

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 17.11.00.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 24.05.02 Bulletin 02/21.

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

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : UNIVERSITE PIERRE ET MARIE
CURIE (PARIS VI) Etablissement public — FR et
PIERRE FABRE MEDICAMENT — FR.

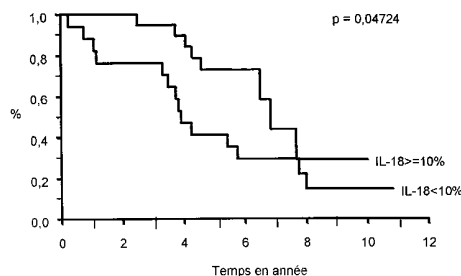
⑦② Inventeur(s) : PAGES FRANCK, FRIDMAN WOLF
HERMAN, THIOUNN NICOLAS et LEBEL BINAY
SOPHIE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤④ UTILISATION DE L'IL-18 COMME FACTEUR DE PRONOSTIC DU CANCER DE LA PROSTATE.

⑤⑦ La présente invention est relative à l'utilisation de l'IL-18 comme facteur de pronostic du cancer de la prostate et à un procédé de pronostic du cancer de la prostate. L'invention comprend également un kit de détection et/ ou de dosage d'IL-18 ou de l'ARNm codant pour l'IL-18 pour le pronostic du cancer de la prostate chez un sujet.



La présente invention est relative à l'utilisation de l'IL-18 comme facteur de pronostic du cancer de la prostate et à un procédé de pronostic du cancer de la prostate. L'invention comprend également un kit de détection et/ou de dosage d'IL-18 ou de l'ARNm codant pour l'IL-18 pour le pronostic du cancer de la prostate chez un sujet.

5 L'adénocarcinome de la prostate survient essentiellement chez l'homme âgé de plus de 50 ans, et 85 % des cas sont diagnostiqués chez l'homme de plus de 60 ans. C'est aujourd'hui le cancer le plus fréquent de l'homme après celui du poumon, puisqu'on dénombre en France environ 12 000 nouveaux cas par an. Le cancer de la prostate est un cancer dont l'incidence et la mortalité sont actuellement en constante augmentation. Des
10 estimations réalisées aux Etats-Unis en 1992 (National Center of Health Statistics and Bureau of the Census) montrent que le cancer de la prostate est désormais le premier cancer de par son incidence devant le cancer du poumon et qu'il est la seconde cause de décès chez l'homme après le cancer du poumon. Les séries autopsiques dont celles de Franks en 1954 ont permis d'estimer la prévalence de ce cancer avec des taux de 30, 40
15 et 67 % dans les 5ème, 6ème et 7ème décennies. On retiendra par ailleurs que 8 % des hommes présenteront une forme clinique, et que 3 % des hommes mourront d'un cancer de la prostate.

Dans le cancer de la prostate, il faut distinguer le cancer cliniquement symptomatique (avec des signes d'appel) et le cancer occulte (de découverte fortuite). A
20 titre d'exemple chez des hommes de 90 ans, on trouve 30 % de cas de cancers occultes qui ne se manifestent jamais et ne seront pas la cause du décès.

Il n'y a pas de facteur favorisant ni de cause connus pour ce cancer bien qu'une alimentation riche en graisses animales soit suspectée. Son caractère héréditaire est également discuté. L'adénocarcinome naît dans la prostate, parfois en plusieurs points,
25 puis gagne l'ensemble de la glande et s'étend dans la graisse péri-prostatique. Ensuite il envahit des organes voisins tels que la vessie, les vésicules séminales et les ganglions pelviens. Les métastases sont osseuses dans 90 % des cas.

Deux marqueurs en relation avec le cancer de prostate sont trouvés dans le sang : la phosphatase acide prostatique (PAP) et l'antigène spécifique de prostate PSA
30 (Prostate Specific Antigen). Le PSA est une protéine essentiellement produite par le tissu prostatique, mais qui n'est pas spécifique du cancer, son taux peut être également

élevé quand la prostate est inflammatoire (prostatite) ou adénomateuse (tumeur bénigne).

Le dépistage peut se faire par l'examen de la prostate au toucher rectal et le dosage de la PSA. Si ces examens sont anormaux, le cancer doit être prouvé par biopsie.

- 5 Dans une proportion importante de cas, on finira par découvrir un cancer de la prostate avant tout symptôme, mais sans pouvoir prévoir son agressivité potentielle qui déterminera son mode évolutif.

- 10 Il ne semble pas exister de relations causales entre adénome et cancer de la prostate. Ce dernier est sensible aux hormones mâles (testostérone) qui accélèrent l'évolution tandis que leur suppression la ralentit : on dit qu'il est hormonosensible, mais avec le temps il devient insensible à ces hormones (cancer hormonorésistant).

- 15 Les symptômes sont habituellement absents dans les formes localisées. Les troubles mictionnels sont liés soit à une hyperplasie bénigne de la prostate associée, soit à un nodule adénocarcinomeux au contact de l'urètre prostatique. A un stade plus tardif, ce sont les signes d'une tumeur évoluée qui peuvent être présents : altération de l'état général, douleurs ou fractures, liés à des localisations secondaires osseuses, signes de compression veineuse, urétrale ou urétérale. Le diagnostic du cancer prostatique repose sur l'examen anatomopathologique des biopsies transrectales écho guidées ou sur la pièce opératoire d'une adénomectomie prostatique réalisée pour troubles mictionnels.
- 20 Le diagnostic est suspecté devant une élévation du taux de PSA, devant une induration de la prostate au toucher rectal, et devant une zone hypoéchogène de la zone périphérique de la prostate à l'échographie. La scintigraphie osseuse, la tomodensitométrie abdominopelvienne, la radiographie du thorax, et éventuellement l'IRM (imagerie par résonance magnétique nucléaire) avec antenne endorectale font
- 25 partie du bilan d'extension.

- En cas de cancer localisé, il y a deux possibilités de traitement : la radiothérapie et la chirurgie. La radiothérapie peut être externe, conformationnelle et fractionnée en près de 38 séances sur la loge prostatique et éventuellement sur les ganglions voisins. Elle est fréquemment associée à un blocage androgénique temporaire de 6 mois. Elle
- 30 peut provoquer une irritation de la vessie (cystite) ou du rectum (rectite), et entraîner des troubles érectiles. La radiothérapie interstitielle ou Curiethérapie est en cours d'évaluation et donnerait des résultats comparables à la radiothérapie externe en une

seule application sous anesthésie générale. La chirurgie consiste à réaliser une prostatectomie totale après avoir examiné extemporanément les ganglions iliaques externes qui ne doivent pas être envahis par des cellules adénocarcinomeuses. Deux complications principales peuvent survenir : une incontinence urinaire (en général
5 passagère) et des troubles érectiles le plus souvent définitifs. Parfois on complète l'acte chirurgical par une radiothérapie externe.

S'il existe des métastases, le traitement consiste à supprimer la production des hormones mâles, puisque le cancer de prostate est le plus souvent initialement hormonosensible. Ce traitement repose sur les agonistes de la LH-RH (LH-RH pour
10 « luteinizing hormone-releasing hormone ») et les anti-androgènes. La castration est plus rarement réalisée car elle est moins bien acceptée par les patients. L'association d'un agoniste de la LH-RH et d'un anti-androgène réalise un blocage androgénique complet. Sous l'effet du traitement, le taux de PSA diminue le plus souvent et peut se normaliser. Les effets secondaires sont les bouffées de chaleur, l'ostéoporose et surtout les troubles
15 de la sexualité. La réascension du taux de PSA correspond à l'échappement hormonal, traduisant l'hormonorésistance des cellules tumorales prostatiques.

De nombreux patients présentent des cancers de la prostate sans pour autant être gènes par ce cancer. Ainsi, une des attitudes actuellement préconisées est de ne pas traiter dans des formes non évolutives chez des patients ayant une espérance de vie de
20 moins de 10 ans.

Parmi les facteurs de pronostic du risque évolutif du cancer de la prostate chez des patients, on peut citer également la détermination du taux sérique de l'IL-6 associée à la présence de métastases osseuses (Nakashima et al., Clin. Cancer Res., 6(7), 2702-2706, 2000).

25 La détermination du taux sérique de l'IL-6 décrite dans le document Nakashima et al. aurait l'avantage de pouvoir être effectuée directement à partir d'une prise de sang sur un échantillon de sérum du patient. Néanmoins, la spécificité du test reste faible compte tenu du grand nombre de situations pathologiques autres que prostatiques pouvant modifier le taux sérique d'IL-6.

