

12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22) Date de dépôt : 31.07.98.

30) Priorité :

43) Date de mise à la disposition du public de la demande : 04.02.00 Bulletin 00/05.

56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

71) Demandeur(s) : BIO MERIEUX Société anonyme — FR.

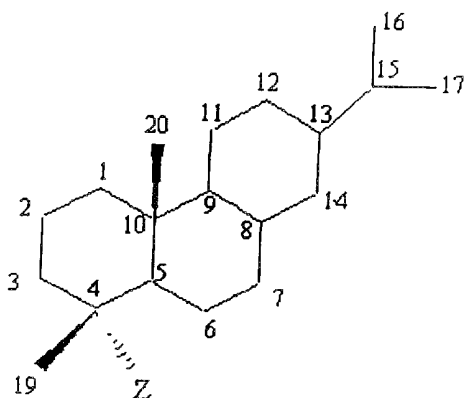
72) Inventeur(s) : CHARLES MARIE HELENE, PIGA NADIA, BATAIL POIROT NICOLE, VERON LAURENT, DELAIR THIERRY et MANDRAND BERNARD.

73) Titulaire(s) :

74) Mandataire(s) : GERMAIN ET MAUREAU.

54) DERIVES SATURES OU INSATURES DE L'ABIETANE, CONJUGUES DERIVES ET UTILISATIONS DANS UNE COMPOSITION DIAGNOSTIQUE, UN REACTIF ET UN DISPOSITIF.

57) L'invention concerne un dérivé saturé ou insaturé de l'abiétane de formule générale (I)



COONR^3R^4 , $-\text{COR}^6$, $-\text{CON}$, $-\text{COOR}^5$, $-\text{CHOHR}^7$, $-\text{SR}^8$, $-\text{OR}^9$, $-\text{CN}$, $-\text{CNO}$, $-\text{CNS}$, $-\text{NCO}$, $-\text{NCS}$, $-\text{R}^1\text{R}^2\text{CR}^9$;

où R^1 , R^2 , R^3 et R^4 représentent un atome d'hydrogène, un alkyle en $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, un aryle en $\text{C}_6\text{-C}_{20}$, éventuellement substitué; un alcène en $\text{C}_7\text{-C}_{10}$; un alcyne en $\text{C}_1\text{-C}_{10}$; un aminoacyle ou peptidyle éventuellement substitué, ou R^1 et R^2 ou R^3 et R^4 ensemble peuvent former un cycle ou un hétérocycle; R^5 représente un hydrogène, un alkyle en $\text{C}_{>1}\text{-C}_{10}$, un alcène en $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, un alcyne en $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, un aryle, éventuellement substitué en $\text{C}_6\text{-C}_{20}$; R^6 représente un hydrogène, un halogène, un alkyle en $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, un alcène en $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, un alcyne en $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, un aryle, éventuellement substitué, en $\text{C}_6\text{-C}_{20}$; R^7 représente un hydrogène, un alkyle en $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, un alcène en $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, un alcyne en $\text{C}_1\text{-C}_{10}$; R^8 représente un hydrogène, un alkyle en $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, un alcène en $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, un alcyne en $\text{C}_1\text{-C}_{10}$; et R^9 est choisi parmi $-\text{CN}$, $-\text{CNO}$, $-\text{CNS}$, $-\text{NCO}$ et $-\text{NCS}$;

à la condition que si ledit dérivé de l'abiétane est un dérivé insaturé, Z ne représente pas un radical acide carboxylique.

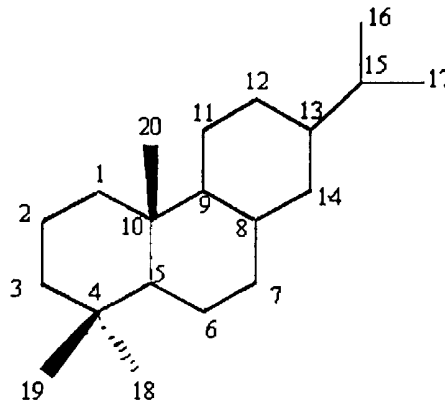
dans laquelle Z est choisi parmi $-\text{COOR}^5$, $-\text{CONR}^1\text{R}^2$, -



La présente invention a pour objet de nouveaux dérivés de l'abiétane, de nouveaux conjugués dérivés de l'abiétane et leurs utilisations.

5

Les nouveaux dérivés comprennent le squelette de base de l'abiétane qui répond à la formule ci-dessous



10 ladite molécule comprenant en position 18 un groupement fonctionnel réactif Z.

Les nouveaux dérivés de l'abiétane sont utilisables dans un grand nombre d'analyses. A titre d'exemple, ils peuvent être
15 utilisés directement ou indirectement pour le développement de nouveaux tests de diagnostic ; dans le suivi d'une infection, par exemple d'une infection virale ; dans le suivi et/ou le dosage de produits chimiques et en particulier de produits potentiellement polluants.

20 Dans des tests de diagnostic, ils peuvent être utilisés soit comme marqueurs, soit pour constituer une phase solide universelle, soit pour la production d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux utilisables à des fins diagnostiques. A ce titre,

ils peuvent avantageusement se substituer à la biotine pour développer de nouveaux tests de diagnostic. En effet, il s'agit de molécules chimiques que l'on ne retrouve pas chez l'être humain, en particulier dans le sérum, ce qui signifie qu'ils
5 permettent d'éviter de potentielles interactions avec des molécules biologiques.

Dans le dosage et/ou le suivi de produits chimiques, les dérivés de l'abiétane selon l'invention étant chimiquement relativement inertes, ils peuvent être utilisés comme marqueurs
10 dans de nombreux tests de dosage de composés chimiques sans perturber les propriétés physiques et/ou chimiques et/ou physico-chimiques de ces derniers.

Sur le plan de la synthèse, étant monofonctionnels, ils sont aisément synthétisables de façon chimiospécifique.

15 A titre d'exemple, on développera maintenant quelques applications des nouveaux dérivés de l'abiétane dans des tests de dosages immunologiques :

Utilisation desdits dérivés comme marqueurs dans un test de diagnostic : Les nouveaux dérivés de l'abiétane peuvent être
20 utilisés comme marqueurs dans un test d'immunoanalyse par exemple pour le dosage et/ou la quantification d'anticorps spécifiques d'un antigène dans un échantillon biologique par technique de compétition. A cet effet, l'antigène est fixé sur une phase solide, telle que par exemple représentée par un
25 puits d'une plaque de microtitration. L'échantillon biologique à doser et une quantité déterminée d'un anticorps conjugué à un dérivé de l'abiétane sont ajoutés à la phase solide, et on détecte la formation de complexes antigène/anticorps conjugués à un dérivé de l'abiétane à l'aide d'un anticorps dirigé contre
30 le dérivé de l'abiétane, ledit anticorps étant marqué par tout marqueur approprié. De manière similaire, les dérivés de l'abiétane peuvent être utilisés comme marqueurs dans un test pour le dosage et/ou la quantification d'un antigène dans un échantillon biologique par technique de compétition. Dans ce
35 cas, un anticorps spécifique de l'antigène à doser est fixé sur

une phase solide et on ajoute à la phase solide ainsi constituée à la fois l'échantillon biologique susceptible de contenir l'antigène recherché et une quantité prédéterminée d'un dérivé de l'antigène conjugué à un dérivé de l'abiétane.

5 La formation des complexes anticorps/dérivé de l'antigène conjugué à un dérivé de l'abiétane est ensuite mise en évidence par l'addition d'un anticorps dirigé contre le dérivé de l'abiétane, ledit anticorps étant marqué par tout marqueur approprié. De même, les dérivés de l'abiétane sont utilisables
10 comme marqueurs dans une technique sandwich pour la recherche d'un antigène ou d'un anticorps dans un échantillon. A cet effet, le complexe immun anticorps/antigène de l'échantillon est mis en évidence par complexation avec un second anticorps conjugué à un dérivé de l'abiétane ou par complexation avec un
15 second antigène conjugué à un dérivé de l'abiétane et la révélation est effectuée à l'aide d'un anticorps dirigé contre le dérivé de l'abiétane marqué, ledit anticorps étant marqué par tout marqueur approprié.

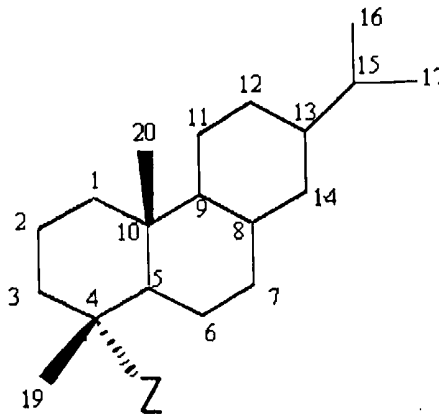
Les dérivés de l'abiétane précités sont couplés à une
20 molécule biologique, telle qu'une protéine choisie parmi les anticorps, les antigènes et les polypeptides, directement ou indirectement. Indirectement, ils sont couplés par l'intermédiaire de composés ayant au moins deux fonctions réactives, identiques ou différentes, tels que des bras
25 espaceurs ou des polymères naturels ou de synthèse définis plus en détail ci-après. Les dérivés de l'abiétane ainsi couplés sont utilisés dans un réactif pour le diagnostic. Ainsi, la présente invention a aussi pour objet un réactif comprenant en
30 outre un dérivé de l'abiétane couplé à une protéine choisie parmi les polypeptides, les antigènes et les anticorps, l'utilisation d'un tel réactif dans un test de diagnostic et une composition comprenant en outre un réactif tel que défini ci-dessus.

