

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 09.09.91.

③0 Priorité : 10.09.90 IE 326690.

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 13.03.92 Bulletin 92/11.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : *Le rapport de recherche n'a pas été
établi à la date de publication de la demande.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : ELAN CORPORATION, PLC — IE.

⑦2 Inventeur(s) : Masterson Joseph Gérard.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Armengaud Ainé.

⑤4 Méthode pour déterminer le risque d'évolution d'une infection provoquée par HIV et sa mise en œuvre.

⑤7 La méthode de détermination d'un risque d'évolution d'une infection provoquée par HIV chez un sujet, qui est indépendante des autres indices de risque d'une telle évolution, comprend la détermination dans un échantillon d'un fluide ou d'une sécrétion corporel prélevé chez ledit sujet d'un taux de DHEA qui est à l'extrémité inférieure de, ou plus petit que la plus faible valeur de la gamme de référence de 180-1250 ng/dl. La méthode peut être utilisée pour déterminer les taux de DHEA chez un sujet, indiquant une prédisposition à, ou confirmant une possibilité de l'évolution d'une infection par HIV, et pouvant être évitée par administration de DHEA ou d'un sel ou d'un conjugué de celle-ci.

(FIN DE FICHE D'ANNÉE POUR CETTE SOUS-CLASSE)

FR 2 666 657 - A1



5

METHODE DE DEPISTAGE ET SA MISE EN OEUVRE

10

La présente invention a pour objet une méthode pour déterminer le risque d'évolution de l'infection provoquée par le Virus d'Immunodéficience Humaine (HIV) chez un sujet, la méthode étant basée sur les taux d'hormone dans le sérum.

15 UK-A 2 204 237 décrit l'utilisation de certains 17-cétostéroïdes, comprenant la déhydroépiandrostérone (DHEA), dans la prophylaxie et le traitement des infections rétrovirales, y compris l'infection par HIV, le Syndrome d'ImmunoDéficience Acquisée (SIDA) et le complexe lié au SIDA (ARC). En particulier,
20 UK-A 2 204 237 décrit l'inhibition de la production d'antigène HIV p24 dans les macrophages infectés par HIV.

Bricaire F. et al. (La Presse Médicale, Sept. 1988, 17, n° 30) ont déterminé le profil hormonal (hormones sexuelles et cortisol) chez douze personnes atteintes du SIDA et chez vingt huit
25 personnes ayant le ARC. Les quarante personnes étaient des hommes homosexuels dont l'âge moyen était de trente sept ans. Les taux globaux d'hormones sexuelles, comprenant le sulfate de déhydroépiandrostérone (DHEA-S), se sont révélés être notablement réduits chez les patients ayant le SIDA et le ARC, alors
30 que les taux de cortisol étaient inchangés.

Jacobson M.A. et al. (Abstracts of the 5th International Conference on AIDS, Montreal, Juin 1989) ont décrit une inhibition à cinquante pourcents de l'expression du macrophage HIV p24 à des concentrations de DHEA de 3-30 µg/ml. Ils ont également
35 observé que des hommes homosexuels séronégatifs à risque vis-à-vis du HIV ont un taux de DHEA-S dans le sérum nettement supérieur à celui des hommes du même âge HIV-positifs ou à celui

des donneurs de sang HIV-négatifs en bonne santé. Ils en ont conclu que la DHEA/DHEA-S peut avoir un effet de protection dans les infections par HIV.

5 Wisniewski T. et al. (Abstracts of the 7th International Conference on AIDS, Florence, Juin 1991) ont étudié la relation entre les taux de DHEA et le cortisol, les taux absolus de T4 et l'état clinique de la maladie d'individus HIV-positifs. Quatre vingt dix huit adultes ayant une infection par HIV avaient des taux déterminés de cortisol et de DHEA dans le plasma, soixante sept
10 parmi eux ayant des taux absolus T4 simultanés estimés ; l'état clinique était déterminé par un examen historique et physique. Les auteurs ont trouvé une relation importante entre des taux de DHEA et les taux absolus de T4, mais pas entre les taux absolus de T4 et de cortisol ou les rapports cortisol/DHEA. Ils en ont conclu qu'une
15 relation positive existe entre l'état immunitaire et les taux de DHEA.