30 L'ensemble de ces observations montre qu'il est nécessaire de définir des facteurs pronostics permettant de déterminer à un stade précoce le risque évolutif du cancer de la prostate, afin de mieux guider les indications thérapeutiques.

Les inventeurs de la présente invention ont observé de manière tout à fait surprenante que chez des patients atteints d'un cancer de la prostate, pour des cancers intra-épithéliaux et des tumeurs prostatiques plus évoluées, la quantité d'IL-18 produite par les cellules tumorales est corrélée à l'évolution clinique des patients.

5 L'interleukine-18 (IL-18) est apparentée aux cytokines de la famille de l'IL-1. L'IL-18 est synthétisée sous la forme d'un précurseur (pro-IL-18) de 24 kDa, précurseur qui serait dépourvu d'activité biologique et doit être clivée par l'enzyme ICE (ICE pour « IL-1 β Converting Enzym », appelée encore caspase-1) (comme l'IL-1 β) pour obtenir une forme mature active de 18 KDa.

10 L'IL-18 est principalement produite par les cellules immunitaires spécialisées dans la présentation antigénique. Elle participe à l'initiation et à l'orientation de la réponse immunitaire vers un profil de sécrétion de cytokines lymphocytaires de type Th1 (IL-2, interféron gamma (IFN-gamma)), favorise une réponse cellulaire cytotoxique de type FasL (Ligand-Fas de récepteur de surface cellulaire directement responsable du
15 déclenchement de la mort cellulaire par apoptose) ou perforine, et induit la synthèse de nombreux médiateurs de l'inflammation (Lebel-Binay S *et al.*, Eur. Cytokine Network 2000, 11:15-25).

Les propriétés immunologiques de l'IL-18 favoriseraient la réponse immunitaire cellulaire anti-tumorale. Ainsi, il a été observé dans les cancers coliques, qu'un niveau
20 élevé d'expression des transcrits d'IFN-gamma et de ICE, témoins d'une réponse immunitaire IL-18-dépendante, était associé à l'absence de métastases ganglionnaires et hépatiques (Pagés F. *et al.*, Int. J. Cancer, 84:326-330, 1999). Cette observation suggère que l'IL-18 pourrait participer à la mise en place d'une réponse immunitaire cellulaire impliquée dans le contrôle local du processus tumoral.

25 D'autre part, des travaux antérieurs décrivent l'utilisation de l'IL-18 comme agent anti-tumoral. La demande WO 99/59565 décrit l'utilisation de polypeptides possédant au moins 70 % d'identité avec la séquence de 157 acides aminés de l'IL-18 en combinaison avec un agent chimiothérapique pour prévenir ou traiter le cancer. Des agents anti-tumoraux comprenant un gène codant pour l'IL-18 contenu dans des liposomes sont
30 décrits dans la demande JP 11139994. L'utilisation de l'IL-18 en combinaison avec l'IL-12 pour inhiber l'angiogénèse et pour prévenir ou retarder la croissance des cellules tumorales est décrite dans WO 99/22760.

Les inventeurs ont constaté de manière surprenante que l'IL-18 pouvait être utilisée comme facteur de pronostic du cancer de la prostate.

Les données relatives à l'évolution clinique (médiane de 95 mois) au stade et au grade de Gleason, ont été recueillies pour l'ensemble des prélèvements analysés, constituant un groupe de 36 patients (cf. Exemple 2). La lecture de l'ensemble de la série a permis d'évaluer le pourcentage de cellules tumorales pour lesquelles la présence d'IL-18 a été mise en évidence et de corréler ce score aux critères d'évolution clinique.

Les résultats de l'analyse statistique ont montré que la présence d'IL-18 au niveau des cellules tumorales de la prostate est associée à l'évolution clinique des patients (voir les exemples ci-après) et que cette présence est associée à un bon pronostic.

Les inventeurs ont également mis en évidence que le taux d'expression de l'IL-18, notamment l'hIL-18, comme facteur de pronostic du cancer de la prostate, est un facteur indépendant donnant une information non disponible par la simple analyse des données du stade de Gleason.

Sous un premier aspect, la présente invention concerne un procédé de pronostic du cancer à partir d'un échantillon de plasma ou sérum d'un patient atteint ou suspecté d'être atteint d'un cancer de la prostate, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de détermination du taux d'IL-18 dans ledit échantillon.

La présente invention concerne notamment un procédé de pronostic du cancer de la prostate à partir d'un échantillon de plasma ou de sérum de patient atteint ou suspecté d'être atteint d'un cancer de la prostate selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) la détermination du taux d'IL-18 dans ledit échantillon de plasma ou de sérum ; et
- b) la comparaison dudit taux obtenu avec la valeur du taux standard d'IL-18 au-dessus et pour laquelle valeur le pronostic du cancer de la prostate chez un patient atteint est considéré comme bon.

Par "taux standard", on entend désigner ici le taux ou concentration seuil que l'homme de l'art saura déterminer avec une analyse statistique en comparant les taux sériques ou plasmatiques d'IL-18 déterminés sur des prélèvements chez des patients atteints d'un cancer de la prostate, prélèvements dont la classification TNM 92 (classification de l'Union Internationale Contre le Cancer, 1978, faisant intervenir les

trois paramètres standards T, N et M) et/ou la classification de Gleason (cf. Exemple 2i.) est connue, classifications permettant de pronostiquer la sévérité du cancer, en particulier le risque évolutif du cancer et les indications thérapeutiques attachées à ce risque, et/ou patients pour lesquels le suivi des événements habituellement répertoriés est
5 connu (durée de survie, récurrence, présence de métastases etc.).

Par bon pronostic au sens de la présente invention, on entendra désigner de manière générale un risque faible d'évolution du cancer.

On pourra en particulier entendre par bon pronostic au sens de la présente invention, un cancer de la prostate pour lequel la probabilité de survie sans récurrence du
10 patient pendant une durée d'au moins 3, de préférence 4 et 5 ans est nettement supérieure à 0,5, de préférence supérieure ou égale à 0,75 ceci avec un intervalle de confiance significatif (de préférence supérieure ou égale à 90 %, de manière plus préférée supérieure ou égale à 95 %, 98 %, 99 % et 99,5 %).

Dans un mode particulier de réalisation, l'étape a) de détermination du taux d'IL-
15 18 dans le procédé de pronostic du cancer de la prostate à partir d'un échantillon de plasma ou de sérum selon l'invention, comprend une étape de mise en contact dudit échantillon de plasma ou de sérum avec un anticorps anti-IL-18, ou l'un de ses fragments, d'origine monoclonale ou polyclonale, capable de reconnaître spécifiquement ladite IL-18, de préférence un épitope situé sur la partie correspondant à la protéine
20 mature de IL-18, ceci, le cas échéant, dans des conditions permettant une réaction immunologique entre lesdits anticorps et ladite IL-18.

La détermination d'un taux d'interleukine, notamment le taux d'IL-18 ou d'IL-6, dans ledit échantillon de plasma ou de sérum à l'aide d'anticorps, ou leurs fragments, dirigés spécifiquement contre ladite interleukine, notamment anti-IL-18 ou anti-IL-6
25 spécifiques, marqués ou non marqués, pourra être réalisée par toute méthode de dosage de complexe immunitaire anticorps-antigène connue de l'homme de l'art telle que, sans s'y limiter, les méthodes qui seront ci-après citées.

Le plasma ou sérum du patient à analyser pourra être obtenu à partir d'une prise de sang classique, le prélèvement sanguin étant centrifugé pour isoler le plasma ou
30 coagulé pour isoler le sérum.

Dans le cas d'échantillon sérique ou plasmatique, ledit taux standard d'IL-18 au-dessus ou pour lequel le pronostic du cancer de la prostate chez un patient atteint sera

considéré comme bon est de préférence de l'ordre de 400 pg/ml, le taux plasmatique d'un sujet normal, évalué à partir de 46 donneurs sains, est de 126 pg/ml plus ou moins 44,5 (déviatoin standard) (cf « MBL Human IL-18 kit procedure » page 7).

La présente invention concerne également un procédé de pronostic du cancer de la prostate à partir d'un échantillon de plasma ou de sérum de patient atteint ou suspecté d'être atteint d'un cancer de la prostate selon la présente invention, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape de détermination du taux d'IL-6 dans ledit échantillon de plasma ou de sérum.

