



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets⁴ : C07K 15/00, A61K 35/16, 37/04 G01N 33/68</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 87/ 02368 (43) Date de publication internationale: 23 avril 1987 (23.04.87)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR86/00353 (22) Date de dépôt international: 14 octobre 1986 (14.10.86) (31) Numéro de la demande prioritaire: 85/15196 (32) Date de priorité: 14 octobre 1985 (14.10.85) (33) Pays de priorité: FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 15, quai Anatole France, F-75007 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : CHATEAU-REYNAUD-DUPRAT, Pierrette, Marie [FR/FR]; Le Videau, 350, rue des Girolles, St Jean d'Yllac, F-33127 Martignas/Jalle (FR). GIROUD, Jean-Paul [FR/FR]; 66, avenue de Breteuil, F-75007 Paris (FR).</p>		<p>(71)Déposant (US seulement): GRABAR, Ludmilla (héritière de GRABAR, Pierre (décédé)) [FR/FR]; 192bis, rue de Vaugirard, F-75015 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeur: GRABAR, Pierre (décédé).</p> <p>(74) Mandataire: NONY, Michel; Cabinet Nony & Cie, 29, rue Cambacérès, F-75008 Paris (FR).</p> <p>(81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>
<p>(54) Title: NEW MAMMAL PROTEIN HAVING AN IMMUNOMODULATING AND PROGESTATIONAL ACTIVITY</p> <p>(54) Titre: NOUVELLE PROTEINE DE MAMMIFERE AYANT UNE ACTIVITE IMMUNOMODULATRICE ET PROGESTATIVE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>New protein characterized particularly in that it is present in the serum of pregnant females and normally absent in males; in that it is present in the serum of individuals who develop an inflammatory reaction; in that it migrates in electrophoresis with alpha₂-macroglobulines; in that it has a molecular mass of 800.000 ± 50.000 approximately measured by filtration on polyacrylamide gel; and in that its administration <i>in vivo</i> prolongs significantly the survival of allografts; antibodies directed against said protein; preparation thereof and application thereof particularly as medicine.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>Nouvelle protéine caractérisée notamment par le fait: qu'elle est présente dans le sérum des femelles gestantes et normalement absente chez les mâles; qu'elle est présente dans le sérum des individus développant une réaction inflammatoire; qu'elle migre en électrophorèse avec les alpha₂-macroglobulines; qu'elle a une masse moléculaire, mesurée par filtration sur gel de polyacrylamide, de 800.000 ± 50.000 environ; et que son administration <i>in vivo</i> prolonge de façon significative la survie des allogreffes; anticorps dirigés contre cette protéine; leur préparation et leur application notamment comme médicament.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	ML	Mali
AU	Australie	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BE	Belgique	HU	Hongrie	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	IT	Italie	NO	Norvège
BJ	Bénin	JP	Japon	RO	Roumanie
BR	Brésil	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DE	Allemagne, République fédérale d'	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Danemark	MG	Madagascar	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande				

Nouvelle protéine de mammifère ayant
une activité immunomodulatrice et progestative.

5

La présente invention a pour objet une nouvelle protéine de mammifère ayant une activité immunomodulatrice et progestative, sa préparation et son application notamment comme médicament immunomodulateur, en particulier
10 comme inhibiteur de la réaction de rejet des allogreffes.

On sait que la pratique des greffes d'organes oblige à provoquer artificiellement une inhibition de l'immunité pour éviter la réaction de rejet de l'organe greffé. Cette inhibition des défenses immunologiques est obtenue par l'emploi de diverses méthodes : irradiation, chimiothérapie (agents
15 alkylants, certains antibiotiques tels que la cyclosporine, sérums antilymphocytaires, etc..).

Cependant, l'emploi de ces méthodes d'inhibition de l'immunité présente des inconvénients. En effet, ces méthodes paralysent non seulement les défenses de l'organisme contre la greffe, mais aussi les défenses naturelles contre les
20 agents infectieux.

La nouvelle protéine objet de l'invention présente l'avantage de ne pas inhiber les défenses immunitaires autres que l'immunité de greffe.

On sait d'autre part que la gestation représente pour l'immunologiste un paradoxe puisque le fœtus, porteur d'antigènes étrangers,
25 et assimilable à une allogreffe, est cependant toléré par la mère pendant toute la gestation.

Ce paradoxe a conduit à étudier le mécanisme immunologique faisant obstacle au rejet du fœtus par la mère, et plusieurs chercheurs ont démontré les propriétés immunosuppressives de certaines protéines présentes
30 principalement chez la femelle gestante et normalement absente chez la femelle non gestante et chez le mâle.

C'est ainsi qu'on a décrit une globuline associée à l'état de gestation, ayant un poids moléculaire de l'ordre de 510.000, qui possède des propriétés immunosuppressive in vitro ; voir par exemple Stimson et coll. FEBS
35 Letters, Vol. 23, n°3, 298-302 (1972) ; Stimson, Clin. Exp. Immunol., 25, 199-206 (1976).

On a également décrit une protéine dite PZP (Pregnancy Zone Protein) de poids moléculaire 359.000, liée à l'état hormonal de la gestation, présente également chez les femmes utilisant les pilules contraceptives, et qui inhibe
40 in vitro la stimulation des lymphocytes par la phytohémagglutinine ; voir par exemple Von Schoultz et coll., FEBS Letters, Vol. 38, n°1, 23-26 (1973).

On a aussi décrit la dépression de l'activité lymphocytaire in vitro par deux facteurs sériques apparaissant au tout début de la gestation, le premier (poids moléculaire 180.000) apparaissant 6 heures après la fertilisation, le deuxième (poids moléculaire 40.000) apparaissant 4 à 5 jours après chez la souris ; voir par exemple Clark et coll., Clin. Exp. Immunol., 32, 318-323 (1978).

La démonstration d'un phénomène de rejet maternel contre l'embryon et de l'inhibition de cette réaction n'a toutefois été faite, jusqu'à présent, que chez un organisme ovovivipare, la salamandre ; voir par exemple Chateaufreynaud et coll. J. Repr. Immunol., I, 47-60 (1979) et Badet et coll., Ann. Immunol. (Inst. Pasteur) 131D, 57-69 (1980).

On a maintenant découvert une nouvelle protéine, présente chez les mammifères femelles gestantes, qui possède des propriétés, (non spécifiques d'individus voire d'espèces) d'inhibition du rejet des allogreffes, permettant notamment une survie prolongée des allogreffes cutanées, sans modification apparente des autres défenses de l'organisme. On désignera ici cette protéine par le sigle I.R.G. (inhibitrice du rejet de greffes).

La présente invention a pour objet une protéine dite I.R.G. caractérisée par le fait :

- qu'elle est présente dans le sérum des femelles gestantes et normalement absente chez les mâles ;
- qu'elle est présente dans le sérum des individus développant une réaction inflammatoire ;
- qu'elle migre en électrophorèse avec les α_2 -macroglobulines ;
- qu'elle a une masse moléculaire, mesurée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, de 800.000 ± 50.000 environ ;
- qu'elle réagit spécifiquement avec des anticorps dirigés contre la fraction α_2 -macroglobuline des femelles gestantes ;
- qu'elle inhibe de façon significative in vitro l'activité des lymphocytes cytotoxiques au cours d'une réaction lymphocytaire mixte secondaire ;
- que, mélangée avec le complément, elle inhibe la réaction d'hémolyse des globules rouges de moutons sensibilisés ;
- qu'elle n'a pas d'activité antiprotéase ;
- et que son administration in vivo prolonge de façon significative la survie des allogreffes; ainsi que les analogues de cette protéine.

Dans la présente demande, on désigne par "analogues" de la protéine I.R.G. tous fragments et tous peptides synthétiques ou semi-synthétiques contenant des séquences peptidiques présentes sur la protéine I.R.G. ainsi que tous dérivés de ces fragments ou peptides, à conditions que ces fragments, peptides ou dérivés satisfassent aux conditions suivantes :

- ils inhibent de façon significative l'activité in vitro des lymphocytes cytotoxiques au cours d'une réaction lymphocytaire mixte secondaire ; et

- leur administration in vivo prolonge de façon significative la survie des allogreffes.

