

82345
Brevet N°
du 8 avril 1980
Titre délivré : 16 DEC 1980

GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG



Monsieur le Ministre
de l'Économie Nationale et des Classes Moyennes
Service de la Propriété Industrielle
LUXEMBOURG

Demande de Brevet d'Invention

I. Requête

La société dite: BRISTOL-MYERS COMPANY, 345 Park Avenue, (1)
à NEW-YORK, N.Y. 10022, Etats-Unis d'Amérique, représentée
par Monsieur Jacques de Muyser, agissant en qualité de man- (2)
dataire

dépose ce huit avril 1980 quatre-vingt (3)
à 15 heures, au Ministère de l'Économie Nationale et des Classes Moyennes, à Luxembourg :

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant :
"Méthode de détection du cancer". (4)

Je déclare, en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont) /

2. la délégation de pouvoir, datée de NEW-YORK le 4 avril 1980
3. la description en langue française de l'invention en deux exemplaires ;
4. // planches de dessin, en deux exemplaires ;
5. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg,
le 8 avril 1980

revendique pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de
(6) brevet déposée(s) en (7) aux Etats-Unis d'Amérique
le 10 avril 1979 (No. 028.732) (8)

au nom de s inventeurs (9)
élit domicile pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg
35, blâ. Royal (10)

sollicite la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les annexes
susmentionnées, — avec ajournement de cette délivrance à 6 mois.

Le mandataire

II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie Nationale
et des Classes Moyennes, Service de la Propriété Industrielle à Luxembourg, en date du :

8 avril 1980

à 15 heures

Pr. le Ministre
de l'Économie Nationale et des Classes Moyennes,
p. d.

Brevet N° **8 2 3 4 5**
 du **8 avril 1980**
 Titre délivré :

GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG



Monsieur le Ministre
 de l'Économie Nationale et des Classes Moyennes
 Service de la Propriété Industrielle
 LUXEMBOURG

Demande de Brevet d'Invention

I. Requête

La société dite: BRISTOL-MYERS COMPANY, 345 Park Avenue, (1)
à NEW-YORK, N.Y. 10022, Etats-Unis d'Amérique, représentée
par Monsieur Jacques de Muyser, agissant en qualité de man- (2)
dataire

dépose ce huit avril 1900 quatre-vingt (3)
 à 15 heures, au Ministère de l'Économie Nationale et des Classes Moyennes, à Luxembourg :

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant :
"Méthode de détection du cancer". (4)

Je déclare en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l(es) inventeur(s) est (sont) : (5)

2. la délégation de pouvoir, datée de NEW-YORK le 4 avril 1980
 3. la description en langue française de l'invention en deux exemplaires ;
 4. // planches de dessin, en deux exemplaires ;
 5. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg,

le 8 avril 1980
revendique pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de
 (6) brevet déposée(s) en (7) aux Etats-Unis d'Amérique
 le 10 avril 1979 (No. 028.732) (8)

au nom de S inventeurs (9)
élit domicile pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg
35, blvd. Royal (10)

sollicite la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les annexes
susmentionnées, — avec ajournement de cette délivrance à 6 mois.

Le mandataire

II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie Nationale et des Classes Moyennes, Service de la Propriété Industrielle à Luxembourg, en date du :

8 avril 1980

à 15 heures

Pr. le Ministre
 de l'Économie Nationale et des Classes Moyennes,
 p. d.

REVENDEICATION DE LA PRIORITE

de la demande de brevet / *du modèle d'utilité* /

En Aux ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Du 10 AVRIL 1979

Mémoire Descriptif

déposé à l'appui d'une demande de

BREVET D'INVENTION

au

Luxembourg

au nom de : BRISTOL-MYERS COMPANY

pour : "Méthode de détection du cancer".

La présente invention concerne une méthode diagnostique d'essai pour la détection de tumeurs malignes.

