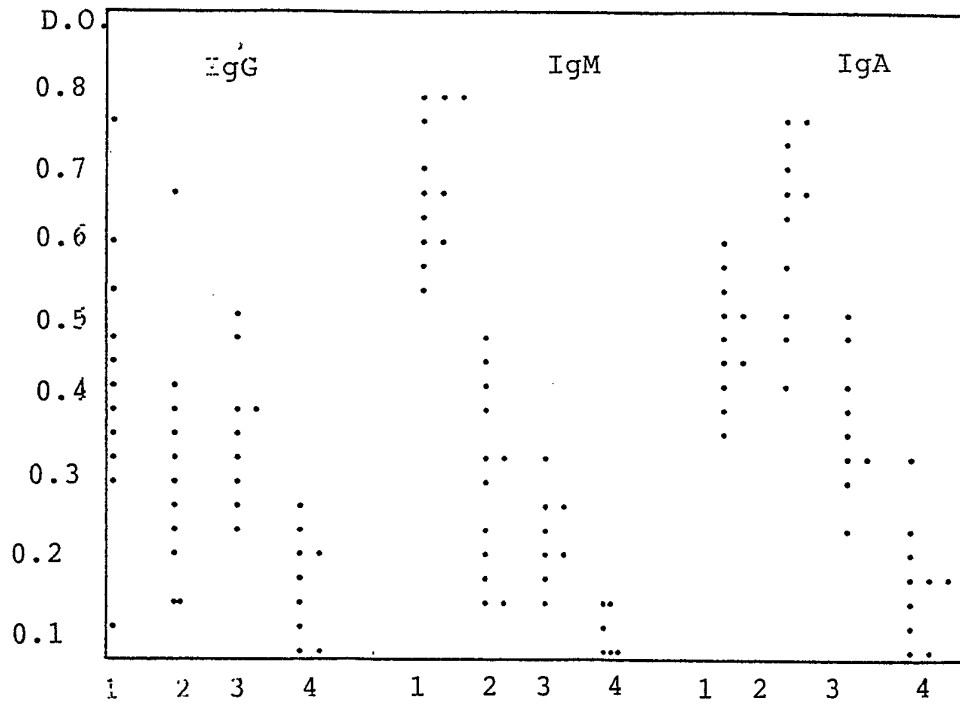
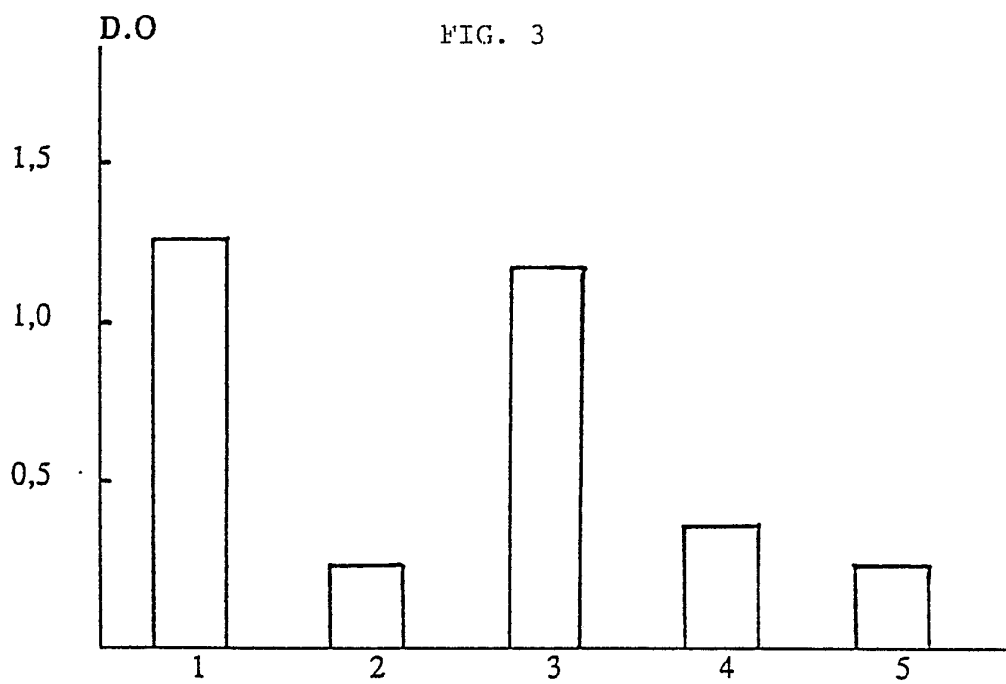