Utilisation des dérivés de l'abiétane pour la constitution
35 d'une phase solide universelle : A titre d'exemple, des

anticorps dirigés contre un dérivé de l'abiétane sont immobilisés sur une phase ou support solide, directement ou indirectement, et un polypeptide ou un oligonucléotide est modifié par fixation à une de ses extrémités d'un dérivé de l'abiétane. Le complexe anticorps dirigé contre le dérivé de l'abiétane/dérivé de l'abiétane-polypeptide ou le complexe anticorps dirigé contre le dérivé de l'abiétane/dérivé de l'abiétane-oligonucléotide est ensuite utilisé selon les techniques usuelles sandwich ou par compétition. La phase solide universelle est constituée par l'ensemble phase solide/anticorps dirigé contre un dérivé de l'abiétane. La présente invention a donc également pour objet un dispositif comprenant outre la phase ou support solide un anticorps polyclonal ou monoclonal dirigé contre un dérivé de l'abiétane, ledit anticorps étant immobilisé directement ou indirectement sur ladite phase ou support solide. De préférence, l'anticorps est un anticorps monoclonal obtenu selon des techniques connues, à titre de référence celle décrite dans l'exemple 10.

Les dérivés de l'invention peuvent être utilisés pour le dosage et/ou le suivi de produits chimiques dans un milieu liquide, en particulier dans un milieu aqueux, par technique sandwich ou par technique de compétition comme décrit précédemment pour les tests de diagnostic.

Aussi, la présente invention a pour objet de nouveaux dérivés saturés ou insaturés de l'abiétane répondant à la formule générique (I) :



dans laquelle Z est choisi dans le groupe consistant en $-\text{COOR}^5$,
 $-\text{CONR}^1\text{R}^2$, $-\text{COONR}^3\text{R}^4$, $-\text{COR}^6$, $-\text{CON}$, $-\text{COOR}^5$, $-\text{CHOHR}^7$, $-\text{SR}^8$, $-\text{OR}^8$,
 5 CN , $-\text{CNO}$, $-\text{CNS}$, $-\text{NCO}$, $-\text{NCS}$, $-\text{R}^1\text{R}^2\text{CR}^9$;
 dans lesquels R^1 , R^2 , R^3 et R^4 , indépendamment les uns des
 autres représentent un atome d'hydrogène, un radical alkyle
 comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical aryle de
 préférence comprenant de 6 à 20 atomes de carbone,
 10 éventuellement substitué; un radical alcène comprenant de 7 à
 10 atomes de carbone; un radical alcyne comprenant de 1 à 10
 atomes de carbone; un radical aminoacyle ou peptidyle
 éventuellement substitué, ou R^1 et R^2 ou R^3 et R^4 ensemble
 peuvent former un cycle ou un hétérocycle ; R^5 représente un
 15 atome d'hydrogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10
 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10
 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10
 atomes de carbone, un radical aryle, éventuellement substitué,
 comprenant de 6 à 20 atomes de carbone; R^6 représente un atome
 20 d'hydrogène, un halogène, un radical alkyle comprenant de 1 à
 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10
 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10
 atomes de carbone, un radical aryle, éventuellement substitué,
 comprenant de 6 à 20 atomes de carbone; R^7 représente un atome
 25 d'hydrogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de
 carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de

carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone ; R^8 représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne
5 comprenant de 1 à 10 atomes de carbone; et R^9 est choisi parmi -CN, -CNO, -CNS, -NCO et -NCS ;

à la condition que si ledit dérivé de l'abiétane est un dérivé insaturé, Z ne représente pas un radical acide carboxylique.

Par dérivé saturé de l'abiétane, on entend un dérivé ayant
10 le squelette de l'abiétane précité dans lequel les trois cycles et le groupe latéral en position 13 ne comportent aucune insaturation, indépendamment de la définition de Z. Par dérivé insaturé, on comprend un dérivé ayant le squelette de l'abiétane dans lequel au moins l'un des trois cycles et/ou le
15 groupe latéral en position 13 comporte une insaturation. A titre d'exemple de dérivé insaturé, on peut citer ceux dont le squelette est choisi parmi les squelettes de l'acide abiétique, de l'acide déhydroabiétique, de l'acide néoabiétique, indépendamment de la définition de Z.

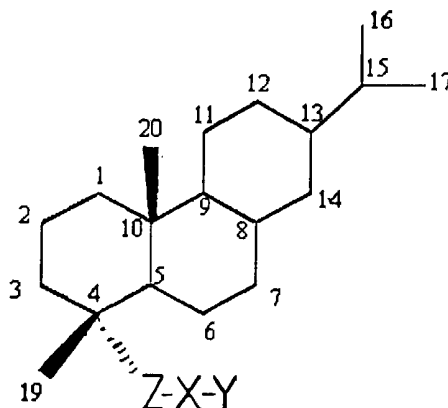
20 Les radicaux alkyles mentionnés ci-dessus comprennent de préférence de 1 à 6 atomes de carbone. Ils peuvent être linéaires ou ramifiés. De préférence, ce sont des radicaux linéaires. Un radical alkyle peut être interrompu par un ou plusieurs hétéroatomes et/ou substitué ou non substitué.

25 Les radicaux aryles mentionnés précédemment comprennent de préférence de 6 à 14 atomes de carbone. Il peut s'agir de composés cycliques ou hétérocycliques, éventuellement substitués, en particulier par des hétéroatomes ou des groupes d'hétéroatomes, tels que des groupements nitro, sulfonique et
30 sulfonate.

Avantageusement, $-\text{COONR}^3\text{R}^4$ représente un ester de N-hydroxysuccinimide, $-\text{COR}^6$ représente un chlorure d'acide, $-\text{CONR}^1\text{R}^2$ représente un groupement amide N-substitué dans lequel R^1 et R^2 indépendamment l'un de l'autre représente un atome
35 d'hydrogène ou un radical polyéthylèneglycol et avantageusement

un radical tétra ou hexaéthylèneglycol ou encore un radical peptidyle éventuellement substitué comprenant de 2 à 6 résidus aminoacyles. De préférence, le radical peptidyle est un radical glycyglycine et avantageusement le radical glycyglycine est substitué par la N-hydroxysuccinimide ; $-\text{COOR}^5$ de préférence représente un ester de polyéthylèneglycol et avantageusement un ester de tétra ou hexaéthylèneglycol.

La présente invention a aussi pour objet de nouveaux conjugués dérivés de l'abiétane qui répondent à la formule générale (II)



dans laquelle, Z représente un radical tel que défini dans la formule (I) précédente ; X représente un bras espaceur choisi parmi une chaîne aliphatique $(\text{CH}_2)_n$ dans laquelle n est un nombre entier compris entre 0 et 10 et de préférence égal à 6, un éthylène glycol ou un polyéthylèneglycol, de préférence un tétra ou hexaéthylèneglycol, un résidu aminoacyle ou peptidyle et en particulier une chaîne peptidique comprenant de 2 à 10 acides aminés ; Y représente un polymère choisi parmi les protéines, les polypeptides, les polynucléotides ou oligonucléotides et les polymères chimiques ; à la condition que si ledit conjugué comprend un dérivé insaturé de l'abiétane Y ne soit pas la BSA.

Par polymère, on entend une molécule ou une macromolécule constituée d'au moins deux unités monomères.

Ainsi, une protéine, est une macromolécule, d'origine naturelle ou obtenue par voie de synthèse ou par technique de recombinaison génétique, présentant une masse moléculaire moyenne d'environ au moins 200 daltons.

Un polypeptide correspond à un enchaînement d'au moins deux acides aminés, de préférence de 2 à 20 acides aminés et ses équivalents ; lesdits polypeptides étant obtenus et/ou par voie de synthèse chimique et/ou par fragmentation d'une protéine native à l'aide d'enzymes de restriction appropriées et/ou par recombinaison génétique. Un polypeptide est dit équivalent par rapport à un polypeptide de référence s'il présente sensiblement les mêmes propriétés, et notamment les mêmes propriétés antigéniques, immunologiques, enzymologiques et/ou de reconnaissance moléculaire. Est notamment équivalent à un polypeptide de référence : tout polypeptide possédant une séquence dont au moins un acide aminé est substitué par un acide aminé analogue, c'est à dire un acide aminé qui présente sensiblement les mêmes caractéristiques physico-chimiques qu'un acide aminé de référence ; tout polypeptide présentant une séquence peptidique équivalente, obtenue par variation naturelle ou induite du polypeptide de référence et/ou du fragment nucléotidique codant pour ledit polypeptide ; un mimotope, tout polypeptide dans la séquence duquel un ou plusieurs acides aminés de la série L sont remplacés par un ou plusieurs acides aminés de la série D et vice versa ; tout polypeptide dans la séquence duquel on a introduit une modification des chaînes latérales d'au moins un acide aminé, telle que par exemple une acétylation des fonctions amines, une carboxylation des fonctions thiols, une estérification des fonctions carboxyliques ; tout polypeptide dans la séquence duquel une ou des liaisons peptidiques ont été modifiées, comme par exemple les liaisons carba, rétro, inverso, rétro-inverso,

méthylène-oxy et tout polypeptide dont au moins un antigène est reconnu par un anticorps dirigé contre un peptide de référence.