Des méthodes nouvelles sont sans aucun doute nécessaires pour la détection du cancer. Dans de nombreux cas, le diagnostic précoce du cancer multiplierait grandement les chances de rémission complète de la maladie.

La littérature décrit les tentatives qui ont été faites pour démontrer la présence de composants spécifiques des tumeurs tels que des hormones et des antigènes dans le sang de patients atteints de cancer. Toutefois, ces tentatives ont largement échoué et une méthode diagnostique pratique, non agressive, basée sur le taux d'un composant spécifique de la tumeur dans le sérum est un but qui n'a pas pu être atteint jusqu'à présent.

Récemment, la présence de protéines fixant l'ADN a été mise en évidence dans le sérum de patients atteints de néoplasies, de lupus érythémateux systémique et d'autres troubles inflammatoires (voir, par exemple, FEBS Letters 92(2) : 211-213 (1978) ; Europ J. Biochem. 71 : 1-8 (1976) ; Amer. J. Med. 65 : 437-445 (1978)). Cependant, aucune méthode analytique correcte, qui serait nécessaire pour un diagnostic pratique, n'a été proposée pour la recherche de ces protéines sériques. En outre, les protéines du sérum décrites dans l'art antérieur n'ont pas paru présenter le degré désiré de sélectivité dans une méthode de dépistage du cancer.

La protéine sérique inhibitrice utilisée dans la présente invention est décrite dans The Pharmacologists - (Abs.) 20 (3) : 238 (1978). Toutefois, le sommaire ne donne aucune indication sur la présence de la protéine à des taux différents chez des patients atteints de cancer, comparative-ment à des patients non cancéreux.

La présente invention propose une méthode diagnostique d'essai applicable d'une façon générale à la détection de tumeurs malignes chez des êtres humains. Plus particulièrement, l'invention propose une méthode diagnostique indiquant l'existence de tumeurs malignes par analyse d'échantillons de sérum humain pour détecter la présence

d'une protéine spécifique se liant à l'ADN. La méthode est utile pour la détection précoce d'une maladie de nature maligne et comme indicateur de progression de la maladie chez un patient cancéreux en traitement.

5 La méthode de l'invention est basée sur l'observation selon laquelle une protéine déterminée se liant à l'ADN (appelée ci-après protéine inhibitrice X) est présente à des concentrations notablement réduites dans le sérum de patients atteints de cancer comparativement à des patients
10 non cancéreux. En offrant une épreuve sensible de recherche de ces protéines sériques, la présente invention permet la détection rapide, non agressive et précise de l'existence d'un cancer.

 La présence d'une protéine particulière se liant
15 à l'ADN dans le sérum humain a été mise en évidence parallèlement à la présente invention au cours de travaux de recherche portant sur la dégradation induite par la bléomycine de l'ADN de PM-2 (ADN circulaire fermé par covalence, de bactériophage de Pseudomonas). L'observation de l'inhibition
20 de cette dégradation par le sérum humain a ouvert la voie à des études sur la nature de l'inhibition et à des tentatives d'identification du composé inhibiteur.

 L'hypothèse de la Demanderesse, selon laquelle l'inhibition de la réaction de dégradation de l'ADN de PM-2
25 est due à une protéine sérique, a été confirmée lorsqu'un traitement à la pronase a entraîné une baisse de l'activité inhibitrice. Un traitement à l'ADNase I ou à l'ARNase pancréatique n'exerce aucun effet sur l'activité inhibitrice du sérum. Des sérums de chiens et de veaux ne se sont pas
30 montrés inhibiteurs, pas plus que ne l'ont été l'albumine et les immunoglobulines humaines.