Il convient de remarquer que, contrairement à l'I.R.G., le sérum entier de femelle gestante n'a pas d'activité anti-complément et n'a pas d'activité anti-protéases, à l'inverse des fractions sériques des individus autres que les femelles gestantes ou autres que les individus présentant des réactions inflammatoires. En outre l'I.R.G. n'inhibe pas les mécanismes de défense humorale (formation d'anticorps).

L'invention a également pour objet un procédé de purification et d'obtention de la protéine I.R.G., ce procédé étant caractérisé par le fait :

- que l'on fractionne le sérum de mammifères femelles gestantes, et/ou d'animaux mammifères développant une réaction inflammatoire expérimentale, de façon à isoler des fractions migrant avec les α_2 -macroglobulines ;

- et que l'on soumet lesdites fractions à un épuisement immunologique avec des anticorps IgG anti-sérum entier de mâle et/ou anti-(α_2 -macroglobulines) de mâle pour recueillir les fractions ne réagissant pas avec lesdits anticorps,

étant entendu que l'on effectue les diverses opérations de fractionnement et de purification dans une solution tampon ayant un pH de 7,6 à 8,1.

On a en effet constaté que c'est dans cette gamme de pH que l'on peut isoler la protéine IRG ayant les propriétés biologiques annoncées ci-dessus, et que ces propriétés biologiques peuvent être conservées.

Les tampons utilisables peuvent être facilement déterminés par des expériences de routine. Un tampon préféré est constitué par un mélange de phosphates monosodique et disodique (par exemple 0,05M) contenant NaCl 0,20-0,30M. De préférence, on prépare le tampon phosphate en mélangeant les phosphates monosodique et disodique, puis on ajuste le pH à 8 environ. On ajoute ensuite le chlorure de sodium jusqu'à la molarité désirée, puis on ajuste le pH à la valeur finale désirée (de 7,6 à 8,1 et de préférence de 7,7 à 8,0).

Le sérum de femelle gestante ne contient la protéine I.R.G. qu'après un certain temps, variable et facilement déterminable pour chaque espèce, après la fertilisation. Chez la ratte, ce temps est de l'ordre de 12 jours. Chez la femme, l'activité d'I.R.G. est croissante jusqu'au 3^e mois de la grossesse puis reste stable jusqu'à 10 jours après l'accouchement.

Les méthodes de fractionnement utilisées peuvent comprendre toute méthode connue de fractionnement des protéines du sérum comme par exemple la filtration sur gel, l'ultracentrifugation, le relargage par les sels neutres, la précipitation fractionnée à l'aide d'un agent précipitant (tel qu'un alcool, un polyalkylène- glycol, ou le Rivanol), la chromatographie d'adsorption, la chromatographie sur résine échangeuse d'ions, la chromatographie d'affinité, etc....

Le principe de l'utilisation de ces méthodes de fractionnement des protéines est connu et ne sera pas rappelé ici.

La filtration sur gel est effectuée par exemple sur gel de dextrane ou de polyacrylamide.

Parmi les sels neutres utilisés pour le relargage, on citera par exemple le sulfate d'ammonium et les phosphates alcalins.

La chromatographie d'adsorption peut être effectuée sur des supports tels que l'alumine, le phosphate de calcium, la silice, etc..

Les résines échangeuses d'ions sont par exemple des celluloses modifiées telles que la diéthylaminoéthyl cellulose ou la carboxyméthyl cellulose.

On peut également utiliser la chromatographie d'affinité avec un support pulvérulent inerte sur lequel on fixe par covalence, selon les méthodes connues, soit des anticorps dirigés contre la protéine I.R.G., soit des anticorps dirigés contre une fraction α_2 -macroglobulines de femelle gestante, soit des anticorps dirigés contre la fraction α_2 -macroglobulines de mâle. Dans les deux premiers cas, la protéine I.R.G. se fixe sur le support, dans l'autre cas elle reste dans l'éluat.

Pour concentrer la protéine obtenue on peut utiliser, outre les techniques de précipitation, la technique d'ultrafiltration.

La technique d'épuisement immunologique consiste à mettre en contact la fraction protéique à purifier avec des anticorps dirigés contre au moins une fraction protéique analogue (par exemple une fraction d' α_2 -macroglobulines) provenant du sérum d'un mâle, puis à recueillir la fraction protéique qui ne se fixe pas sur lesdits anticorps. Bien entendu, on peut utiliser des anticorps dirigés contre le sérum total de mâle.

L'invention a également pour objet l'utilisation de la protéine I.R.G. ou de ses analogues, ou de fractions sériques la contenant, comme ingrédient actif dans un médicament immunomodulateur ayant notamment la propriété d'inhiber l'immunité de greffe sans affecter les autres défenses de l'organisme, ou dans un médicament progestatif.

Le médicament de l'invention est utilisable en particulier dans la prévention et le traitement des malades recevant des greffes d'organes.

Le médicament de l'invention peut être administré notamment par voie parentérale ou locale.

A cet effet, il peut être présenté par exemple sous la forme de solutions injectables ou de poudres lyophilisées pour solutions injectables, ou encore sous la forme d'implants ou de réservoirs.

Dans le cas d'une transplantation d'organe, l'administration du médicament de l'invention peut être effectuée selon des modalités diverses en fonction des techniques de dépression immunitaire utilisées par le médecin avant et après la greffe.

Le médicament de l'invention peut être administré avant la transplantation d'organes pour provoquer la dépression de l'immunité de greffe, et/ou après la transplantation, en relais ou avec d'autres médicaments suppressives de l'immunité.

La posologie dépend notamment du mode d'administration et de la phase du traitement. Par exemple, chez les humains, elle varie généralement de 0,1 à 10 g de principe actif par jour chez l'adulte.

On a découvert que chez les mammifères femelles faisant des avortements spontanés, la protéine I.R.G. est souvent absente. Il est possible de favoriser le maintien de la gestation chez ces individus par administration d'I.R.G.

La protéine IRG peut également être utilisée pour favoriser l'implantation de l'oeuf, notamment dans le cas d'une fécondation in vitro.

L'invention a également pour objet l'utilisation de la protéine I.R.G. ou de ses analogues dans la préparation d'un médicament immunomodulateur ou progestatif.

Les études effectuées ont montré que l'I.R.G. apparaît dans le sérum non seulement lors de la gestation mais aussi, plus généralement, chez les mâles comme chez les femelles, lors de toute réaction inflammatoire.

On conçoit donc l'intérêt des anticorps dirigés soit contre des fractions sériques contenant la protéine I.R.G., soit contre la protéine I.R.G. purifiée, soit encore contre des déterminants antigéniques caractéristiques de cette protéine. En effet, non seulement ces anticorps peuvent servir à la purification ou à la détection de la présence ou de l'absence de la protéine I.R.G., mais aussi l'administration de ces anticorps permettra d'inhiber, lorsqu'elle est indésirable, la tolérance, acquise ou potentielle, vis-à-vis des alloantigènes, induite par l'I.R.G. apparaissant dans le sérum lors des processus inflammatoires. Les anticorps anti-I.R.G. ou les anticorps analogues apparaissent donc comme des agents thérapeutiques nouveaux permettant la prévention et le traitement des maladies consécutives à des processus inflammatoires et conduisant à des tolérances anormales

vis-à-vis des alloantigènes, telles que les maladies de système, les maladies auto-immunes, et certains types de cancers, etc...

L'invention a donc pour objet des anticorps dirigés contre des fractions sériques contenant la protéine I.R.G., contre la protéine I.R.G.,
5 contre des analogues de cette protéine (tels que définis plus haut), ou contre des déterminants antigéniques caractéristiques de cette protéine (y compris des anticorps monoclonaux).

Ces anticorps seront appelés ici "anticorps anti-I.R.G.", et englobent bien entendu les fragments Fab ou F(ab')₂ correspondants obtenus par
10 clivage enzymatique.

L'invention s'étend aux anticorps anti-I.R.G. tels que définis précédemment mais modifiés par marquage avec un traceur radioactif, fluorescent ou enzymatique, obtenu selon les méthodes classiques de
15 préparation de tels anticorps marqués.

