



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

(51) Classification internationale des brevets⁴ : G01N 33/53, 33/551	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 87/ 07725 (43) Date de publication internationale: 17 décembre 1987 (17.12.87)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR87/00203 (22) Date de dépôt international: 9 juin 1987 (09.06.87) (31) Numéro de la demande prioritaire: 86/08267 (32) Date de priorité: 9 juin 1986 (09.06.86) (33) Pays de priorité: FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) [FR/FR]; 15, quai Anatole France, F-75007 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : BOURDILLON, Christian [FR/FR]; 45, rue de la République, F-60380 Le Meux (FR). THOMAS, Daniel [FR/FR]; Domaine de Rimberlieu, 33, allée de l'Etang, F-60450 Villiers/Coudun (FR). GYSS, Catherine [FR/FR]; 5bis, route de la Plaine, F-78110 Le Vésinet (FR).		(74) Mandataire: CABINET BROT ET JOLLY; 83, rue d'Amsterdam, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: CYCLIC METHOD FOR THE IMMUNOENZYMATIC DOSING OF A LIGAND (54) Titre: PROCEDE CYCLIQUE DE DOSAGE IMMUNOENZYMATIQUE D'UN LIGAND (57) Abstract In this method, an electrode is used to the surface of which an anti-ligand specific to the ligand to be dosed is directly fixed. At the end of the dosing operation, said electrode is subjected to an electrochemical etching in order to re-use it in a new measuring cycle. (57) Abrégé Dans ce procédé, on utilise une électrode à la surface de laquelle est fixé directement un anti-ligand spécifique du ligand à doser. En fin de dosage, on soumet cette électrode à un décapage électrochimique pour la réutiliser dans un nouveau cycle de mesure.		

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	FR	France	ML	Mali
AU	Australia	GA	Gabon	MR	Mauritania
BB	Barbados	GB	United Kingdom	MW	Malawi
BE	Belgium	HU	Hungary	NL	Netherlands
BG	Bulgaria	IT	Italy	NO	Norway
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Romania
BR	Brazil	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CF	Central African Republic	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CH	Switzerland	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CM	Cameroon	LU	Luxembourg	TD	Chad
DE	Germany, Federal Republic of	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Denmark	MG	Madagascar	US	United States of America
FI	Finland				

Procédé cyclique de dosage immunoenzymatique d'un ligand.

5 La présente invention concerne un procédé cyclique de dosage immunoenzymatique d'un ligand, en phase hétérogène.

On sait que le dosage de substances présentes en faible concentration dans les liquides biologiques industriels soulève un grand intérêt dans les milieux scientifiques; en raison des très nombreuses applications de ces dosages dans divers domaines techniques.

10 Les techniques récentes utilisent l'activité enzymatique comme moyen de marquage et d'amplification des molécules assurant les processus de reconnaissance moléculaire qui interviennent dans les procédés d'analyse immunologique.

15 On a ainsi envisagé de marquer des antigènes ou des anticorps avec des enzymes telles que la peroxydase ou la glucose oxydase, dont il est possible de doser facilement l'activité par spectrophotométrie.

On distingue, dans ces techniques, les dosages en phase homogène et les dosages en phase hétérogène :

- dans les dosages en phase homogène, l'activité enzymatique est fonction de la réaction anticorps-antigène et il n'est pas nécessaire de séparer la "fraction liée", c'est-à-dire l'immunoréactant (conjugué antigène-enzyme ou anticorps-enzyme), qui a réagi dans la réaction immunologique, de la "fraction libre", qui représente l'immunoréactant qui n'a pas réagi ;

25 - dans les dosages en phase hétérogène, l'activité enzymatique n'est pas modifiée par la réaction antigène-anticorps et une séparation de la fraction liée et de la fraction libre s'avère nécessaire.

C'est à ces dosages en phase hétérogène que s'intéresse la présente invention et l'on commencera par rappeler les principes de ces différents dosages, qu'il est usuel de classer en méthodes compétitives et non-compétitives.

35 Dans les méthodes dites compétitives, le conjugué

enzyme-ligand (antigène ou anticorps) est mélangé avec un échantillon du milieu biologique à doser (ou avec un échantillon d'un milieu standard) contenant le ligand libre, en vue d'entrer en compétition avec ce dernier pour
5 se combiner à des antiligands fixés en quantité limitée sur un support solide. En variante (dosage par inhibition), le ligand peut être immobilisé sur un support et entrer en compétition avec le ligand à doser, lorsqu'ils sont mis simultanément en présence d'une quantité limitée
10 d'antiligand en solution. Dans ces méthodes, l'activité enzymatique est inversement proportionnelle à la concentration en ligand à doser.