 La protéine inhibitrice a été purifiée dans des conditions non dénaturantes par l'utilisation de filtres moléculaires, par dialyse et par chromatographie sur colonne
35 de "Sephadex". La purification de la protéine a été considérablement améliorée par la liaison de la protéine à l'ADN, l'isolement du complexe ADN-protéine de la protéine non liée puis la dissociation de la protéine de l'ADN par traitement à

l'urée. La purification par électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide et par précipitation au point iso-électrique est considérée comme donnant un degré de pureté plus de 2000 fois supérieur. L'électrophorèse sur gel avec précipitation iso-électrique indique que l'inhibiteur est une protéine dont le poids moléculaire s'approche de 64 000 daltons et dont le pI est égal à 5,9. Cette protéine a été provisoirement appelée protéine inhibitrice X dans le présent mémoire.

La protéine inhibitrice X exerce son effet inhibiteur en se liant à l'ADN. La liaison à l'ADN a été mise en évidence par l'électrophorèse sur gel d'agarose, l'isolement du complexe ADN-protéine, l'extinction de la fluorescence et des études du dichroïsme circulaire.

Dans l'étude de la nature de la protéine inhibitrice X, on a découvert le fait très inattendu qu'il existe une différence notable entre le taux de cette protéine dans le sérum de patients atteints de cancer et son taux dans le sérum de patients non cancéreux. A partir de cette découverte importante, on a cherché à établir une méthode sensible et rapide de détection de la présence de la protéine inhibitrice X dans du sérum humain.

L'ADN de PM-2 a déjà été utilisé dans une méthode spectrofluorométrique pour déterminer l'activité biochimique de la bléomycine (Cancer Res. 38 : 3322-3326 (1978)). Le mécanisme d'action de la bléomycine semble être en relation avec son aptitude à dégrader l'ADN, et la décroissance de la liaison du bromure d'éthidium (bromure de 2,7-diamino-10-éthyl-9-phénylphénanthridinium) à l'ADN de PM-2 induite par la bléomycine, comme déterminé par la spectrométrie de la fluorescence, peut donc être utilisée pour doser l'activité en bléomycine.

Comme indiqué ci-dessus, on a observé que la protéine inhibitrice X agit comme inhibiteur de la dégradation de l'ADN de PM-2 sous l'effet de la bléomycine. Pour cette raison, l'épreuve fluorométrique utilisée dans l'art antérieur pour mesurer l'activité de la bléomycine peut aussi être utilisée pour déterminer la concentration de la protéine

inhibitrice X dans du sérum humain. Le taux de protéine inhibitrice X peut alors être utilisé pour prédire la probabilité de cancer chez le patient examiné.

La présente invention propose donc une méthode de
5 détection du cancer chez des êtres humains, qui comprend les étapes suivantes :

- (a) prélèvement d'un échantillon de sang à un patient examiné pour la recherche du cancer ;
- 10 (b) détermination de la concentration de la protéine inhibitrice X dans cet échantillon ; et
- (c) comparaison de la concentration déterminée dans l'étape (b) avec la concentration en protéine inhibitrice X normale correspondant
15 au sérum de patients non cancéreux, une réduction notable de la concentration en protéine inhibitrice X par rapport à la concentration normale étant un indice de proba-
20 bilité de cancer.

La méthode particulière de titrage utilisée dans l'étape (b) pour déterminer la concentration en protéine inhibitrice X dans le sérum n'est pas déterminante, et l'invention, dans son sens le plus large, réside dans le fait
25 établi que la concentration en protéine inhibitrice X (quel que soit son mode de détermination) peut être utilisée comme moyen de diagnostic pour une grande variété de cancers chez l'homme.

Une méthode de titrage qui s'est révélée
30 avantageuse est la méthode fluorométrique à l'ADN de PM-2 décrite dans Cancer Res. 38 : 3322-3326 (1976). L'utilisation de cette méthode est basée sur l'effet inhibiteur qu'exerce la protéine inhibitrice X sur la dégradation bien connue, induite par la bléomycine, de la réaction de l'ADN de
35 PM-2. Lorsqu'on a recours à cette méthode analytique, il est avantageux d'exprimer la concentration en protéine inhibitrice X par une valeur CI_{50} définie comme étant la concentration en protéine inhibitrice X nécessaire pour

inhiber 50 % de la dégradation de l'ADN de PM-2 induite par la bléomycine. Cette valeur CI_{50} peut ensuite être comparée à la valeur CI_{50} normale correspondant au sérum de patients non cancéreux, et une élévation importante de la valeur CI_{50} par rapport à la valeur normale est l'indice d'un cancer probable.

