

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication : **2 769 093**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **97 12143**

⑤① Int Cl⁶ : G 01 N 33/86, G 01 N 33/53, 33/68

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 30.09.97.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 02.04.99 Bulletin 99/13.

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

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : PASTEUR SANOFI DIAGNOSTICS
SOCIETE ANONYME — FR.

⑦② Inventeur(s) : DROUET LUDOVIC JEAN PIERRE
MAX, PAOLUCCI FRANCIS EGISTE JOSEPH et VAN-
HOVE NICOLE LUCIE SIMONE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET LAVOIX.

⑤④ PROCEDE IN VITRO D'EVALUATION DES RISQUES THROMBOTIQUES PAR DOSAGE DU FIBRINOGENE
PLASMATIQUE.

⑤⑦ L'invention concerne un procédé in vitro permettant
l'évaluation du risque thrombotique à l'origine d'accidents
vasculaires, notamment artériels, chez un sujet par évalua-
tion du rapport des concentrations fibrinogène hétérodimé-
rique $\gamma\gamma'$ /fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$.

FR 2 769 093 - A1



L'invention concerne un procédé *in vitro* d'évaluation des risques thrombotiques à l'origine d'accidents vasculaires, notamment artériels chez un sujet par le dosage du fibrinogène plasmatique homodimérique $\gamma\gamma$ et du fibrinogène plasmatique hétérodimérique $\gamma\gamma'$ et évaluation du rapport des concentrations fibrinogène hétérodimérique / fibrinogène homodimérique.

La thrombose est un processus biologique qui consiste en la coagulation du sang (ou formation d'un thrombus) à l'intérieur d'une cavité vasculaire (veine, artère) ou d'une cavité cardiaque. Elle aboutit à l'obturation de la lumière du vaisseau ou de la cavité concernée et interdit toute circulation sanguine. Les mécanismes mis en jeu dans la formation d'une thrombose sont les mêmes que ceux de l'hémostase (pour arrêter les hémorragies spontanées, ou pathologiques). Par ailleurs, dans le système artériel, l'athérosclérose est un processus pathologique que l'on peut définir comme une maladie artérielle généralisée associant des dépôts lipidiques (ou athérome) sur la surface interne des parois artérielles à une sclérose (rigidification) de ces parois vasculaires. L'athérosclérose, qui contribue à réduire la lumière d'un vaisseau et le débit sanguin, est un facteur déclenchant de la thrombose.

20

L'obturation vasculaire pathologique, consécutive à la thrombose associée à l'athérosclérose (on parle d'athérothrombose lorsque les deux sont conjuguées), est à l'origine d'accidents qui sont localisés le plus fréquemment au niveau cardiaque, cérébral, au niveau des membres inférieurs mais peuvent intervenir également dans tous les autres organes. Ces accidents peuvent être de gravité diverse. On connaît l'accident vasculaire cérébral (AVC), les ischémies cérébrales, les ischémies cardiaques, les insuffisances coronaires (IC) et l'infarctus du myocarde (IM), les artériopathies oblitérantes des membres inférieurs (AOMI), l'infarctus mésentérique, etc.

30

Le mécanisme de la thrombose en circulation artérielle passe par les étapes initiales essentielles suivantes qui impliquent préférentiellement les plaquettes sanguines. Ces étapes sont :

- 5 - l'adhésion des plaquettes sanguines circulantes à la paroi vasculaire lésée sur laquelle elles reconnaissent l'exposition de surfaces de réaction,
- l'activation des plaquettes adhérentes qui expriment des récepteurs de surface pour des molécules d'adhésion, et qui libèrent des médiateurs qui viennent recruter de nouvelles plaquettes circulantes,
- 10 - l'agrégation de ces plaquettes à la surface des plaquettes déjà déposées et formation d'un thrombus plaquettaire.

Parallèlement, les surfaces exposées déclenchent le processus en cascade de la coagulation alors que la surface des plaquettes déposées
15 activées contribue à développer la formation de fibrine (à laquelle aboutit l'activation de la coagulation plasmatique) qui vient compléter et renforcer les thrombus plaquettaires, en même temps que la thrombine, qui est générée par l'activation de la coagulation.

20 Ce schéma coopératif entre les plaquettes et la coagulation aboutit à la formation du thrombus dont le développement va rentrer en compétition avec, d'une part, les forces circulatoires et d'autre part, avec des processus actifs de destruction dont le processus fibrinolytique. Le thrombus peut donc, soit rester limité à la paroi jusqu'à une prochaine évolution de la
25 lésion, soit se dissocier et être responsable d'accidents emboliques, soit grossir jusqu'à devenir totalement obstructif et bloquer l'irrigation des tissus et organes en aval qui donc meurent par ischémie.

30 Une des méthodes de prévention efficaces contre les accidents vasculaires consiste précisément en l'administration de médicaments, les anti-agrégants plaquettaires, qui vont inhiber la formation du thrombus plaquettaire. En effet, lors de l'activation des plaquettes, un récepteur

spécifique du fibrinogène apparaît à leur surface. Il s'agit d'une protéine membranaire, responsable de l'agrégation plaquettaire, appelée complexe GPIIb/IIIa, ou intégrine α IIb- β 3. Lors de l'activation plaquettaire, l'intégrine α IIb- β 3 devient le récepteur du fibrinogène. Par sa structure dimérique, comme
5 cela est indiqué ci-après, le fibrinogène peut se fixer sur deux plaquettes adjacentes et permettre la formation de ponts moléculaires entre les plaquettes qui est le substratum anatomique de l'agrégat plaquettaire.

Il existe des sujets plus exposés que d'autres au risque thrombotique, et donc aux accidents vasculaires. Certains le sont pour des raisons génétiques - par exemple, déficience en gène codant pour un inhibiteur de la coagulation - ou autres. Ces sujets sont en état d'hypercoagulabilité potentielle et risquent un accident vasculaire. Dans le sens d'un hyperfonctionnement, pour des raisons d'implications
10 préférentielles, les anomalies dans le système de la coagulation, traduisent surtout un risque thrombotique veineux et les anomalies dans le système plaquettaire, traduisent surtout un risque thrombotique artériel.