La présente invention concerne de préférence un procédé de pronostic du cancer de la prostate à partir d'un échantillon de plasma ou de sérum de patient atteint ou suspecté d'être atteint d'un cancer de la prostate selon la présente invention, caractérisé en ce qu'il comprend en outre les étapes suivantes :

- la détermination du taux d'IL-6 dans ledit échantillon de plasma ou de sérum, notamment à l'aide d'un anticorps anti-IL-6, ou l'un de ses fragments, d'origine monoclonale ou polyclonale, marqué ou non marqué capable de reconnaître spécifiquement ladite IL-6 ; et

- la comparaison dudit taux d'IL-6 obtenu avec la valeur du taux standard d'IL-6 au-dessous de laquelle valeur le pronostic du cancer de la prostate chez un patient atteint est considéré comme bon.

Dans un mode particulier de réalisation ci-avant, la détermination du taux d'IL-6 dans le procédé de pronostic du cancer de la prostate à partir d'un échantillon de plasma ou de sérum selon l'invention, comprend une étape de mise en contact dudit échantillon de plasma ou de sérum avec un anticorps anti-IL-6, ou l'un de ses fragments, d'origine monoclonale ou polyclonale, capable de reconnaître spécifiquement ladite IL-6, de préférence un épitope situé sur la partie correspondant à la protéine mature de IL-6, ceci, le cas échéant, dans des conditions permettant une réaction immunologique entre lesdits anticorps et ladite IL-6.

Comme exemple de taux standard d'IL-6, on pourra prendre la valeur de 7 pg/ml, valeur citée dans le document Nakashima et al., (Clin. Cancer Res., 6(7), 2702-2706, 2000). Cette valeur du taux standard d'IL-6 pourra également être recalculée, confirmée ou adaptée par l'homme de l'art pour les paramètres liés au procédé (tels que le choix des anticorps ou la méthode d'immunoanalyse choisie pour déterminer le taux d'IL-18

et/ou d'IL-6, l'intervalle de confiance du pronostic et /ou sa probabilité) par analyse statistique sur des prélèvement d'échantillons de patients dont la classification de la tumeur et/ou le suivi des événements est connu, comme pour le calcul du taux standard d'IL-18 ci-avant décrit.

5 La présente invention concerne aussi un procédé de pronostic du cancer de la prostate caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) le prélèvement chez un patient atteint (ou suspecté d'être atteint) d'un cancer de la prostate d'un échantillon comprenant des cellules prostatiques tumorales ; et
- b) la mise en évidence de la présence d'IL-18 ou de l'ARNm codant pour l'IL-18 à
10 partir de cet échantillon dans lesdites cellules tumorales.

Dans le cadre de la présente invention, le terme "mise en évidence", sauf mention particulière, doit se comprendre au sens large, à savoir la détection qualitative et/ou le dosage quantitatif. On pourra ainsi déterminer la présence et/ou la quantité d'IL-18 ou de l'ARNm codant pour l'IL-18 dans l'échantillon testé.

15 Le terme IL-18, au sens de la présente invention désigne les formes matures et/ou immatures (pro-IL-18) de cette cytokine, de préférence de l'hIL-18.

L'échantillon de cellules de la prostate peut par exemple être obtenu par une biopsie ou lors d'une intervention chirurgicale pour prostatectomie totale.

Dans un mode de réalisation préféré, l'échantillon de cellules de la prostate est
20 choisi de façon à être constitué majoritairement de cellules tumorales et encore plus préférentiellement uniquement de cellules tumorales.

Ainsi, dans un mode de réalisation préféré, le procédé selon l'invention comprendra après l'étape a) de prélèvement d'un échantillon comprenant des cellules prostatiques tumorales, une étape supplémentaire de séparation des cellules saines des
25 cellules tumorales, de préférence par la technique dite de microdissection laser. La microdissection laser est en effet une technique innovante permettant d'aborder le problème de l'hétérogénéité tumorale par sa capacité à isoler des cellules au sein d'un échantillon tissulaire, telle que décrite par exemple par Suarez-Quian CA *et al.* (Biotechniques, 26:328-35, 1999).

30 Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, l'invention concerne un procédé de pronostic du cancer de la prostate caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) le prélèvement chez un patient atteint (ou suspecté d'être atteint) d'un cancer de la prostate d'un échantillon comprenant des cellules prostatiques tumorales ;
- b) le cas échéant, la séparation des cellules saines des cellules tumorales dudit échantillon prélevé à l'étape a) ;
- 5 c) la détection de la présence ou non d'IL-18 ou d'ARNm codant pour l'IL-18 dans lesdites cellules tumorales ;
- d) la détermination du pourcentage de cellules tumorales pour lesquelles la présence d'IL-18 ou de l'ARNm codant pour l'IL-18 est détectée, par rapport au nombre total de cellules tumorales analysées à l'étape c) ; et
- 10 e) la comparaison du pourcentage obtenu à l'étape d) avec la valeur du pourcentage standard au-dessus duquel ou pour lequel le pronostic du cancer de la prostate chez un patient atteint est considéré comme bon.

Par "pourcentage standard", on entend désigner ici le pourcentage seuil que l'homme de l'art saura déterminer avec une analyse statistique en comparant les
15 pourcentages de cellules tumorales pour lesquelles la présence d'IL-18 ou de l'ARNm codant pour l'IL-18 est détectée, par rapport au nombre total de cellules tumorales analysées, pourcentages déterminés chez des patients atteints d'un cancer de la prostate dont la classification TNM et/ou la classification de Gleason (cf. Exemple 2i.) est connue, classifications permettant de pronostiquer la sévérité du cancer, en particulier le
20 risque évolutif du cancer et les indications thérapeutiques attachées à ce risque, et/ou patients pour lesquels le suivi des événements habituellement répertoriés est connu (durée de survie, récurrence, présence de métastases etc.).

De préférence, ledit pourcentage standard est voisin de 10 %, de préférence compris entre 8 à 12 %.

25 Dans un mode de réalisation plus particulièrement préféré, l'invention concerne un procédé de pronostic du cancer de la prostate, caractérisé en ce qu'à l'étape c) du procédé ci-avant, on effectue la détection de la présence ou non d'IL-18 dans lesdites cellules tumorales, notamment par marquage immunohistochimique au moyen d'anticorps anti-IL-18, ou l'un de ses fragments, d'origine monoclonale ou polyclonale,
30 capable de reconnaître spécifiquement ladite IL-18.

Les techniques d'immunomarquage histochimiques sont bien connues de l'homme de l'art et ne seront pas développées ici. Parmi ces techniques, on peut citer,

sans s'y limiter les techniques utilisant des anticorps marqués dont le marqueur permet la détection directe du complexe immunitaire formé, ou les techniques d'immunohistochimie utilisant des anticorps marqués ou non marqués nécessitant l'addition d'un composé nécessaire à la détection du complexe immunitaire formé, comme par exemple la technique décrite à l'exemple l'iii.) ci-après.

Dans un mode de réalisation également préféré, l'invention concerne un procédé de pronostic du cancer de la prostate selon l'invention caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) le prélèvement chez un patient atteint (ou suspecté d'être atteint) d'un cancer de la prostate d'un échantillon comprenant des cellules prostatiques tumorales ;
- b) le cas échéant, la séparation des cellules saines des cellules tumorales dudit échantillon prélevé à l'étape a) ;
- c) la détermination du taux d'IL-18 ou de la quantité d'ARNm codant pour l'IL-18 pour l'ensemble des cellules de l'échantillon comprenant des cellules tumorales obtenu à l'étape a) ou b) ; et
- d) la comparaison du taux d'IL-18 ou de la quantité d'ARNm avec la valeur standard moyenne pour ledit taux d'IL-18 ou pour ladite quantité d'ARNm obtenue pour des échantillons témoins comprenant des cellules prostatiques tumorales dont une quantité connue, de préférence voisine de 10 %, desdites cellules tumorales produisent de l'IL-18 ou expriment de l'ARNm codant pour l'IL-18, un taux d'IL-18 ou une quantité d'ARNm obtenu à l'étape c) supérieure ou égale à ladite valeur standard moyenne étant attachée à un bon pronostic.

Dans le procédé ci-avant décrit, l'échantillon de cellules prostatiques tumorales dont on déterminera à l'étape c) le taux d'IL-18 ou de la quantité d'ARNm codant pour l'IL-18 pour l'ensemble desdites cellules tumorales sera de préférence constitué uniquement de cellules tumorales, à partir duquel des extraits protéiques totaux, si nécessaire pour le dosage de l'IL-18, ou les ARNs totaux (ou ARNm totaux) issus de cet échantillon auront été isolés.