FIG. 3



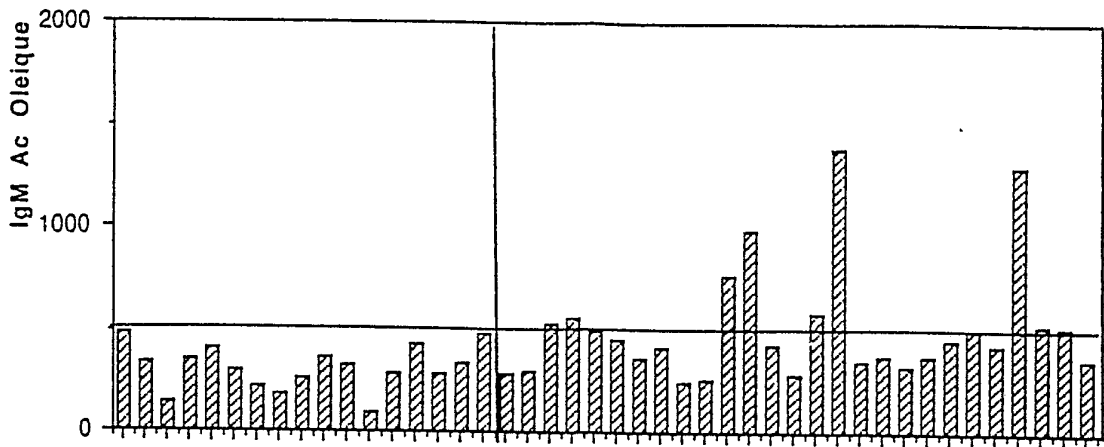


FIG. 4

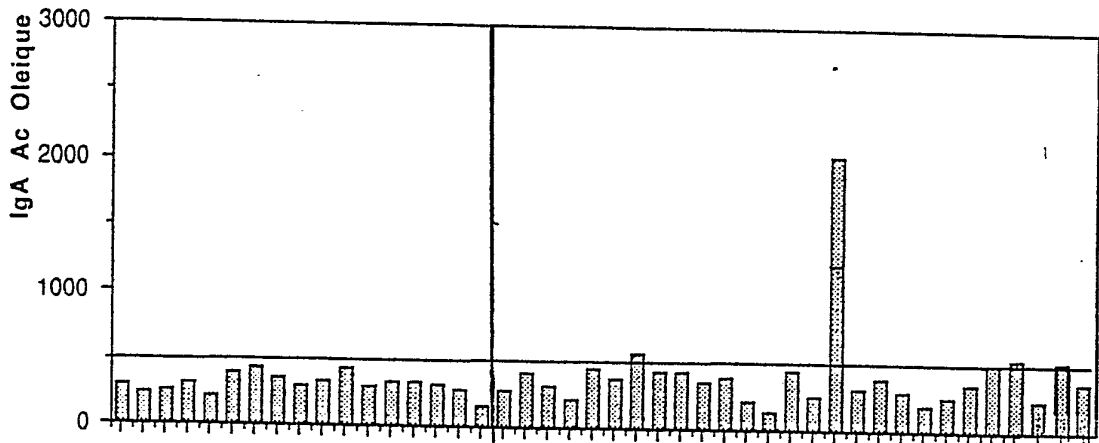


FIG. 5