Parmi les méthodes non compétitives, la méthode dite "sandwich" est la plus connue et elle s'applique au dosage
15 de ligands ayant au moins deux sites antigéniques. Le ligand à doser est mis en contact avec un support solide sur lequel sont fixés des anticorps. Le ligand se combine avec les anticorps et, après lavage du support, on met celui-ci en contact avec un excès déterminé des mêmes
20 anticorps marqués par une enzyme. Ceux-ci se fixent à leur tour sur les ligands, qui sont ainsi pris en sandwich entre les anticorps fixés sur le support et ceux marqués par l'enzyme, d'où le nom de la méthode. Dans ce cas, l'activité enzymatique est directement proportionnelle à la con-
25 centration en ligand à doser.

L'utilisation d'une phase solide dans un dosage immuno-enzymatique est une technique relativement récente, qui présente l'avantage de permettre une séparation de la fraction libre sans avoir recours à des procédés physico-
30 chimiques qui compliquent les dosages.

Toutes ces méthodes en phase hétérogène nécessitent la détection finale de l'activité enzymatique, qui est réalisée en général en phase homogène (par des méthodes spectrophotométriques, fluorimétriques ou par biolumines-
35 cence), ou pseudo-homogène (par un capteur enzymatique).

Une méthode optique très complexe, l'éllipsométrie, permet de détecter directement sur la phase solide la

présence, par exemple, de l'anticorps utilisé pour le dosage. Mais, cette méthode n'est pas envisageable pour des mesures de routine.

5 Aussi a-t-on proposé d'utiliser la phase solide elle-même comme détecteur de la présence de l'enzyme, ce qui rend le processus totalement hétérogène et facilite sa mise en oeuvre.

10 Dans des procédés de ce type, après avoir fait apparaître des sites réactifs à la surface d'une électrode, on amène celle-ci en contact avec un antiligand spécifique du ligand à doser pour former une phase solide conductrice que l'on expose ensuite au ligand à doser et à un conjugué antiligand-enzyme ou ligand-enzyme, l'enzyme de ce
15 conjugué étant apte à réagir avec un substrat pour fournir un produit électro-actif vis-à-vis de la phase solide conductrice (voir, par exemple, EP-A-O 142 301 et EP-A-0150999).

20 En effet, lorsqu'une enzyme qui produit une espèce électroactive se trouve immobilisée en situation de proximité moléculaire sur une surface conductrice, la cinétique électrochimique et la cinétique enzymatique sont interdépendantes, ce qui permet de quantifier la présence de l'enzyme par le courant électrique de détection électrochimique de cette espèce électroactive.

25 Cet état de proximité moléculaire peut être obtenu par l'une quelconque des méthodes immunologiques précédemment décrites, l'anticorps étant immobilisé directement sur la surface conductrice.

30 Une conséquence importante de l'utilisation de ce procédé de dosage, que l'on désignera par l'expression "électrocatalyse enzymatique", est que la quantité d'enzyme détectable dans cette situation est extrêmement faible, ce qui, dans son application à un dosage immunoenzymatique, en phase hétérogène, conduit à une sensibilité supérieure
35 à celle des moyens de détection antérieurs.

Pour des dosages successifs à l'échelle industrielle de ligands identiques ou différents, il serait toutefois

avantageux de pouvoir réutiliser immédiatement pour un nouveau cycle de mesure l'électrode qui a déjà servi dans une première mise en oeuvre du procédé. On gagnerait ainsi un temps considérable entre des cycles successifs de dosage par rapport aux méthodes connues dans la technique.

C'est ce problème que se propose de résoudre la présente invention.

A cet effet, l'invention a pour objet un procédé cyclique de dosage immunoenzymatique d'un ligand, selon lequel, après avoir fait apparaître par oxydation électrochimique des sites réactifs à la surface d'une électrode, on amène celle-ci en contact avec un antiligand spécifique du ligand à doser pour former une phase solide conductrice comprenant ladite électrode et, fixée à la surface de celle-ci, une couche sensiblement monomoléculaire dudit antiligand sans interposition d'un support intermédiaire, cette phase solide étant ensuite exposée au ligand à doser et à un conjugué antiligand-enzyme ou ligand-enzyme, suivant que l'on applique les méthodes de dosage dites "sandwich" ou "compétitive", l'enzyme dudit conjugué étant apte à réagir avec un substrat pour fournir un produit électro-actif vis-à-vis de ladite phase solide, ce procédé étant caractérisé en ce que, en fin de dosage, on sépare de l'électrode au moins les ligands et les conjugués antiligand-enzyme ou ligand-enzyme fixés sur ladite phase solide, en vue de la réutilisation de cette dernière pour un nouveau cycle de dosage.

La séparation de la phase solide des ligands et des conjugués anti-ligand enzyme ou ligand-enzyme pourra s'effectuer par simple rinçage de la phase solide avec un liquide dont les conditions de pH et/ou de polarité sont différentes de celles du milieu de dosage.