L'échantillon de cellules de la prostate pourra aussi être constitué de la globalité du tissu tumoral pouvant comprendre ainsi des cellules saines, ou des ARNs totaux ou des extraits protéiques totaux issus de cet échantillon de tissu tumoral global. En effet, sans vouloir se restreindre à une telle hypothèse, un petit contingent de cellules normales

prostatiques produit l'IL-18, et ce de façon probablement identique entre des sujets sains et porteurs de cancer de prostate. De plus, les cellules immunitaires infiltrant les tumeurs (macrophages, ...) peuvent produire de l'IL-18. Ainsi, la prise en compte globale de la production d'IL-18 ou de l'ARNm codant pour l'IL-18 dans le tissu tumoral
5 indépendamment du type cellulaire producteur sera elle aussi une bonne valeur de pronostic.

L'invention comprend de préférence un procédé ci-avant selon, caractérisé en ce qu'à l'étape c), on effectue la détermination du taux d'IL-18 pour l'ensemble des cellules de l'échantillon comprenant des cellules tumorales obtenu à l'étape a) ou b), notamment
10 au moyen d'anticorps monoclonal ou polyclonal anti-IL-18, marqué ou non marqué, ou de l'un de ses fragments.

De préférence, dans ledit procédé ci-avant selon l'invention on effectuera à l'étape c), la détermination du taux d'IL-18 à partir d'un extrait des protéines totales ou de protéines enrichies en IL-18 de l'échantillon comprenant des cellules tumorales
15 obtenu à l'étape a) ou b).

Pour détecter et/ou quantifier l'IL-18 à partir d'un échantillon, notamment plasmatique, sérique ou tissulaire (ou extrait protéique total issu de tissu), on pourra utiliser les méthodes connues de l'homme du métier pour détecter et/ou quantifier une protéine ou un peptide particulier, notamment à l'aide d'anticorps ou fragments
20 d'anticorps dirigés spécifiquement contre cette protéine ou peptide.

Au sens de la présente invention, le terme anticorps comprend les anticorps monoclonaux, polyclonaux, ou un de leurs fragments, dirigés spécifiquement contre l'IL-18, de préférence contre l'hIL-18 (ou de l'IL-6, de préférence contre l'hIL-6 lorsqu'il s'agit du dosage de cette cytokine).

De préférence, dans les méthodes de détection et/ou de quantification de l'IL-18
25 (ou de l'IL-6) qui seront utilisées dans la présente invention, l'anticorps monoclonal, polyclonal ou l'un de leurs fragments, est capable de se fixer spécifiquement sur un épitope ou déterminant de l'IL-18 (ou de l'IL-6). Les déterminants épitopiques consistent habituellement en des groupes de molécules présentant des surfaces chimiquement actives telles que des acides aminés ou des chaînes latérales de sucres et
30 ayant une structure tridimensionnelle spécifique et/ou une charge spécifique caractéristique.

Les fragments d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux qui pourront être utilisés dans la présente invention comprennent tout fragment dudit anticorps monoclonal ou polyclonal capable de se fixer sur un épitope de l'IL-18 (ou de l'IL-6) humaine sur lequel se fixe l'anticorps monoclonal ou polyclonal dont ledit fragment est issu. Des exemples
5 de tels fragments incluent en particulier des anticorps monoclonaux simple chaîne ou des fragments monovalents Fab ou Fab' et des fragments divalents tels que F(ab')₂, qui possèdent la même spécificité de fixation que l'anticorps monoclonal ou polyclonal dont ils sont issus. Un fragment pourra également être un fragment Fv simple chaîne produit par des méthodes connues de l'homme de l'art et telles que décrites par exemple par
10 Skerra et al. (Science, 240:1038-1041, 1988) et King et al. (Biochemical J., 290:723-729, 1991).

Pour la caractérisation des anticorps monoclonaux anti-IL-18 et leurs applications dans la détection et/ou la quantification de l'IL-18 par ELISA, on pourra par exemple se référer à la publication de Taniguchi et al. (J. Immunol. Methods, 206(1-2),
15 107-113, 1997).

Des fragments d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux peuvent être obtenus à partir des anticorps monoclonaux ou polyclonaux tels que décrits précédemment par des méthodes telles que la digestion par des enzymes, comme la pepsine ou la papaine et/ou par clivage des ponts disulfures par réduction chimique. Les fragments d'anticorps
20 monoclonaux ou polyclonaux, qui pourront être utilisés dans la présente invention, peuvent également être synthétisés par des synthétiseurs automatiques de peptides tels que ceux fournis par la société Applied Biosystems, etc., ou peuvent être préparés manuellement en utilisant des techniques connues de l'homme de l'art et telles que décrites par exemple par Geysen et al. (J. Immunol. Methods, 102:259-274, 1978).

25 En général, pour la préparation d'anticorps monoclonaux, polyclonaux ou de leurs fragments, on pourra se référer aux techniques qui sont en particulier décrites dans le manuel "antibodies" (Harlow et al., antibodies: a laboratory manual, Cold Spring Harbor publications pp. 726, 1988) ou à la technique de préparation à partir d'hybridomes décrite par Kohler et Milstein en 1975.

30 Les anticorps monoclonaux ou polyclonaux selon l'invention ou leurs fragments peuvent également, selon l'invention, se présenter sous forme d'anticorps marqués afin d'obtenir un signal détectable et/ou quantifiable.

Les anticorps monoclonaux marqués selon l'invention ou leurs fragments incluent par exemple des anticorps dits immunoconjugués qui peuvent être conjugués par exemple avec des enzymes telles que la peroxydase, la phosphatase alcaline, la β -D-galactosidase, la glucose oxydase, la glucose amylase, l'anhydrase carbonique, l'acétylcholinestérase, le lysozyme, la malate déshydrogénase ou la glucose-6 phosphate déshydrogénase ou par une molécule comme la biotine, la digoxigénine ou la 5-bromo-désoxyuridine. Des marqueurs fluorescents peuvent être également conjugués aux anticorps monoclonaux ou leurs fragments de l'invention et incluent notamment la fluorescéine et ses dérivés, la rhodamine et ses dérivés, la GFP (GFP pour "Green Fluorescent Protein"), le dansyl, l'umbelliférone etc.. Dans de tels conjugués, les anticorps monoclonaux de l'invention ou leurs fragments peuvent être préparés par des méthodes connues de l'homme de l'art. Ils peuvent être couplés aux enzymes ou aux marqueurs fluorescents directement ou par l'intermédiaire d'un groupe espaceur ou d'un groupe de liaisons tel qu'un polyaldéhyde, comme le glutaraldéhyde, l'acide éthylènediamine-tétraacétique (EDTA), l'acide diéthylènetriaminepentaacétique (DPTA), ou en présence d'agents de couplage tels que le périodate etc.. Les conjugués comportant des marqueurs de type fluorescéine peuvent être préparés par réaction avec un isothiocyanate.

D'autres conjugués peuvent inclure également des marqueurs chimiluminescences tels que le luminol et les dioxétanes ou des marqueurs bioluminescents tels que la luciférase et la luciférine.

Parmi les marqueurs pouvant être fixés sur l'anticorps monoclonal ou un de ses fragments, on préfère également les marqueurs radioactifs tels que ^{14}C , ^{36}Cl , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{51}Cr , ^{152}Eu , ^{59}Fe , ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{75}SE et $^{99\text{m}}\text{Tc}$ qui peuvent être détectés par des moyens connus tels que par exemple le compteur gamma ou à scintillations ou par autoradiographie.

Quand on utilisera de tels anticorps, la méthode de détection et ou de quantification pourra être une méthode par compétition ou par sandwich, ou toute méthode connue de l'homme de l'art dépendant de la formation d'un complexe immun anticorps-IL-18 (ou anticorps-IL-6). Les anticorps monoclonaux, polyclonaux ou un de leurs fragments peuvent être immobilisés ou marqués. Cette immobilisation peut être réalisée sur de nombreux supports connus de l'homme de l'art. Ces supports peuvent

notamment inclure le verre, le polystyrène, le polypropylène, le polyéthylène, le dextran, le nylon, ou des celluloses naturelles ou modifiées. Ces supports peuvent être soit solubles ou insolubles.

A titre d'exemple, une méthode préférée de dosage de l'IL-18 (ou de l'IL-6) met en jeu des processus immunoenzymatiques selon la technique ELISA, par immunofluorescence, ou radio-immunologique (RIA) ou équivalent.