Par exemple, le traceur peut être un traceur radioactif obtenu par échange isotopique avec un isotope radioactif, par exemple de l'iode ou de l'indium. Le couplage des anticorps avec un agent traceur radioactif est connu en soi et peut être réalisé par exemple selon la méthode de GREENWOOD.

Le couplage des anticorps avec un fluorochrome (par exemple isothiocyanate de fluorescéine ou de rhodamine) est bien connu.
20

Le couplage des anticorps avec un traceur enzymatique est également connu en soi et peut être réalisé par exemple en fixant l'enzyme sur les molécules d'immunoglobulines selon une méthode analogue à celle décrite par NAKANE, Journal Histochemistry Cytochemistry, 22 : 1984-1991 (1974).

L'enzyme est par exemple une peroxydase ou une phosphatase alcaline.
25

L'activité enzymatique éventuellement présente sur le réactif, après réalisation d'un test, peut être déterminée selon les méthodes connues avec un substrat approprié permettant par exemple une révélation par colorimétrie, par fluorescence, par luminescence, par potentiométrie, etc ...

L'invention s'étend également aux anticorps anti-I.R.G. monoclonaux obtenus selon la technique connue des hybridomes au départ des lymphocytes prélevés sur des animaux immunisés selon la méthode qui sera décrite ci-après.
30

L'invention s'étend en outre aux anticorps anti-I.R.G. polyclonaux ou monoclonaux, marqués ou non, fixés sur un support solide permettant leur
35 utilisation comme agents immunoabsorbants dans des méthodes de chromatographie d'affinité ou comme réactifs dans les méthodes d'analyse fondées sur la réaction antigène-anticorps (techniques radioimmunologiques, techniques d'immunofluorescence, techniques immunoenzymatiques).

Ledit support solide peut être réalisé avec tout matériau solide,
40 biologique ou synthétique, doué de propriétés adsorbantes ou capable de fixer

un agent de couplage. Ces matériaux sont connus et décrits dans la littérature. Parmi les matériaux solides capables de fixer les anticorps par adsorption, on citera par exemple le polystyrène, le polypropylène, les latex, etc... Parmi les matériaux solides utilisables pour fixer les anticorps par covalence à l'aide d'un agent de couplage, on peut citer notamment le dextran, la cellulose, leurs dérivés aminés (diéthylamino-cellulose ou diéthylamino-dextran), etc ...

Le support solide peut se présenter par exemple sous forme de disques, de tubes, de baguettes, de billes, ou de plaques de microtitration.

Les agents de couplage permettant de fixer par covalence les anticorps sur le support solide sont des dérivés bifonctionnels tels que des dialdéhydes, des quinones, etc...

Les anticorps peuvent également être fixés sur des supports solides minéraux, par exemple selon les méthodes décrites dans les brevets français 2.319.176, 2.403.556 et 2.403.098.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation des anticorps tels que définis ci-dessus.

Ce procédé est principalement caractérisé par le fait que l'on immunise des animaux par administrations répétées, selon les méthodes connues, d'I.R.G., de fractions sériques enrichies en I.R.G., ou de fragments antigéniques d'I.R.G. éventuellement couplés à une macromolécule, puis que l'on recueille les anticorps sériques desdits animaux immunisés, et que, si désiré, on fixe lesdits anticorps sur un support selon les méthodes connues et/ou les fait réagir avec un marqueur radioactif, fluorescent ou enzymatique selon les méthodes connues et/ou vérifie la spécificité des anticorps obtenus. Pour recueillir les anticorps sériques, on utilise les techniques classiques de fractionnement permettant d'isoler les immunoglobulines.

Pour obtenir l'I.R.G. animale destinée à l'immunisation, on peut induire chez l'animal la formation d'I.R.G. en provoquant une réaction inflammatoire expérimentale.

L'invention a également pour objet l'utilisation des anticorps anti-I.R.G. comme agents de purification ou de détection de l'I.R.G., comme agents anti-projestatifs, et aussi comme médicaments dans la prévention et le traitement des maladies consécutives à des processus inflammatoires et caractérisées par une tolérance anormale vis-à-vis des allo-antigènes. Ces anticorps peuvent être administrés par voie parentérale ou locale, les doses étant les doses usuelles pour les anticorps.

Les anticorps anti-I.R.G., éventuellement fixés sur un support, sont utilisables comme réactifs dans toutes les techniques fondées sur la réaction antigène-anticorps, notamment les dosages radio-immunologiques, les techniques

d'immunofluorescence, les techniques immuno-enzymatiques, les techniques d'immunodiffusion et les techniques d'immunoélectrophorèse.

Par exemple, pour détecter ou doser l'I.R.G. et/ou un de ses analogues en solution, on peut utiliser les techniques immunoenzymatiques connues (notamment un test ELISA). On met en contact la solution à tester avec un support adsorbant de façon à adsorber l'antigène (I.R.G.), s'il est présent. On ajoute une première solution d'anticorps spécifiques anti-I.R.G. tels que ceux définis ci-dessus. On rince et on ajoute ensuite une deuxième solution d'anticorps, qui sont cette fois des anti-immunoglobulines marquées par un traceur enzymatique, ces anti-immunoglobulines étant dirigées contre les anticorps de l'espèce animale ayant servi à préparer les anticorps de ladite première solution. On rince à nouveau le support.

Il suffit ensuite de révéler la présence des anticorps marqués éventuellement fixés sur le support pour savoir si l'I.R.G. était présente ou non.

Les médicaments à base d'anticorps anti-I.R.G. sont administrés par voie parentérale, locale, etc.. A cet effet, ils sont présentés par exemple sous la forme de solutions injectables, de préparations lyophilisées pour solutions injectables, de pommades, d'implants, etc..

Il convient de noter aussi qu'il est possible de déterminer la présence, la diminution ou l'absence de l'I.R.G. chez les mammifères, et en particulier chez la femme enceinte, en mesurant l'activité biologique de l'I.R.G. sur des fractions sériques purifiées, par exemple par chromatographie et/ou par épuisement immunologique. L'activité biologique étudiée peut être en particulier l'inhibition du complément (test de la lyse immune) ou encore l'inhibition de la cytotoxicité (par exemple après une réaction lymphocytaire mixte secondaire).

On peut ainsi réaliser un test de prédiction des risques d'avortement chez des sujets gestants, en particulier chez la femme entre les troisième et quinzième semaines de la grossesse.

Pour cela, on compare l'activité d'I.R.G. d'une fraction sérique purifiée dudit sujet à celle des sujets gestants normaux. Il y a risque d'avortement lorsque l'activité d'I.R.G. est fortement diminuée, par exemple d'au moins 60%.

On peut également réaliser le test de cytotoxicité en remplaçant la réaction lymphocytaire mixte secondaire par deux greffes successives de peau chez le rat. On étudie ensuite la cytotoxicité des cellules spléniques du receveur (qui peuvent être cultivées notamment sur du sérum d'homme AB) sur les cellules du donneur (lymphocytes traités à la mitomycine ou mieux macrophages péritonéaux, marqués au chrome). On peut ainsi réaliser un essai

de cytotoxicité en 18 heures, au lieu de 7 jours avec la technique classique décrite par Châteaureynaud et al., Annales Gynécologiques, pp.181-189 (1982).

Il faut remarquer enfin que l'I.R.G. d'inflammation apparaît à des moments différents selon le type d'inflammation, et que le moment de l'activité inhibitrice maximale de la cytotoxicité ou du complément ne correspond pas au moment où la quantité des alpha₂-macroglobulines est maximale (voir la partie expérimentale). L'I.R.G. pourrait donc correspondre à une modification locale d'une protéine d'inflammation existante.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois la limiter.

EXEMPLE 1. Purification de la protéine I.R.G. de rat

I. ANIMAUX

Les animaux utilisés sont des rats de souche pure WISTAR/FURTH, FISCHER/344 (IFFA-CREDO), WAG (fournis par l'Institut de recherche sur le cancer de VILLEJUIF), pesant 150-200 grammes.

II. SERIES EXPERIMENTALES

A. GESTATION ALLOGENIQUE : (Femelle FISCHER/344 X mâle WISTAR/FURTH ou WAG).

On appelle jour 1 de la gravidité, celui de la mise en évidence d'un bouchon vaginal ou de la présence des spermatozoïdes dans le frottis vaginal le lendemain de la mise au mâle. Le sang est prélevé aux 6^e, 9^e, 15^e et 19^e jours de la gestation et 1^{er}, 3^e, 5^e et 7^e jours du post-partum.