En fin de dosage, la couche sensiblement monomoléculaire d'anti-ligand peut également être séparée de l'électrode sur laquelle elle est fixée, en vue de la réutilisation de cette électrode pour un nouveau cycle de dosage, par exemple en soumettant cette électrode à

un décapage électrochimique par action d'un courant continu ou alternatif.

Dans ce but, on pourra avantageusement faire passer un courant continu dans une solution oxydante, entre l'élec-
5 trode de dosage et une électrode de référence, avec une différence de potentiel comprise entre + 1,7 volt et 2,2 volts.

On pourra aussi utiliser un courant alternatif avec une différence de potentiel de ± 3 volts entre l'électrode
10 de dosage et l'électrode de décapage.

L'électrode de dosage pourra être, par exemple, en carbone, en platine ou en or, et pourra prendre n'importe
15 quelle forme en fonction des contraintes d'introduction de l'échantillon à doser (électrode plane, poreuse ou à solution percolante).

Les anticorps ou les antigènes peuvent être fixés sur l'électrode par tout moyen connu dans la technique, par exemple par liaison covalente ou par adsorption phy-
sique, en formant une unique couche moléculaire.

Dans le cas d'une fixation par liaison covalente, on fera subir à l'électrode un prétraitement comprenant, de
20 façon connue en soi, une phase de création de sites réactifs à la surface de l'électrode par oxydation électrochimique de celle-ci et une phase d'activation de ces sites par un agent de couplage approprié à la nature de
25 l'électrode et à celle de l'anticorps ou de l'antigène à fixer, par exemple une activation par un carbodiimide dans le cas d'une électrode en carbone.

Dans le cas d'une immobilisation des anticorps ou des
30 antigènes sur l'électrode par adsorption physique, on procédera également à un prétraitement électrochimique de la surface de l'électrode avant de la mettre en contact avec lesdits anticorps ou antigènes.

Dans chaque cas d'espèce, on peut optimiser la quan-
35 tité d'anticorps ou d'antigène à mettre en contact avec l'électrode en vue d'obtenir une couche sensiblement mono-
moléculaire à la surface de l'électrode, afin qu'elle ne

fasse pas "écran" devant la phase solide lors de la détection électrochimique ultérieure du produit de catalyse enzymatique.

5 Pendant la phase de dosage, les ligands et/ou les conjugués anti-ligand enzyme pourront ne saturer qu'une fraction des sites des anti-ligands ou ligands associés, ce qui limitera la durée de mise en oeuvre du procédé.

10 La détection du produit libéré par le substrat, pendant la phase de dosage, pourra avantageusement être effectuée par mesure d'un courant s'écoulant entre l'électrode et une électrode de référence à potentiel contrôlé.

Les dessins schématiques annexés illustrent la mise en oeuvre de l'invention. Sur ces dessins:

15 Les figures 1 à 4 illustrent la préparation d'une électrode électroenzymatique selon l'invention utilisable dans un procédé de dosage par une méthode non compétitive du type "sandwich";

Les figures 5 et 6 illustrent la préparation d'une électrode utilisable dans une méthode compétitive;

20 Les figures 7 et 8 sont des schémas, respectivement, d'une cellule électrochimique et d'un système de dosage utilisables dans les procédés de dosage électroenzymatique conforme à l'invention ;

25 Les figures 9 et 10 représentent des courbes d'étalonnage utilisées respectivement dans les dosages des Exemples 1 et 2 ;

La figure 11 est un schéma d'une cellule de dosage utilisée dans l'Exemple 3 ;

30 La figure 12 est une courbe d'étalonnage utilisée dans l'Exemple 3.

35 Comme on le voit sur la figure 1, l'électrode 1, après avoir subi un traitement propre à permettre l'immobilisation à sa surface d'anticorps 2, par liaison covalente ou par adsorption physique, est mise en contact avec une solution contenant ces anticorps. Ceux-ci, qui sont des anticorps spécifiques de l'antigène à doser, se fixent à la surface de l'électrode en formant une monocouche, qui

recouvre totalement ou partiellement la surface traitée, suivant les conditions du traitement et le résultat souhaité.

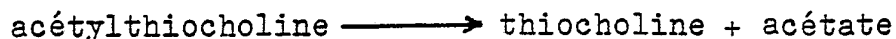
5 L'électrode modifiée résultante est ensuite mise en contact avec une solution de l'antigène 3 à doser (figure 2) qui vient se fixer sur les anticorps 2. Les conditions de la mise en contact sont telles que les anticorps ne soient pas saturés en antigènes et qu'une partie des sites anticorps demeure vacante. Le nombre des liaisons antigène-
10 anticorps formées dépendra de la concentration en antigènes de la solution à doser.