Un polynucléotide ou oligonucléotide correspond à un enchaînement d'au moins deux unités monomères, en particulier
5 d'au moins cinq monomères et, de préférence de 5 à 22 monomères, avantageusement de 18 à 22 monomères et préférentiellement de 20 monomères, caractérisé par la séquence informationnelle des acides nucléiques naturels, susceptible de s'hybrider dans des conditions prédéterminées à un fragment
10 nucléotidique, l'enchaînement pouvant contenir des monomères de structures différentes et être obtenu par voie de synthèse chimique et/ou par fragmentation d'un acide nucléique naturel et/ou par recombinaison génétique. Ainsi, un monomère peut être un nucléotide naturel d'acide nucléique dont les éléments
15 constitutifs sont une base azotée, un sucre et un groupement phosphate, ou un nucléotide modifié dans l'un au moins des trois éléments constitutifs ; à titre d'exemple la modification peut intervenir au niveau des bases, générant des bases modifiées telles que l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la
20 désoxyuridine,, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine ou tout autre base modifiés permettant l'hybridation ; au niveau du sucre par exemple par le remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide (P.E. Nielsen et al., Science, 254,1497-1500
25 (1991)) ; au niveau du groupement phosphate par exemple par son remplacement par des esters choisis parmi les esters de diphosphate, d'alkyl et arylphosphonate et de phosphorothioate. Ces modifications peuvent être prises en combinaison.

Par « séquence informationnelle », on entend toute suite
30 ordonnée de monomères, dont la nature chimique et l'ordre dans un sens de référence constituent une information correspondant à celle des acides nucléiques naturels.

Un polymère chimique correspond à l'enchaînement d'au moins deux unités monomères, identiques ou différentes. De
35 préférence, il présente une masse moléculaire moyenne comprise

entre 1000 et 100 000. Ce polymère est de préférence choisi parmi les homopolymères d'anhydride maléique, les copolymères à base d'anhydride maléique, les copolymères à base de N-vinylpyrrolidone et les polysaccharides. En particulier, le polymère est choisi parmi les poly (anhydride maléique-éthylène), les poly (anhydride maléique-propylène), les poly (anhydride maléique-méthyl-vinyléther) (AMVE) ; le N-vinyl pyrrolidone-N-acryloxysuccinimide (NVP-NAS) et les polysaccharides.

10 Selon l'invention, X est avantageusement choisi parmi une chaîne aliphatique $(CH_2)_n$ dans laquelle n est un nombre entier égal à 6, un éthylène glycol, un tétra ou hexaéthylèneglycol, un résidu peptidyle comprenant de 2 à 10 acides aminés; et Y représente un polymère choisi parmi la BSA, les
15 oligonucléotides de 18 à 22 mers, les homopolymères d'anhydride maléique, les copolymères à base d'anhydride maléique, les copolymères à base de N-vinylpyrrolidone, les polysaccharides.

En particulier, le polymère est choisi parmi les oligonucléotides de 20 mers et en particulier l'oligonucléotide
20 dénommé sous la référence SEQ ID NO 2 et décrit ultérieurement dans l'exemple 5, les poly (anhydride maléique-éthylène), les poly (anhydride maléique-propylène), les poly (anhydride maléique-méthyl-vinyléther) (AMVE) et le N-vinyl pyrrolidone-N-acryloxysuccinimide (NVP-NAS). Avantageusement, le polymère est
25 couplé à au moins une protéine et/ou un polypeptide et/ou un oligonucléotide.

Les nouveaux conjugués dérivés de l'abiétane sont utilisables dans un grand nombre d'analyses. A titre d'exemple, lesdits conjugués dérivés de l'abiétane sont utilisés dans des
30 tests de diagnostic, tels que des essais immunologiques ou dans des essais utilisant la technologie des sondes ; dans le suivi d'une infection, par exemple d'une infection virale ; dans le suivi et/ou le dosage de produits chimiques et en particulier de produits potentiellement polluants.

A titre d'exemple, ils peuvent être utilisés dans un test de diagnostic immunologique comme marqueurs comme décrit au préalable pour les dérivés de l'abiétane ou dans des essais utilisant la technologie des sondes pour la détection et/ou la
5 quantification d'un fragment d'acide nucléique dans un échantillon biologique.

Dans la technologie des sondes, ils peuvent être utilisés indifféremment comme sondes de capture et/ou de détection. Ainsi dans la technologie dite sandwich, ils peuvent être
10 utilisés comme sonde de détection selon le protocole suivant : une sonde de capture est immobilisée sur un support solide, la phase de capture ainsi constituée est mise en contact avec la séquence cible de l'échantillon et avec un conjugué dérivé de l'abiétane qui consiste en un oligonucléotide couplé à un
15 dérivé de l'abiétane. Le complexe éventuellement formé est ensuite détecté par addition d'un anticorps dirigé contre le dérivé de l'abiétane, ledit anticorps étant marqué par tout marqueur approprié. Ils peuvent être également utilisés comme sonde de capture. A cet égard, le conjugué dérivé de l'abiétane
20 qui consiste en un oligonucléotide couplé à un dérivé de l'abiétane est immobilisé sur un support solide. La phase de capture ainsi constituée est mise en contact avec la séquence cible de l'échantillon et le complexe éventuellement formé est détecté par une sonde de détection marquée par tout marqueur
25 approprié. La capture peut être réalisée directement ou indirectement, c'est à dire soit le conjugué est immobilisé directement sur le support solide, soit il est immobilisé indirectement par couplage à un anticorps dirigé contre le dérivé de l'abiétane, fixé au préalable sur le support solide.
30 Bien entendu, la technique sandwich peut être effectuée en une étape ou deux étapes. De même, les conjugués de l'invention peuvent être utilisés pour la détection d'une séquence cible dans un échantillon à la fois comme sonde de capture et de détection. Il est à la portée de l'homme de l'art de définir la
35 séquence et la longueur de l'oligonucléotide du conjugué en

fonction de la séquence de la cible recherchée dans l'échantillon. Il est également à la portée de l'homme de l'art de définir des sondes de capture et/ou de détection spécifiques de la cible recherchée.

5 La présente invention a donc également pour objet un réactif et une composition diagnostiques comprenant en outre un conjugué tel que défini précédemment et l'utilisation dudit réactif dans un test de diagnostic.

10 Les conjugués de l'invention peuvent être utilisés également pour développer des phases de capture universelles. Par exemple, des anticorps dirigés contre un dérivé de l'abiétane sont immobilisés, directement ou indirectement, sur une phase ou un support solide et l'oligonucléotide du conjugué de l'invention est modifié par fixation à une de ses
15 extrémités, de préférence au niveau de l'extrémité 5', d'un dérivé de l'abiétane. La phase solide universelle est constituée par l'ensemble phase solide/anticorps dirigé contre un dérivé de l'abiétane. Un autre objet de l'invention est donc un dispositif comprenant outre la phase ou le support solide un
20 anticorps polyclonal ou monoclonal immobilisé directement ou indirectement sur la phase ou le support solide. L'anticorps est de préférence un anticorps monoclonal obtenu selon des techniques connues et en particulier selon la technique décrite dans l'exemple 10.

25 Un conjugué de l'invention comprenant un polymère chimique peut également être utilisé comme marqueur ou pour développer une phase de capture universelle, comme décrit précédemment.

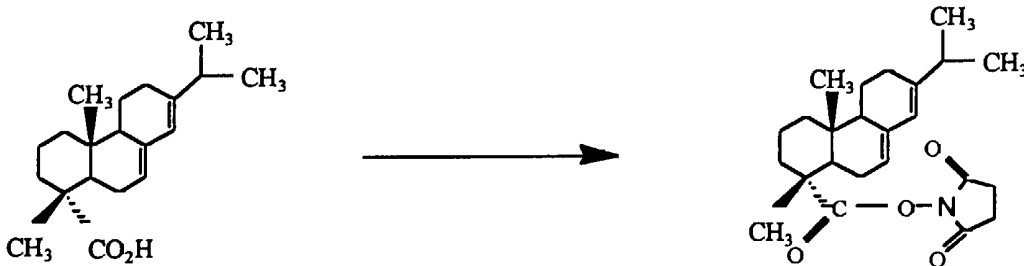
30 Un conjugué de l'invention peut être utilisé comme immunogène, pour l'immunisation d'organismes appropriés, tels que des animaux, pour la production d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux. L'invention a donc aussi pour objet un réactif et une composition diagnostiques comprenant en outre lesdits anticorps monoclonaux ou polyclonaux et de préférence des anticorps monoclonaux obtenus selon des techniques connues,
35 comme celle décrite à l'exemple 10. L'invention comprend

également l'utilisation dudit réactif dans un test de diagnostic.

Par ailleurs, un conjugué de l'invention peut être utilisé pour le dosage et/ou le suivi de produits chimiques, par technique de compétition ou par la technique dite sandwich. Ainsi, la présente invention a également pour objet une composition comprenant en outre un conjugué de l'invention et un anticorps polyclonal ou monoclonal obtenu par immunisation d'organismes appropriés à l'aide de l'immunogène précité, de préférence un anticorps monoclonal anti-acide abiétique obtenu par immunisation d'un animal selon des techniques connues, telles que celle décrite ultérieurement dans l'exemple 10. L'invention se rapporte également à l'utilisation d'une composition telle que définie précédemment pour le dosage et/ou le suivi de produits chimiques.