Des détails sur la méthode de dosage par fluorescence de l'ADN de PM-2 de la protéine inhibitrice X sont donnés ci-dessous :

On prépare d'abord un mélange d'un échantillon de sérum (par exemple un échantillon de 50 μ l) d'un patient à examiner avec une solution de bléomycine, d'ADN de PM-2 et de 2-mercapto-éthanol dans un tampon à pH 9,5. Normalement, un échantillon de 50 μ l de sérum est mélangé avec 450 μ l d'une solution renfermant 35 nanomoles de bléomycine, 8,3 micromoles d'ADN de PM-2 et 25 millimoles de 2-mercapto-éthanol dans un tampon au borate de sodium de pH 9,5 (NaCl 0,015 M : borate de sodium 0,05 M).

On fait ensuite incuber le mélange ci-dessus à 37°C pendant 30 minutes.

Une solution de bromure d'éthidium dans un tampon de dénaturation de pH 12,1 est ensuite préparée par addition de 0,1 ml d'une solution de bromure d'éthidium (22 μ g de bromure d'éthidium par ml de tampon de dénaturation de pH 12,1) à 0,9 ml de tampon de dénaturation de pH 12,1. Un tampon convenable de dénaturation est un tampon Na_3PO_4 0,09M : EDTA 0,01M : NaCl 0,01M, de pH ajusté à 12,1 par addition de NaOH 0,15M. On ajoute à 1 ml de cette solution de bromure d'éthidium une portion aliquote (par exemple 100 μ l) du mélange à base de sérum incubé, préparé comme indiqué ci-dessus.

La fluorescence du mélange de bromure d'éthidium et d'ADN de PM-2 est déterminée au moyen d'un spectrofluoromètre pour une excitation de 530 nm et une émission de 590 nm. Une fluorescence supérieure au fond est due à la liaison du bromure d'éthidium à l'ADN de PM-2, et une variation de fluorescence par rapport à une réaction témoin (identique à l'échantillon à analyser, mais ne renfermant pas

de bléomycine) permet d'exprimer quantitativement le degré de dégradation de l'ADN de PM-2 sous l'influence de la bléomycine. D'après les valeurs de fluorescence, on peut déterminer aisément le pourcentage d'inhibition de la dégradation de l'ADN de PM-2 due à la présence de la protéine inhibitrice X dans le sérum.

La concentration de la protéine inhibitrice X dans l'échantillon de sérum est ensuite déterminée par la méthode classique de Lowry (réactif phénolique de Folin), comme décrit dans J. Biol. Chem. 193 : 265-275 (1951).

La représentation graphique du pourcentage d'inhibition de la dégradation de l'ADN de PM-2 en fonction du logarithme de la concentration de la protéine inhibitrice X permet de déterminer aisément la valeur CI_{50} pour l'échantillon particulier de sérum.

Une fois que la valeur CI_{50} a été calculée pour un patient donné, cette valeur peut être utilisée directement pour prédire la probabilité de cancer chez ce patient. Des études approfondies effectuées sur des patients sains (non cancéreux) et des patients atteints d'une grande variété de tumeurs malignes ont montré que la protéine inhibitrice X se rencontre en quantités notablement plus faibles dans le sérum de patients atteints d'un cancer. Par conséquent, la valeur CI_{50} pour des patients cancéreux se montre notablement élevée par rapport à la valeur normale correspondant à des sujets sains. Cette nette différenciation des valeurs CI_{50} offre une base simple et précise de détection de la présence du cancer et forme l'objet principal de la présente invention.