Mulder J.H. et al. (Abstracts of the 7th International Conference on AIDS, Florence, Juin 1991) ont suivi un groupe d'hommes homosexuels, initialement asymptomatiques, infectés par HIV-1. Les taux de DHEA dans le sérum ont été déterminés chez
20 quarante et un sujets qui ont évolué vers le SIDA pendant une période de cinq années, les mesures initiales étant réalisées sur un échantillon de sérum de 1985 et la mesure finale, sur un échantillon de sérum prélevé quatre mois avant le diagnostic du SIDA. Quarante et un sujets infectés par HIV, du même âge, qui sont
25 restés asymptomatiques pendant la période du suivi, ont servi comme témoins. Les comptes CD4⁺ et l'antigénaémie de HIV p24 ont également été déterminés. Les sujets qui ont évolué vers le SIDA ont montré une diminution notable des taux de DHEA, alors que les témoins ne présentaient pas ce phénomène. Les taux de
30 DHEA, les comptes de CD4⁺ et l'état d'antigène de HIV p24 se sont révélés des symptômes de prédiction indépendants de l'évolution de la maladie. Les auteurs en ont conclu que chez les sujets ayant une infection par HIV-I, asymptomatiques, une diminution des taux de DHEA est observée avant le développement du SIDA.

35 Jacobson M.A. et al. (Journal of Infectious Diseases, sous presse) ont décrit une étude sur les taux de DHEA et de DHEA-S dans le sérum et l'évolution subséquente vers le SIDA chez des

hommes homosexuels ayant une infection par HIV, dans le San Francisco Men's Health Study, suivis de façon prospective depuis 1984. Parmi cent huit hommes séropositifs vis-à-vis du HIV au début de l'étude, et ayant un compte de lymphocytes CD4 dans la gamme de 200-500 cellules/ μ l, des taux de DHEA inférieurs à la limite inférieure de la normale (< 180 ng/dl) permettent de prévoir l'évolution subséquente vers le SIDA, après contrôle des hématokrites, de l'âge et des nombres absolus de cellules CD4. Les auteurs ont conclu que la DHEA peut présenter un effet de protection dans les infections par HIV.

La DHEA et son sulfate DHEA-S interconvertible ont été décrits comme inhibant l'expression virale et ont été associés avec un risque diminué de cancer (Schwartz A.G. et al., Toxicologic Pathology, 1986, 14, n° 3). Des taux de DHEA-S accrus ont été associés à une apparition réduite du cancer du sein (Schwartz A.G. et al., Nutrition and Cancer, 1981, 3, n° 1).

Selon la présente invention, il est fourni une méthode pour déterminer le risque d'évolution d'une infection par HIV chez un sujet, qui est indépendante d'autres indices du risque d'une telle évolution, ladite méthode comprenant la détermination dans un échantillon d'un fluide corporel ou d'une sécrétion corporelle dudit sujet du taux de DHEA, qui est à l'extrémité inférieure, ou inférieure à la valeur la plus faible, d'une gamme de référence de 180-1250 ng/dl, comme défini ci-après.

La gamme de référence utilisée ci-après pour la DHEA est la gamme de référence du Nichol's Institute, San Francisco, U.S.A.

Il a été déterminé que de faibles taux de DHEA, c'est-à-dire ≤ 180 ng/dl chez des sujets séropositifs pour le HIV, semblent être associés avec une évolution de la maladie indépendamment des facteurs tels que l'âge, le comptage de CD4 et les hématokrites (Jacobson M.A. et al. (Journal of Infectious Diseases, sous presse) est inclus ici à titre de référence).

De plus, de préférence, l'échantillon de fluide ou de sécrétion corporel est prélevé chez un sujet ayant un nombre de lymphocytes CD4 de 200-500 cellules/ μ l.

De plus, de préférence, l'échantillon utilisé pour la détermination de la DHEA selon l'invention est un fluide corporel.

Le fluide corporel est de préférence le sang ou une fraction du sang.
La fraction du sang est de préférence le plasma ou le sérum.

La quantité de DHEA peut être mesurée de différentes façons
secundem artem. Ainsi, la DHEA peut être mesurée par
5 chromatographie en phase gazeuse liquide (GLC).

Toutefois, les laboratoires cliniques ou les praticiens de
chirurgie ne sont généralement pas équipés des appareils
nécessaires pour réaliser un test GLC. Ainsi, de préférence, la
détermination de DHEA selon la présente invention est réalisée par
10 un dosage immunologique.