La figure annexée représente les signaux obtenus lors la détection en ELISA de l'antigène alpha foeto-protéine soit par utilisation d'un anticorps polyclonal anti- alpha foeto-protéine (symboles ronds), soit par utilisation d'un conjugué de l'invention AMVE/acide abiétique hydrazide/ anticorps polyclonal anti-alpha foeto-protéine (symboles carrés). En abscisse sont représentées les quantités d'alpha foeto-protéine en ng/ml et en ordonnée les DO à 492 nm.

Exemple 1 : synthèse de l'ester N-hydroxysuccinimide de l'acide abiétique



Dans un ballon monocol de 100 ml sous atmosphère d'azote, 1 gramme d'acide abiétique (3,3 mmol-1 équivalent (1 eq)) est dissout dans 40 ml de CH_2Cl_2 à la température de 0°C . 1,1 eq de N-hydroxysucciminide est ajouté. 1 eq de DDC est ensuite ajouté goutte à goutte, soit 0,825 ml d'une solution à 4 mol/l dans du CH_2Cl_2 anhydride. La réaction est effectuée pendant 5 h à -20°C , puis le milieu est dilué dans 200 ml d'éther et ensuite précipité pendant 24 h à -20°C . Après filtration sur verre fritté, les eaux mères sont évaporées. La purification est effectuée sur 75 fois le poids de silice en éluant avec le mélange pentane/AcEtOH/ CHCl_3 (65/25/10). 0,0998 gramme de l'ester $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{O}_4\text{N}$ est récupéré, soit un rendement de 75%.

$\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{O}_4\text{N}$

15 Mw=399.54 g/mole.

IR: (cm^{-1})

2957 ($\text{CH}_3, \text{CH}_2, \text{CH}$);

1777 ($\text{C}=\text{O}$ cycle NHS);

1740 ($\text{C}=\text{O}$ amide).

20 RMN:

^1H (ppm)

5,74 (s, CH); 5,3 (d, CH); 2,79 (s, CH_2 , NHS); 1,29 (s, CH_3); 1,01 (d, CH_3); 0,98 (d, CH_3); 0,82 (s, CH_3).

^{13}C (ppm)

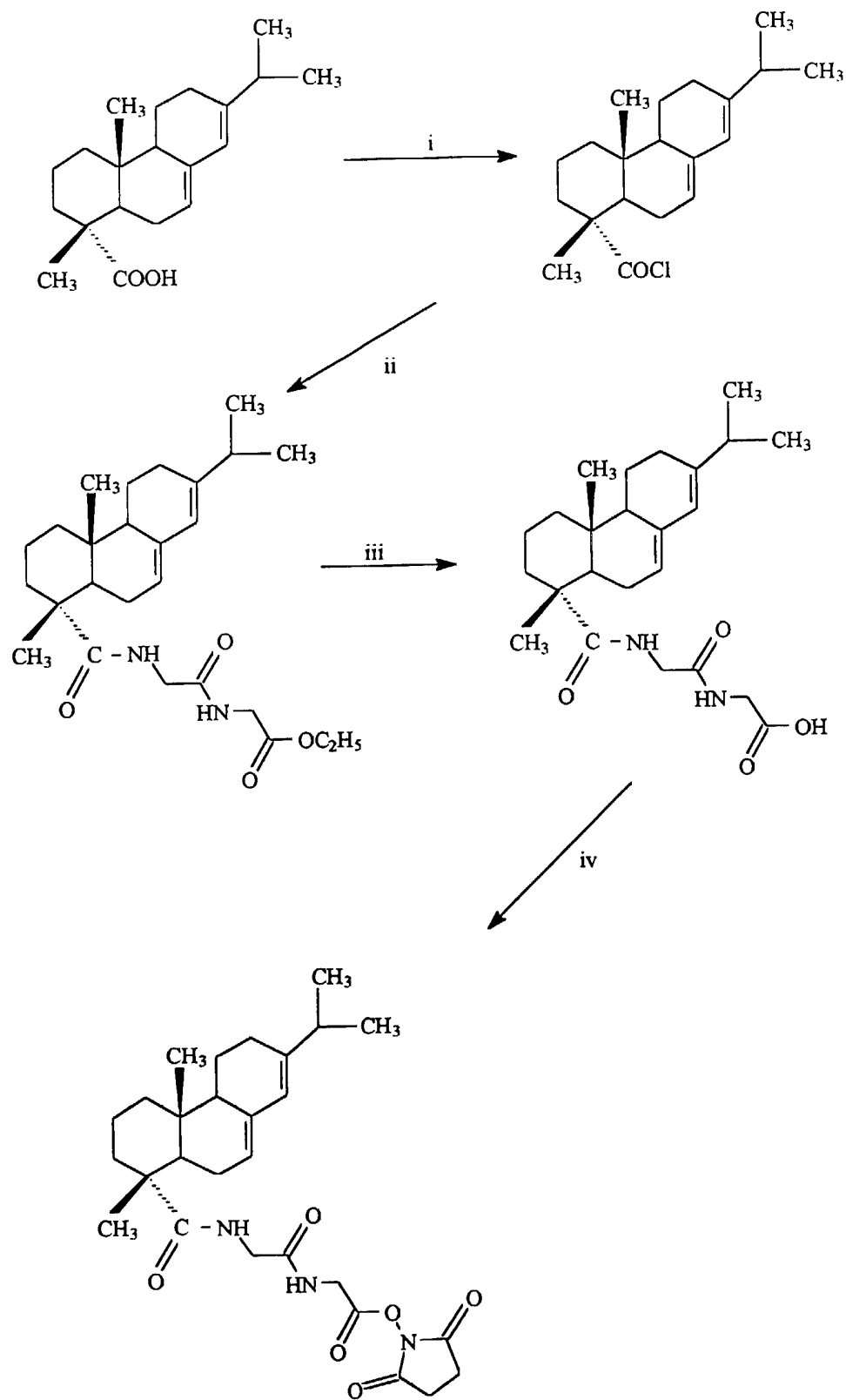
25 173,5 ($\text{C}=\text{O}$); 169,2 ($\text{C}=\text{O}$); 145 (C quater.); 135,2 (C quater.); 122,4 ($\text{CH}=\text{}$); 120,4 ($\text{CH}=\text{}$); 25,6 (CH_2 du NHS).

Exemple 2 : synthèse d'un dérivé glycyglycine activé de l'acide abiétique

30

La synthèse est effectuée selon le schéma réactionnel décrit ci-dessous :

15



Synthèse du chlorure d'acide (i):

5 L'acide abiétique est recristallisé avant de synthétiser le chlorure. Dans un ballon tricol de 100 ml sous atmosphère d'azote, 1,2 gramme d'acide abiétique (3,97 mmol-1eq) sont dissous dans 10 ml de toluène anhydre et refroidi à 0° C. 3 eq soit 1ml de chlorure d'oxalyle sont additionnés en solution
10 dans 3 ml de toluène anhydre . Après 15 min à 0° C, la réaction est laissée 2 h à température ambiante. Le milieu est cannulé dans un ballon monocol et le toluène est éliminé sous vide partiel, puis séché 2 h sous vide. Le produit sera utilisé tel quel pour l'étape suivante. La disparition totale de l'acide
15 est contrôlée en chromatographie sur couche mince (pentane/AcEtOH/CHCl₃ : 65/25/10). Par infrarouge, l'apparition d'une bande à 1775 cm⁻¹ montre la présence de chlorure d'acide (O=C-Cl), ce qui confirme la disparition de la bande acide à 1700 cm⁻¹ et de la bande OH à 3000 cm⁻¹. Le rendement est
20 quantitatif.

Couplage de l'ester éthylique du glycyL-glycine (ii):

1,95 gramme de l'ester éthylique du glycyL-glycine sous la forme d'hydrochlorure (9,92 mmol-1 eq) est dissous en présence
25 de triéthylamine (2 eq) dans 30 ml de dichlorométhane anhydre (distillé sur hydrure de calcium) dans un flacon tricol de 100 ml sous azote. Le chlorure de l'acide abiétique (9,92 mmol-1eq) solubilisé dans 15 ml de dichlorométhane anhydre est additionné lentement à la solution précédente. Lar réaction, elle est
30 laissée 7 h à température ambiante. Les sels d'amodium sont précipités dans 200 ml d'éther, puis filtrés sur verre fritté. Des lavages sont effectués avec HCl 0,1M, puis la phase organique est lavée par une solution saturée de NaCl avant d'être séchée sur Na₂SO₄. Après filtration, le solvant est

éliminé sous vide partiel. Le rendement global sur les deux étapes est de 83%.

Saponification de l'ester éthylique du glycyL-glycine (iii):

5 La saponification est réalisée en dissolvant environ 2 grammes d'ester dans 30 ml d'éthanol et en ajoutant lentement environ 5 ml de NaOH. Au bout de 2 h, l'ester a totalement disparu, ce qui est confirmé par les spots de Rf sur silice (éluant 70/30 : éther/acétone) (Rf ester=0,6 Rf acide=0). Le milieu est dilué
10 dans 250 ml d'eau puis lavé trois fois avec 50 ml d'éther. Après acidification par HCl 2N, le composé est extrait par trois fois avec 50 ml d'éther. La phase étherée est lavée avec du NaCl saturé, séchée sur Na₂SO₄, puis filtrée. Le rendement brut est de 86%.