Le temps de mise en contact de la phase solide avec la solution d'antigène, ou phase d'incubation, est de l'ordre de quelques minutes, alors que, dans la plupart des
15 méthodes de dosages immunoenzymatiques, les durées d'incubation sont de l'ordre de 1 heure. En effet, ce procédé est beaucoup plus sensible que les procédés usuels, pour les raisons indiquées ci-dessus, et il n'est donc pas nécessaire de saturer tous les sites anticorps, ce qui
20 permet de réduire de façon importante la durée de contact.

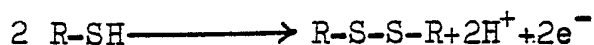
L'électrode est alors exposée au conjugué anticorps-enzyme 4, qui vient se fixer sélectivement sur les anti-
gènes 3 (figure 3). Les conditions de la mise en contact peuvent être telles que les conjugués 4 saturent tous
25 les sites antigènes, mais ceci n'est pas une obligation, si l'on procède par comparaison avec un étalon interne réalisé dans les mêmes conditions. Le temps d'incubation peut donc être considérablement réduit par rapport aux techniques antérieures.

30 A l'issue de la phase illustrée par la figure 3, le conjugué anticorps-enzyme 4 se trouve en situation d'électro-catalyse enzymatique à la surface de l'électrode 1. Il suffit, en effet, d'introduire dans le milieu à doser une ou des substances 5 (ou "substrats") aptes à réagir avec
35 l'enzyme du conjugué 4, comme on le voit sur la figure 4, pour détecter et doser à l'aide de l'électrode 1 le produit 6 de la réaction enzymatique.

C'est ainsi qu'avec l'acétylcholinesterase utilisée avec un substrat artificiel du type acétylthiocholine la réaction catalysée est :



5 La thiocholine (R-SH) produite est électrochimiquement détectée si le potentiel de l'électrode est au moins à 0,7 V par rapport à une électrode de référence du type Ag/Ag Cl:



10 Il est possible, à partir du courant d'oxydation obtenu, de calculer le nombre de molécules enzymatiques en situation d'électrocatalyse enzymatique et de mesurer ainsi, avec l'aide d'un étalonnage interne, la concentration de l'antigène 3.

15 Les figures 5 et 6 illustrent le même procédé de mise en condition d'électrocatalyse enzymatique pour un conjugué antigène-enzyme 7 utilisé dans une méthode par compétition.

Dans cette utilisation, le conjugué enzyme-ligand 7
20 est mis en compétition avec le ligand libre 3 du milieu biologique à doser pour se combiner avec les anticorps 2 immobilisés en formant monocouche sur l'électrode 1 (figure 5). Comme précédemment, si l'on introduit alors dans le milieu à doser une ou des substances 5 (ou sub-
25 strats) aptes à réagir avec l'enzyme E du conjugué 7, on peut, comme on le voit sur la figure 6, détecter et doser à l'aide de l'électrode 1 le produit 6 de la réaction enzymatique.

30 Conformément à l'invention, en vue de pouvoir réutiliser l'électrode pour un nouveau cycle de dosage, après la phase de détection illustrée par les figures 4 à 6, on ramène l'électrode à son état de départ, avant la fixation des anticorps 2.

35 A cet effet, on procède à un décapage électrochimique dans des conditions analogues à celles du prétraitement de l'électrode mentionné ci-dessus.

On notera que ce décapage de l'électrode n'est

efficace que parce que la couche d'anticorps qui y adhère est une couche sensiblement monomoléculaire.

Pour procéder à ce décapage électrochimique, dans le cas d'une électrode en carbone vitreux, par exemple, 5 il suffira de porter l'électrode à un potentiel d'environ 2 volts par rapport à une électrode de référence Ag/Ag Cl dans une solution oxydante, pendant quelques secondes.

Il se peut aussi qu'après la phase de dosage, on veuille simplement réutiliser les anticorps fixés. Dans ce 10 cas, les anticorps utilisés (par exemple monoclonaux) auront été sélectionnés pour qu'un rinçage, dans des conditions physicochimiques différentes de la mesure, assure la rupture des liaisons antigène-anticorps, sans dénaturation de l'anticorps immobilisé sur la phase solide.

La réutilisation de l'électrode, conformément à l'in- 15 vention, s'applique à tous les procédés usuels de dosage immunoenzymatique en phase hétérogène, que ce soit les méthodes compétitives, sandwich ou par inhibition, de n'importe quelle molécule permettant une reconnaissance 20 immunologique (protéine, enzyme, hormone, haptène, etc...), moyennant l'utilisation d'un milieu et de conditions de dosage appropriées.

On remarquera que, de façon connue si la molécule à 25 doser est une enzyme catalysant une réaction électrochimique détectable, le dosage est notablement simplifié et ne nécessite qu'un anticorps de cette enzyme. C'est ce qui ressortira notamment de l'Exemple 4 qui sera décrit ci-après.