En conséquence, la DHEA peut être déterminée par un dosage
radioimmunologique ou un dosage enzymoimmunologique. Comme
pour la GLC, les laboratoires cliniques peuvent ne pas être équipés
et il est peu probable que les praticiens chirurgiens aient les
15 équipements et les moyens pour réaliser des dosages
radioimmunologiques.

Ainsi, le dosage immunologique pour la détermination de la
DHEA selon l'invention est réalisé de préférence par un dosage
enzymoimmunologique.

20 Ainsi, selon un mode de réalisation de la présente invention, il
est fourni une méthode de dosage immunologique pour la
détermination du composant antigène DHEA de la réaction
antigène DHEA-anticorps qui comprend :

- 25 a) l'addition d'un échantillon d'un fluide ou sécrétion corporel,
contenant de la DHEA, à une quantité d'anti-DHEA sous une
forme insolubilisée ;
- b) le déroulement de la réaction immunochimique ; et
- 30 c) l'estimation de la quantité de DHEA liée audit anti-DHEA
insolubilisé.

La quantité de DHEA liée peut être déterminée par Western
35 Blotting d'une manière connue en soi.

Toutefois, la quantité de DHEA liée peut être également
déterminée par voie enzymatique d'une manière connue en soi.

Ainsi, une méthode de dosage immunologique selon l'invention peut comprendre :

- 5 a) l'addition d'un échantillon d'un fluide ou sécrétion corporel contenant de la DHEA à une quantité d'anti-DHEA sous une forme insolubilisée ;
- 10 b) le déroulement de la réaction immunochimique, tout en ajoutant simultanément ou subséquentement une quantité prédéterminée d'anti-DHEA marqué ; et
- 15 c) l'estimation de la quantité de DHEA par détermination de la quantité d'anti-DHEA marqué libre ou lié, d'une manière connue en soi.

L'anti-DHEA lié peut être mis en contact avec de l'immunoglobuline anti-mammifère avant la détermination enzymatique.

20 L'anticorps insolubilisé peut être un anticorps polyclonal ou un anticorps monoclonal.

Lorsqu'on utilise l'anticorps monoclonal, ce peut être de préférence un anticorps monoclonal humain, de souris ou de rat, préparé par des méthodes classiques comprenant les méthodes existant généralement pour la production d'anticorps monoclonaux
25 à l'échelle industrielle, d'anticorps ou de fragments d'anticorps monoclonaux préparés par génie génétique ou d'anticorps produits par immunisation in vitro de cellules appropriées.

De préférence, l'anticorps monoclonal est de la classe IgG.

Les méthodes de dosage immunologique selon la présente
30 invention peuvent être réalisées en utilisant un format connu quelconque, par exemple des billes, des tiges, des membranes, des particules, des plaques, des batonnets, des bandes, etc. Par exemple, l'anticorps insolubilisé ou en phase solide tel qu'utilisé selon la présente invention est lié de préférence à une bille, une tige, une
35 membrane, une particule, une plaque, un batonnet, une bande, un tube, une alvéole, ou autres, en matière plastique ou en verre, d'une manière connue en soi. Les billes en latex, en nylon ou en un autre

matériau approprié peuvent être utilisées selon des méthodes connues en soi.

En particulier, la forme insolubilisé de l'anticorps comprend ledit anticorps adsorbé à la surface adaptée pour l'adsorption de protéines. Ladite surface peut être une bille, un liposome, une membrane, une particule, une plaque, un batonnet, un tube, une alvéole, ou autres, et en un matériau tel que spécifié ci-dessus.

Dans les conditions de laboratoire appropriées, la surface comprend une plaque ou une bande de microtitrage en matière plastique, adaptée pour l'adsorption de protéines, dans laquelle la réaction immunochimique et l'estimation de la DHEA peuvent avoir lieu. Les plaques de microtitrage sont de préférence des plaques de microtitrage en polystyrène comportant des alvéoles plates, commercialisées par Dynatech sous le nom commercial de MICROELISA. Des exemples de bandes sont des bandes commercialisées par Dynatech sous le nom commercial de REMOVAWELL.