B. DECIDUOME EXPERIMENTAL : (Femelles pseudogestantes)

L'état de la pseudogestation est induit chez des rattes FISCHER/344 par ligature utéro-tubaire au 2^e jour de la gestation pour empêcher les ovules fécondés de descendre dans les cornes utérines et de s'implanter. L'équilibre hormonal progestérone-oestrogène est celui de la gestation vraie. La réaction déciduale est obtenue par traumatisme mécanique chez ces femelles pseudogestantes par insertion le 5^e jour (jour de l'implantation de l'oeuf chez la femelle gestante d'un fil dans chaque corne utérine. Le sang est prélevé les 6^e, 9^e, 12^e jours de la pseudogestation.

C. INDUCTION D'UNE REACTION INFLAMMATOIRE "AIGUE"

L'enrichissement sérique en alpha₂-macroglobuline a été réalisé chez le mâle FISCHER/344 normal par injection sous-cutanée bilatérale de 2 x 0,5 cm³ d'essence de térébenthine (induction d'une inflammation "aiguë") associée à l'administration intra-musculaire de 5 mg d'acétate de cortisone. Le sérum inflammatoire est prélevé 48h après ces injections.

III. FILTRATION SUR GEL

La filtration sur gel de polyacrylamide commercialisé sous la marque Ultrogel AcA₂₂ (IBF) de gamme de fractionnement (100 000 - 1 200 000) a été utilisée. La colonne 100 x 1,6 cm (LKB) a été préparée avec un tampon phosphate 0.05M, NaCl 0,25M, pH 8,0.

Le calibrage de la colonne a été effectué avec des protéines de référence.

Un volume de 2 cm³ de sérum de rat est déposé sur la surface du gel par un adaptateur lié à une pompe péristaltique (volume total du gel : 180cm³).

Les différents sérums subissent auparavant une dialyse contre le tampon de départ (tampon phosphate 0.05M, NaCl 0,25M, pH 8,0) pendant 2 heures.

L'élution est effectuée dans le même tampon phosphate pH 8,0. Le volume de chaque fraction recueillie est de 5 ml.

On mesure l'absorption à 280nm des fractions éluées, à l'aide d'un spectrophotomètre.

Les fractions sériques (I, II, III, IV, etc...) recueillies sont concentrées jusqu'au volume initial (2ml.), par ultra-filtration sur membrane Millipore 100 x M (Amicon).

La fraction IV correspond au deuxième pic observé au spectrophotomètre lors de l'élution.

IV. ANALYSE ELECTROPHORETIQUE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE. Résultats

Du 12^e jour de gestation au 7^e jour post-partum, le sérum de femelles allogestantes et le sérum de femelles en post-partum montrent la présence d'une bande protéique supplémentaire dans la fraction IV (zone de gammaglobulines IgM).

Le sérum d'inflammation "aiguë" de mâle et le sérum de femelle pseudogestante ont montré une bande protéique supplémentaire dans la fraction IV, qui est comparable à celle observée dans le sérum de femelle allogestante.

La fraction IV contient l'ensemble des alpha₂-macroglobulines.

V. DETERMINATION DES POIDS MOLECULAIRES

Le poids moléculaire de la bande protéique caractéristique de la gestation est déterminé par la comparaison de la mobilité électrophorétique en gel avec celle des protéines de référence.

Cette bande protéique a une mobilité R_F 0,11 et son poids moléculaire est approximativement 840.000 Daltons.

VI. EPUISEMENT IMMUNOLOGIQUE

Immunisation de lapins contre la fraction IV

La fraction sérique IV (50-200µg) de mâle normal FISCHER/344 est mélangée avec l'adjuvant de Freund complet.

5 L'émulsion qui en résulte est injectée par voie intra-dermique. Les injections sont répétées tous les dix jours par voie intra-musculaire à dose protéique de 50µg en adjuvant de Freund incomplet.

Le prélèvement de sang a lieu une semaine après la quatrième injection.

10 Les IgG spécifiques de l'immun sérum obtenu sont précipités par le sulfate d'ammonium et purifiés sur DEAE cellulose.

On prépare de façon analogue un immun sérum de lapin contenant des IgG dirigées contre la fraction sérique IV de rattes non gestantes.

TECHNIQUE D'EPUISEMENT IMMUNOLOGIQUE

15 100µl d'antigène (fraction sérique) de femelle allogestante sont ajoutés à 300µl d'immun sérum spécifique(IgG). Le mélange est laissé 1 heure à température ambiante et 2 heures à + 4°C., puis centrifugé 15 minutes à 3000g.

Le procédé est répété en ajoutant 1 volume d'immunsérum à 1 volume de surnageant. Après une nuit à + 4°C, on centrifuge 15 minutes à 3000g, et on
20 recueille le surnageant.

On opère de même avec les fractions sériques de femelle pseudogestante et de mâle développant une inflammation aiguë.

VII. CARACTERISATION DE LA PROTEINE

25 a) IMMUNO-DIFFUSION EN GELOSE

Après épuisement immunologique soit de la fraction IV de femelle allogestante, soit de la fraction IV du sérum de femelle pseudogestante (déciduome) soit de la même fraction de sérum d'inflammation "aiguë" par
30 l'immun-sérum anti-(fraction IV) de mâle normal, on n'observe plus qu'un seul arc de précipitation pour la fraction sérique IV épuisée de femelle allogestante ou pour la fraction sérique IV épuisée de femelle porteuse d'un déciduome ou de mâle ayant subi une inflammation "aiguë".

b) ANALYSE IMMUNO-ELECTROPHORETIQUE

Les résultats précédents sont confirmés par l'analyse
35 immuno-électrophorétique.

Les fractions sériques IV (de femelle gestante ou pseudo-gestante, ou d'inflammation aiguë) épuisées avec l'immun-sérum anti-fraction IV de mâle montrent un seul arc de précipitation principale.

c) ETUDE ELECTROPHORETIQUE

La fraction sérique IV épuisée de femelle allogestante avec l'immun
sérum anti-fraction IV de mâle est étudiée par électrophorèse en gel de
polyacrylamide (gradient de 4 à 12%), qui révèle une seule bande protéique
5 d'une mobilité R_F 0,17 et de poids moléculaire 760 000 Daltons, comparable aux
fraction sériques IV épuisées de décidualisation et d'inflammation.

EXEMPLE 2 :

En opérant de façon analogue à celle décrite à l'exemple 1, au
10 départ d'un pool de sérums de femmes enceintes (entre le 3^e et le 9^e mois de
grossesse), on a obtenu une fraction protéique analogue à la fraction IV de
l'exemple 1.

Par épuisement immunologique avec des anticorps de lapin dirigés
contre le sérum total d'homme et avec des anticorps de lapin dirigés contre la
15 fraction sérique d' α_2 -macroglobuline de femmes non gestantes, on a obtenu
une protéine I.R.G. purifiée ayant des caractéristiques analogues à celles de
la protéine décrite à l'exemple 1.

En outre, chez 11 femmes en menace d'avortement sans cause connue
(de 3 semaines à 3 mois de grossesse) on a observé l'absence d'activité
d'I.R.G. dans les sérums individuels.

20 Chez la femme, on a observé la présence de la protéine I.R.G. dans
la période de 2 à 8 heures qui suit l'ovulation sans fécondation, ainsi que
dans la période de 5 à 8 heures précédant la menstruation.