15

Activation du dérivé glycyL-glycine sous forme d'ester N-hydroxysuccinimide (iv) :

0,2645 gramme de l'acide obtenu dans l'étape précédente (0,635 mmoles-1 eq) est dissous dans 40 ml de CH₂Cl₂, puis 0,111
20 gramme de N-hydroxysuccinimide est ajouté. Le milieu est refroidi sous atmosphère d'azote à 0° C et 0,63 ml de DCC en solution à 1M dans CH₂Cl₂ est versé en une fois. La réaction est maintenue à température ambiante pendant 5 h et la dicyclohexylurée est précipitée à -20° C pendant 24 h. Le
25 produit (C₂₈H₃₉O₆N₃) est filtré sur 20 fois le poids de silice en éluant par un mélange éther/acétone (80/20). Le rendement est de 20%.

SM (FAB+)

C₂₈H₃₉O₆N₃

30 MH⁺ (calc.)= 514.29169 g/mole.

MH⁺ (exp.)= 514.29171 g/mole.

IR: (cm⁻¹)

1643 (C=O amide II)

1740 (C=O amide)

1784, 1823 (C=O NHS)

2937 (CH₃, CH₂, CH)

3389 (NH amide)

RMN:

5 ¹H: (ppm)

0.79 (s, CH₃), 0.95 (d, J=1.6 Hz, CH₃), 0.98 (d, J=1.4 Hz, CH₃), 1.25 (s, CH₃), 2.79 (CH₂, N-hydroxysuccinimide), 4.34 (d, J=5.6 Hz, CH₂), 5.3 (CH), 5.74 (s, CH).

¹³C: (ppm)

10

Exemple 3 : Synthèse d'un dérivé hydrazide de l'acide abiétique

L'acide abiétique est activée au préalable sous forme de chlorure, comme décrit dans l'exemple 3. 0,53 g d'hydrazide t-
 15 BOC (4 mmoles) est dissout dans 10 ml de toluène anhydride auquel sont ajoutées 0,6 ml (2 eq) de triéthylamine sous atmosphère d'azote. 1 eq de chlorure d'acide en solution dans le toluène sont ajoutés au goutte à goutte à la température de 0° C. La réaction est laissée pendant 18 h à température
 20 ambiante. Après quoi, on observe l'apparition d'un précipité. Le milieu est acidifié par ajout de 4 ml de HCl 1 N, le précipité est filtré sur verre fritté. Le milieu est dilué dans 50 ml d'éther et après séchage sur Na₂SO₄, la phase organique est évaporée sous vide et séchée à la pompe. Le produit est
 25 filtré sur 20 fois le poids de silice en éluant avec un mélange hexane/acétone (80/20). Le produit est isolé avec un rendement de 47 %.

L'hydrazide t-BOC est clivé dans le dioxanne anhydre par une solution d'HCl anhydre à 4M dans le dioxane-anhydre. Après 20 h
 30 à température ambiante, un précipité apparaît. Un bullage d'azote permet d'entraîner l'HCl restant. L'évaporation au rotavap élimine l'acide et le dioxanne. Le résidu est ensuite repris dans de l'éther puis filtré sur verre fritté. Le rendement en brut est de 54 %.

Exemple 4 : Synthèse d'un dérivé glycyglycine hydrazide de l'acide abiétique

5 1 ml d'hydrate d'hydrazine (19 mmole-21 eq) en solution dans 5 ml de dioxanne anhydre sont agités vigoureusement. 0,4777 g d'ester obtenu selon l'exemple 3 (0,93 mmol-1 eq) en solution dans 45 ml de dioxanne anhydre sont ajoutés en 1 h 30. Un précipité apparaît après 50 min de réaction. Après 4 h de
10 réaction, le milieu est précipité dans 250 ml d'éther, la filtration permet d'isoler un composé qui est repris dans CHCl_3 puis séché sous vide après concentration. La dissolution dans CHCl_3 est suivie d'une reprecipitation dans l'éther et 200 mg de produit sont isolés, soit un rendement de 49 %.

15 **IR:** (cm^{-1})
1655 (C=O amide II)
2932 (CH_3 , CH_2 , CH)
3319 (NH, NH_2 bande large)

20 Exemple 5 : couplage de l'ester N-hydroxysuccinimide de l'acide abiétique sur un oligonucléotide

Des oligonucléotides sont synthétisés sur un appareil automatique 394 de la société APPLIED BIOSYSTEMS en utilisant
25 la chimie des phosphoramidites selon le protocole du constructeur. Pour permettre le couplage d'un oligonucléotide à l'ester N-hydroxysuccinimide de l'acide abiétique sur une position bien déterminée, des fonctions réactives sont introduites sur l'oligonucléotide par l'intermédiaire de bras
30 de liaison compatibles avec la synthèse automatique, comme décrit dans le brevet FR 93 07093 dont l'enseignement est inclus à titre de référence.

Les oligonucléotides suivants ont été synthétisés :

SEQ ID NO	Nucléotide (*)	Tr (**)
1	bêta	19,54
2	bêta	18,45
3	bêta	19,85
4	alpha	23,21
5	alpha	20,04

SEQ ID NO 1 :

ACTAAAAACT AGTAATGCAA AG 22 mers

5 SEQ ID NO 2 :

ATGTCACGAG CAATTAAGCG 20 mers

SEQ ID NO 3 :

ACTAAAAACT AGNAATGCAA AG 22 mers

SEQ ID NO 4 :

10 ACCCCGAGAT TTACGTTATG T 21 mers

SEQ ID NO 5 :

TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT 20 mers

(*) les nucléotides bêta sont des nucléotides naturels (la liaison glycosidique est sous la forme anomérique bêta). Les
 15 nucléotides alpha sont des nucléotides non naturels (la liaison glycosidique est sous la forme anomérique alpha). Les oligonucléotides contenant les nucléotides alpha ont été préparés selon la technique décrite dans la demande de brevet PCT W088/04301, dont le contenu est incorporé à titre de
 20 référence.

(**) Tr représente le temps de rétention en minutes de l'oligonucléotide dans les conditions décrites dans le brevet FR 93 07093 cité précédemment.

25 200µg de l'oligonucléotide de synthèse SEQ ID NO 2 sont dissous dans 25 µl de tampon carbonate, 0,2 M/NaCl 0,15 M, pH=8,8. 500 µl d'une solution de l'ester C₂₄H₃₃O₄N à 2,5 mg/ml dans du DMSO anhydre sont ajoutés à la solution de

l'oligonucléotide. Le mélange est agité vigoureusement puis
laissé pendant 4 h à 50° C sur un thermo-mixeur. 10 µl NH₄Cl 1M
pH=6 sont ajoutés en fin de réaction. Le milieu est séché au
speed-vac, puis repris dans de l'eau. Trois extractions par du
5 butanol sont effectuées pour éliminer ce qui n'a pas réagi.
Après lyophilisation, le l'oligonucléotide est repris dans de
l'eau bidistillée et analysé par HPLC en phase inverse sur une
colonne RP300 avec l'éluant suivant : TEAA 0,1M - TEAA
0,1M/CH₃CN (50/50). Le profil du chromatogramme montre la
10 présence d'oligonucléotide non modifié et un massif de pics
plus hydrophobes contenant l'oligonucléotide couplé à l'ester.
Le rendement estimé par intégration de l'aire des pics et en
considérant que les coefficients d'extinction moléculaire sont
identiques est de 40%.

15

Exemple 6 : Couplage de l'ester C₂₈H₃₉O₆N₃ sur un
oligonucléotide

Le protocole est identique à celui décrit dans l'exemple
20 5. 20% de rendement en produit isolé sont obtenus après les
extractions au butanol. La purification est effectuée en HPLC.

Exemple 7 : Couplage du dérivé glycyglycine hydrazide sur le
polymère AMVE

25

100 µl (1 mg) d'une solution à 10 mg/ml d'AMVE dans le
DMSO anhydre sont mis à réagir avec 200 µl (0,2 mg) d'hydrazide
glycyl-glycine d'acide abiétique en présence de 20 µl de DIEA
et 680 ml de DMSO. La réaction est laissée 17 h à 37 ° C.

30

Exemple 8 : Couplage de l'ester C₂₄H₃₃O₄N sur la BSA

20 mg de BSA (fraction 5-Sigma) sont dissous dans 1 ml de
tampon carbonate 0,2 M/NaCl 0,5 M, pH = 8,2. A 40 µl de cette
35 solution (1,212 x 10⁻⁸ mol) sont ajoutés 960 µl d'une solution

d'ester obtenu selon l'exemple 1 à 1 mg/ml (soit 200 eq) dans le DMSO anhydre. Après agitation vive, l'épendorf est agité pendant 5 h à 37° C sur un thermomixeur. Le mélange est dilué dans un grand volume d'eau, puis filtré sur Centricom (nom commercial) PM30 à 7 TPM. L'opération est répétée 3 fois pour éliminer l'ester n'ayant pas réagi et les produits d'hydrolyse, ainsi que pour entraîner le DMSO. Le résidu est séché au speed-vac puis repris dans un volume de 1 ml d'eau bidistillée. Le conjugué est dosé après dilution en mesurant la DO à 280 nm.

10 Le conjugué obtenu sera injecté à des souris pour induire une réponse immunitaire et la production d'anticorps monoclonaux, comme décrit dans l'exemple 10.

Exemple 9 : Couplage de l'ester $C_{28}H_{39}O_6N_3$ sur la BSA

15 Le protocole est identique à celui décrit dans l'exemple précédent. Le couplage met en jeu 40 ou 80 eq d'esters NHS. Les conjugués obtenus seront injectés à des souris pour induire une réponse immunitaire et la production d'anticorps monoclonaux, comme décrit dans l'exemple qui suit.