La surface concernée peut être revêtue directement avec une dilution optimale de l'anticorps polyclonal préparé par séparation de la fraction d'immunoglobuline concernée de l'antisérum ou selon une variante, de l'anticorps monoclonal.

L'estimation de la DHEA liée dans l'échantillon peut être réalisée par un dosage enzymatique, fluorométrique, luminométrique ou radiométrique, en utilisant des enzymes, des fluorochromes, des échantillons émetteurs de lumière ou des marqueurs radioactifs, respectivement dans les dosages qualitatifs et semiquantitatifs. L'estimation peut être réalisée visuellement, par exemple lorsque le dosage implique l'utilisation de billes colorées ou autres, d'une manière connue en soi, comme la méthode décrite dans EP-A 0 154 749.

Les agents marqués destinés à l'utilisation dans les dosages selon l'invention sont préparés de manière classique ou sont achetés chez les fournisseurs appropriés. Ces agents marqués sont généralement sous la forme conjuguée tels que les anticorps marqués par enzyme, destinés à l'utilisation dans les dosages de liaison par compétition. L'agent marqué peut être un anticorps lié par covalence à un marqueur radioactif utilisable dans un dosage

radiométrique, lorsque les dosages sont réalisés dans les conditions de laboratoire fournissant l'équipement et le savoir-faire nécessaire.

Dans des conditions de laboratoire, l'estimation de la DHEA
5 liée peut être réalisée par un dosage enzymoimmunologique, par
exemple en utilisant un anticorps approprié marqué à la
peroxydase ou un autre conjugué de peroxydase approprié. Une
peroxydase appropriée est la peroxydase de raifort. Un autre
conjugué de peroxydase approprié est un complexe de peroxydase
10 avidine-biotine, qui peut être utilisé avec un conjugué anticorps-
biotine pour renforcer le dosage enzymoimmunologique d'une
manière classique. Dans un dosage enzymoimmunologique de ce
type, l'antigène insolubilisé sur l'anticorps en phase solide se lie au
complexe anticorps-biotine qui à son tour se lie au complexe de
15 peroxydase avidine/streptavidine-biotine, ce qui permet de
mesurer l'activité peroxydase.

Les méthodes décrites ci-dessus peuvent être utilisées pour
déterminer les taux de DHEA chez un sujet, indiquant une
prédisposition à, ou confirmant une probabilité d'évolution de
20 l'infection par HIV et pouvant être évitée par administration de
DHEA ou d'un sel ou d'un conjugué de celle-ci.

L'invention fournit également différents kits ou boîtes de test
contenant les composants/ingrédients nécessaires pour réaliser les
méthodes de diagnostic selon l'invention. Un tel kit ou boîte de test
25 peut contenir des tubes revêtus d'anticorps contenant tous les
composants nécessaires pour la mise en oeuvre des méthodes de
diagnostic selon l'invention lorsqu'on y ajoute un échantillon d'un
fluide corporel.

Il est également possible de fournir une bande contenant tous
30 les composants/ingrédients nécessaires pour réaliser un dosage
rapide, en une étape, selon la présente invention, en déposant
dessus un fluide corporel d'une manière connue en soi.

La base théorique de l'invention est l'étude suivante, décrite
par Jacobson et al. (Journal of Infectious Diseases, In Press)
35 mentionnée plus haut.

Les sujets participant à une étude de santé de San Francisco
(San Francisco Health Study) ayant débuté en 1984, ont été évalués

à des intervalles de six mois, appelés des cycles, par prélèvement d'échantillons de sérum qui ont été congelés à -70°C . Les sérums prélevés chez 108 individus de sexe masculin, homosexuels, HIV-séropositifs, participant à cette étude, ont été testés pour

5 déterminer l'association entre les taux de DHEA et l'évolution du SIDA. Au cinquième cycle d'étude, lorsque chacun des sujets avait un compte de CD4 dans la gamme de 200-500 cellules/ μl , les taux de DHEA ont été déterminés par dosage radioimmunologique. Les

10 taux de DHEA ont été ainsi mesurés à chaque cycle de suivi et les sujets ont été divisés en deux groupes selon que leurs taux de DHEA dans le plasma étaient de (i) $< 180 \text{ ng/dl}$ ou (ii) $\geq 180 \text{ ng/dl}$. Les

15 deux groupes ont été ensuite subdivisés selon que les sujets ont complètement développé le SIDA ou non. Pendant une période intermédiaire de suivi de 37 mois, 16 individus sur 27, ayant des

taux de DHEA inférieurs à la normale ($< 180 \text{ ng/dl}$) ont évolué jusqu'au stade du SIDA, par rapport à 22 individus sur 81 ayant des taux de DHEA normaux.