EXEMPLE 3 . Etude de la protéine I.R.G. :

25 INHIBITION "IN VITRO" DE LA REPONSE T CYTOTOXIQUE ALLOSPECIFIQUE

La réponse T cytolytique se développe au cours d'une réaction
lymphocytaire mixte (RLM) secondaire unidirectionnelle. Pour cela, des
cellules spléniques sont prélevées chez des rats mâles Fischer, 5 jours après
la pose d'un greffon de peau de rat Wag. Ces cellules immunisées (2×10^6)
30 sont incubées en présence d'un même nombre de cellules spléniques de rat Wag
traitées à la mitomycine C (cellules stimulantes), dans un volume total de
2 ml de RPMI 1640 (Eurobio) additionné de tampon HEPES (20 mM), de
2-mercaptoéthanol (5×10^{-5} M) d'antibiotiques, et de 5% de sérum de rat
inactivé par la chaleur. Après 7 jours de culture à 37°C dans une atmosphère
35 humide contenant 5% de CO₂, l'activité cytolytique des cellules répondeuses
est étudiée en CML (lympholyse à médiation cellulaire) contre des cellules
péritonéales de rat Wag préalablement stimulées par la phytohémagglutinine et
marquées au Chrome 51, le rapport cellules tueuses/cellules cibles étant de
100/1. Après une incubation de 6 heures à 37°C, la quantité de chrome 51

relarguée dans le surnageant est mesurée et le pourcentage de cytotoxicité calculé d'après la formule :

$$\frac{\text{cpm expérimental} - \text{cpm spontané}}{\text{cpm incorporé sur les cellules cibles}} \times 100$$

La fraction sérique examinée pour son activité immunosuppressive est ajoutée à une concentration finale de 5% (100 µl) soit au début de la culture lymphocytaire mixte (temps zéro), soit après le 7^e jour de la culture durant la dernière heure de l'incubation. Dans les deux cas, les cellules sont lavées avant la mesure de leur activité cytolytique. Le pourcentage d'inhibition de la cytotoxicité est calculé d'après la formule :

$$100 - \frac{\% \text{ cytotoxicité en présence de la fraction sérique}}{\% \text{ cytotoxicité en absence de la fraction sérique}}$$

Les fractions sériques examinées sont la fraction IV du sérum de rat mâle développant une inflammation aiguë, la même fraction purifiée (par épuisement immunologique), et la fraction IV purifiée de femelle gestante. Les résultats sont résumés dans les tableaux I et II ci-après.

Des résultats analogues ont été obtenus avec les fractions sériques de rattes femelles pseudogestantes et de femmes enceintes.

25

30

35

40

TABLEAU I*

FRACTIONS SERIQUES TESTEES	No. EXP.				% DE CYTOTOXICITE	% D' INHIBITION
	1	2	3	4		
Témoins	46.28	56.48	56.46	50.46	52.42 ± 4.97	
Fr. IV T	16.87	14.07	17.25	12.72	15.22 ± 2.40	70.96 ± 1.70
Fr. IV TP	12.92	10.90	15.15	15.85	13.70 ± 1.12	73.86 ± 1.25
Fr. IV gP	11.22	12.32	14.50	13.22	12.81 ± 0.75	75.56 ± 0.75

* Les fractions sériques purifiées sont ajoutées au temps 0 de la RLM.

Résultats significatifs $p < 0.001$

Fr. IV T : fraction IV d'inflammation aiguë

Fr. IV gP : fraction IV purifiée de femelle gestante

Fr. IV TP : fraction IV purifiée d'inflammation aiguë

TABLEAU II*

FRACTIONS SERIQUES TESTEES	No. EXP.				% DE CYTOTOXICITE	% D' INHIBITION
	1	2	3	4		
Témoïn	46.28	56.48	56.46	50.46	52.42 \pm 4.97	-
Fr. IV T	18.88	18.30	18.95	16.10	18.05 \pm 0.66	65.56 \pm 0.50
Fr. IV TP	18.15	15.10	17.10	13.22	15.89 \pm 1.09	69.68 \pm 1.22
Fr. IV gP	13.37	13.90	15.45	17.98	15.17 \pm 0.90	70.06 \pm 0.75

* Les fractions fractions sériques purifiées sont ajoutées au jour 7 de la RLM

résultats significatifs $p < 0.001$

Fr. IV T : fraction sérique d'inflammation aiguë

Fr. IV gP: fraction IV purifiée de femelle gestante

Fr. IV TP: fraction IV purifiée d'inflammation aiguë

EXEMPLE 4 : Etude de l'inhibition de l'activité du complément in vitro

On utilise le sérum de rattes allogestantes Fischer/344 accouplées à des mâles Wistar, prélevé aux jours 9, 12, 15 et 19 de la gestation, ainsi que des sérums de femmes enceintes depuis 3 à 9 mois et de femmes enceintes en préavortement spontané.

Pour extraire et purifier les fractions correspondant à la protéine IRG, on opère comme à l'exemple 1.

L'inhibition du complément a été mesurée par la méthode classique de l'hémolyse en plaques de microtitration.

RESULTATS :

Le sérum entier ou des fractions des sérums de rats femelles allogestantes ou de femmes enceintes ajoutés au milieu contenant des hématies de mouton sensibilisées par des IgG de lapin anti-mouton n'a pas d'activité inhibitrice sur le complément de cobaye. L'incubation préalable (1h à 37°C) de ces sérums entiers ou du sérum entier de mâle ne modifie pas la réaction de lyse immune. Mais après incubation préalable de la fraction I.R.G. avec le complément, on constate que :

1) il y a inhibition de l'activité complémentaire par la fraction IV et par la fraction I.R.G. ;

2) il y a augmentation de l'activité anti-complémentaire de ces fractions après purification ;

3) la fraction correspondant à l'I.R.G. des sérums de rats mâles, de rats femelles vierges ou de femmes enceintes sur le point d'avorter n'entraîne pas d'inhibition de l'activité complémentaire (à dilutions comparables).

On a recherché en outre si la protéine I.R.G. possède une activité anti-protéase. Lorsque l'I.R.G. est incubée avec de la trypsine et un petit substrat (le T.A.M.E.) ou un gros substrat (caséine), on constate que :

1) l'I.R.G. n'inhibe pas l'activité de la trypsine mais au contraire l'augmente ;

2) l'I.R.G., après incubation avec la trypsine et ses substrats, garde ses propriétés anti-complémentaires ;

3) la fraction de sérum de rat mâle correspondant à l'I.R.G. inhibe l'activité de la trypsine ; elle a donc une activité anti-protéase.

L'I.R.G. de gestation serait donc un activateur des protéases induisant comme la plasmine soit l'activation de C_1S dans la voie classique et du C_3 dans les voies classique et alterne. Cette propriété n'est trouvée que dans le sérum de femelles gestantes normales.

En outre, on a observé :

- que le sérum entier d'homme, de femme enceinte multipare (2ème à 8ème mois) et de femme en avortement spontané n'inhibe pas la réaction d'hémolyse immune ;

5 - que la fraction IV d'homme (AB) n'inhibe pas cette réaction, contrairement à la fraction IV de femme enceinte (en particulier de 3 semaines à 15 semaines).

EXEMPLE 5 : Etude in vivo :

10 INHIBITION DU REJET D'ALLOGREFFES CUTANÉES, AVEC MAINTIEN DES DEFENSES IMMUNITAIRES AUTRES QU'ANTI-GREFFES.

Des rats Fisher/344 reçoivent le jour 0 un greffon de peau de rat Wag de 1 cm de diamètre dans la région sous scapulaire. Le greffon étant maintenu par six points de suture, le jour du rejet est défini comme celui où
15 le greffon nécrosé se détache de son lit (14,5 jours après la pose du greffon chez les témoins).

Les receveurs de l'allogreffe sont traités avec au total 0,5 ml de la fraction sérique répartis en plusieurs injections intraveineuses effectuées avant et après la greffe.

20 Les résultats sont résumés dans le Tableau III ci-après.

En administrant la même quantité d'I.R.G. répartie en plusieurs injections (8 injections intra-veineuses aux jours J-3, J-2, J-1, J+3 et J+5 à J+7, + 3 injections locales sous le greffon à J+5 et J+7), le temps moyen de survie du greffon a été de $30,60 \pm 0,30$ jours (limites extrêmes des temps de
25 rejet : 29 à 31 jours).

En administrant la même quantité d'I.R.G. répartie en plusieurs injections (7 injections intraveineuses aux jours J-3, J-2, J-1, J+1, J+3, J+5, J+6 et 4 injections locales de J+7 à J+10), les limites extrêmes des temps de rejet ont été de 45 à 51 jours.