Ainsi qu'il est connu, l'enzyme utilisée pour la 30 préparation des conjugués est nécessairement une enzyme possédant comme substrat ou produit de la catalyse un couple redox électroactif. Ce couple redox, qui peut être physiologique ou artificiel, est choisi de telle sorte qu'il présente une bonne réactivité électrochimique sur 35 l'électrode employée, afin d'obtenir une sensibilité optimale.

Les enzymes correspondantes sont en général des

oxydoréductases, mais peuvent être aussi des enzymes d'une autre classe, répondant à la condition précédente, par exemple des hydrolases.

Le tableau ci-après rassemble quelques enzymes utilisables pour la préparation des conjugués détectables par électrocatalyse enzymatique.

TABLEAU

10	Enzymes	Réactions catalysées	Molécules électroactives détectables
15	<p><u>Hydrolases</u></p> <p>Ex.: Acétylcholine estérase</p>	<p>acétylthiocholine \rightarrow thiocholine + acétate</p>	<p>thiocholine</p>
	<p>Ex.: Phosphatase alcaline</p>	<p>phényl phosphate + H₂O \rightarrow acide phosphorique + phénol</p>	<p>phénol</p>
20	<p><u>Oxydoréductases</u></p> <p>Ex.: Glucose oxydase</p>	<p>glucose + cosubstrat \rightarrow acide gluconique + cosubstrat réduit</p> <p>Le cosubstrat peut être O₂ ou des accepteurs artificiels comme, par exemple, la benzoquinone</p>	<p>cosubstrat réduit</p> <p>H₂O₂</p> <p>hydroquinone</p>
25	<p>Ex.: Péroxydase</p>	<p>H₂O₂ + substrat \rightarrow H₂O + substrat oxydé</p> <p>De très nombreux substrats possibles, par exemple, orthométhoxy phénol</p>	<p>substrat oxydé</p> <p>ex.: 3,3'-diméthoxydiphénoquinone</p>

La sensibilité globale des procédés de dosage dépend de trois facteurs :

- la sensibilité intrinsèque de la détection en phase solide,

- le temps de contact entre l'échantillon à doser et la phase solide,

- la qualité du matériel immunologique utilisé.

Pour le premier facteur, la sensibilité de détection
5 est liée à l'activité catalytique moléculaire de l'enzyme
utilisée pour l'amplification (par exemple, environ 10 000
 s^{-1} pour un conjugué obtenu avec l'acétylcholinestérase de
Electricus Electrophorus). Dans ce cas, l'électrocatalyse
enzymatique est capable de détecter la présence d'un
10 minimum de 10^{-16} mole de conjugué par cm^2 de surface réelle
de la phase solide.

Cette exceptionnelle sensibilité s'explique par la
proximité moléculaire entre site enzymatique et site
électrochimique, ce qui réduit à quelques nanomètres la
15 distance que doit parcourir le produit pour être détecté.

Il est important de noter, à ce propos, que la
sensibilité de détection du conjugué est entièrement indé-
pendante de la surface de la phase solide. La taille et
la forme de l'électrode utilisée peut donc être adaptée à
20 la quantité d'antigène que l'on souhaite doser.

Ce point sera illustré dans les exemples proposés.

Pour ce qui est du temps de contact entre la phase
solide et l'échantillon, ce temps de contact détermine un
"taux de capture" T, qui peut être inférieure à 1, si tous
25 les antigènes n'ont pas été captés, le taux de capture
étant défini comme le rapport entre le nombre de molécules
antigéniques capturées par la phase solide et leur nombre
total dans l'échantillon.

Le taux T est également sensible au rapport entre le
30 volume de l'échantillon et la surface de la phase solide.
Une des caractéristiques de l'invention est que la
détection est suffisamment sensible pour qu'il soit
possible d'accepter des taux de capture faibles
(par exemple $T = 0,03$ dans l'exemple 1).

35 Enfin, la sensibilité pratique du procédé de dosage
est fonction, comme pour toute méthode immunologique,
de la qualité des anticorps utilisés ainsi que des

adsorptions non spécifiques parasites sur la phase solide. Les rinçages dans des tampons appropriés, connus de l'homme de l'art, limitent ces adsorptions non spécifiques. Mais on notera que le temps d'incubation très court permis par la procédure proposée réduit considérablement ces adsorptions non spécifiques.

La sensibilité globale obtenue est finalement un paramètre modulable en fonction du problème analytique traité. Les exemples présentés ci-après illustrent des sensibilités effectives pouvant atteindre $2 \cdot 10^{-12}$ mole par litre ou $2 \cdot 10^{-21}$ mole dans la prise d'essai.

Les exemples suivants illustrent diverses formes de mise en oeuvre de l'invention.

15

EXEMPLE 1

Cet exemple illustre le dosage d'une immunoglobine G par la méthode "sandwich" sur une phase solide de surface moyenne (électrode plane de carbone vitreux de surface d'environ $0,1 \text{ cm}^2$).