La valeur CI_{50} précise obtenue à partir d'échantillons de sang de patients non cancéreux varie à un certain degré avec le sujet particulier. Chez les patients examinés jusqu'à ce jour, la valeur CI_{50} moyenne pour des sujets non cancéreux a été trouvée égale à $90,2 \pm 11,0$ $\mu\text{g/ml}$ (seuil de signification : 0,001). La plus forte valeur de CI_{50} observée pour un patient sain a été de 120 $\mu\text{g/ml}$.

Chez des patients cancéreux, les valeurs CI_{50} obtenues varient avec le type de cancer impliqué, mais dans tous les cas connus jusqu'à présent, la valeur a été

nettement supérieure à celles qui ont été obtenues pour des sujets non cancéreux. La valeur CI_{50} la plus faible connue jusqu'à ce jour pour un patient cancéreux a été de 270 $\mu\text{g/ml}$. Toutefois, en général, une valeur CI_{50} supérieure à environ 200 indique que le patient a de fortes chances d'être atteint d'une tumeur maligne d'un type ou d'un autre.

La méthode de la présente invention a été utilisée avec succès pour détecter une grande variété de types de cancer et on considère donc qu'elle s'applique d'une manière générale au diagnostic du cancer. Comme exemples particuliers de types de tumeurs détectés, on peut mentionner le cancer du testicule, le lymphome, la leucémie, l'adénocarcinome du sein, l'adénocarcinome des petites et grandes cellules du poumon, l'adénocarcinome du colon et le mélanome, pour n'en citer que quelques-uns. La méthode de l'invention paraît également être spécifique du diagnostic du cancer, étant donné que des patients non cancéreux atteints de diverses sortes de maladies non néoplastiques n'ont pas présenté de valeurs CI_{50} élevées associées à la présence du cancer.

L'épreuve de fluorescence décrite ci-dessus pour la recherche de la protéine inhibitrice X selon la présente invention est basée sur une propriété intrinsèque de cette substance, à savoir l'inhibition de la dégradation de l'ADN de PM-2 induite par la bléomycine. Des taux de cette protéine dans le sérum, déterminés par cette méthode, ont été mis en corrélation avec la présence ou l'absence d'une affection maligne dans la présente invention. Le fait de disposer d'une protéine inhibitrice X purifiée permet d'utiliser pour son dosage une diversité d'autres méthodes connues dans le domaine de la biochimie et de la chimie clinique. Parmi ces méthodes, on remarque principalement des méthodes immunologiques telles que l'épreuve radio-immunologique, l'épreuve fluoro-immunologique, l'épreuve immunologique enzymatique (par exemple ELISA), l'épreuve immunologique des spins, l'épreuve immunologique de chimioluminescence, l'épreuve immunologique par polarisation de la fluorescence, l'épreuve néphélométrique, des méthodes de diffusion sur gel et des

méthodes classiques telles que l'hémagglutination et la fixation du complément. En outre, d'autres propriétés fonctionnelles de la protéine inhibitrice X peuvent être exploitées pour son dosage dans des liquides biologiques. Des phénomènes catalytiques associés à la molécule peuvent être mesurés dans des épreuves spectrophotométriques ou spectrofluorométriques cinétiques ou basées sur un point de virage. En outre, une technologie de séparation peut être appliquée au liquide en question, et diverses méthodes de détection peuvent être utilisées pour doser quantitativement la protéine, par exemple des méthodes spectrales ou densitométriques et des méthodes immunologiques. Attendu que les méthodes ci-dessus permettent de déterminer spécifiquement la concentration en protéine inhibitrice X, il s'ensuit que des taux sériques de la protéine déterminés par de telles méthodes sont en corrélation avec la présence ou l'absence d'une affection maligne.

La protéine inhibitrice X a été purifiée conformément aux modes opératoires ci-après.