30 Des expériences préliminaires sur la qualité des défenses de l'organisme avant et après une allogreffe chez le rat avec ou sans injection d'I.R.G. :

- injection de glycoprotéines de membrane de T. equiperdum (Botat 1), réputée comme stimulant les défenses humorales,

35 - infestation avec un parasite non mortel (Plasmodium berghei berghei),

ont montré que les défenses ne sont pas modifiées lorsque l'allogreffe est précédée et suivie d'injections d'I.R.G.

40 On rappellera ici que chez le rat l'infestation par Plasmodium berghei berghei est une maladie curable et que la résistance à la maladie fait appel aux défenses immunitaires cellulaire et humorale.

TABLEAU III

	TRAITEMENT	No. ALLOGREFFE	LIMITES EXTREMES DES TEMPS DE REJET DE GREFFE	TEMPS MOYEN DE SURVIE \pm ECART TYPE
5	Sérum phy- siologique (témoin)	10	13 - 15	14.50 \pm 0.34
10	Fr. IV g	10	17 - 21	20.71 \pm 1.01
	Fr. IV T	10	21 - 27	24.00 \pm 0.58

15

Fr. IV g : fraction sérique purifiée de femelle gestante
 Fr. IV T : fraction sérique purifiée d'inflammation aiguë
 Résultats significatifs : $p < 0,001$

20

EXEMPLE 6 : Préparation d'anticorps anti-I.R.G.

On immunise des lapins contre la protéine I.R.G. de ratte obtenue à l'exemple 1 (fraction IV purifiée par épuisement immunologique).

25

La technique d'immunisation et de purification des gammaglobulines est analogue à celle décrite à l'exemple 1.

On obtient une préparation de gammaglobulines anti-(I.R.G. de ratte) permettant par exemple de purifier ou de détecter cette protéine I.R.G.

30

En outre, on a administré à des rattes gestantes les anticorps ainsi préparés (2 fois 1ml de solution d'anticorps à 6g/litre au jours J3 et J5 de la gestation). Cette administration a provoqué des avortements entre J6 et J10 dans les cinq cas étudiés.

EXEMPLE 7 :

35

Cinétique de l'enrichissement sérique en α_2 -macroglobulines par induction d'une réaction inflammatoire aiguë.

a) INDUCTION D'UNE REACTION INFLAMMATOIRE AIGUE.

On effectue cette étude sur des rats Sprague Dawley mâles âgés de 6 semaines.

40

On provoque la réaction inflammatoire expérimentale soit par injection sous-cutanée bilatérale de 2 x 0,5cm³ d'essence de térébenthine, soit par l'injection d'une suspension de 1ml à 1% (poids/volume) de cristaux de pyrophosphate de calcium dans la plèvre.

5 Les sérums sont prélevés à divers intervalles de temps après le déclenchement de la réaction inflammatoire. Chaque résultat est donné pour un pool de sérums de cinq animaux injectés.

b) FRACTIONNEMENT DES SERUMS PAR FILTRATION SUR GEL.

La technique utilisée est celle décrite ci-dessus à l'exemple 1.III.

10 La solution tampon utilisée ici est un tampon phosphate 0,05M, NaCl 0,25M, pH 7,8.

Avant d'être déposés sur la colonne, les sérums sont dialysés contre ledit tampon pendant au moins 4 heures à 4°C.

15 Les éluats sortant de la colonne passent devant une cellule optique reliée à un enregistreur de densité optique à 280nm, puis sont recueillis par fractions de 3,5ml. Les fraction correspondant à chaque pic sont réunies.

Après élution, les fractions sont concentrées par ultrafiltration dans une cellule Amicon pourvue d'une membrane XM 100, jusqu'au volume de départ.

20 La fraction analogue à la fraction IV de l'exemple 1 (deuxième pic) est recueillie.

La concentration des protéines est déterminée par la méthode de Bradford, avec l'ovo-albumine comme protéine de référence.

25 Les résultats sont résumés dans le Tableau IV ci-après.
L'enrichissement en alpha₂-macroglobulines n'est pas concomitant avec l'activité inhibitrice maximale, différente selon les modèles utilisés (essence de térébenthine, pyrophosphate de calcium) comme le montrent les exemples suivants :

30

35

40

TABLEAU IV

Sérum	Concentration en protéines ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de la fraction IV)
Témoins	3,6
Traitement à la térébenthine	
Sérum prélevé au bout de :	
6h	3,15
24h	3,5
40h	4,15
48h	5,15
72h	2,7
5 jours	4,35
Traitement au pyrophosphate	
Sérum prélevé au bout de :	
2h	2,0
6h	1,26
24h	2,28
48h	2,42
72h	4,20
5 jours	3,5

EXEMPLE 8 :PURIFICATION DE LA FRACTION ALPHA_2 -MACROGLOBULINES DE FEMME ENCEINTE

Les sérums sont obtenus par prélèvement de sang de femmes enceintes.

Les fractions sériques d' alpha_2 -macroglobulines de chacun des sérums sont séparées par filtration sur gel, de façon analogue à celle décrite dans l'exemple 1. On observe, par rapport au sérum de rat, l'apparition d'un pic supplémentaire. On recueille les fractions correspondant à la fraction IV de l'exemple 1, c'est-à-dire la fraction qui, dans les mêmes conditions, sort au bout du même temps. Il s'agit ici du troisième pic, alors que chez le rat la fraction IV correspondait au deuxième pic. Par analogie, ce troisième pic est encore appelé ici "fraction IV".

EXEMPLE 9

ANALYSE PAR ELECTROPHORESE DES SERUMS ET DES FRACTIONS SERIQUES

Les sérums prélevés chez des rats en réponse inflammatoire (exemple 7) et chez des rats témoins, chez des femmes à différents stades de la grossesse (exemple 8) et chez des hommes (témoins), ainsi que les fractions sériques d'alpha₂-macroglobulines correspondantes (exemples 7 et 8) ont été analysés par électrophorèse en gradient de gel de polyacrylamide.

Diverses solutions tampon ont été employées concurremment :

- tampon Tris-glycine qui permet une bonne révélation de l'ensemble des protéines sériques ;

- tampon Tris-acide borique-EDTA qui permet une meilleure résolution des constituants alpha₂-macroglobulines.

Les électrophorèses ont été réalisées à voltage assez élevé (200 volts) et pendant une longue durée (18heures) à basse température (4°C) de manière à stabiliser chaque protéine selon sa masse moléculaire propre.

On a utilisé ici trois types de gradients d'acrylamide : 4-12% pour l'ensemble des protéines sériques, 4-15% pour les sérums humains et 4-8% pour assurer une meilleure définition dans le cas des hauts poids moléculaires, et notamment de la fraction IV.

Les résultats mis en évidence par l'analyse électrophorétique sont les suivants :

- Rats soumis à une réaction inflammatoire expérimentale :

Une bande protéique de poids moléculaire supérieur à celui de l'alpha₁-macroglobuline apparaît en quantité progressivement croissante au cours de l'évolution de la réponse inflammatoire.

Les résultats obtenus avec les sérums d'inflammation au pyrophosphate de calcium et à l'essence de térébenthine sont similaires, seule la cinétique du phénomène est différente.

- Sérum de femme enceinte, en comparaison avec un sérum d'homme :

Dans la zone correspondant à la fraction IV, il existe une bande protéique chez l'homme (sérum AB⁺) mais cette bande est plus importante chez la femme enceinte (grossesse normale).

Le poids moléculaire de cette protéine est de 760.000 environ.

EXEMPLE 10TESTS DE CYTOTOXICITE

Ce test est effectué, de façon analogue à celle décrite à l'exemple 3, avec le sérum entier et les fractions sériques correspondantes riches en IRG des rats mâles ayant subi la réaction inflammatoire expérimentale (exemple 7).

Dans le cas de la réaction inflammatoire provoquée par l'essence de térébenthine, le sérum entier ne donne pas lieu à une inhibition de cytotoxicité spécifique.

5 Au contraire, les fractions sériques riches en IRG provenant des sérums prélevés à 24 heures, 48 heures et 72 heures après l'inflammation provoquée donnent lieu à une inhibition de la cytotoxicité spécifique. Dans ce cas, la mesure de cytotoxicité est réalisée en utilisant le marquage au chrome 51 des cellules cibles. L'activité est maximum 48 heures après l'inflammation.