20

Exemple 10 : Obtention d'anticorps monoclonaux anti-acide abiétique

Un antigène de l'acide abiétique couplé sur de la BSA
25 comme décrit respectivement dans les exemples 10 et 11 est utilisé comme immunogène. Chacun des antigènes a été injecté à des souris femelles de l'espèce BALB/C et de la souche BALB/C BYJICO. Les souris sont immunisées à 15 jours d'intervalle à l'aide de trois injections par voie intrapéritonéale associant
30 respectivement 50 μ g d'antigène et de l'adjuvant complet de Freund pour la 1^{ère} injection et de l'adjuvant incomplet de Freund pour les autres injections. La fusion est réalisée avec la lignée myélomateuse SP2/O-AG14, selon la technique classique décrite par Köhler et Milstein (Nature 256, 495-497 1975).

Les cellules ont été cultivées en utilisant un milieu de base: Iscove's Modified Dulbecco Medium (IMDM) additionné de bicarbonate de sodium (3024 mg/l), de 10% de sérum de veau foetal (SVF), pH 6,7 à 7,3. Les réactifs additionnels suivants
5 ont été ajoutés: insuline 4 mg/l, 2-mercaptoéthanol (10 μ M), éthanolamine (20 μ M), pénicilline (100 U/ml), et streptomycine (50 μ g/ml). Les cellules hétéroplloïdes obtenues ont été sub-cultivées tous les deux ou trois jours et congelées dans le milieu IMDM additionné de 10% de sérum de veau foetal (SVF) et
10 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO commercialisé par Sigma) d'abord à -80°C pendant 24 à 72 heures, puis conservées dans de l'azote liquide à -180°C.

La concentration cellulaire est de $3,6 \times 10^6$ cellules par ampoule (2×10^6 cellules/ml).

15 La production d'anticorps in vivo a été effectuée par injection intrapéritonéale des lignées d'hybridomes obtenues dans des souris femelles ayant de 4 à 6 semaines, de l'espèce BALB/C, de la souche BALB/C BYJICO.

20

Exemple 11 : Criblage des anticorps anti-acide abiétique

Un criblage a été effectué par la technique ELISA indirect
25 comme suit :

des plaques de polystyrène Maxisorb NUNC (commercialisées par la société Polylabo Paul Block sous la référence 4-39454) sont sensibilisées avec 100 μ l d'acide abiétique couplé à un oligonucléotique (ODN) comme décrit dans l'exemple 2 à 0,25
30 μ g/ml d'acide abiétique-ODN dans du tampon PBS x 3 (NaCl 0,45 M ; phosphate de sodium 0,15 M ; pH7,0). Les plaques ont été incubées une nuit à 22°C ou une heure à 37° C. Les plaques ont été saturées avec 100 μ l de tampon PBS (50mM phosphate et 150mM NaCl, pH 7,2) additionné de 1% d'extrait de lait lyophilisé
35 (Régilait) durant 1 heure à 37°C. 100 μ l d'anticorps, dilués

dans du PBS-Tween 20 à 0,05 % ont été ajoutés et incubés une heure à 37°C. 100 µl d'immunoglobulines anti-Ig totales de souris conjuguées à la phosphatase alcaline (Jackson Laboratories référence 115-055-062) dilués au 1/2000 dans du tampon PBS-BSA 1% (phosphate buffer saline-bovine sérum albumine) ont été ajoutés et incubés pendant une heure à 37°C. La révélation a été effectuée par addition de 100 µl de p-nitrophénylphosphate ((pNPP), commercialisé par bioMérieux, référence 60002990) à la concentration de 2 mg/ml dans de la DEA-HCl (commercialisé par bioMérieux, référence 60002989), pH 9,8, et incubation pendant 30 minutes à 37°C. La réaction a ensuite été bloquée avec 100 µl de NaOH 1N. Trois lavages ont été effectués entre chaque étape avec 300 µl de PBS-Tween 20 à 0,05 % et un lavage supplémentaire a été réalisé en eau distillée avant d'ajouter le pNPP.

Exemple 12 : Couplage de l'ester $C_{28}H_{39}O_6N_3$ sur un anticorps anti-alpha-foeto-protéine (anti-AFP)

Le dérivé N-hydroxysuccinimide est couplé à un anticorps monoclonal anti-AFP dans un mélange tampon borate de sodium 0,1M pH 9,2 contenant 8% en volume de diméthylsulfoxyde. Le rapport molaire anticorps/dérivé est 1/45. Le milieu réactionnel est agité 4 heures à température ambiante, avant d'être dialysé contre du PBS.

- Mise en évidence immunologique du greffage du dérivé de l'acide abiétique sur l'anticorps.

Les puits d'une plaque de microtitration NUNC MAXISORB sont sensibilisés pendant deux heures à 37°C avec une solution de l'anticorps obtenu précédemment dilué à 10µg/ml dans un tampon carbonate 50 mM.. Après lavage au PBS- 0.5% Tween 20, des solutions d'anticorps anti-acide abiétique marqués à la peroxydase dilués dans du PBS-Tween contenant 10% en volume de sérum de cheval sont incubées une heure à 37°C. Après lavages, on ajoute le substrat enzymatique, o-phénylène diamine, la

réaction colorimétrique est stoppée par ajout d'acide sulfurique 1N. L'intensité de la coloration est lue à 492 nm sur un lecteur Axia Micro-reader, bioMérieux. Les signaux spécifiques obtenus sont de 2500 milliabsorbances.

5

Exemple 13 : Couplage du dérivé glycyL-glycine hydrazide sur polymère et greffage sur anticorps anti-alpha foeto protéine (AFP)

10 10 μ l (150 μ g) d'une solution à 15 mg/ml d'AMVE dans du DMSO anhydre sont mis à réagir avec 10 μ l (2 μ g) d'hydrazide glycyL-glycine de l'acide abiétique en présence de 980 μ l de DMSO anhydre. Le mélange est agité vivement pendant 5 min, puis 15 μ l de ce milieu sont additionnés à 1 ml d'anticorps anti-AFP
15 polyclonal à 0,5 mg/ml dans un tampon Tris 50 mM, pH = 9,2. Le couplage est effectué pendant 1 nuit à 37° C.

Exemple 14 : Couplage de l'acide abiétique et d'un anticorps polyclonal de lapin anti-alpha foeto-protéine sur la copolymère

20 AMVE

Dans 1 ml de diméthylsulfoxyde (DMSO), sont dissoutes successivement 22 nmoles de copolymère AMVE (masse molaire 67 000 g/mole) puis 16 μ moles du dérivé hydrazide issu de
25 l'exemple 3. Après 20 minutes d'agitation du mélange réactionnel à température ambiante, 15 μ l de la solution sont prélevés et ajoutés à 1 ml de solution d'anticorps à 0,5 g/l dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 9,2. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 12 heures. Les conjugués
30 sont conservés en l'état à +4°C.

Le greffage de l'acide abiétique et de l'anticorps polyclonal sur le copolymère AMVE est contrôlé par un test immunologique comme suit :

Un anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'acide
35 abiétique obtenu selon l'exemple 10 est dilué à la

concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ dans un tampon carbonate 50 mM. Les puits d'une plaque de microtitration NUNC MAXISORB sont sensibilisés avec cet anticorps pendant deux heures à 37°C. Après lavages au PBS (Phosphate Buffer Saline)- 0.5% Tween 20, des solutions de complexes AMVE/anticorps polyclonal de lapin anti-alpha foeto-protéine/dérivé hydrazide de l'acide abiétique dilués dans du PBS-Tween contenant 10% en volume de sérum de cheval sont incubées une heure à 37°C. Deux possibilités de détection sont possibles à ce niveau de l'expérience :

10 - Détection de la fixation du dérivé hydrazide de l'acide abiétique

Après trois lavages au PBS-Tween, on incube une heure à 37°C avec un anticorps monoclonal anti-acide abiétique conjugué à la Peroxydase dilué au 1/1500° dans du PBS-Tween contenant 10% en volume de sérum de cheval. Après lavages, on ajoute le substrat enzymatique, o-phénylène diamine, la réaction colorimétrique est stoppée par ajout d'acide sulfurique 1N. L'intensité de la coloration est lue à 492 nm sur un lecteur Axia Micro-reader, bioMérieux. Les valeurs de Densité Optique obtenues sont de 20 2500 milliAbsorbance pour les échantillons et de 170 pour le contrôle négatif, prouvant ainsi que le dérivé hydrazide de l'acide abiétique s'est bien fixé sur le polymère.

- Détection de la fixation de l'anticorps polyclonal sur le copolymère AMVE.

25 Après trois lavages au PBS-Tween, on incube une heure à 37°C avec un anticorps anti-anticorps de chèvre conjugué à la Peroxydase dilué au 1/3000° dans du PBS-Tween contenant 10% en volume de sérum de cheval. Après lavages, on ajoute le substrat enzymatique, o-phénylène diamine, la réaction colorimétrique est stoppée par ajout d'acide sulfurique 1N. L'intensité de la coloration est lue à 492 nm sur un lecteur Axia Micro-reader, bioMérieux. Les valeurs de Densité Optique lues sont de 30 2500 milliAbsorbance pour les échantillons et de 25 pour le contrôle négatif, prouvant ainsi que l'anticorps polyclonal anti AFP s'est bien fixé sur le polymère.

Cet exemple montre que l'on peut détecter par une technique sandwich des polymères porteurs de l'acide abiétique.