20 Purification partielle - Mode opératoire A

On purifie partiellement la protéine inhibitrice X par chromatographie sur colonne de "Sephadex". On charge 1 ml de sérum humain sur une colonne de "Sephadex G-75" (88 cm x 2 cm), puis on procède à l'élution dans un tampon au phosphate de sodium (0,07 M, pH 6,8) à un débit de 6 à 8 ml par heure, à la température ambiante. L'inhibiteur est contenu dans les volumes de vides qui sont recueillis, lyophilisés, remis en suspension dans 1 ml d'eau, dialysés vis-à-vis de 20 volumes d'eau pendant 24 heures à 4°C, puis chargés sur une colonne de "Sephadex G-200" équilibrée dans le même tampon.

L'élution de la colonne de "Sephadex G-200" donne trois pics qui absorbent à 280 nm. Le pic III qui représente 7,7 % de la protéine totale éluee contient la protéine inhibitrice X. Cette fraction est traitée de la manière décrite ci-dessus, puis chargée de nouveau sur une colonne de "Sephadex G-200". L'élution est effectuée avec le tampon au phosphate décrit ci-dessus. On recueille des fractions de

3 ml de chaque colonne au moyen d'un collecteur de fractions (Gilson Medical Electronics, Inc., Middleton, Wis.), et on trace les courbes d'élution en mesurant l'absorption à 280 nm au moyen d'un spectrophotomètre. Les concentrations en protéine sont déterminées par la méthode de Lowry.

Purification - Mode opératoire B

La purification de la protéine inhibitrice est effectuée par filtration moléculaire au moyen de filtres "Amicon", par dialyse et par chromatographie sur colonne de gel de "Sephadex". Les sérums humains (1 à 5 ml) sont centrifugés dans des tubes filtrants coniques "Amicon" (Amicon, Lexington, Mass.) à 5000 x g pendant 10 minutes à 4°C. La portion retenue qui reste dans le cône du filtre après la centrifugation est remise en suspension dans de l'eau désionisée dont le volume est ajusté au volume initial de sérum. Des portions aliquotes du résidu et du filtrat sont soumises à une épreuve d'activité inhibitrice. Le résidu actif est dialysé dans un tube de cellulose vis-à-vis de 20 volumes d'eau désionisée, à 4°C pendant 24 heures. Le résidu et le dialysat sont lyophilisés et remis en suspension dans de l'eau désionisée. Les résultats des épreuves portant sur les deux fractions montrent que l'activité inhibitrice réside dans la portion retenue. Cette portion (1 ml) est chargée sur une colonne de 60 x 5 cm de "Sephadex G-50" et éluee avec un tampon au phosphate de sodium (0,07 M, pH 6,8) à un débit de 30 ml par heure à 4°C. L'éluat de la colonne (5 ml par tube) est recueilli au moyen d'un collecteur de fractions "Buchler Fractomette Alpha 200" (Searle, Fort Lee, N.J.). L'absorption à 280 nm de chaque fraction est mesurée avec un spectrophotomètre et les tubes sont rassemblés conformément aux pics d'absorption. Les fractions rassemblées sont lyophilisées, dialysées et l'activité inhibitrice est déterminée par la méthode décrite ci-dessus. La substance "active" contenue dans la fraction de volume de vides est chargée sur des colonnes "Sephadex G-75" et "G-100" et éluee de la même manière que la colonne de "G-50". L'activité inhibitrice est trouvée dans les fractions de volume de vides des deux colonnes. La substance "active" qui

a été recueillie dans la fraction de volume de vides de la colonne Sephadex "G-200" est éluée avec un tampon au phosphate de sodium (0,07 M, pH 6,8) à la température ambiante, à un débit de 6 à 8 ml par heure. Les fractions
 5 sont recueillies (3 ml par tube) avec un collecteur de micro-fractions "Gilson" (Gilson, Middleton, Wis.). L'éluat de la colonne est fractionné sur la base du profil d'absorption de 280 nm par rassemblement des tubes au-dessous de chaque pic d'absorption. Chaque fraction est ensuite lyophilisée,
 10 dialysée et l'activité inhibitrice est déterminée comme décrit ci-dessus. L'activité inhibitrice est trouvée dans la fraction III. La substance contenue dans la fraction III est chargée à nouveau sur la colonne de Sephadex "G-200" et éluée dans les mêmes conditions. La fraction III de la colonne
 15 Sephadex "G-200" contenant la protéine inhibitrice X représente un facteur de purification supérieur à 1000.