20

1) Préparation des réactifs

L'anticorps anti IgG de lapin a été fourni par les laboratoires BYOSIS, de Compiègne (France). Il a été obtenu chez le mouton et purifié selon les procédures connues. Le conjugué glucose oxydase-anti IgG est préparé par la méthode au glutaraldéhyde d'AVRAMEAS et al (Immunochemistry, Pergamon Press 6, 43-52 (1969)). Après purification, le conjugué est enzymatiquement actif à 95% et immunologiquement actif à 60%.

30

2) Appareillage

La mesure pourra, par exemple, être effectuée dans une cellule électrochimique à circulation, du type illustré par la figure 7.

35

Dans cette cellule, le liquide arrive par une canalisation 10, circule en lame mince délimitée par une pellicule 11 de matière plastique, par exemple de P T F E,

et est évacué par une canalisation 12. La cellule comprend, par ailleurs, une électrode de travail 13, par exemple en carbone vitreux, une contre-électrode 14, par exemple du type Ag/Ag Cl, et une électrode de décapage 15, par exemple en carbone vitreux. Les électrodes sont gainées sur toute leur surface latérale par une matière isolante et ne sont en contact avec le liquide à doser que par leur face d'extrémité. Bien entendu, une telle cellule n'a qu'une valeur d'exemple et l'on pourrait utiliser tout autre système conçu par l'homme de l'art.

La cellule 9 s'incorpore dans un système entièrement automatisé du type de celui de la figure 8, qui permet un étalonnage interne assurant la précision du dosage.

La cellule électrochimique 9 est alimentée par la canalisation 10 à partir d'un circuit fluide 16, lui-même alimenté en réactifs par le conduit 17, avec prise d'échantillon éventuelle par le conduit 18. Les électrodes 13, 14 et 15 sont connectées à un système d'alimentation électrique 19, qui sert en même temps d'interface électronique de contrôle et d'acquisition, couplée à un microordinateur 20.

3) Dosage

On utilise, dans ce cas, le principe de la méthode "sandwich" décrite en référence aux figures 1 à 4. L'introduction et la circulation des réactifs est assurée par le circuit fluide 16 de la manière suivante:

L'électrode de travail 13 est oxydée 5 secondes dans un mélange nitrochromique (10% en poids de HNO_3 + 2% en poids de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ + eau) par passage d'un courant de 5 mA. L'électrode 15 est utilisée comme cathode. Cette phase de décapage de l'électrode régénère la surface de la phase solide et facilite l'adsorption de l'anticorps.

Après rinçage au tampon (phosphate 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M), une solution d'anticorps (300 µg/ml dans le même tampon) est mise en contact 5 minutes avec la phase solide. Un rinçage pendant 2 minutes au tampon bloquant (phosphate 0,01 M, pH 7,4 + gélatine 0,25% +

Tween 20, 0,1% (monolaurate de polyoxyéthylènesorbitane commercialisé sous cette appellation et utilisé comme tensio-actif) + NaCl 0,15 M) permet d'éliminer l'anticorps en excès.

5 On introduit $0,2 \text{ cm}^3$ de la solution contenant l'antigène à doser avec un débit de $0,1 \text{ cm}^3$ par minute. Cette phase est suivie par 2 minutes de rinçage au tampon bloquant.

Le conjugué ($100 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^3$ dans le tampon bloquant) est introduit pendant 1 minute, puis rincé par une solution de benzoquinone (10^{-2} M dans du tampon acétate $0,1 \text{ M}$, pH 5,6 + NaCl $0,15 \text{ M}$).

Le courant de l'électrode, portée à 350 mV par rapport à l'électrode 14, est alors échantillonné pendant 15 1 minute par le système d'acquisition de données 19 et 20. L'introduction de glucose $0,2 \text{ M}$ dans la même solution provoque un saut de courant, dû à la détection de l'hydroquinone enzymatiquement formée. Ce saut de courant, pratiquement instantané, est directement proportionnel à la quantité de conjugué en position d'électrocatalyse enzymatique. Il est relié par une courbe d'étalonnage (figure 9) à la concentration en $1 \text{ } \mu\text{g}$ dans l'échantillon.

Le taux de capture calculé est ici de l'ordre de $0,03$ et la sensibilité de l'ordre de $2 \cdot 10^{-11} \text{ mole/l}$ en antigène, soit $4 \cdot 10^{-15} \text{ mole}$ d'antigène dans la prise d'essai. Le cycle de mesure peut alors recommencer par le décapage de la phase solide. L'ensemble du cycle dure ici 20 minutes y compris l'adsorption de l'anticorps sur la phase solide.

30 Pour réutiliser immédiatement l'électrode 13 dans un nouveau cycle de mesure, il suffit de la soumettre à la même opération de décapage que celle qui a initié le cycle précédent.

EXEMPLE 2

35 Cet exemple concerne le dosage d'un stéroïde, le 17 β oestradiol, par une méthode dite "compétitive", sur une phase solide de surface moyenne (électrode plane de carbone

vitreux de 0,1 cm² de surface).