Pour les raisons qui précèdent et pour pouvoir appliquer la meilleure méthode préventive ou thérapeutique, il est essentiel de pouvoir
20 estimer le risque thrombotique, notamment artériel/athérombotique, du sujet à un moment donné. Dans cette optique, l'une des meilleures approches est d'évaluer l'état d'activation plaquettaire, dans une phase encore asymptomatique, en vue de notamment prévenir les accidents ischémiques cliniques, conséquences des processus thrombotiques intra-artériels.
25

Cependant, de nombreux facteurs non spécifiques peuvent favoriser une activation plaquettaire non pathologique du sujet comme, par exemple, l'effort physique, le régime nutritionnel, notamment lipidique, le mode
30 de prélèvement du sang, le mode de conservation des plaquettes et divers facteurs environnementaux. Tous ces éléments contribuent donc à la difficulté actuelle d'évaluer directement l'état d'activation plaquettaire.

Il est également établi que le fibrinogène plasmatique, en plus d'être un marqueur de la réaction inflammatoire, est un marqueur de risque cardio-vasculaire ou athérombotique majeur. Une augmentation de 1g/l de sa concentration double la probabilité de mortalité dans les 6 années (Banerjee et al. *Thromb. Haemost.* 1992, 68, pp 261-263). Un faible taux de fibrinogène plasmatique caractérise les sujets à faible risque d'accidents vasculaires.

Un des meilleurs modes d'appréciation - bien qu'indirect - de l'activation des plaquettes sera donc d'apprécier le degré d'implication du fibrinogène dans le processus d'agrégation plaquettaire. Le fibrinogène, polypeptide soluble du sang, lors de la coagulation consécutive à une phase hémorragique, sous l'action de la thrombine, est clivé en fibrine insoluble, constitutive du caillot interrompant l'hémorragie.

Le fibrinogène, composé de masse moléculaire d'environ 340 KDa, est constitué de deux parties (« demi-molécules ») chacune constituée de 3 chaînes polypeptidiques : la chaîne $A\alpha$ composée de 610 acides aminés (AA), la chaîne $B\beta$ composée de 461 AA, et la chaîne γ composée de 411 AA, encore appelée γ_A ou γ_{50} . Ainsi, la structure complète du fibrinogène est de type $A\alpha_2B\beta_2\gamma_2$. Les chaînes du fibrinogène sont reliées entre elles par des ponts disulfures.

Le fibrinogène, par ailleurs, est une molécule hautement polymorphe et hétérogène. En ce qui concerne la taille moléculaire, il existe plusieurs variants de synthèse de chacune des chaînes, des possibilités d'action enzymatique ou non (glycosylation, sulfatation...) et surtout des possibilités de dégradation partielle par des activités protéasiques circulantes.

L'ensemble de ces phénomènes fait qu'il n'existe pas une molécule de fibrinogène mais de nombreuses possibilités de formes de fibrinogène présentes dans un seul individu.

5 Jusqu'à présent, il n'existe qu'un test permettant de distinguer les molécules à chaîne $A\alpha$ complète ou à chaîne $A\alpha$ raccourcie, que l'on appelle le fibrinogène de haut poids moléculaire [HMW] et le fibrinogène de bas poids moléculaire [LMW] (Henschen Ah., *Thromb Hemostasis*, (1993), 70, pp 42-47; Nieuwenhuizen W., *Eur Heart J.*, (1995), 16 sup. A, pp 6-10; Hoegge de Nobel
10 E et al., *Thromb Hemostasis*, (1988), 60, pp 415-418).

Qualitativement, des variations sont connues au niveau de chacun de ces types de chaînes du fibrinogène. Ainsi, la chaîne γ ou γ_A ou γ_{50} peut se retrouver sous forme de variant structurel appelé γ' , ou $\gamma_{57,5}$. Le variant
15 structurel appelé γ' contient une séquence différente et additionnelle d'acides aminés (AA 408-427) insérée, par un mécanisme d'épissage alternatif sur la chaîne γ de base (Finlayson et Mosesson, *Biochemistry* (1963), 2, pp 42-46; Mosesson et al., *J. Biol. Chem.*, (1972), 247, pp 5223-52-27; Kirschbaum et al., *Blood*, (1992); 79, n° 10, pp 2643-2648; Siebenlist K. et al., *Biochem.*
20 (1996), 35, pp 10448-10453).

Le tableau I ci-après indique les séquences C-terminales des chaînes γ et γ' du fibrinogène.

25 Le fibrinogène contenant une chaîne γ' est un variant fonctionnellement non actif dans le processus de l'agrégation plaquettaire (Haidaris et al., *Blood*, (1989), 74 no 2, pp. 743-750). Il n'a pas d'affinité pour le récepteur spécifique du fibrinogène qui est la protéine GPIIb/IIIa.

30 Chaque molécule de fibrinogène existe donc sous la forme de fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ ou de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$. Ce dernier correspond à 5 à 7 % du fibrinogène plasmatique total. Le fibrinogène

homodimérique $\gamma\gamma$ n'existerait pas. L'ensemble fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ et fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ sera appelé par la suite fibrinogène total.

TABLEAU I

5

Acide aminé N°	CHAINE γ (γ_{50})	CHAINE γ' ($\gamma_{57,5}$)
397	Gly	Gly
398	Gln	Gln
399	Gln	Gln
400	His	His
401	His	His
402	Leu	Leu
403	Gly	Gly
404	Gly	Gly
405	Ala	Ala
406	Lys	Lys
407	Gln	Gln
408	Ala	Val
409	Gly	Arg
410	Asp	Pro
411	Val	Glu
412		His
413		Pro
414		Ala
415		Glu
416		Thr
417		Glu
418		Tyr
419		Asp
420		Ser
421		Leu
422		Tyr
423		Pro
424		Glu
425		Asp
426		Asp
427		Leu

Les techniques actuelles de dosage du fibrinogène plasmatique telles que la méthode pondérale, la méthode dite cinétique, la méthode de Von

Clauss - la mesure du temps de coagulation reflétant le fibrinogène fonctionnel -, les tests immuno-enzymatiques -, l'immunodiffusion radiale reflétant le fibrinogène antigéniquement intact - ne sont pas toujours cohérentes entre elles car elles apprécient divers aspects du fibrinogène.