Pour détecter et/ou quantifier l'ARNm codant pour l'IL-18 à partir d'un échantillon, notamment tissulaire, on pourra utiliser les méthodes connues de l'homme du métier pour détecter et/ou quantifier de l'ADNc ou de l'ARN et ainsi utiliser des amorces ou sondes nucléotidiques spécifiques de la séquence de l'ARN ou de son l'ADNc codant pour l'IL-18.

Pour détecter l'ARNm codant pour l'IL-18, on pourra procéder préalablement à une extraction de l'ARN à partir des cellules prélevées chez le patient. De telles méthodes sont connues de l'homme du métier, on pourra se référer aux techniques qui sont en particulier décrites dans le manuel "Molecular Cloning, a Laboratory Manual" (Sambrook et al, Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory publications, pp. 7.3-7.11, 1989).

Les méthodes connues pour détecter l'ARN codant pour l'IL-18 mettent en œuvre des sondes nucléotidiques qui s'hybrident avec ledit ARN codant pour l'IL-18. On choisit ces sondes de manière à ce qu'elles soient spécifiques de l'ARNm codant pour l'IL-18, c'est-à-dire qu'elles s'hybrident préférentiellement avec cet ARNm et non avec celui correspondant à d'autres constituants cellulaires. Comme type de sondes, on peut citer les sondes d'ADNc, les sondes ribonucléotidiques, etc.. Elles seront choisies en fonction de la technique utilisée ; ainsi, les sondes d'ADNc seront utilisées pour les northern blotting et les sondes ribonucléotidiques pour l'hybridation *in situ*.

A titre d'exemple d'amorce pour PCR (« Polymerase Chain Reaction ») classique, on pourra utiliser les amorces suivantes :

IL18 sens

5' GCTTGAATCTAAATTATCAGTC 3' (séquence SEQ ID No. 1),

30 # IL18 antisens

5' GAAGATTCAAATTGCATCTTAT 3' (séquence SEQ ID No. 2) ;

ou pour une quantification par PCR quantitative selon la méthodologie dite "Taqman" :

IL-18 sens

CCA AGG AAA TCG GCC TCT ATT (séquence SEQ ID No. 3),

IL-18 antisens

CCA TAC CTC TAG GCT GGC TAT CTT T (séquence SEQ ID No. 4),

5 # Sonde Taqman

FAM-TGA CTG TAG AGA TAA TGC ACC CCG GAC C-TAMRA (séquence SEQ ID No. 5).

Les sondes utilisées pourront aussi être marquées afin d'obtenir un signal détectable et/ou quantifiable, préférentiellement on utilisera des marqueurs radioactifs
10 tels que ^{14}C , ^{36}Cl , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{51}Cr , ^{152}Eu , ^{59}Fe , ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{75}Se et $^{99\text{m}}\text{Tc}$ qui peuvent être détectés par des moyens connus tels que par exemple le compteur gamma ou à scintillations ou par autoradiographie. On pourra aussi marquer ces sondes par des enzymes ou des anticorps.

La technique dite de Northern blotting consiste à faire migrer l'ARN extrait des
15 cellules du patient sur un gel d'agarose dénaturant puis de réaliser un transfert sur un support adéquat, tel qu'une membrane de cellulose, nitrocellulose ou de nylon. On hybride ensuite la membrane avec l'ADNc ou l'ARN marqué, on lave et on analyse par autoradiographie.

De manière préférée, pour la détection de la présence d'ARN, on mettra en
20 œuvre, par exemple, la technique dite d'hybridation *in situ*. Cette dernière présente l'avantage de pouvoir être utilisée directement sur l'échantillon prélevé. De fines lamelles de ce dernier sont hybridés avec des sondes d'ARNc (sondes ribonucléotidiques) marquées, par des radioisotopes ou par de la digoxigénine par exemple, puis sont lavées et traitées avec de la RNase. Puis on révèle ces lamelles de manière à obtenir une
25 autoradiographie, quand les sondes sont marquées par des marqueurs radioactifs. On pourra ainsi visualiser le nombre de cellules marquées, c'est-à-dire celles qui expriment l'ARN codant pour l'IL-18.

L'invention concerne également un procédé selon l'invention, caractérisé en ce
qu'à l'étape c) du procédé ci-avant, on effectue la détermination de la quantité d'ARNm
30 codant pour l'IL-18 pour l'ensemble des cellules de l'échantillon comprenant des cellules tumorales obtenu à l'étape a) ou b), notamment par une technique dite de RT-PCR

quantitative au moyen d'amorces capables de s'hybrider spécifiquement avec la séquence de l'ARN et/ou de l'ADNc codant pour l'IL-18.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit procédé selon l'invention ci-avant est caractérisé en ce qu'à l'étape c), on effectue la détermination de la quantité d'ARNm
5 codant pour l'IL-18 à partir d'un échantillon obtenu après extraction de l'ARN total ou de l'ARNm total de l'échantillon comprenant des cellules tumorales obtenu à l'étape a) ou b).

Pour la quantification d'ARN, on pourra, par exemple, utiliser la technique de RT-PCR (RT pour « Reverse Transcription ») quantitative connue de l'homme du
10 métier, par exemple en utilisant un PCR automat 7700 Taqman et séquenceur 377 commercialisés par la société Perkin Elmer, mettant en œuvre des sondes marquées, de préférence avec une substance fluorescente.

Parmi les méthodes de quantification d'IL-18 ARNm, on peut citer également mais sans s'y limiter la méthode telle que décrite dans le document Klein et al. (Cytokine,
15 11(6), 451-458, 1999).

Une autre méthode également appropriée est l'utilisation de puces à ADN, notamment celles commercialisées par les sociétés Affymetrix, Incyte, Genometrix, Hyseq ou Nanogen. Une puce d'ADN (ou DNA-chip) contient sur une plaque plusieurs
20 milliers de spots, dont chacun correspond à une séquence nucléotidique. On peut ainsi quantifier des niveaux d'expression, grâce à une mesure de signal en fluorescence (l'intensité de la fluorescence sur un spot dépendant de l'expression dans la cellule analysée).

Ainsi, l'utilisation d'une séquence polynucléotidique qui s'hybride avec une séquence polynucléotidique codant pour l'IL-18 ou un de ses fragments pour le dosage
25 ou l'identification *in vitro* d'une telle séquence polynucléotidique dans un échantillon est aussi un mode de réalisation de l'invention.

De manière générale, la présente invention concerne l'utilisation d'un anticorps monoclonal ou polyclonal anti-IL-18, ou de l'un de ses fragments, ou d'un acide nucléique, comme amorce ou sonde, capable de s'hybrider spécifiquement avec l'ARNm
30 ou l'ADNc codant pour l'IL-18 pour le pronostic *in vitro* d'un cancer de la prostate.

Bien entendu, sera également comprise dans la présente invention, l'utilisation pour le pronostic *in vitro* d'un cancer de la prostate dudit anticorps anti-IL-18 ou dudit

acide nucléique ci-avant défini, associée à tout autre facteur ou marqueur, autre que l'IL-18, et connu de l'homme de l'art pour permettre d'évaluer ou de confirmer le risque évolutif du cancer de la prostate (tel que ci-après décrit).

Un autre objet de l'invention concerne un kit de pronostic du cancer de la prostate, caractérisé en ce qu'il comprend les moyens nécessaires à la mise en œuvre d'un procédé selon l'invention, le cas échéant avec une notice explicative permettant de déterminer le pronostic (bon ou mauvais) en fonction des résultats obtenus (taux plasmatique ou sérique d'IL-18 et le cas échéant d'IL-6, pourcentage de cellules tumorales produisant de l'IL-18 ou exprimant l'ARN codant pour l'IL-18, quantité ou concentration globale d'IL-18 produite ou quantité globale d'ARN exprimé par l'ensemble du tissu tumoral testé, et ce par comparaison avec la valeur ou le taux standard de référence correspondant au type d'analyse réalisée avec ce kit.

Ce kit pourra par exemple comprendre les moyens nécessaires pour détecter et/ou quantifier l'ARNm codant pour l'IL-18, notamment un oligonucléotide, en particulier un ribonucléotide, le cas échéant marqué, capable de s'hybrider spécifiquement avec la séquence de l'ARN ou de l'ADNc codant pour l'IL-18, et, le cas échéant à la mise en œuvre d'un procédé d'extraction d'ARNm.

Préférentiellement, ce kit comprendra les moyens nécessaires pour réaliser une ou plusieurs hybridation *in situ*, et notamment au moins une sonde ribonucléotidique reconnaissant spécifiquement l'ARNm de l'IL-18.