1) Réactifs

L'anticorps de lapin anti-oestradiol a été obtenu d'un laboratoire spécialisé. Le conjugué oestradiol-acétylcholinestérase a été préparé selon la méthode de ERLANGER et al (Methods in immunology and immunochemistry, Academic Press, vol 1 144, (1967).

2) Appareillage

On utilise le même appareillage que dans l'Exemple 1.

3) Dosage

On utilise le principe de la méthode par compétition de l'antigène vis-à-vis de l'antigène marqué pour la phase solide, décrite en référence aux figures 5 et 6.

L'introduction et la circulation des réactifs est assurée automatiquement par le circuit fluide 16 selon la chronologie suivante :

Les phases de décapage puis d'adsorption de l'anticorps anti-oestradiol sont identiques aux deux premières phases de l'Exemple 1.

Pendant la phase de compétition, une solution de conjugué antigène-enzyme de concentration appropriée est introduite avec la solution à doser. Le débit de ce mélange échantillon/conjugué est de 0,1 cm³/min. et cette phase dure 3 minutes.

Après un rinçage d'une minute au tampon phosphate (0,01 M, pH 7,5 + NaCl 0,15 M), la solution d'acétylthiocholine ($5 \cdot 10^{-4}$ M dans le même tampon) est introduite.

Le saut de courant mesuré par l'électrode 13, préalablement portée à + 700 mV par rapport à l'électrode 14, correspond à l'oxydation de la thiocholine produite par le conjugué en position d'électrocatalyse enzymatique.

Dans ce cas, le courant mesuré est inversement proportionnel à la concentration en antigène dans l'échantillon à doser. La figure 10 représente une courbe d'éta-

lonnage.

Pour une nouvelle mesure, il suffit de procéder à

un nouveau décapage de l'électrode 13.

EXEMPLE 3

Cet exemple concerne le dosage d'une immunoglobine G par la méthode "sandwich", à l'aide d'une phase solide
5 de grande surface (électrode en feutre de carbone de surface réelle 50 cm²).

1) Réactifs

Les anticorps ont la même provenance que ceux de l'Exemple 1. Le conjugué est ici obtenu par couplage de
10 l'acétylcholinestérase de *Electricus electrophorus* sur l'anticorps par la méthode au carbodiimide décrite par Goodfried T.L. et al., Science 1964, 144, 1344 - 46.

2) Appareillage

L'appareillage utilisé est représenté schématiquement
15 sur la figure 11. La phase solide est un cylindre 22 de feutre de carbone (par exemple, celui portant la référence RVC 2000 commercialisé par la Société Le Carbone Lorraine) de 7 mm de long sur 5 mm de diamètre, correspondant à une surface réelle de fibre de carbone de l'ordre de 50 cm².
20 Le contact électrique avec cette électrode de travail est assuré par l'électrode annulaire 23 en platine. La solution, introduite par 24, percole au travers de l'électrode 22 et est évacuée par la sortie 25.

L'électrode de référence 26 et l'électrode de déca-
25 page 27 sont identiques à celles de la figure 7. Ce micro-réacteur électrochimique 21 s'incorpore à la place de la cellule électrochimique dans le système automatisé décrit dans la figure 8.

Ce micro réacteur est particulièrement efficace pour
30 les solutions très diluées qui nécessitent un taux de capture élevé. Il permet également de réduire encore les temps de contact entre solutions et phase solide du fait de l'important rapport surface/volume obtenu.

3) Dosage

35 Dans son principe, le processus de dosage est identique à celui de l'exemple 1, avec les différences suivantes :

- le temps d'adsorption de l'anticorps est réduit à 2 minutes;

- l'échantillon à doser (volume 10 cm^3) est introduit avec un débit de $5 \text{ cm}^3/\text{minute}$;

5 - le potentiel de l'électrode 22 pendant la phase de mesure est à + 700 mV par rapport à l'électrode 26 ; le saut de courant est obtenu par introduction du substrat de l'enzyme, ici l'acétylthiocholine 510^{-4} M dans un tampon phosphate 0,01 M, pH 7,5/NaCl 0,15 M.

10 La procédure de décapage de la phase solide est différente à cause de sa grande surface. Dans ce cas, l'alimentation 18 impose un courant alternatif à la fréquence du secteur d'environ $\pm 3\text{V}$ d'amplitude entre l'électrode de travail 22 et l'électrode 27.

15 Cette phase, réalisée en présence du mélange nitrochromique (10% HNO_3 + $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 2%), dure 5 secondes. Elle est suivie d'une phase de rinçage au tampon phosphate 0,01 M, pH 7,4).