5

De plus, les méthodes d'essai quantitatives actuelles mesurent la totalité du (des) fibrinogène(s), chacune sous un angle différent. Or, il apparaît de plus en plus important de déterminer et quantifier les variants moléculaires pour pouvoir déterminer leur fonctionnalité.

10

W. Nieuwenhuizen (Nieuwenhuizen W., *Eur. Heart Journal*, 1995, 16 Sup. A, pp 6-10) a proposé et développé des protocoles en vue de mesurer le fibrinogène fonctionnel (Von Clauss) par le ratio de fibrinogène de haut poids moléculaire (HMW) sur le fibrinogène de bas poids moléculaire (LMW),
15 détectés par un test immunoenzymatique. Ce ratio paraît augmenter chez les patients atteints de maladies cardio-vasculaires et pourrait apporter une solution plus appropriée aux besoins.

D'autres facteurs d'évaluation du risque cardio-vasculaire sont
20 connus. La demande WO 93/00364 décrit un essai de détection de la fibrinolyse et de la fibrinogénolyse à l'aide de marqueurs C-terminaux de la chaîne A α .

Les chaînes γ et γ' ont été étudiées sur le plan épitopique à l'aide
25 d'anticorps spécifiques. Ainsi, des anticorps monoclonaux (Acm) dirigés contre les chaînes γ (Acm H9B7 et J88B) ou γ' (Acm L2B) ont été décrits par Haidaris et al. (*Blood*, (1989), 74 No 2, pp. 743-750). Des essais de type immunoempreinte (Western Blot), utilisant ces Acm à des fins purement analytiques et qualitatives ont été mis en oeuvre. Or, actuellement, il n'existe
30 aucun essai quantitatif, à visée diagnostique ou pronostique, des chaînes γ ou γ' .

Il existe donc un besoin d'avoir une méthode prédictive de l'accident vasculaire, notamment artériel, se basant sur le degré d'activation plaquettaire, et qui soit fiable, robuste, reproductible, standardisée, permettant
5 d'établir des « valeurs fréquentes » applicables à un seul individu et le moins influencées possible par les variations liées au prélèvement du sang.

Il a maintenant été trouvé un procédé de dosage du fibrinogène, notamment du fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ et du fibrinogène
10 hétérodimérique $\gamma\gamma'$ permettant d'établir le degré de l'activation plaquettaire et permettant ainsi d'évaluer le risque d'accident vasculaire, notamment artériel. Notamment, il a été trouvé, de façon surprenante, que le dosage conjoint de fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ et de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ permet
15 d'établir un rapport entre les concentrations du fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ et du fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ qui reflète l'état d'activation des plaquettes.

La présente invention a pour objet un procédé permettant de mettre en évidence l'activation plaquettaire et de prédire les risques
20 thrombotiques chez des sujets par l'évaluation du rapport :

$$[\gamma'] / [\gamma]$$

où $[\gamma]$ est la concentration de fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$
et $[\gamma']$ est la concentration de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$.

25 La présente invention a plus particulièrement pour objet un procédé de dosage de fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ et de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ du fibrinogène plasmatique dans un échantillon de plasma caractérisé en ce que l'on met en contact un échantillon plasmatique avec au moins un anticorps spécifique du fibrinogène total et au moins un anticorps
30 spécifique de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$, dans des conditions permettant la formation de complexes [fibrinogène total-anticorps spécifique] et [fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ -anticorps spécifique], que l'on détermine la

concentration du fibrinogène plasmatique total et celle du fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ et que l'on déduit la concentration de fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ par la relation :

$$5 \quad [\gamma] = [\text{total}] - [\gamma'],$$

dans laquelle $[\gamma]$ est la concentration de fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$, $[\gamma']$ est la concentration de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$, et $[\text{total}]$ est la concentration du fibrinogène plasmatique total.

10 La présente invention a également pour objet un procédé *in vitro* d'évaluation des risques thrombotiques d'un sujet, caractérisé en ce que l'on dose spécifiquement le fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ et le fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ du fibrinogène plasmatique dudit sujet et que l'on établit le rapport :

$$15 \quad [\gamma'] / [\gamma]$$

où $[\gamma]$ est la concentration de fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$

et

$[\gamma']$ est la concentration de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$, la concentration de fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ étant plus particulièrement déterminée selon la
20 relation $[\gamma] = [\text{total}] - [\gamma']$.

La présente invention a également pour objet un procédé *in vitro* d'évaluation des risques thrombotiques d'un sujet, caractérisé en ce que l'on met en contact un échantillon plasmatique du sujet avec au moins un anticorps spécifique de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ et au moins un anticorps
25 reconnaissant le fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$, dans des conditions permettant la formation de complexes [fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ -anticorps spécifique] et [fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ -anticorps], que l'on détermine la concentration de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ et de fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$, et que l'on établit le rapport :

$$30 \quad \gamma' / \gamma = [\gamma'] / [\gamma]$$

où $[\gamma]$ est la concentration de fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$

et

où $[\gamma']$ est la concentration de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$.

5 La présente invention a également pour objet un procédé *in vitro*
d'évaluation des risques thrombotiques d'un sujet caractérisé en ce que l'on
met en contact un échantillon plasmatique avec au moins un anticorps
spécifique du fibrinogène total et au moins un anticorps spécifique de
fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ dans des conditions permettant la formation de
10 complexes [fibrinogène total-anticorps spécifique] et [fibrinogène
hétérodimérique $\gamma\gamma'$ -anticorps spécifique], que l'on détermine ensuite la
concentration du fibrinogène total et celle de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ et
que l'on établit le rapport :

$$[\gamma'] / ([\text{total}] - [\gamma'])$$

15 où $[\gamma']$ est la concentration de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ et [total] est la
concentration du fibrinogène plasmatique total.