L'invention concerne encore un kit de pronostic du cancer de la prostate comprenant au moins un anticorps anti-IL-18 monoclonal, polyclonal ou un de leurs fragments afin de déterminer quantitativement et/ou qualitativement la présence d'IL-18 dans l'échantillon.

Plus particulièrement, ce kit comprend les éléments suivants :

- au moins un anticorps anti-IL-18, monoclonal, polyclonal selon l'invention ou un de leurs fragments, le cas échéant marqué ;
- le cas échéant, un réactif pour la constitution du milieu propice à la réalisation de la réaction immunologique ;
- le cas échéant, un réactif permettant la détection des complexes antigène-anticorps produits par la réaction immunologique, ce réactif pouvant également porter un marqueur, ou être susceptible d'être reconnu à son tour par un réactif marqué, plus

particulièrement dans le cas où ledit anticorps monoclonal, polyclonal ou un de leurs fragments n'est pas marqué.

L'invention concerne également un kit de pronostic du cancer de la prostate selon l'invention, comprenant en outre un anticorps anti-IL-6, pouvant être, de manière
5 indépendante de l'anticorps anti-IL-18, monoclonal ou polyclonal, ou un de ses fragments, le cas échéant marqué, afin de déterminer la quantité d'IL-18 et d'IL-6 présentes dans l'échantillon.

L'invention concerne aussi l'utilisation d'un kit *in vitro* selon la présente invention, pour le pronostic du cancer de la prostate d'un patient atteint ou suspecté
10 d'être atteint d'un cancer de la prostate.

Sous un dernier aspect, la présente invention concerne toute utilisation de l'IL-18 comme facteur de pronostic selon l'invention, procédé ou kit de pronostic selon l'invention, dans lequel procédé, kit ou utilisation serait associé au moins à un autre facteur, ou procédé ou composant connu de l'homme de l'art pour déterminer la qualité
15 (présence) ou la quantité (dosage) de cet autre facteur, autre facteur connu de l'homme de l'art pour permettre d'évaluer ou de confirmer le risque évolutif du cancer de la prostate.

Parmi cesdits autres facteurs, on préfère, mais sans s'y limiter, la présence de métastases, notamment osseuses, le taux sérique ou plasmatique de l'antigène spécifique
20 de la prostate (PSA), de phosphatase alcaline ou de lactate déshydrogénase, ou encore l'évaluation du Stade ou du score de Gleason de la tumeur, ou l'un des paramètres entrant dans ladite évaluation.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description avec les exemples qui suivent et la figure dont la légende est ci-après.

25

Légende de la figure :

La figure représente la proportion de patients testés en fonction de la durée de survie sans récurrence de ces patients, pour les patients présentant un pourcentage de cellules tumorales immunomarquées pour l'IL-18 supérieure ou égale à 10 % (« IL-18
30 $\geq 10\%$ ») et pour les patients présentant un pourcentage de cellules tumorales immunomarquées pour l'IL-18 inférieur à 10 % (« IL-18 $< 10\%$ »).

L'échelle de temps est représentée en année. Les valeurs 0,0 et 1,0 représentées en ordonnée signifient respectivement 0 % et 100 % du nombre de patients.

Exemple 1 : Détection de l'IL-18 dans des cellules tumorales par immunohistochimie

5 On utilise des sections de 4 μ m de tumeurs de prostate obtenues par biopsie, ou sur pièce de prostatectomie totale, à partir de bloc en paraffine sur des lames Dako chemmate (réf. s2024, Dako).

i) Déparaffinage des lames :

10 Les lames sont passées dans deux bains de toluène durant 30 minutes, puis successivement dans les solutions suivantes :

- alcool 95° : 2 bains de 2 minutes ;
- alcool 80° : 1 bain de 2 minutes ;
- alcool 70° : 1 bain de 2 minutes ;
- alcool 50° : 1 bain de 2 minutes ; et
- 15 - eau courante : 1 bain de 1 minute.

Les lames sont ensuite rincées à l'eau stérile.

ii) Démasquage antigénique :

20 Les lames sont déposées sur un portoir en plastique puis placées dans un récipient supportant le micro-ondes. Les lames sont ensuite recouvertes de tampon citrate pH 6. Trois cycles de micro-ondes de 5 minutes à la puissance maximale (700 watts) sont réalisées et les lames sont ensuite laissées à refroidir 20 min à température ambiante.

iii) Immunomarquage :

25 L'immunomarquage est réalisé à l'aide du kit LSAB⁺ peroxydase vendu par la société Dako (réf. ko679).

Les lames sont transférées dans du tampon TBS (Tris Buffer Saline) pH 7,6, cernées de Dakopen (Dako), puis incubées avec une solution de saturation BRB (« antibody diluant Background Reducing Buffer ») (Dako réf. s3022) pendant 15 minutes à température ambiante. Les lames sont ensuite incubées avec une solution
30 inhibant les peroxydases endogènes (Tampon 1 "hydrogène peroxydase" du kit) à raison de 200 μ l/lame, pendant 5 minutes à température ambiante, puis les lames sont lavées à

la pissette en tampon TBS pH 7,6, puis lavées par trempage pendant 5 minutes en cuve contenant du tampon TBS pH 7,6.

Les lames sont alors incubées en présence de l'anticorps primaire (anticorps polyclonal anti-IL-18 : R&D SYSTEMS, réf. AF 318 lot ANP02) à la concentration finale de 20 µg/ml, ou d'immunoglobuline contrôle, IgG de chèvre à 20µg/ml (« normal goat IgG » : R&D SYSTEMS réf. AB-108c lot ES20). Ces anticorps sont ajustés à la concentration finale désirée en utilisant du BRB. 200 µl/lame de ces anticorps sont alors déposés sur la coupe pendant une heure à température ambiante.

Les lames sont ensuite lavées successivement par lavage à la pissette en tampon TBS pH 7,6 et 3 lavages de 5 min en cuve, en tampon TBS pH 7,6.

Les lames sont ensuite incubées avec la solution 3 (link du kit LSAB⁺ Dako, Anti-IgG biotinylé) à raison de 200 µl/lame, pendant 15 minutes à température ambiante.

Puis les lames sont lavées successivement par lavage à la pissette en tampon TBS pH 7,6 et 3 lavages de 5 min en cuve, en tampon TBS pH 7,6.

Les lames sont ensuite incubées en présence de la solution 4 (streptavidine peroxydase du kit LSAB⁺ Dako) à raison de 200 µl/lame, pendant 15 minutes à température ambiante.

Les lames sont de nouveau lavées successivement par lavage à la pissette en tampon TBS pH 7,6 et 3 lavages de 5 min en cuve, en tampon TBS pH 7,6.

Les lames sont ensuite incubées en présence de 200 µl de chromogène (réalisé extemporanément en ajoutant 1 goutte de solution 6 à 1 ml de solution 5 ; kit LSAB⁺ Dako), pendant 5 minutes à température ambiante.

Les lames sont finalement rincées, rinçage doux, à la pissette en eau stérile puis par trempage de 5 minutes en cuve en eau stérile.

iv) Contre Coloration à l'hématoxyline de Harris :

Les lames sont trempées pendant 30 à 45 secondes dans la solution de coloration (préalablement filtrée), rincées en cuve à l'eau ammoniacale puis à l'eau courante.

Le montage entre lame et lamelles est réalisé avec un milieu aqueux de montage. Le lendemain, les lames sont lutées au vernis à ongle

v) Lecture anatomopathologique :

La lecture des lames est effectuée par un anatomopathologiste qui quantifie le nombre de cellules tumorales marquées par l'anticorps anti-IL-18.

Exemple 2 : Analyse statistique

i. Classification clinique : Stade et Gleason

a. Stade : la classification clinique utilisée est la classification dénommée TNM 92, classification connue de l'homme de l'art ; on rappellera les différents stades :

- 5 - T0 pas de signe de tumeur primaire,
- T1 tumeur cliniquement inapparente, non palpable, non visible par imagerie médicale,
- T2 tumeur limitée au tissu prostatique,
- T3 tumeur envahissant la capsule,
- 10 - T4 tumeur fixée aux tissus avoisinants ou envahissement des organes voisins autres que les vésicules séminales ;

b. Gleason : la classification de Gleason correspond à la gradation histologique de l'agressivité tumorale pour les cancers prostatiques. La gradation histologique de l'agressivité tumorale est basée sur 2 critères qui sont :

- 15 - le degré de différenciation des cellules tumorales (i.e. le degré de ressemblance de la tumeur avec le tissu normal dont elle dérive) ; et
- le nombre de mitoses, reflet de l'activité proliférative de la tumeur et indirectement de la croissance tumorale.