10 Les autres fractions sériques (obtenues par filtration sur gel ; voir exemples 1 et 7) n'inhibent pas la cytotoxicité dans ce test.

Le sérum de femme enceinte (du 3ème mois de la grossesse jusqu'à 10 jours après l'accouchement), inhibe la réaction cytotoxique cellulaire in vitro. Le sérum de femmes en risque d'avortement n'a pas ces propriétés.

15 EXEMPLE 11

TESTS D'INHIBITION DU COMPLEMENT PAR LE SERUM INFLAMMATOIRE DE RAT

On a utilisé la réaction d'hémolyse immune pour tester la capacité d'inhibition du complément de cobayes par des sérums entiers et des fractions sériques de rats.

20 La réaction d'hémolyse immune consiste à mettre en présence des hématies de mouton sensibilisées par des IgG de lapin anti-hématies de mouton, avec une source de complément.

Sensibilisation des hématies

25 Une suspension d'hématies standardisées en tampon Mayer (tampon Véronal, Mg^{2+} Ca^{2+} pH 7,2) est sensibilisée par un égal volume d'une solution titrée de sérum hémolytique. Le mélange est laissé pendant au moins 20 minutes à température ambiante, puis placé à 4°C jusqu'à utilisation extemporanée.

Source de complément

30 Il s'agit d'un mélange de sérums de 20 cobayes fractionnés en aliquotes de 50µl.

Test en tubes

On étudie l'inhibition de la réaction de l'hémolyse immune par des quantités décroissantes de la fraction étudiée.

35 Pour cette étude on prépare une série de tubes contenant 100µl de complément (sérum de cobaye) à une dilution fixe qui est ici de 1/400 (CH 50 = 2.130), 100µl de la fraction étudiée, à différentes concentrations. On laisse incuber pendant 1 heure à 37°, puis on ajoute 200µl de la suspension d'hématies de moutons sensibilisés, à 10^8 cellules/ml. On laisse incuber pendant 45 minutes à 37°C, puis on arrête la réaction. Après centrifugation 40 pendant 5 minutes à 800g, on effectue une lecture au spectrophotomètre à 413nm.

Tests en plaques de microtitration

On emploie des microplaques Microwell NUNC de 96 cupules à fond rond.

5 On effectue des dilutions en série du sérum ou des fractions à tester dans des tampons Mayer pH 7,2.

On verse dans chaque puits 20 μ l de la fraction étudiée et 40 μ l de complément dilué ici au 1/300. On laisse incuber pendant 1 heure à 37°C puis on ajoute 40 μ l de la suspension d'hématies sensibilisées. On laisse incuber pendant 45 minutes à 37°C avec agitation, puis on centrifuge pendant 5 minutes à 800g. On lit les résultats de l'hémolyse par estimation à l'oeil nu.

10 Les fractions ou les sérums entiers testés sont recueillis en tampons phosphate et sont testés directement.

Dans l'espèce humaine (contrairement au rat) la dialyse de la fraction contre le tampon Mayer pH 7,2 augmente la sensibilité du test.

15 On a également testé la capacité d'inhibition du complément de cobaye par les fractions alpha₂-macroglobulines en faisant varier la concentration du complément par rapport à une quantité fixe de protéines.

Résultats

20 Tous les sérums entiers obtenus au cours de la réaction inflammatoire provoquée par les cristaux de pyrophosphate ou par injection d'essence de térébenthine chez les rats mâles Sprague Dawley, ainsi que les sérums entiers des rats mâles témoins ne sont pas inhibiteurs de la réaction d'hémolyse par le complément in vitro.

25 Au contraire, toutes les fractions sériques d'inflammation riches en I.R.G. (alpha₂-macroglobulines ; fraction IV ayant subi le traitement d'épuisement immunologique) inhibent l'action du complément in vitro.

30 On a constaté qu'il existe une cinétique du développement du pouvoir inhibiteur du complément pour les fractions provenant des sérums de rats soumis à une réaction inflammatoire expérimentale.

Dans la réaction inflammatoire provoquée par l'essence de térébenthine, le pouvoir inhibiteur apparaît après 6 heures de réaction, atteint une valeur maximum au bout de 24 heures environ et commence ensuite à décroître.

35 Dans la réaction inflammatoire provoquée par le pyrophosphate, l'inhibition se manifeste à partir de 48 heures de réaction et atteint une valeur maximum vers 72 heures environ.

L'inhibition provoquée par l'essence de térébenthine est plus forte.

40 Les autres fractions sériques obtenues par filtration sur gel (exemples 1 et 7) ne donnent pas lieu à cette réaction d'inhibition.

Pour quantifier les résultats, on a défini une unité arbitraire I 50 qui est la quantité de protéines capables de produire 50% d'inhibition de $1\mu\text{l}$ de la source de complément dans une réaction d'hémolyse immune. Bien entendu, les unités I 50 ne peuvent être comparées que dans le cas d'une même source de complément, sinon, il faut les rapporter au CH 50 de la source de complément utilisé.

On a défini ensuite une "activité spécifique" qui est le nombre d'unités I 50/mg de la fraction sérique étudiée.

Les résultats sont résumés dans le Tableau V suivant :

TABLEAU V

ECHANTILLON	I 50	ACTIVITE SPECIFIQUE
Témoins	25.0	40
Inflammation à la térébenthine		
Sérum prélevé		
au bout de :		
6 h	7,4	135
24 h	2,5	400
40 h	12,5	80
72 h	6,3	158

ECHANTILLON	I 50	ACTIVITE SPECIFIQUE
Témoins	29	34,4
Inflammation au pyrophosphate		
24 h	18	55,5
48 h	11	90,9
72 h	9	111,0
120 h	13	76,9

REVENDICATIONS

1. Protéine I.R.G. caractérisée par le fait :

- qu'elle est présente dans le sérum des mammifères femelles gestantes et normalement absente chez les mâles ;

5 - qu'elle est présente dans le sérum des individus développant une réaction inflammatoire ;

- qu'elle migre en électrophorèse avec les α_2 -macroglobulines ;

- qu'elle a une masse moléculaire, mesurée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, de 800.000 ± 50.000 environ ;

10 - qu'elle réagit spécifiquement avec des anticorps dirigés contre la fraction α_2 -macroglobuline des femelles gestantes ;

- qu'elle inhibe de façon significative in vitro l'activité des lymphocytes cytotoxiques au cours d'une réaction lymphocytaire mixte secondaire ;

15 - que, mélangée avec le complément, elle inhibe la réaction d'hémolyse des globules rouges de moutons sensibilisés ;

- qu'elle n'a pas d'activité antiprotéase ;

- et que son administration in vivo prolonge de façon significative la survie des allogreffes ;

20 ainsi que les analogues de cette protéine, lesdits analogues étant tous fragments et tous peptides synthétiques ou semi-synthétiques contenant des séquences peptidiques présentes sur la protéine I.R.G. ainsi que tous dérivés de ces fragments ou peptides, à conditions que ces fragments, peptides ou dérivés satisfassent aux conditions suivantes :

25 - ils inhibent de façon significative l'activité in vitro des lymphocytes cytotoxiques au cours d'une réaction lymphocytaire mixte secondaire ;

- leur administration in vivo prolonge de façon significative la survie des allogreffes.

30 2. Procédé de purification et d'obtention de la protéine I.R.G., caractérisé par le fait :

- que l'on fractionne le sérum de mammifères femelles gestantes, et/ou d'animaux mammifères développant une réaction inflammatoire expérimentale, de façon à isoler des fractions migrant avec les
35 α_2 -macroglobulines ;

- et que l'on soumet lesdites fractions à un épuisement immunologique avec des anticorps IgG anti-sérum entier de mâle et/ou anti-(α_2 -macroglobulines) de mâle pour recueillir les fractions ne réagissant pas avec lesdits anticorps,

40 étant entendu que l'on effectue les diverses opérations de

fractionnement et de purification dans une solution tampon ayant un pH de 7,6 à 8,1.

3. Utilisation de la protéine I.R.G. ou de ses analogues, ou de fractions sériques la contenant, comme ingrédient actif dans un médicament immunomodulateur ayant notamment la propriété d'inhiber l'immunité de greffe sans modifier de façon notable les autres défenses de l'organisme, ou dans un médicament progestatif.