Exemple 15 : Amplification du signal de détection de l'antigène alpha foeto-protéine par les complexes mixtes AMVE/dérivé hydrazide de l'acide abiétique/anticorps polyclonal anti-alpha foeto-protéine.

Un anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'alpha foeto-protéine (AFP) est dilué à la concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ dans un tampon carbonate 50 mM. Les puits d'une plaque de microtitration NUNC MAXISORB sont sensibilisés pendant deux heures à 37°C avec cet anticorps. Après lavage au PBS- 0.5% Tween 20, des solutions d'antigène AFP dilué dans du PBS-Tween contenant 10% en volume de sérum de cheval sont incubées une heure à 37°C. A ce stade deux procédés de détection sont envisageables, soit d'une façon non amplifiée, soit en utilisant le complexe mixte précédemment obtenu pour accroître le niveau de signal.

- Détection simple de l'antigène AFP

Après trois lavages au PBS-Tween, on incube une heure à 37°C l'anticorps polyclonal anti - AFP conjugué à la Peroxydase dilué au 1/3000° dans du PBS-Tween contenant 10% en volume de sérum de cheval. Après lavages, on ajoute le substrat enzymatique, o-phénylène diamine, la réaction colorimétrique est stoppée par ajout d'acide sulfurique 1N. L'intensité de la coloration est lue à 492 nm sur un lecteur Axia Micro-reader, bioMérieux. Les valeurs de densité optique (DO), lues à 492 nm sur l'Axia micro-reader de bioMérieux, pour les échantillons sont rapportées dans la figure annexée.

- Détection amplifiée par le polymère de l'antigène AFP

Après trois lavages au PBS-Tween, on fait incuber une heure à 37°C le conjugué mixte polymère/acide abiétique hydrazide/ anticorps polyclonal anti-AFP dilué au 1/50° dans du PBS-Tween contenant 10% en volume de sérum de cheval. Après lavages, on incube pendant une heure à 37°C un anticorps anti-acide

abiétique marqué à la peroxydase. Après lavages, on ajoute le substrat enzymatique, o-phénylène diamine. La réaction colorimétrique est stoppée par ajout d'acide sulfurique 1N. L'intensité de la coloration est lue à 492 nm sur un lecteur
5 Axia Micro-reader, bioMérieux. Les valeurs de DO, lues à 492 nm sur l'Axia micro-reader de bioMérieux, pour les échantillons sont rapportées dans la figure annexée.

Les résultats montrent que l'utilisation de polymère permet d'amplifier les signaux de détection lors de l'utilisation
10 d'une technique ELISA.

Exemple 16 : Essai en compétition avec des hormones naturelles

Un test ELISA en compétition a été effectué selon la
15 technique décrite dans le brevet FR 93 07093 cité précédemment en utilisant les hormones naturelles T3, T4, progestérone, testostérone et oestradiol. Bien que les hormones stéroïdiennes présentent une analogie de structure avec l'acide abiétique, il ne faut pas que les anticorps développés présentent des
20 réactions croisées avec ces hormones.

La phase antigène a été obtenue comme décrit dans l'exemple 11, puis on incube une heure à 37°C des concentrations croissantes d'hormone dissoute dans une solution à 5 µg/ml d'un anticorps anti-acide abiétique dans du PBS-Tween
25 contenant 10% en volume de sérum de cheval. Après lavages au PBS Tween, un anticorps anti-anticorps de souris couplé à la peroxydase en solution dans du PBS Tween - cheval est incubé une heure à 37°C. Après lavages, on ajoute le substrat enzymatique, o-phénylène diamine La réaction colorimétrique est
30 stoppée par ajout d'acide sulfurique 1N. L'intensité de la coloration est lue à 492 nm sur un lecteur Axia Micro-reader, bioMérieux.

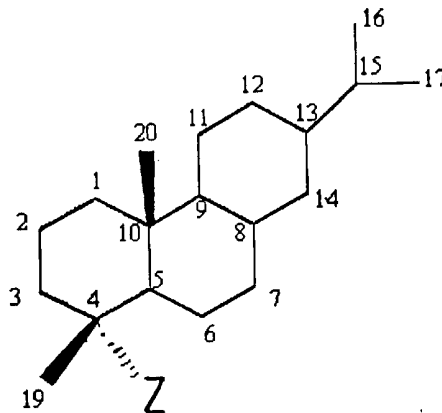
Les résultats montrent qu'il n'y a pas d'inhibition avec les hormones stéroïdiennes telles que ~~œ~~estradiol, testostérone
35 et progestérone. Par contre on observe une réaction croisée

avec les hormones thyroïdiennes T3 et T4. On obtient 25% d'inhibition pour une concentration de 0,33 μ mole/ml d'hormone ce qui est bien au delà des concentrations physiologiques en hormone totale (c'est à dire libre et liée) qui sont
5 respectivement de 2 - 4 nmole/l pour la T3 et 50 - 100 nmole/l pour la T4. Ces résultats permettent de conclure que les anticorps anti-acide abiétique sont très spécifiques et peuvent être utilisés dans le domaine de l'analyse sans risque de réaction croisée.

REVENDEICATIONS

1. Dérivé saturé ou insaturé de l'abiétane de formule générale (I)

5



dans laquelle Z est choisi dans le groupe consistant en $-\text{COOR}^5$, $-\text{CONR}^1\text{R}^2$, $-\text{COONR}^3\text{R}^4$, $-\text{COR}^6$, $-\text{CON}$, $-\text{COOR}^5$, $-\text{CHOHR}^7$, $-\text{SR}^8$, $-\text{OR}^8$, $-\text{CN}$, $-\text{CNO}$, $-\text{CNS}$, $-\text{NCO}$, $-\text{NCS}$, $-\text{R}^1\text{R}^2\text{CR}^9$;

dans lesquels R^1 , R^2 , R^3 et R^4 , indépendamment les uns des autres représentent un atome d'hydrogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical aryle de préférence comprenant de 6 à 20 atomes de carbone, éventuellement substitué ; un radical alcène comprenant de 7 à 10 atomes de carbone ; un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone ; un radical aminoacyle ou peptidyle éventuellement substitué, ou R^1 et R^2 ou R^3 et R^4 ensemble peuvent former un cycle ou un hétérocycle ; R^5 représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical aryle, éventuellement substitué, comprenant de 6 à 20 atomes de carbone ; R^6 représente un atome d'hydrogène, un halogène, un radical alkyle comprenant de 1 à

10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical aryle, éventuellement substitué, comprenant de 6 à 20 atomes de carbone; R^7 représente un atome
5 d'hydrogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone ; R^8 représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un
10 radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone; et R^9 est choisi parmi -CN, -CNO, -CNS, -NCO et -NCS ;

à la condition que si ledit dérivé de l'abiétane est un dérivé insaturé, Z ne représente pas un radical acide
15 carboxylique.

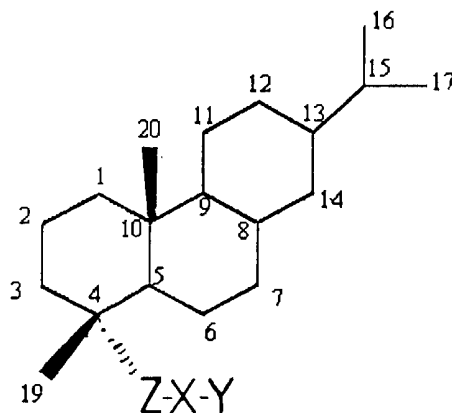
2. Dérivé selon la revendication 1, dans lequel le radical alkyle comprend 6 atomes de carbone et la radical aryle comprend de 6 à 14 atomes de carbone.

3. Dérivé selon les revendications 1 et 2, dans lequel
20 $-\text{COONR}^3\text{R}^4$ représente un ester de N-hydroxysuccinimide, $-\text{COR}^6$ représente un chlorure d'acide, $-\text{CONR}^1\text{R}^2$ représente un groupement amide N-substitué dans lequel R^1 et R^2 indépendamment l'un de l'autre représente un atome d'hydrogène, un radical polyéthylèneglycol, un radical peptidyle
25 éventuellement substitué comprenant de 2 à 6 résidus aminoacyles et $-\text{COOR}^5$ est un ester de polyéthylèneglycol.

4. Dérivé selon la revendication 3, dans lequel R^1 et R^2 indépendamment l'un de l'autre représente un atome d'hydrogène, un radical tétraéthylèneglycol, un radical
30 hexaéthylèneglycol ou un radical glycyglycine et $-\text{COOR}^5$ est choisi parmi les esters de tétraéthylèneglycol et d'hexaéthylèneglycol.