La gradation histologique de Gleason permet de distinguer les tumeurs en 5
20 groupes en fonction de leur différenciation : G1 étant très différencié, G5 étant indifférencié. La tumeur étant hétérogène, le score de Gleason additionne les 2 zones prédominantes et varie de 2 à 10. Par exemple, un score de 7 correspond à certaines zones avec un aspect moyennement différencié et d'autres zones avec un aspect peu différencié.

25 ii. Echantillon :

36 patients atteints de cancers de la prostate cliniquement localisés ayant bénéficiés d'une prostatectomie totale entre novembre 1987 et mars 1995.

Caractéristiques du suivi de ces patients sur une période médiane de 95 mois (IQR, pour Inter Quartil Range, 75-115 mois) : 6 décès, 22 récidives, 11 métastases, 23
30 événements (tout événement confondu).

Résultats : variation du nombre de patients par classe de % de cellules tumorales immunomarquées pour l'IL-18, par classe de score de Gleason et par classe de Stade (cf. Tableau 1 ci-après).

TABLEAU 1

	Nombre de patients	% du nombre total de patients
% de cellules tumorales immunomarquées IL-18		
0 %	9	25,0
<10 %	8	22,2
10-33 %	8	22,2
33-66 %	8	22,2
>66%	3	8,3
Gleason (score)		
<7	13	36.1
7-9	23	63.9
Stade T (classification TNM 92)		
T1	2	5.6
T2	17	47.2
T3	15	41.7
T4	2	5.6

5 iii. Test statistique :

La valeur seuil (« pourcentage standard ») retenue pour les tests statistiques est de 10 % de cellules tumorales marquées parmi l'ensemble des cellules tumorales.

10 L'étude de la survie sans récurrence en fonction du marquage tumoral par l'IL-18 a été réalisée selon la méthode décrite par Kaplan *et al.* (Kaplan *et al.* Non parametric estimation from incomplete observations. JASA 53,457-81, 1958), méthode utilisée pour réaliser les courbes, le test statistique utilisé pour comparer les courbes est le test dit du Log-rank.

L'effet du marquage à 10 % en ajustant sur le Stade et le Gleason dans un modèle de Cox (modèle multivarié pour les données de survie) a également été effectué.

Résultats

a. Etude de la survie sans récidive :

Cette étude a montré une variation significative du taux de survie sans récidive en fonction de l'expression de l'IL-18. Les patients dont les tumeurs expriment peu l'IL-18 (% de cellules tumorales immunomarquées pour IL-18 <10 %) récidivent plus précocement que les autres ($p < 0,05$, test du Log-rank) (cf. figure).

b. Analyse univariée et multivariée – Survie sans récidive (cf. Tableau 2 ci-après).

	Univariée			Multivariée		
	RR	IC	p*	RR	IC	p*
«Marquage IL18 »			0,049			0,02
< 10 %	1			1		
= 10 %	0,4	0,2-1,0		0,3	0,1-0,8	
Gleason (score)			0,049			0,7
<7	1			1		
7-9	2,5	1,0-6,4		1,2	0,4-4,0	
Stade T			0,01			0,02
T1T2	1			1		
T3T4	3,5	1,4-8,8		4,1	1,3-12,7	

* : p du test de rapport des vraisemblances

«Marquage IL-18» : % de cellules tumorales immunomarquées pour IL-18

L'effet du paramètre « immunomarquage pour l'IL-18 » sur la survie sans récidive persiste après ajustement sur le Gleason et sur le stade (RR : risque relatif, 0,3 ; IC (intervalle de confiance) 95 %, 0,1-0,8 ; p, 0,02).

Les tumeurs dont le % de cellules tumorales immunomarquées pour IL-18 est supérieur ou égal à 10 % des cellules sont associées à un taux de récidive significativement plus faible que celles dont le % de cellules tumorales immunomarquées pour IL-18 est inférieur à 10 %, même après prise en compte du Gleason et du stade.

Ce lien est retrouvé en analyse multivariée ($p = 0,02$) ce qui souligne son indépendance par rapport au Gleason et au stade.

REVENDICATIONS

1. Utilisation de l'IL-18 comme facteur de pronostic du cancer de la prostate.
- 5 2. Procédé de pronostic du cancer à partir d'un échantillon de plasma ou sérum d'un patient atteint ou suspecté d'être atteint d'un cancer de la prostate, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de détermination du taux d'IL-18 dans ledit échantillon.
3. Procédé de pronostic du cancer de la prostate selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
 - 10 a) la détermination du taux d'IL-18 dans ledit échantillon de plasma ou de sérum ; et
 - b) la comparaison dudit taux obtenu avec la valeur du taux standard d'IL-18 au-dessus et pour laquelle valeur le pronostic du cancer de la prostate chez un patient atteint est considéré comme bon.
- 15 4. Procédé de pronostic du cancer de la prostate selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'étape a) de détermination du taux d'IL-18 comprend une étape de mise en contact dudit échantillon de plasma ou de sérum avec un anticorps monoclonal ou polyclonal anti-IL-18, ou l'un de ses fragments, le cas échéant dans des conditions permettant une réaction immunologique entre ledit anticorps et ladite IL-18.
- 20 5. Procédé de pronostic du cancer de la prostate selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape suivante de détermination du taux d'IL-6 dans ledit échantillon de plasma ou de sérum.
6. Procédé de pronostic du cancer de la prostate selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend en outre les étapes suivantes :
 - 25 - la détermination du taux d'IL-6 dans ledit échantillon de plasma ou de sérum ;
 - et
 - la comparaison dudit taux d'IL-6 obtenu avec la valeur du taux standard d'IL-6 au-dessous de laquelle valeur le pronostic du cancer de la prostate chez un patient atteint est considéré comme bon.
- 30 7. Procédé de pronostic du cancer de la prostate chez un patient atteint ou suspecté d'être atteint d'un cancer de la prostate, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) le prélèvement chez ledit patient d'un échantillon comprenant des cellules prostatiques tumorales ;
- b) le cas échéant, la séparation des cellules saines des cellules tumorales dudit échantillon prélevé à l'étape a) ; et
- 5 c) la mise en évidence de la présence d'IL-18 ou de l'ARNm codant pour l'IL-18 à partir de cet échantillon dans lesdites cellules tumorales.

8. Procédé selon la revendication 7, dans lequel l'échantillon sur lequel on réalise ladite mise en évidence à l'étape c) est constitué majoritairement de cellules tumorales, de préférence uniquement de cellules tumorales.

- 10 9. Procédé selon la revendication 7 ou 8, dans lequel l'étape b) est réalisée par un procédé de laser microdissection.

10. Procédé selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 15 a) le prélèvement d'un échantillon chez ledit patient comprenant des cellules prostatiques tumorales ;
- b) le cas échéant, la séparation des cellules saines des cellules tumorales dudit échantillon prélevé à l'étape a) ;
- c) la détection de la présence ou non d'IL-18 ou d'ARNm codant pour l'IL-18 dans lesdites cellules tumorales ;
- 20 d) la détermination du pourcentage de cellules tumorales pour lesquelles la présence d'IL-18 ou de l'ARNm codant pour l'IL-18 est détectée, par rapport au nombre total de cellules tumorales analysées à l'étape c) ; et
- e) la comparaison du pourcentage obtenu à l'étape d) avec la valeur du pourcentage standard au-dessus duquel ou pour lequel le pronostic du cancer de la prostate chez
- 25 un patient atteint est considéré comme bon.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que la valeur du pourcentage standard au-dessus duquel ou pour lequel le pronostic du cancer de la prostate chez un patient atteint est considéré comme bon est voisine de 10 %.

12. Procédé selon l'une des revendications 10 et 11, caractérisé en ce qu'à
- 30 l'étape c) du procédé, on effectue la détection de la présence ou non d'IL-18 dans lesdites cellules tumorales, notamment par marquage immunohistochimique au moyen d'anticorps monoclonal ou polyclonal anti-IL-18, ou l'un de ses fragments.

13. Procédé selon l'une des revendications 10 et 11, caractérisé en ce qu'à l'étape c) du procédé, on effectue la détection de la présence ou non d'ARNm codant pour l'IL-18 dans lesdites cellules tumorales, notamment par la technique dite d'hybridation *in situ*.