4. Utilisation de la protéine I.R.G. ou de ses analogues comme ingrédient actif dans la préparation d'un médicament immunomodulateur ou progestatif.

5. Anticorps anti-I.R.G. caractérisés par le fait qu'ils sont dirigés contre la protéine I.R.G. ou contre ses analogues tels que définis dans la revendication 1, ou contre des déterminants antigéniques caractéristiques de cette protéine, lesdits anticorps, polyclonaux ou monoclonaux, étant éventuellement marqués et/ou fixés sur un support solide permettant leur utilisation comme agents immunoadsorbants dans des méthodes d'analyse fondées sur la réaction antigène-anticorps.

6. Procédé de préparation des anticorps de la revendication 5, caractérisé par le fait que l'on immunise des animaux par administrations répétées d'I.R.G., selon les méthodes connues, de fractions sériques enrichies en I.R.G., ou de fragments antigéniques d'I.R.G. éventuellement couplés à une macromolécule, puis que l'on recueille les anticorps sériques desdits animaux immunisés, et que, si désiré, on fixe lesdits anticorps sur un support selon les méthodes connues et/ou les fait réagir avec un marqueur radioactif, fluorescent ou enzymatique selon les méthodes connues et/ou vérifie la spécificité des anticorps obtenus.

7. Utilisation des anticorps anti-I.R.G. tels que définis dans la revendication 5, comme agents de purification ou de détection de l'I.R.G., comme agents anti-progestatifs, ou comme ingrédients actifs dans des médicaments pour la prévention et le traitement des maladies consécutives à des processus inflammatoires.

8. Médicament caractérisé par le fait qu'il contient comme ingrédient actif la protéine I.R.G. ou ses analogues, tels que définis dans la revendication 1, ou des anticorps anti-I.R.G.

9. Procédé de réalisation d'un test de dépistage des risques d'avortement chez un sujet gestant, caractérisé par le fait que l'on mesure l'activité biologique d'I.R.G. sur une fraction sérique dudit sujet, purifiée par chromatographie et/ou par épuisement immunologique, et que l'on compare cette activité à celle présente chez les sujets gestants normaux.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 86/00353

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl. ⁴ C 07 K 15/00; A 61 K 35/16; A 61 K 37/04; G 01 N 33/68		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. ⁴	A 61 K	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category [*]	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X,P	C.R. Acad. Sc. Paris, vol. 301, serial III, no. 14, 1985, (Paris, FR) P. Grabar et al.: "Survie prolongée d'allogreffes de peau chez le rat par injection de sérum ou d'une fraction sérique (IRG) extraite de rattes gestantes", pages 653-658, see the whole article	1-4,8
Y	--	5-7
Y	Nature, vol. 256, 7 August 1975, G. Köhler et al: "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity", pages 495-497, see the whole article	5-7
X,P	Chemical Abstracts, vol. 105, no. 9, 1 September 1986, (Columbus, Ohio, US), P. Grabar et al.: "In vitro and in vivo inhibitions of allograft reactions and anticomplement activity by an a ² macroglobulin produced during gestation",	1-4,8
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>[*] Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
8 January 1987 (08.01.87)	13 February 1987 (13.02.87)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
EUROPEAN PATENT OFFICE		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
	see page 516, abstract 77356q, & Bul. Acad. Natl. Med. (Paris) 1985, 169(9), 1371-8	
	--	
A	GB, A, 1401238 (UNIVERSITY OF STRATHCLYDE) 23 July 1975, see page 1, lines 10-20, line 26 - page 2, line 43; page 3, lines 93-101; claims 1-3,5	1-9
	--	
A	J. Repr. Immunol. vol. 6, no. 5, 1984, Elsevier Science Publishers B.V. M.T. Badet: "Specific and non-specific immunosuppressive factors in salamander pregnancy serum", pages 299-311, see page 299, line 12 - page 300, line 9; page 302, lines 30-39; page 304, lines 9-15; page 305, line 15 - page 308, line 3; page 309, lines 36-43	1-9
	--	
A	Chemical Abstracts, vol. 99, no. 11, 12 September 1983, (Columbus, Ohio, US), P. Chateaufreynaud-Duprat et al.: "Inhibition of an immune reaction of hemolysis in higher vertebrates by serum fraction (fraction P) from pregnant Salamandra salamandra L", see page 436, abstract 86475n, & C.R. Seances Acad. Sci., ser. 3, 1983, 296(7), 323-8	1-9
	--	
A	Biological Abstracts, vol. 74, no. 11, 1982, P.C. Duprat et al.: "Inhibition of the in vitro allograft rejection (allograft-induced lymphocytotoxicity) by a fraction extracted from pregnant female serum, in the salamander (Salamandra salamandra)", & C.R. Seances Acad. Sci. Ser. III SI VIE 292(9): 595-598, 1981, see abstract 74398	1-9

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/FR 86/00353 (SA 14874)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 29/01/87

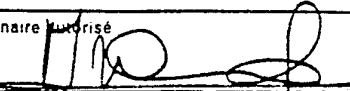
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB-A- 1401238	16/07/75	None	

For more details about this annex :
see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 86/00353

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB ⁴ : C 07 K 15/00; A 61 K 35/16; A 61 K 37/04; G 01 N 33/68		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁴	A 61 K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie [*]	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
X,P	C.R. Acad. Sc. Paris, volume 301, série III, no. 14, 1985, (Paris, FR) P. Grabar et al.: "Survie prolongée d'allogreffes de peau chez le rat par injection de sérum ou d'une fraction sérique (IRG) extraite de rattes gestantes", pages 653-658, voir l'article en entier	1-4, 8
Y	--	5-7
Y	Nature, volume 256, 7 août 1975, G. Köhler et al.: "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity", pages 495-497, voir l'article en entier	5-7
X,P	-- Chemical Abstracts, volume 105, no. 9, 1er septembre 1986, (Columbus, Ohio, US), P. Grabar et al.: "In vitro and in vivo inhibitions of allograft ./.	
<p>[*] Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
8 janvier 1987	13 FEV. 1987	
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé M. VAN MOL 	

(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁴		
Catégorie *	Identification des documents cités, ¹⁵ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	N° des revendications visées ¹⁸
	reactions and anticomplement activity by an a ² macroglobulin produced during gestation", voir page 516, abrégé 77356q, & Bul.. Acad. Natl. Med. (Paris) 1985, 169(9), 1371-8 --	1-4,8
A	GB, A, 1401238 (UNIVERSITY OF STRATHCLYDE) 23 juillet 1975, voir page 1, lignes 10-20, ligne 26 - page 2, ligne 43; page 3, lignes 93-101; revendications 1-3,5 --	1-9
A	J. Repr. Immunol. volume 6, no. 5, 1984, Elsevier Science Publishers B.V. M.T. Badet: "Specific and non-specific immunosuppressive factors in salamander pregnancy serum", pages 299-311, voir page 299, ligne 12 - page 300, ligne 9; page 302, lignes 30-39; page 304, lignes 9-15; page 305, ligne 15 - page 308, ligne 3; page 309, lignes 36-43 --	1-9
A	Chemical Abstracts, volume 99, no. 11, 12 septembre 1983, (Columbus, Ohio, US), P. Chateaufreynaud-Duprat et al.: "Inhibition of an immune reaction of hemolysis in higher vertebrates by serium fraction (fraction P) from pregnant Salamandra salamandra L", voir page 436, abrégé 86475n, & C.R. Seances Acad. Sci., ser. 3, 1983, 296(7), 323-8 --	1-9
A	Biological Abstracts, volume 74, no. 11, 1982, P.C. Duprat et al.: "Inhibition of the in vitro allograft rejection (allograft-induced lymphocytotoxicity) by a fraction extracted from pregnant female serum, in the salamander (Salamandra salamandra)", & C.R. Seances Acad. Sci. Ser. III SI VIE 292(9): 595-598, 1981, voir abrégé 74398 -----	1-9

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE RELATIF

A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO. PCT/FR 86/00353 (SA 14874)

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche international visé ci-dessus. Lesdits membres sont ceux contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 29/01/87

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

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets	Date de publication
GB-A- 1401238	16/07/75	Aucun	

Pour tout renseignement concernant cette annexe :
voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No. 12/82