La présente invention a également pour objet un procédé de
dosage, caractérisé en ce que l'on met en contact sur un support solide, sur
20 lequel a été adsorbé du fibrinogène purifié, un anticorps spécifique du
fibrinogène total, l'échantillon plasmatique à doser et au moins un anticorps
spécifique de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$, dans des conditions permettant
la formation de complexes [fibrinogène total-anticorps spécifique] et
[fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ -anticorps spécifique], que l'on détermine la
25 concentration du fibrinogène plasmatique total et celle du fibrinogène
hétérodimérique $\gamma\gamma'$.

Il a été trouvé de façon surprenante que la valeur du rapport des
concentrations plasmatiques fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ /fibrinogène
30 homodimérique $\gamma\gamma$ ($[\gamma']/[\gamma]$) reflète l'état d'activation plaquettaire et permet de
prédire l'absence ou la présence de risques d'accident vasculaire, notamment
artériel, chez des sujets, notamment chez des sujets jeunes, en apparence

bien portants. En effet, il a été mis en évidence que le rapport $[\gamma']/[\gamma]$ varie selon les sujets et permet de distinguer des catégories d'individus bien caractérisées. Plus particulièrement, il a été démontré que les individus ayant un rapport de la concentration plasmatique en fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ sur la concentration plasmatique en fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ égal ou supérieur à 0,06, plus spécialement d'environ 0,08, étaient des sujets présentant un risque de problème vasculaire, notamment artériel, futur.

Il est donc maintenant possible, selon l'invention, d'effectuer des dosages, par immunoessais conventionnels, permettant d'obtenir sur des populations sélectionnées des « valeurs fréquentes » ou « de référence » applicables à la détermination du risque de chaque individu. La comparaison du rapport $[\gamma'] / [\gamma]$ déterminé chez un sujet avec la valeur de référence 0,08 permettrait par exemple de prédire un risque thrombotique futur.

Selon l'invention, diverses méthodes d'immunoessais peuvent être mises en oeuvre : test radio-immunologique (RIA), test immuno-enzymatique (EIA, ELISA), test fluoro-immunologique (FIA), test immunochimioluminescent (CLIA), test par immunoagglutination (IA), immunonéphélémétrie, etc.

Les formats de dosages immunologiques utilisés pourront être de type compétitif, sandwich, sandwich modifié - « double épitope » etc. L'immunoessai peut être effectué en un temps, deux temps, ou encore trois temps immunologiques (étapes), etc..

Les déterminations pourront être réalisées en phase liquide ou sur support solide. Parmi les supports solides, on peut citer à titre d'exemple non limitatif :

- les supports particuliers ou discontinus tels que les billes, constituées de plastique (polystyrène, ou autre), de verre, ou de tout autre matériau solide permettant une bonne séparation des fractions libres et liées. Les billes peuvent éventuellement être de type paramagnétique et

sédimenter dans un champ magnétique. On peut aussi citer les latex, dont les latex de polystyrène, ou autres matériaux solides permettant une bonne séparation des fractions libres et liées,

- les supports continus tels que les microplaques, ou plaques de microtitrage, faite en polystyrène ou toutes sortes de matériau, pourvu qu'elles permettent une bonne séparation des fractions libres et liées, ainsi qu'une lecture du signal appropriée. On citera, à titre d'exemple, les microplaques disponibles chez Nunc®, Danemark. On peut aussi utiliser les bandelettes de nitrocellulose, etc.

10

Le groupe de marquage pourra être de nature diverse comme, par exemple, radioisotopique (tel que I^{125} , H^3), enzymatique (notamment au moyen de phosphatase alcaline, peroxydase du raifort ou β -galactosidase), fluorescent, (notamment au moyen de fluorescéine ou de rhodamine), particulière, (notamment au moyen de latex ou d'or colloïdal). Ces groupes de marquage sont bien connus de l'homme du métier.

15

La conjugaison ou couplage des divers marqueurs sur les réactifs (antigènes ou anticorps) est effectué par des méthodes classiques (couplage au glutaraldéhyde, carbodiimide, anhydride maléique, succinique, agents hétérobifonctionnels etc.).

20

Les échantillons plasmatiques seront prélevés sur milieu anticoagulant (sur héparine, citrate, ou tout autre milieu connu adéquat) selon les règles de ponctions veineuses en usage. Ils pourront être utilisés immédiatement ou conservés congelés à -20°C .

25

Les anticorps anti-fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ devront être exclusivement spécifiques du seul fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$.

30

Le fibrinogène, le fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ ou le fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ peuvent être utilisés comme antigène marqué, lorsque l'on

choisira un format d'essai par compétition. Le fibrinogène purifié utilisé peut être obtenu aisément auprès des fabricants ordinaires.

5 Pour la préparation des étalons, le fibrinogène purifié peut être utilisé aussi bien pour le dosage du fibrinogène total que pour le dosage du fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ et du fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$. En effet, on sait que le fibrinogène purifié contient 5 % de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$.

10 La présente invention a pour objet une trousse de dosage du fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ et du fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un anticorps spécifique du fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ et un anticorps spécifique du fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$, des moyens de détection des complexes formés
15 [fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ - anticorps spécifique] et [fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ - anticorps spécifique] et éventuellement, au moins un réactif étalon de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ et un réactif étalon de fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$.

20 La présente invention a encore pour objet une trousse de dosage du fibrinogène total et du fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ dans un échantillon plasmatique, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un anticorps spécifique du fibrinogène total, au moins un anticorps spécifique de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$, des moyens de détection des complexes
25 formés [fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ -anticorps spécifique] et [fibrinogène total-anticorps spécifique] et, éventuellement au moins un réactif étalon de fibrinogène total et/ou au moins un réactif étalon de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$.

LEGENDE DES FIGURES

La figure 1 représente la distribution des valeurs du rapport $[\gamma']/[\gamma]$ chez 200 sujets sains âgés de 18 à 45 ans.

5 La figure 2 représente la distribution des valeurs du rapport $[\gamma']/[\gamma]$ chez 233 sujets sains âgés de plus de 60 ans.