La méthode d'analyse par fluorescence de l'ADN de PM-2 pour doser la protéine inhibitrice X est décrite en détail ci-dessous :

20 Détermination de la valeur CI_{50} pour la protéine inhibitrice X.

La détermination de la valeur CI_{50} (concentration de la protéine nécessaire pour inhiber à 50 % la dégradation de l'ADN de PM-2) pour doser la protéine inhibitrice X
 25 dans des sérums humains est effectuée en deux étapes :

1. La concentration en protéine dans le sérum est déterminée par la méthode de Lowry.

2. L'utilisation de l'épreuve de fluorescence de l'ADN de PM-2 pour la bléomycine, de manière à obtenir une
 30 courbe de réponse à la dose pour l'inhibiteur protéinique du sérum. Les valeurs CI_{50} sont déterminées d'après des représentations graphiques logarithmiques en probits de la variation du pourcentage d'inhibition de la dégradation de l'ADN en fonction des concentrations en protéine.

Modes opératoires :

I. Réaction de Lowry

A. Préparation de solutions-mères :

5 Solution A. Na_2CO_3 à 2 % dans l'hydroxyde de sodium décinormal.

Solution B. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à 1 % dans l'eau.

Solution C. Tartrate double de sodium et de potassium à 2 % dans l'eau.

10 Solution D. Réactif phénolique de Folin-Ciocalteu 2N.

B. Préparation de réactifs en solution

Réactif en solution 1. Mélanger 1 volume de solution-mère B avec 1 volume de solution-mère C.

15 Réactif en solution 2. Mélanger 50 volumes de solution-mère A avec 1 volume de réactif en solution 1.

Réactif en solution 3. Mélanger 1 volume de solution-mère D avec 1 volume d'eau.

20 C. Réactions

1. Diluer les sérums à 1:10 avec de l'eau.

2. Transférer 10 μl des sérums dilués dans un tube à essai en verre de 13 x 100 mm et ajouter 290 μl d'eau.

25 3. Ajouter 1 ml de réactif en solution 2, mélanger correctement et laisser incuber à la température ambiante pendant 10 minutes.

4. Ajouter 100 μl de réactif en solution 3, agiter correctement et laisser incuber pendant 30 minutes à la température ambiante.

30 5. Utiliser un spectrophotomètre pour mesurer l'absorption à 750 nm.

6. Déterminer la concentration en protéine d'après la courbe d'étalonnage de la sérum-albumine de boeuf.

D. Courbe d'étalonnage de la sérum-albumine de boeuf (SAB).

35 1. Préparer des dilutions en série de SAB (par exemple 25, 50, 75, 150 $\mu\text{g/ml}$ dans un volume final de 0,3 ml.