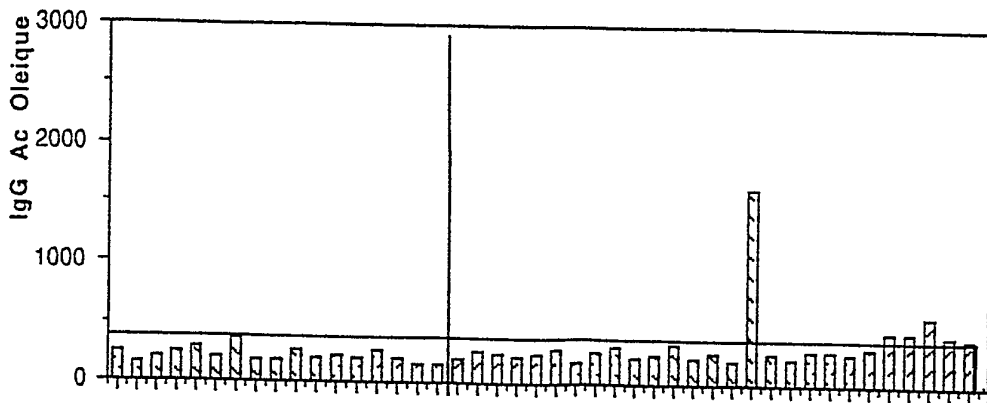


FIG. 6

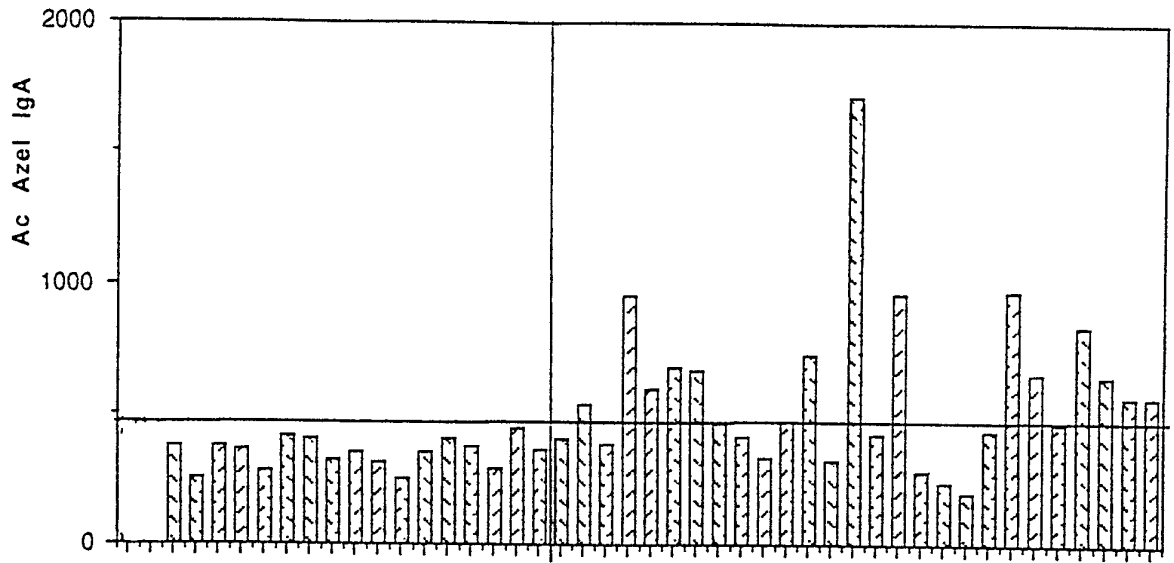


FIG. 7

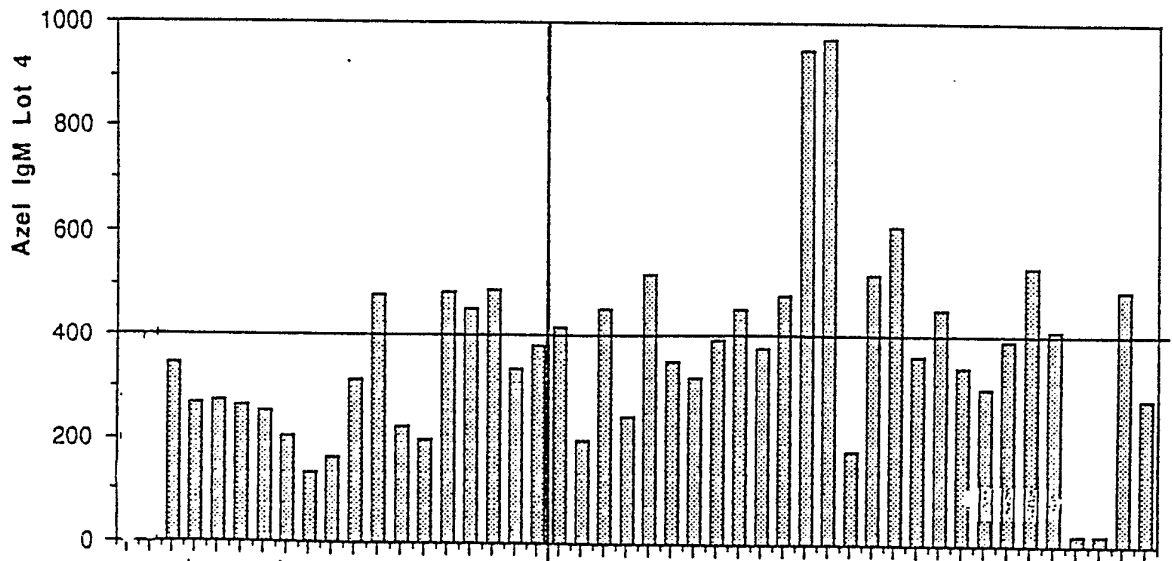