La figure 3 représente la distribution des valeurs du rapport $[\gamma']/[\gamma]$ chez 233 sujets âgés de 18 à 45 ans atteints de pathologies artérielles diverses.

10 La figure 4 représente la distribution des valeurs du rapport γ'/γ chez 24 sujets âgés de 18 à 45 ans atteints d'infarctus, issus du groupe des 233 sujets âgés de 18 à 45 ans.

15 Les exemples suivants sont donnés à titre non limitatif pour illustrer l'invention.

EXEMPLE 1 : Evaluation chez des sujets sains et chez des patients de la concentration de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ et de fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ dans un échantillon plasmatique et
20 **établissement du rapport $[\gamma]/[\gamma']$.**

Pour l'étude décrite ci-après les échantillons suivants ont été utilisés :

• 433 plasmas de sujets âgés de 18 à 45 ans dont 200 sains et
25 233 atteints de pathologies artérielles diverses, dont 24 d'infarctus du myocarde,

et,

• 233 plasmas de sujets sains âgés de plus de 60 ans.

30 Le tampon de dilution des échantillons était un tampon, de pH égal à 7,4, contenant du PBS Dulbecco à 9,55 g/l, 50 mM en phosphate, 150

mM en chlorure de sodium (fournisseur SEROMED, ref L182-50) additionné de 0,3% de Tween 20 (fournisseur MERCK, référence produit 822184), de 0,3% de sérum albumine bovine (BSA de la société SIGMA, référence A-4503), de 10% de sérum normal de lapin décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C avant l'utilisation (fournisseur GIBCO, référence 16120-032), de 10% de sérum normal de chèvre décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C avant l'utilisation (fournisseur GIBCO, référence 16210-015) et enfin de 100 µg/ml de fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF de la société SIGMA, référence P-7626). Ce tampon est appelé TpC+L+PMSF. Les échantillons étaient dilués au 1/1.000ème.

(A). DOSAGE DU FIBRINOGENE TOTAL - ESSAI 1

Le dosage du fibrinogène a été effectué à partir de la trousse Asserachrom commercialisée par Diagnostica Stago (France). Cette trousse met en oeuvre des fragments F(ab')₂ polyclonaux et pour l'étalonnage utilise du fibrinogène humain purifié.

Pour l'étalonnage, il a été aussi utilisé du fibrinogène « étalon international » (NIBSC) décrit par Gaffney PJ, et all. dans *Thromb. Haemost.* (1992); 68(4), pp 428-432.

(B). DOSAGE DU FIBRINOGENE HETERODIMERIQUE $\gamma\gamma'$ - ESSAI 2

Ce dosage a été effectué selon la méthode du sandwich modifié - « double épitope ».

25

On recouvre avec du fibrinogène purifié une première série de microplaques (NUNC MAXISORB) par adsorption passive classique, en ajoutant 100 µl d'une solution de fibrinogène humain purifié (fournisseur Diagnostica STAGO, référence produit 00519) à une concentration de 40 µg/ml dans du PBS Dulbecco à 9,55 g/l, 50 mM en phosphate, 150 mM en chlorure de sodium, pH = 7,4. On laisse réagir pendant 3 heures à 37°C puis on lave trois fois avec un tampon PBS Dulbecco à 9,55 g/l, 50 mM en phosphate, 150 mM

30

en chlorure de sodium, pH=7,4 (fournisseur SEROMED, référence produit L182-50) additionné de 0,3% de Tween 20 (mélange PBS/T20). On met à incuber ensuite les microplaques pendant 18 heures à 4°C avec une solution d'anticorps polyclonal anti-fibrinogène (fragment F(ab)'₂ disponible chez la société Diagnostica Stago, France), dilué au 1/50ème dans un mélange
5 TpC+L. Il s'agit de tampon PBS Dulbecco à 9,55 g/l, 50 mM en phosphate, 150mM en chlorure de sodium, pH=7,4 (fournisseur SEROMED, référence produit L182-50) additionné de 0,3 % de tween 20), de 0,3% de sérum albumine bovine (BSA de la société SIGMA, référence A-4503), de 10% de
10 sérum normal de lapin décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C avant l'utilisation (fournisseur GIBCO, référence 16120-032), et de 10% de sérum normal de chèvre décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C avant l'utilisation (fournisseur GIBCO, référence 16210-015). On lave ensuite trois fois avec un mélange PBS/T20, puis avec une solution de saccharose à 20%.
15 La microplaque ainsi préparée est utilisée immédiatement ou conservée à -20°C, pour utilisation différée.

Pour effectuer le dosage on ajoute 100 µl de plasma dilué, comme cela a été indiqué précédemment, au 1/1000 ème avec un mélange
20 TpC+L+PMSF. On laisse réagir pendant 1 heure à 25°C sous agitation (400 rpm), puis on lave trois fois avec un mélange PBS/T20. On ajoute ensuite 100 µl d'une solution contenant un anticorps monoclonal anti fibrinogènes hétérodimériques $\gamma\gamma'$ -l'anticorps monoclonal L2B, décrit par Haidaris P (Haidaris P et al, *Blood*, (1989), 74 n°2, pp 743-750) - à une concentration de
25 10 µg/mL dans un mélange de TpC+L. On laisse réagir pendant 1 heure 30 minutes à 25°C sous agitation, puis on lave cinq fois avec un mélange PBS/T20. On ajoute 100 µl de conjugué peroxydase anti IgG et IgM (H+L) de souris (disponible chez la société JACKSON) dilué au 1/20000 ème dans un tampon TpC+L. On laisse réagir pendant 1 heure à 25°C sous agitation, puis
30 on lave cinq fois avec un mélange PBS/T20. On ajoute 100 µl d'orthophenylènediamine, 2 HCl en tampon substrat (0,03% d'H₂O₂) et on

laisse 20 minutes à l'obscurité. Ensuite, on arrête la réaction avec 50 μ l d' H_2SO_4 et on lit à $\lambda = 490$ nm.