- 5 14. Procédé de pronostic du cancer de la prostate selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) le prélèvement d'un échantillon chez ledit patient comprenant des cellules prostatiques tumorales ;
 - b) le cas échéant, la séparation des cellules saines des cellules tumorales dudit
10 échantillon prélevé à l'étape a) ;
 - c) la détermination du taux d'IL-18 ou de la quantité d'ARNm codant pour l'IL-18 pour l'ensemble des cellules de l'échantillon comprenant des cellules tumorales obtenu à l'étape a) ou b) ; et
 - d) la comparaison du taux d'IL-18 ou de la quantité d'ARNm avec la valeur standard
15 moyenne pour ledit taux d'IL-18 ou pour ladite quantité d'ARNm obtenue pour des échantillons témoins comprenant des cellules prostatiques tumorales dont une quantité connue desdites cellules tumorales produisent de l'IL-18 ou expriment de l'ARNm codant pour l'IL-18,
- un taux d'IL-18 ou une quantité d'ARNm obtenu à l'étape c) supérieure ou égale à ladite
20 valeur standard moyenne étant attachée à un bon pronostic.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'à l'étape d), la valeur standard moyenne est obtenue pour des échantillons témoins comprenant des cellules prostatiques tumorales dont une quantité voisine de 10 % desdites cellules tumorales produisent de l'IL-18 ou expriment de l'ARNm codant pour l'IL-18.

- 25 16. Procédé selon la revendication 14 ou 15, caractérisé en ce qu'à l'étape c), on effectue la détermination du taux d'IL pour l'ensemble des cellules de l'échantillon comprenant des cellules tumorales obtenu à l'étape a) ou b), notamment au moyen d'anticorps monoclonal ou polyclonal anti-IL-18, marqué ou non marqué, ou de l'un de ses fragments.

- 30 17. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'à l'étape c), on effectue la détermination du taux d'IL-18 à partir d'un extrait des protéines totales ou de

protéines enrichies en IL-18 de l'échantillon comprenant des cellules tumorales obtenu à l'étape a) ou b).

18. Procédé selon la revendication 14 ou 15, caractérisé en ce qu'à l'étape c), on effectue la détermination de la quantité d'ARNm codant pour l'IL-18 pour l'ensemble
5 des cellules de l'échantillon comprenant des cellules tumorales obtenu à l'étape a) ou b), notamment par une technique dite de (RT-)PCR quantitative au moyen d'amorces capables de s'hybrider spécifiquement avec la séquence de l'ARN ou de l'ADNc codant pour l'IL-18.

19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'à l'étape c), on
10 effectue la détermination de la quantité d'ARNm codant pour l'IL-18 à partir d'un échantillon obtenu après extraction de l'ARN total ou de l'ARNm total de l'échantillon comprenant des cellules tumorales obtenu à l'étape a) ou b).

20. Utilisation d'un anticorps monoclonal ou polyclonal anti-IL-18, ou de l'un de ses fragments, ou d'un acide nucléique capable de s'hybrider spécifiquement avec
15 l'ARNm ou l'ADNc codant pour l'IL-18 pour le pronostic *in vitro* d'un cancer de la prostate.

21. Kit de pronostic du cancer de la prostate, caractérisé en ce qu'il comprend les moyens nécessaires à la mise en œuvre d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 19.

22. Kit de pronostic selon la revendication 21, caractérisé en ce qu'il
20 comprend les moyens nécessaires à la détection et/ou la quantification de l'ARNm codant pour l'IL-18, notamment un oligonucléotide tel qu'un ribonucléotide, le cas échéant marqué, capable de s'hybrider spécifiquement avec la séquence de l'ARN ou de l'ADNc codant pour l'IL-18, et, le cas échéant, les moyens nécessaires à la mise en œuvre d'un
25 procédé d'extraction d'ARNm.

23. Kit de pronostic selon la revendication 21, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un anticorps monoclonal ou polyclonal anti-IL-18 ou l'un de leurs fragments.

24. Kit de pronostic selon la revendication 22 ou 23, caractérisé en ce qu'il
30 comprend en outre un anticorps monoclonal ou polyclonal anti-IL-6, ou l'un de leurs fragments.

25. Utilisation d'un kit selon l'une des revendications 21 à 24, pour le pronostic du cancer de la prostate d'un patient atteint ou suspecté d'être atteint d'un cancer de la prostate.

1/1

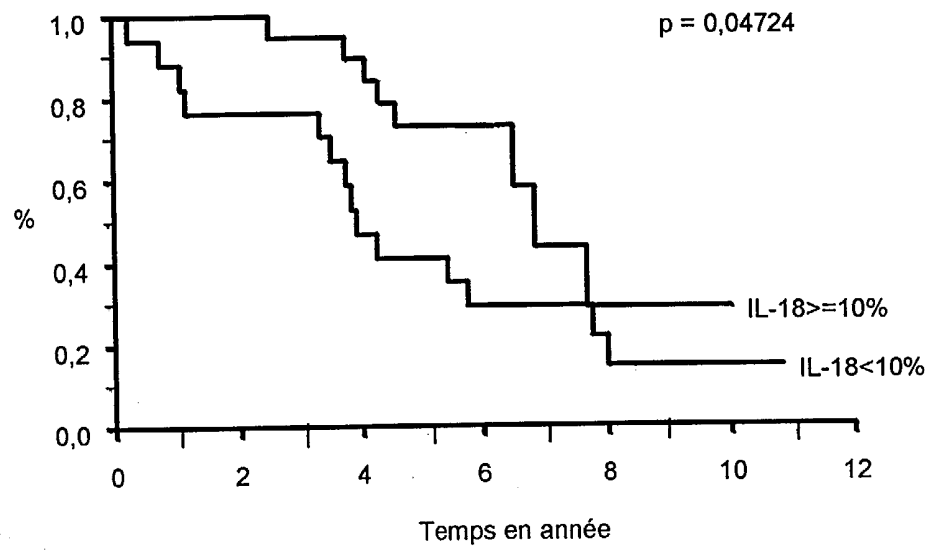


FIGURE UNIQUE

LISTE DE SEQUENCES

<110> UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI)
PIERRE FABRE MEDICAMENT

<120> UTILISATION DE L'IL-18 COMME FACTEUR DE PRONOSTIC DU
CANCER DE LA PROSTATE

<130> D19134

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 22
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Séquence
d'amorce sens dérivée de l'IL-18 d'origine humaine

<400> 1
gcttgaatct aaattatcag tc 22

<210> 2
<211> 22
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Séquence
d'amorce antisens dérivée de l'IL-18 d'origine
humaine

<400> 2
gaagattcaa attgcatctt at 22

<210> 3
<211> 21
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Séquence
d'amorce sens dérivée de l'IL-18 d'origine humaine

<400> 3
ccaaggaaat cggcctctat t 21

<210> 4
<211> 25
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Séquence
d'amorce antisens dérivée de l'IL-18 d'origine
humaine

<400> 4
ccatacctct aggctggcta tcttt

25

<210> 5
<211> 28
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Sonde
Taqman, séquence nucléique dépourvue de son
marqueur

<400> 5
tgactgtaga gataatgcac cccggacc

28



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 597481
FR 0014905

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	PAGES FRANCK ET AL: "Modulation of interleukin-18 expression in human colon carcinoma: Consequences for tumor immune surveillance." INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 84, no. 3, 21 juin 1999 (1999-06-21), pages 326-330, XP001016309 ISSN: 0020-7136	21-24	G01N33/574 G01N33/68 C12Q1/68
A	* le document en entier * ---	1-20,25	
D,X	TANIGUCHI MUTSUO ET AL: "Characterization of anti-human interleukin-18 (IL-18)/interferon-gamma-inducing factor (IGIF) monoclonal antibodies and their application in the measurement of human IL-18 by ELISA." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 206, no. 1-2, 1997, pages 107-113, XP002929440 ISSN: 0022-1759	21-24	
A	* le document en entier * ---	1-20,25	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
A	PAGES FRANCK ET AL: "Control of tumor development by intratumoral cytokines." IMMUNOLOGY LETTERS, vol. 68, no. 1, 3 mai 1999 (1999-05-03), pages 135-139, XP001016296 ISSN: 0165-2478 * page 136, colonne 1, alinéa 1 - page 137, colonne 2, alinéa 2 * --- -/--	1-25	G01N C12Q

Date d'achèvement de la recherche		Examineur
14 septembre 2001		Pellegrini, P

CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.
A : arrière-plan technologique		D : cité dans la demande
O : divulgation non-écrite		L : cité pour d'autres raisons
P : document intercalaire		& : membre de la même famille, document correspondant

1

EPO FORM 1503 12-99 (P04C14)