FIG. 8



FIG. 11

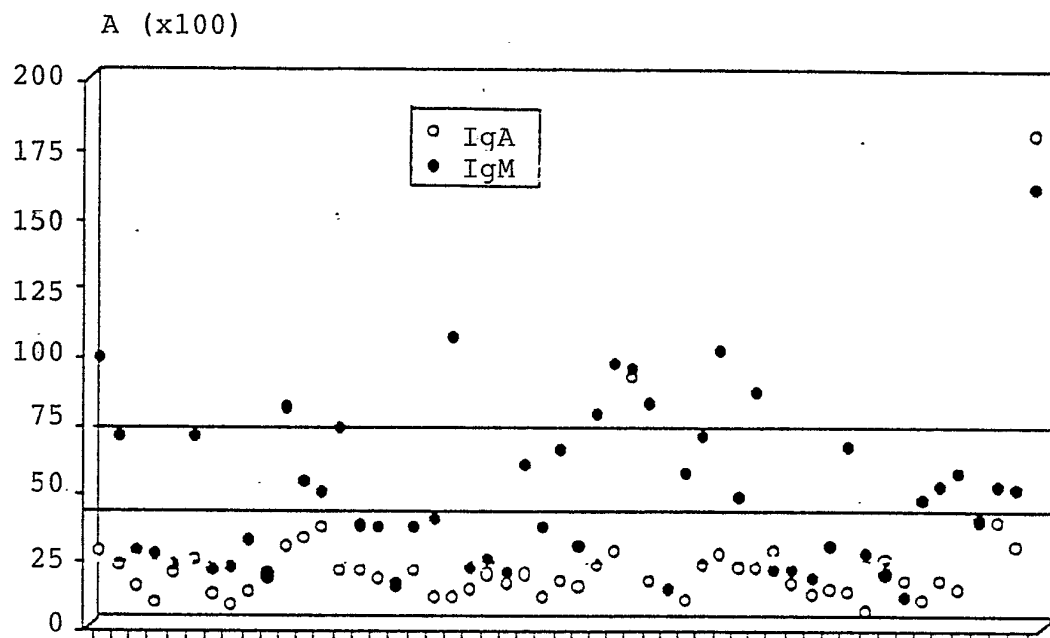
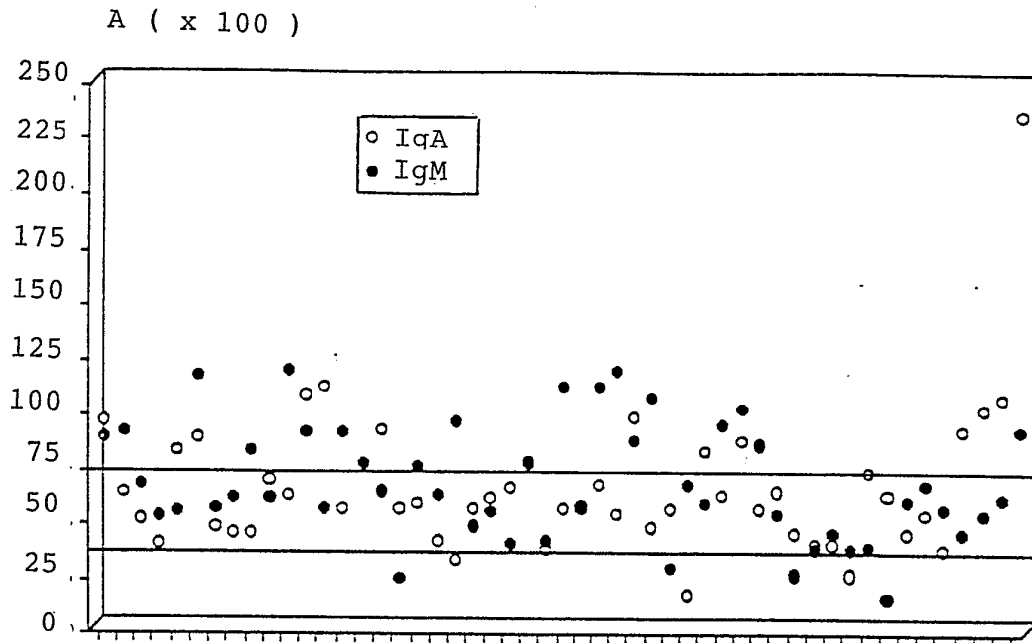