5. Dérivé selon la revendication 4, dans lequel le radical glycyglycine est substitué par la N-
35 hydroxysuccinimide.

6. Conjugué dérivé de l'abiétane selon la formule (II)



- 5 dans laquelle Z est choisi dans le groupe consistant en $-\text{COOR}^5$, $-\text{CONR}^1\text{R}^2$, $-\text{COONR}^3\text{R}^4$, $-\text{COR}^6$, $-\text{CON}$, $-\text{COOR}^5$, $-\text{CHOHR}^7$, $-\text{SR}^8$, $-\text{OR}^8$, $-\text{CN}$, $-\text{CNO}$, $-\text{CNS}$, $-\text{NCO}$, $-\text{NCS}$, $-\text{R}^1\text{R}^2\text{CR}^9$;
- dans lesquels R^1 , R^2 , R^3 et R^4 , indépendamment les uns des autres représentent un atome d'hydrogène, un radical alkyle
- 10 comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical aryle comprenant de 6 à 20 atomes de carbone, éventuellement substitué ; un radical alcène comprenant de 7 à 10 atomes de carbone ; un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone ; un radical aminoacyle ou peptidyle éventuellement
- 15 substitué, ou R^1 et R^2 ou R^3 et R^4 ensemble peuvent former un cycle ou un hétérocycle ; R^5 représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne e comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un
- 20 radical aryle, éventuellement substitué, comprenant de 6 à 20 atomes de carbone ; R^6 représente un atome d'hydrogène, un halogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de
- 25 carbone, un radical aryle, éventuellement substitué, comprenant de 6 à 20 atomes de carbone ; R^7 représente un atome

d'hydrogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone ; R^8 représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle
 5 comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone; et R^9 est choisi parmi -CN, -CNO, -CNS, -NCO et -NCS ;

X est choisi parmi une chaîne aliphatique $(CH_2)_n$ dans
 10 laquelle n est un nombre entier compris entre 0 et 10, un éthylène glycol ou un polyéthylèneglycol,, un résidu aminoacyle ou peptidyle;

Y représente un polymère choisi parmi les protéines, les polypeptides, les oligonucléoties ou polynucléotides et les
 15 polymères chimiques ;

à la condition que si ledit conjugué comprend un dérivé insaturé de l'abiétane Y ne soit pas la BSA.

7. Conjugué selon la revendication 6, dans lequel -
 $COONR^3R^4$ représente un ester de N-hydroxysuccinimide, $-COR^6$
 20 représente un chlorure d'acide, $-CONR^1R^2$ représente un groupement amide N-substitué dans lequel R^1 et R^2 indépendamment l'un de l'autre représente un atome d'hydrogène ou un radical peptidyle éventuellement substitué comprenant de 2 à 6 résidus aminoacyles.

25 8. Conjugué selon la revendication 6, dans lequel le radical peptidyle est un radical glycyL-glycine et avantageusement le radical glycyL-glycine est substitué par la N-hydroxysuccinimide.

9. Conjugué selon l'une quelconque des revendications
 30 6, 7 ou 8, dans lequel X est choisi parmi $(CH_2)_6$, un éthylèneglycol, un polyéthylèneglycol, un radical peptidyle comprenant de 2 à 10 résidus aminoacyles et Y représente un polymère choisi parmi la BSA, les oligonucléotides de 18 à 22 mers, les homopolymères d'anhydride maléique, les copolymères à

base d'anhydride maléique, les copolymères à base de N-vinylpyrrolidone et les polysaccharides.

10. Conjugué selon la revendication 9, dans lequel le polymère est choisi parmi les oligonucléotides de 20 mers et
5 avantageusement l'oligonucléotide SEQ ID NO 2, les poly (anhydride maléique-éthylène), les poly (anhydride maléique-propylène), les poly (anhydride maléique-méthyl-vinyléther) (AMVE) et le N-vinyl pyrrolidone-N-acryloxysuccinimide (NVP-NAS).

10 11. Conjugué selon la revendication 10, dans lequel le polymère est couplé à au moins une protéine et/ou un polypeptide et/ou un oligonucléotide.

15 12. Procédé pour l'obtention d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux, selon lequel on immunise un organisme approprié, selon des techniques connues, avec un conjugué tel que défini dans les revendications 6 à 11.

20 13. Réactif, comprenant en outre un dérivé tel que défini selon les revendications 1 à 5, ledit dérivé étant couplé à une protéine choisie parmi les polypeptides, les antigènes et les anticorps.

14. Réactif, comprenant en outre un anticorps monoclonal ou polyclonal obtenu selon le procédé de la revendication 12, ledit anticorps étant immobilisé sur un support solide et/ou marqué par tout marqueur approprié.

25 15. Utilisation d'un réactif tel que défini selon les revendications 13 et/ou 14 dans un test de diagnostic.

16. Composition diagnostique comprenant en outre un réactif tel que défini selon les revendications 13 et/ou 14.

30 17. Réactif, comprenant en outre un conjugué tel que défini selon les revendications 6 à 11.

18. Utilisation d'un réactif tel que défini selon les revendications 14 et/ou 17 dans un test de diagnostic.

19. Composition diagnostique comprenant en outre un réactif tel que défini selon les revendications 14 et/ou 17.

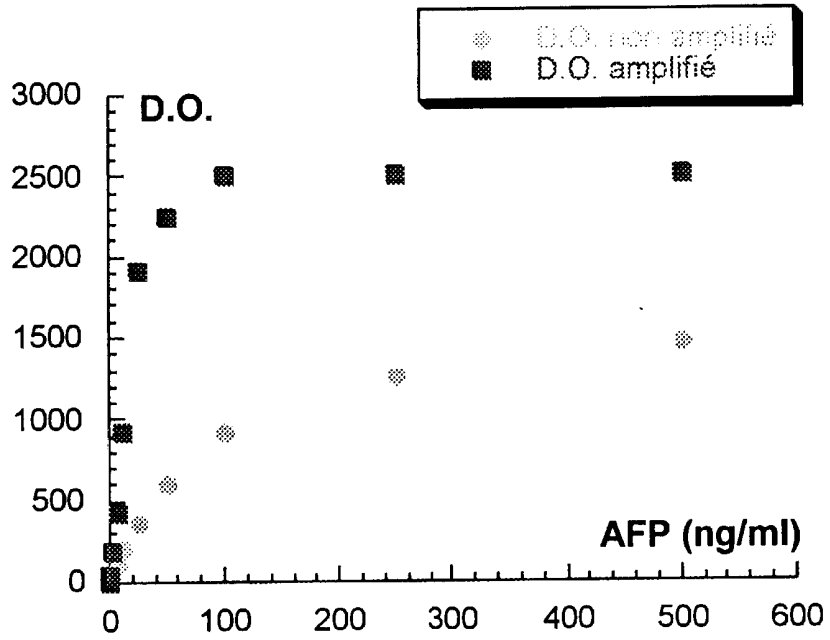
20. Dispositif comprenant outre un support solide un anticorps monoclonal ou polyclonal obtenu selon le procédé de la revendication 12 immobilisé directement ou indirectement sur ledit support solide.

5 21. Composition pour le dosage et/ou le suivi de produits chimiques comprenant en outre un conjugué tel que défini dans les revendications 6 à 11 et un anticorps obtenu selon le procédé de la revendication 12.

10 22. Composition selon la revendication 21, dans laquelle ledit conjugué comprend un polymère tel que défini dans l'une des revendication 10 et 11.

 23. Utilisation d'une composition selon les revendications 21 et 22 dans un test pour le dosage et/ou le suivi de produits chimiques.

///



RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 563537
FR 9810084

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	DEREK H. R. BARTON ET L.: "New and Improved Methods for the Radical Decarboxylation of Acids" JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, CHEMICAL COMMUNICATIONS., no. 17, 1983, pages 939-941, XP002100080 LETCHEWORTH GB * page 939; exemple 24; tableau 1 * * page 940; exemple 24; tableau 2 *	1-4
X	BRIAN E. CROSS ET AL.: "Preparation of the 15,6alpha-Lactone from 8beta,13beta-Tetrahydroabietic acid" JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, PERKIN TRANSACTIONS 1., 1981, pages 3158-3160, XP002100081 LETCHEWORTH GB * page 3158; exemples 1-4 * * page 1981, colonne 1, ligne 11 - colonne 2, ligne 10 *	1-4
X	DE 25 19 943 A (NIPPON SHINYAKU) 4 décembre 1975 * exemples *	1-3
X	FR 2 282 872 A (NIPPON SHINYAKU) 26 mars 1976 * exemples *	1-3
X	DE 25 21 088 A (NIPPON SHINYAKU) 27 novembre 1975 * exemples *	1-3
-/--		
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C07C C07D C07K C12Q G01N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
16 avril 1999		Zervas, B
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>& : membre de la même famille, document correspondant</p>		

2

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 563537
FR 9810084

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 69, no. 9, 26 août 1968 Columbus, Ohio, US; abstract no. 36282g, I. I. BARDYSHEV ET AL.: "Preparation and study of abietic acid anhydride" page 3396; colonne 2; XP002100082 * abrégé * & DOKL. AKAD. NAUK BELORUSS. SSR, vol. 12, no. 4, 1968, pages 344-347, ---	1,2
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 70, no. 9, 3 mars 1969 Columbus, Ohio, US; abstract no. 35043p, E. N. SHMIDT ET AL.: "High-boiling natural compounds from oleoresin of Pinus silvestris" page 81; colonne 2; XP002100083 * abrégé * & IZV. SIB. OTD. AKAD. NAUK SSSR, SER. KHIM. NAUK , no. 4, 1968, pages 144-146, ---	1,2
A	US 5 395 938 A (K. RAMAKRISHNAN) 7 mars 1995 * le document en entier *	1-23
A	US 5 132 242 A (SAU W. CHEUNG) 21 juillet 1992 * le document en entier *	1-23

DOMAINES TECHNIQUES
RECHERCHES (Int.CL.6)

2

Date d'achèvement de la recherche

16 avril 1999

Examineur

Zervas, B

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un
autre document de la même catégorie
A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication
ou arrière-plan technologique général
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure
à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date
de dépôt ou qu'à une date postérieure.
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons
& : membre de la même famille, document correspondant

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)