(C). DOSAGE DU FIBRINOGENE HOMODIMERIQUE $\gamma\gamma$

5 L'évaluation du fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ a été obtenue en appliquant la formule suivante :

$$[\gamma] = [\text{total}] - [\gamma']$$

où [total] est la concentration en fibrinogène total trouvée dans le
10 plasma lors de l'essai 1 décrit ci-dessus en (A)

et

où [γ'] est la concentration en fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ évaluée selon l'essai 2 décrit également ci-dessus en (B).

15

D. ÉTABLISSEMENT DU RAPPORT DES CONCENTRATIONS FIBRINOGENE HETERODIMERIQUE $\gamma\gamma'$ /FIBRINOGENE HOMODIMERIQUE $\gamma\gamma$ ($[\gamma']/[\gamma]$).

L'établissement de ce rapport a été effectué sur la base des résultats obtenus par les dosages décrits en (B) et (C).

20

RESULTATS DE L'ETUDE

Les valeurs enregistrées pour les témoins sains jeunes (200 sujets, sains, non traités, âgés de 18 à 45 ans) se distribuent sous une forme
25 bimodale (voir Figure 1). Il existe en effet deux groupes de population, l'un de médiane à 0,04, l'autre de médiane à 0,08.

Les valeurs enregistrées pour les témoins sains âgés (233 sujets âgés de plus de 60 ans) (voir Figure 2) se répartissent selon une distribution
30 monomodale (de médiane proche de 0,04).

Les valeurs enregistrées pour les patients atteints de pathologies artérielles diverses se distribuent aussi sous une forme bimodale (voir Figure 3). Il existe deux groupes de population, l'un de médiane à 0,04, l'autre de médiane tendant vers 0,08.

5

Les valeurs enregistrées pour les patients atteints d'infarctus se répartissent selon une distribution monomodale (voir Figure 4) de médiane proche de 0,06.

10

L'examen de ces graphiques montre une analogie claire entre les populations : population saine âgée de 18 à 45 ans et population malade (toutes pathologies artérielles) d'une part, et population saine âgée de plus de 60 ans et population saine âgée de 18 à 45 ans, d'autre part.

15

En d'autres termes, le rapport fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ /fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ ($[\gamma\gamma']/[\gamma\gamma]$) met en évidence l'hétérogénéité de la population constituée de sujets sains âgés de 18 à 45 ans.

20

Une partie de cette population présente un rapport avec une valeur centrée près de 0,04, valeur équivalente à celle de la population constituée de sujets sains âgés de plus de 60 ans. Ces sujets sains âgés de 18 à 45 ans préfigurent donc les futurs sujets âgés de plus de 60 ans sans problème artériel.

25

D'autre part, une deuxième partie de la population de sujets sains âgés de 18 à 45 ans présente un rapport avec une valeur centrée près de 0,08, valeur équivalente à celle de certains malades âgés de 18 à 45 ans (deuxième médiane) et proche de la valeur des patients atteints d'infarctus (0,06). Ces sujets sains de 18 à 45 ans préfigurent des futurs malades âgés de

30

plus de 60 ans à problème artériel.

De cette étude, il ressort que le rapport de concentration fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ /fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ est prédictif de l'état futur d'une population. On voit déjà chez les sujets jeunes et bien portants ceux qui auront des problèmes artériels -ou au moins des risques
5 sérieux- et ceux qui n'ont pas de risque de problèmes vasculaires, notamment artériels futurs.

L'évaluation du rapport des concentrations fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ /fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ a donc une valeur
10 pronostique très utile. Lorsque ce rapport est bas et notamment inférieur de 0,05, plus spécialement proche de 0,04 dans ce cas, on peut prédire l'absence de risque de problèmes vasculaires, notamment artériels futurs.

Lorsque le rapport des concentrations fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ /fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ est élevé notamment
15 supérieur de 0,07, plus spécialement proche de 0,08, ce rapport est prédictif de risque de problèmes vasculaires, notamment artériels futurs.

Il est donc possible, selon l'invention, d'effectuer des dosages, par immunoessais conventionnels, permettant d'obtenir sur des populations sélectionnées des « valeurs fréquentes » ou « de référence » applicables à un
20 seul individu.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de dosage de fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ et de
5 fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ du fibrinogène plasmatique dans un
échantillon de plasma caractérisé en ce que l'on met en contact un échantillon
plasmatique avec au moins un anticorps spécifique du fibrinogène total et au
moins un anticorps spécifique de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$, dans des
conditions permettant la formation de complexes [fibrinogène total-anticorps
10 spécifique] et [fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ -anticorps spécifique], que l'on
détermine la concentration du fibrinogène plasmatique total et celle du
fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ et que l'on déduit la concentration de
fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ par la relation :

15
$$[\gamma] = [\text{total}] - [\gamma']$$

dans laquelle $[\gamma]$ est la concentration de fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$, $[\gamma']$ est
la concentration de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$, et $[\text{total}]$ est la
concentration du fibrinogène plasmatique total.

20

2. Procédé *in vitro* d'évaluation des risques thrombotiques
d'un sujet caractérisé en ce que l'on dose spécifiquement le fibrinogène
homodimérique $\gamma\gamma$ et le fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ du fibrinogène
plasmatique dudit sujet et que l'on établit le rapport :

25
$$[\gamma']/[\gamma]$$

où $[\gamma]$ est la concentration de fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$

et

$[\gamma']$ est la concentration de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$.

30

3. Procédé *in vitro* d'évaluation des risques thrombotiques d'un
sujet, caractérisé en ce que l'on met en contact un échantillon plasmatique du

sujet avec au moins un anticorps spécifique de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ et au moins un anticorps reconnaissant le fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$, dans des conditions permettant la formation de complexes [fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ -anticorps spécifique] et [fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ -anticorps], que l'on détermine la concentration de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ et de fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$, et que l'on établit le rapport :

$$\gamma\gamma'/\gamma = [\gamma']/[\gamma]$$

où $[\gamma]$ est la concentration de fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$
et

10 où $[\gamma']$ est la concentration de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$.