FIG. 12

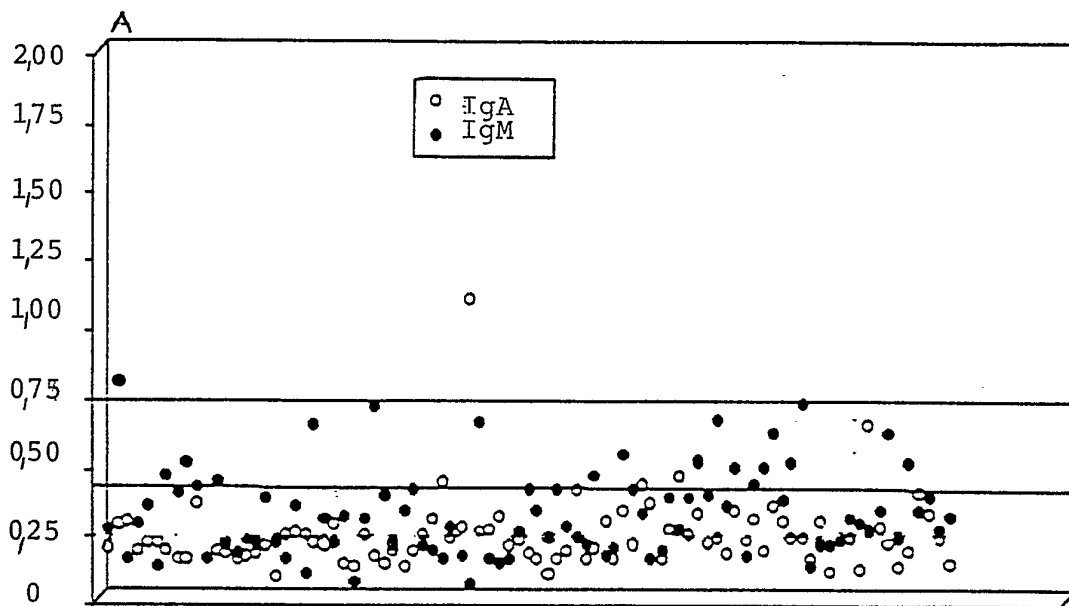


FIG. 13

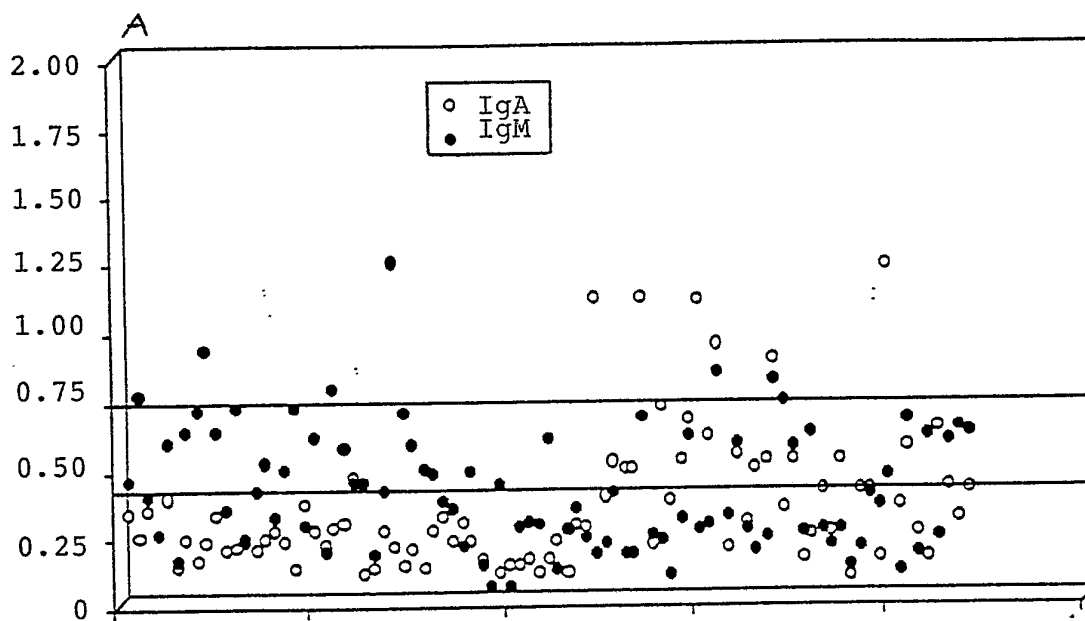


FIG. 14

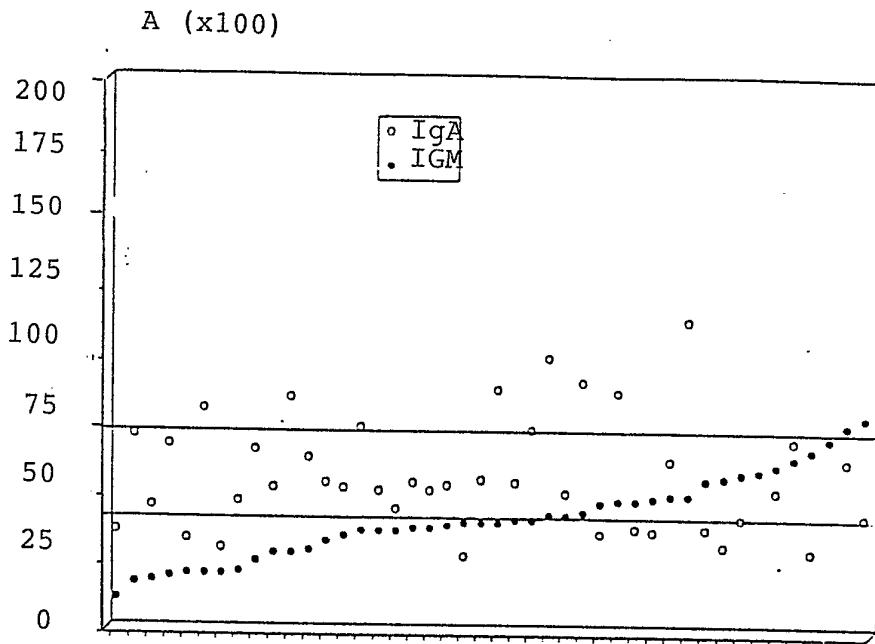


FIG. 15

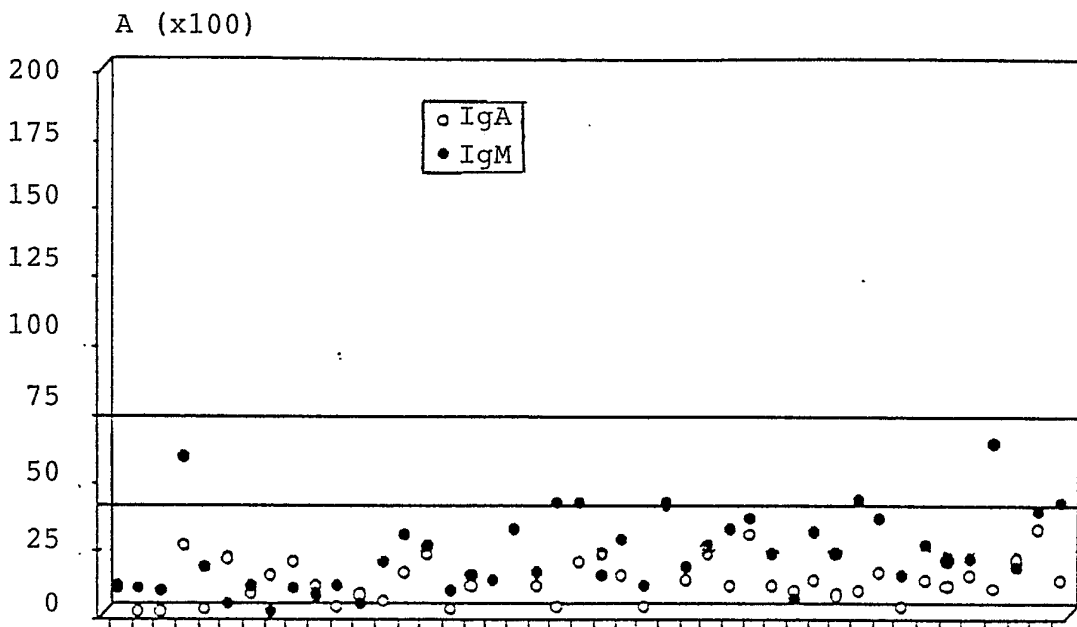


FIG. 16



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

BO 4398  
BE 9300413

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)
A,D	FR-A-2 667 945 (INSTITUT DES NEUROSCIENCES CLINIQUES) * page 1 - page 3; revendications * ---	1,3,8,10	G01N33/564 G01N33/92
A	EP-A-0 410 893 (MITSUBISHI KASEI CORPORATION) * Abrégé; page 4, lignes 14-19; revendications. * ---	1,5-8, 12-14	
A,D	JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY vol. 22, no. 2, Avril 1989 pages 129 - 134 P.DAVERAT ET AL. 'Identification and characterization of anti-conjugated azelaic acid antibodies in multiple sclerosis.' * le document en entier * ---	1,2,8,9	