L'étude de suivi a démontré qu'il existe une relation entre les faibles taux de DHEA chez des sujets impliqués dans l'étude et

20 l'évolution vers un SIDA complètement développé, indépendamment de l'âge, du nombre de CD4 et des hémocrites du sujet, comme on le démontre ci-après.

Lors de l'évaluation des données, on a ajusté une série de modèles de régression de risque proportionnel Cox pour estimer le

25 risque relatif de développement du SIDA associé au taux de DHEA inférieur à la normale, aussi bien seul qu'ajusté au taux des autres facteurs covariables.

Les risques relatifs de développement du SIDA associés aux taux de DHEA inférieurs à la normale, seuls et ajustés à l'influence

30 d'autres facteurs covariables, mesurés pendant le cinquième cycle, sont rassemblés dans le tableau 1.

TABLEAU 1**RISQUES RELATIFS DE DEVELOPPEMENT DU SIDA**

5

	Agent de prévision	Risque relatif	valeur-p
10	DHEA < 180 (seule)	2,38	< 0,01
	DHEA < 180 (ajustée)	2,34	0,02
	Age/10	2,18	< 0,01
	Hématocrites < 40	4,57	< 0,01
15	Cellules de CD4/10	0,99	0,71

La présente invention s'appuie donc sur les analyses ci-dessus qui confirment une association notable entre les taux de DHEA <180 ng/dl et un risque accru d'évolution vers le SIDA. Cette association s'est révélée persister même après l'ajustement au nombre d'hématocrites et de lymphocytes CD4, qui sont connus comme étant des agents de prévision indépendants pour l'évolution des maladies provoquées par le HIV.

REVENDECATIONS

1. Méthode de détermination du risque d'évolution d'une
5 infection provoquée par le HIV chez un sujet, indépendante des
autres indices du risque d'une telle évolution, ladite méthode étant
caractérisée en ce qu'elle comprend la détermination dans un
échantillon d'un fluide corporel ou d'une sécrétion corporelle
prélevé chez ledit sujet, du taux de DHEA qui est à l'extrémité
10 inférieure, ou plus faible que la valeur inférieure, d'une gamme de
référence de 180-1250 ng/dl.

2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce
que l'échantillon de fluide ou de sécrétion corporel est prélevé chez
15 un sujet ayant un compte de lymphocytes CD4 de
200-500 cellules/ μ l.

3. Méthode selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en
ce que le taux de DHEA est ≤ 180 ng/dl.
20

4. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1
à 3, caractérisée en ce que le fluide corporel est le plasma ou le
sérum.

5. Méthode selon l'une quelconque des revendications
25 précédentes, caractérisée en ce que la DHEA est déterminée par
chromatographie liquide gazeuse.

6. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1
30 à 4, caractérisée en ce que la détermination de la DHEA est réalisée
par dosage immunologique.

7. Méthode de dosage immunologique pour la
détermination de l'antigène DHEA de la réaction antigène DHEA-
35 anticorps, qui comprend :

11

- a) l'addition d'un échantillon d'un fluide ou d'une sécrétion corporel contenant de la DHEA à une quantité d'anti-DHEA sous une forme insolubilisée ;
 - 5 b) le déroulement de la réaction immunochimique ; et
 - c) l'estimation de la quantité de DHEA liée audit anti-DHEA insolubilisé.
- 10 8. Méthode selon la revendication 7, qui comprend :
- a) l'addition d'un échantillon d'un fluide ou d'une sécrétion corporel contenant de la DHEA à une quantité d'anti-DHEA sous une forme insolubilisée ;
 - 15 b) la réalisation de la réaction immunochimique, tout en ajoutant simultanément ou subséquentment une quantité prédéterminée d'anti-DHEA marqué ; et
 - 20 c) l'estimation de la quantité de DHEA par détermination de la quantité d'anti-DHEA marqué libre ou lié, d'une manière connue en soi.
- 25 9 . Kit de test contenant un ou plusieurs composant(s), destiné à la mise en oeuvre de la méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

30