2. Conduire les réactions indiquées dans la partie C en partant de l'étape 3 (addition du réactif en solution 2).

3. Tracer la variation de l'absorption à 750 nm en fonction des concentrations en SAB.

II. Dosage de l'inhibiteur de protéine

- 5 A. Effectuer des dilutions en série de la protéine sérique, sur la base des concentrations en protéine du sérum déterminées par la réaction de Lowry. Effectuer les dilutions dans un volume constant de tampon au borate de sodium (0,05 M, pH 9,5).
- 10 B. Ajouter les échantillons de protéine sérique (volume de 50 µl) à 10 µl de bléomycine (34,5 nanomoles) contenus dans un tube à essai en verre (13 x 100 mm).
- C. Ajouter 390 µl de tampon au borate de sodium (0,05 M, pH 9,5) contenant 25 mM de 2-mercapto-éthanol.
- 15 D. Ajouter 50 µl d'ADN de PM-2 ($8,3 \times 10^{-6}$ M dans du chlorure de sodium 0,15 M).
- E. Faire incuber pendant 30 minutes à 37°C.
- F. Transférer des portions aliquotes en triple exemplaire (100 µl) dans des tubes à essai en verre (13 x 100 mm) contenant 0,9 ml de Na_3PO_4 (0,09 M, pH 12,1) contenant de l'EDTA 0,01 M et du chlorure de sodium 0,01 M. Agiter correctement.
- 20 G. Ajouter 100 µl de bromure d'éthidium ($55,7 \times 10^{-6}$ M) dans le tampon au phosphate trisodique, de pH 12,1. Agiter correctement.
- 25 H. Témoins :
 1. Borate de sodium (0,5 M, pH 9,5) contenant du 2-mercapto-éthanol sans bléomycine ni protéines.
 2. Protéine sans bléomycine ni ADN de PM-2.
 3. Protéine sans bléomycine.
 - 30 4. Borate de sodium (0,05 M, pH 9,5) contenant un blanc de 2-mercapto-éthanol.

I. Spectrophotofluorométrie (Aminco-Bowman)

- Transférer l'échantillon dans une petite cuve de quartz de 1 cm et mesurer la fluorescence pour une excitation de 530 nm et une émission de 590 nm.

REVENDEICATIONS

1. Méthode de détection du cancer chez des êtres humains, caractérisée en ce qu'elle consiste :

5 (a) à prélever un échantillon de sang sur un patient soumis au dépistage du cancer ;

(b) à déterminer la concentration en protéine inhibitrice X dans ledit échantillon ; et

10 (c) à comparer la concentration déterminée dans l'étape (b) avec la concentration normale en protéine inhibitrice X associée au sérum de patients non cancéreux, une réduction importante de la concentration en protéine inhibitrice X par rapport à la concentration normale étant l'indice de la probabilité d'un cancer.

15 2. Méthode de détection du cancer chez des êtres humains, caractérisée en ce qu'elle consiste :

(a) à prélever un échantillon de sang sur un patient soumis au dépistage du cancer ;

20 (b) à déterminer dans ledit échantillon la concentration en protéine inhibitrice X nécessaire pour inhiber 50 % de la dégradation de l'ADN de PM-2 induite par la bléomycine ; et

25 (c) à comparer la valeur CI_{50} déterminée dans l'étape (b) avec la valeur CI_{50} normale associée au sérum de patients non cancéreux, une élévation importante de la valeur CI_{50} par rapport à la valeur normale étant l'indice de la probabilité d'un cancer.

3. Méthode suivant la revendication 2, caractérisée en ce que la détermination de la valeur CI_{50} dans l'étape (b) est effectuée par les étapes suivantes :

30 (1) préparation d'un mélange de l'échantillon sanguin avec une solution de bléomycine, d'ADN de PM-2 et de 2-mercapto-éthanol dans un tampon de pH 9,5 ;

(2) incubation du mélange de l'étape (1) pendant 30 minutes à une température de 37°C ;

35 (3) addition d'une portion aliquote du mélange de l'étape (2) à un mélange de bromure d'éthidium dans un tampon de dénaturation de pH 12,1 ;

(4) détermination de la fluorescence du mélange de bromure d'éthidium et d'ADN de PM-2 de l'étape (3) avec un spectrophotofluoromètre pour une excitation à 530 nm et une émission à 590 nm ;

5 (5) détermination du pourcentage d'inhibition de la dégradation, induite par la bléomycine, de l'ADN de PM-2 d'après la variation de fluorescence de l'échantillon par rapport à un échantillon témoin ne renfermant pas de bléomycine ;

10 (6) détermination de la concentration en protéine inhibitrice X par la méthode de Lowry ; et

(7) détermination, d'après les valeurs obtenues dans les étapes (5) et (6), de la concentration en protéine inhibitrice X nécessaire pour inhiber 50 % de la dégradation,
15 induite par la bléomycine, de l'ADN de PM-2.