A	JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS vol. 143, 1991 pages 223 - 229 J.ARVIEUX ET AL. 'Measurement of anti-phospholipid antibodies by ELISA using beta-2-glycoprotein I as an antigen.' * le document en entier * ---	1,3,8,10	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.5)  G01N
A,D	NEUROSCIENCE LETTERS vol. 80, no. 2, 23 Septembre 1987 pages 235 - 239 L. MANETA-PEYRET ET AL. 'Natural seric anti-fatty acid antibodies in multiple sclerosis.' * le document en entier * ---	1,2,8,9	
		-/--	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
14 Janvier 1994		HITCHEN, C	
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>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</p> <p>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  .....  &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

1  
EPO FORM 1503 03.82 (F04C4)



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

BO 4398  
BE 9300413

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)
A,D	H.WIETHOLTER ET AL. EDS. 'Current Concepts in Multiple Sclerosis' 1991, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., THE NETHERLANDS * page 97 - page 102 * -----	1,3,8,10	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.5)
		Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
		14 Janvier 1994	HITCHEN, C
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b> 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	

1

EPO FORM 1503 03.92 (P04C48)

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

**B0 4398  
BE 9300413**

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

14-01-1994

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A-2667945	17-04-92	AUCUN	
EP-A-0410893	30-01-91	CA-A- 2021946 JP-A- 3128462	29-01-91 31-05-91