4. Procédé *in vitro* d'évaluation des risques thrombotiques d'un sujet selon la revendication 2 dans lequel la concentration de fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ est déterminée selon la relation

15
$$[\gamma] = [\text{total}] - [\gamma']$$
,

dans laquelle $[\gamma]$ est la concentration de fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$, $[\gamma']$ est la concentration de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$, et $[\text{total}]$ est la concentration du fibrinogène plasmatique total.

20 5. Procédé *in vitro* d'évaluation des risques thrombotiques d'un sujet caractérisé en ce que l'on met en contact un échantillon plasmatique avec au moins un anticorps spécifique du fibrinogène total et au moins un anticorps spécifique de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ dans des conditions permettant la formation de complexes [fibrinogène total-anticorps spécifique]
25 et [fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ -anticorps spécifique], que l'on détermine ensuite la concentration du fibrinogène total et celle de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ et que l'on établit le rapport :

$$[\gamma'] / ([\text{total}] - [\gamma'])$$

30 où $[\gamma']$ est la concentration de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ et $[\text{total}]$ est la concentration du fibrinogène plasmatique total.

6. Procédé de dosage selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on met en contact sur un support solide, sur lequel a été adsorbé du fibrinogène purifié, un anticorps spécifique du fibrinogène total, l'échantillon plasmatique à doser et au moins un anticorps spécifique de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$, dans des conditions permettant la formation de complexes [fibrinogène total-anticorps spécifique] et [fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ -anticorps spécifique, que l'on détermine la concentration du fibrinogène plasmatique total et celle du fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce que le dosage du fibrinogène total, homodimérique ou hétérodimérique est un dosage immunologique de type compétitif, de type sandwich ou sandwich modifié - double épitope.

8. Trousse de dosage du fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ et du fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ selon le procédé de l'une des revendications 2, 3 ou 7, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un anticorps spécifique du fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ et un anticorps spécifique du fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$, des moyens de détection des complexes formés [fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ - anticorps spécifique] et [fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$ - anticorps spécifique] et éventuellement, au moins un réactif étalon de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ et un réactif étalon de fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$.

9. Trousse de dosage du fibrinogène total et du fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ dans un échantillon plasmatique, selon le procédé d'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un anticorps spécifique du fibrinogène total, au moins un anticorps spécifique de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$, des moyens de détection des complexes formés [fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$ -anticorps spécifique] et [fibrinogène total-anticorps spécifique] et, éventuellement au moins un réactif étalon de

fibrinogène total et/ou au moins un réactif étalon de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$.

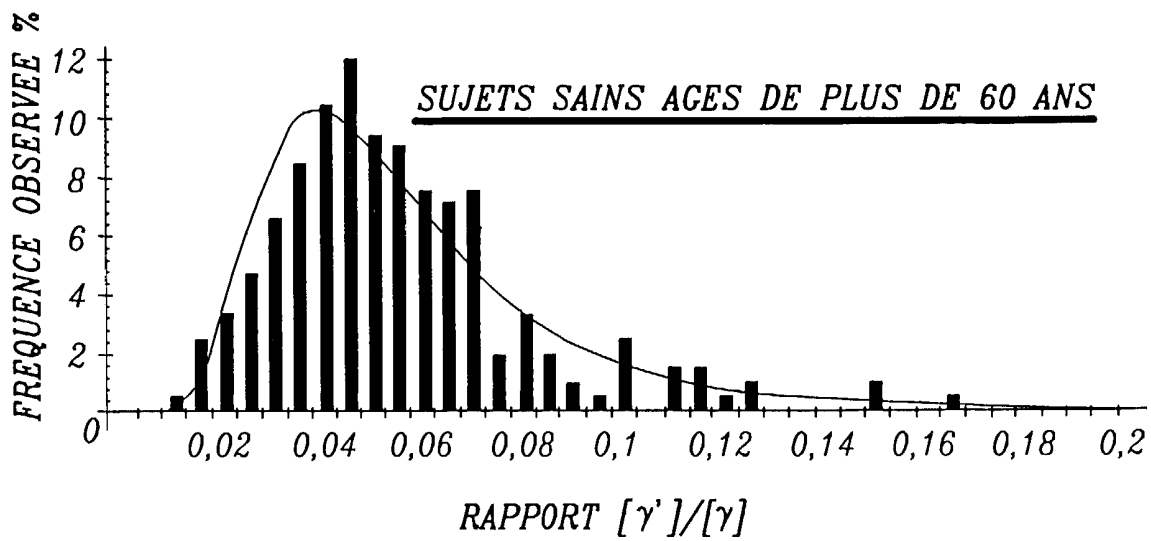
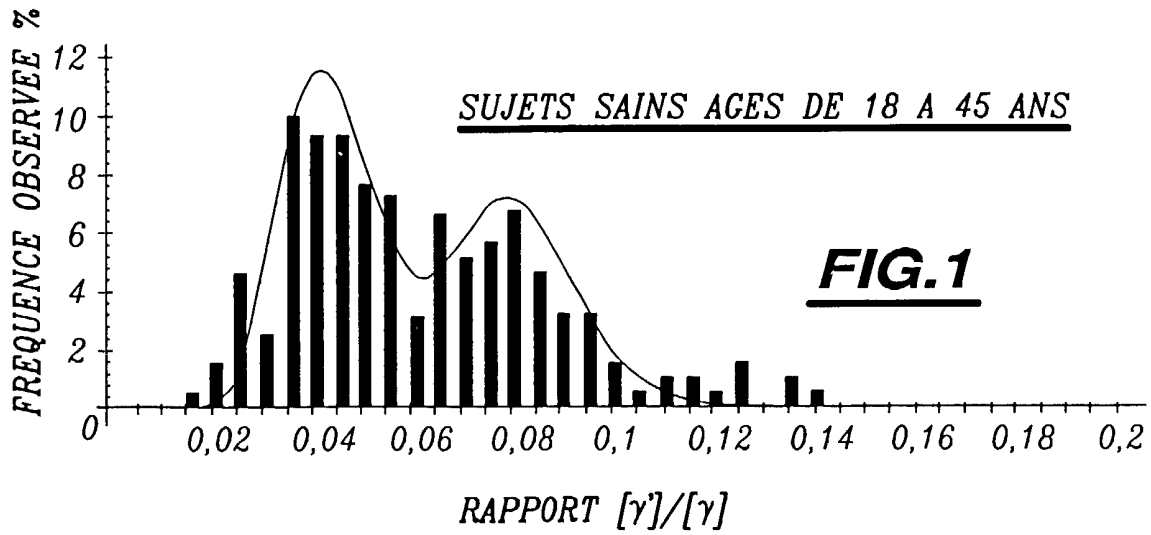
10. Procédé permettant de mettre en évidence l'activation
5 plaquettaire et de prédire les risques thrombotiques chez des sujets par l'évaluation du rapport :

$$[\gamma'] / [\gamma]$$

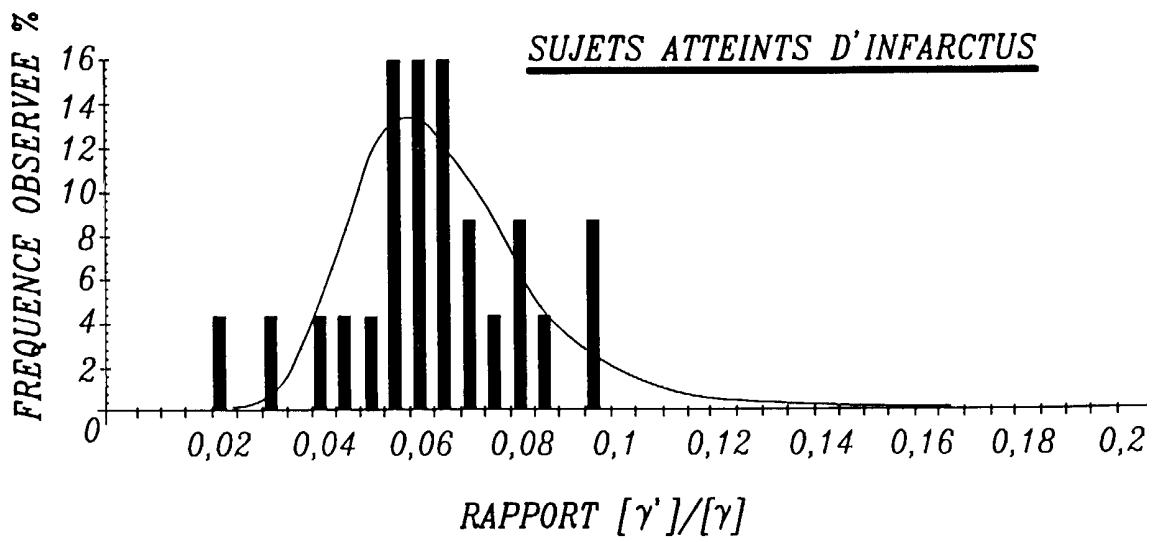
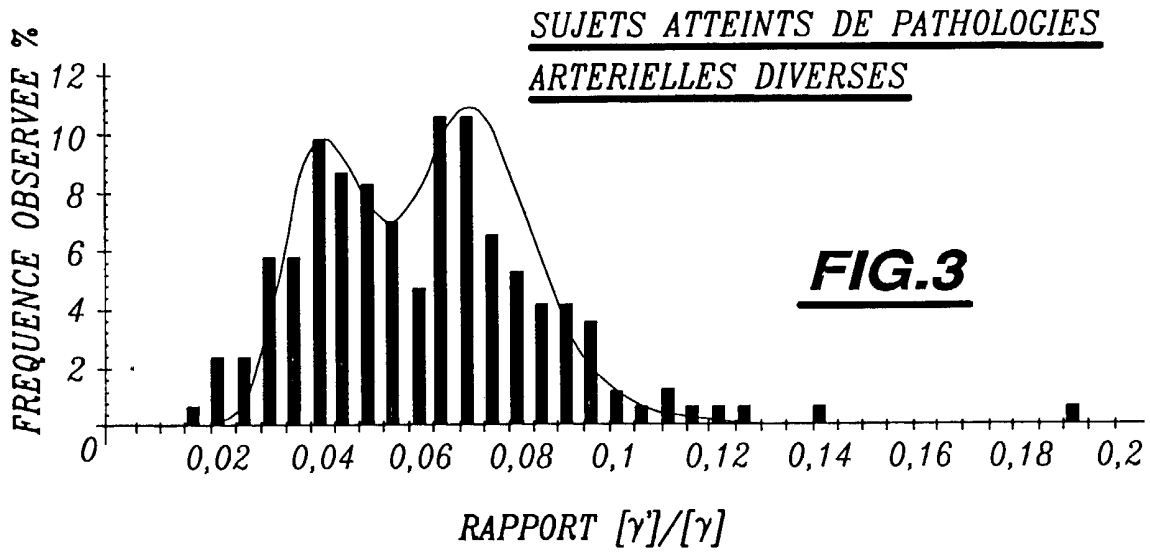
où $[\gamma]$ est la concentration de fibrinogène homodimérique $\gamma\gamma$

et $[\gamma']$ est la concentration de fibrinogène hétérodimérique $\gamma\gamma'$.

1/2

**FIG.2**

2/2

**FIG.4**

INSTITUT NATIONAL

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

de la

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

PROPRIETE INDUSTRIELLE

FA 547839

FR 9712143

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	P. J. HAIDARIS ET AL: "The C-terminal sequences of the gama-57.5 chain of human fibrinogen constitute a plasmin sensitive epitope that is exposed in crosslinked fibrin" BLOOD, vol. 74, no. 7, 15 novembre 1989, pages 2437-2444, XP002070838 * le document en entier * ---	1-3,5,10
A	EP 0 413 587 A (ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEMS INC) 20 février 1991 * le document en entier * ---	1-3,5-10
A	WO 86 06489 A (DOELLGAST GEORGE J) 6 novembre 1986 * le document en entier * ---	1-3,5-10
A	WO 93 00364 A (UNIV COLUMBIA) 7 janvier 1993 * le document en entier * -----	1-3,5,10
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		G01N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
8 juillet 1998		Moreno, C
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)