L'ensemble du cycle de mesure dure 15 minutes et un exemple de courbe de calibration est donné sur la figure 12. La sensibilité est de l'ordre de $2 \cdot 10^{-12}$ mole/l avec un taux de capture compris entre 0,5 et 0,9. On remarquera que, si une moins bonne sensibilité est désirée, il suffit de réduire le volume de l'échantillon.

25

EXEMPLE 4

Cet exemple concerne la détection et la localisation d'une protéine in vivo à l'aide d'une microélectrode (fibre de carbone de diamètre $10 \mu\text{m}$).

30 Dans cet exemple, la phase solide est utilisée pour détecter la présence d'acétylcholinestérase libre localisée à la périphérie d'une cellule nerveuse dans la moëlle épinière du rat. L'anticorps anti-acétylcholinestérase est immobilisé sur la fibre de carbone, qui est introduite sous contrôle microscopique dans les tissus,
35 selon les méthodes habituelles à l'électrophysiologie.

1) Réactifs

L'anticorps monoclonal anti-acétylcholinestérase

adapté à cette mesure n'est pas commercialisé et a été fourni par un laboratoire de recherches universitaire spécialisé.

2) Appareillage

5 On utilise ici une méthode manuelle.

La microélectrode utilisée (par exemple celle portant la référence MFCl commercialisée par SOLEA-TACUSSEL) est sectionnée de telle sorte que la longueur utile de la fibre soit d'environ 50 μm . Compte tenu du diamètre (10 μm), ceci correspond à une surface externe de la fibre de l'ordre de $1,6 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2$.

Pendant la phase de contact avec l'échantillon, l'électrode est montée sur un stand de micromanipulation.

15 Pendant la phase de mesure de l'activité enzymatique, l'électrode est placée comme électrode de travail dans un montage électrochimique classique à trois électrodes. Le courant est mesuré à l'aide d'un pico-ampéromètre, à cause des faibles courants débités.

3) Dosage

20 La micro-électrode est prétraitée par passage de 10 μA pendant 5 secondes dans le mélange nitrochromique de l'Exemple 1. Après rinçage au tampon phosphate (0,01 M, pH 7,4), l'anticorps anti-acétylcholinestérase est adsorbé par simple trempage de la fibre dans une solution à 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ dans le même tampon.

Après rinçage au tampon bloquant de l'Exemple 1, l'électrode est fixée sur un micromanipulateur et la pointe de la fibre de carbone est enfoncée dans la préparation pendant 2 minutes. La localisation s'effectue sous microscope.

30 La détection de l'acétylcholinestérase ainsi "prélevée" par les anticorps fixés sur l'électrode peut ensuite être effectuée, en différé, dans la cellule électrochimique. Les courants mesurés sont de l'ordre de 10 à 100 pico A, en fonction de la quantité d'enzymes à détecter et des temps de contact in vivo. La sensibilité, exprimée ici en quantité d'enzymes et non en concentration, est

de l'ordre de $2 \cdot 10^{-21}$ mole d'acétylcholinestérase. La méthode est semi quantitative, à condition de standardiser les temps de contact avec des témoins.

5 On remarquera que la méthode peut être utilisée in vitro selon les mêmes principes, dans le cas de volumes d'échantillons très faibles (par exemple de volume inférieur à 1 μ l). Ceci prouve la très grande sensibilité de la méthode de détection.

REVENDICATIONS

1.- Procédé cyclique de dosage immunoenzymatique d'un ligand, selon lequel, après avoir fait apparaître par oxydation électrochimique des sites réactifs à la surface d'une électrode, on amène celle-ci en contact avec un antiligand spécifique du ligand à doser pour former une phase solide conductrice comprenant ladite électrode et, fixée à la surface de celle-ci, une couche sensiblement monomoléculaire dudit antiligand sans interposition d'un support intermédiaire, cette phase solide étant ensuite exposée au ligand à doser et à un conjugué anti-ligand-enzyme ou ligand-enzyme suivant que l'on applique les méthodes de dosage dites "sandwich" ou "compétitive", l'enzyme dudit conjugué étant apte à réagir avec un substrat pour fournir un produit électro-actif vis-à-vis de ladite phase solide, ce procédé étant caractérisé en ce que, en fin de dosage, on sépare de l'électrode au moins les ligands et les conjugués antiligand-enzyme ou ligand-enzyme fixés sur ladite phase solide, en vue de la réutilisation de cette dernière pour un nouveau cycle de dosage.

2.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la séparation de la phase solide des ligands et des conjugués antiligand-enzyme ou ligand-enzyme s'effectue par rinçage de ladite phase solide avec un liquide dont les conditions de pH et/ou de polarité sont différentes de celles du milieu de dosage.

3.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que, en fin de dosage, ladite couche dudit antiligand est également séparée de l'électrode sur laquelle elle est fixée, en vue de la réutilisation de ladite électrode pour un nouveau cycle de dosage.

4.- Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la séparation de ladite couche d'anti-ligand est réalisée en soumettant ladite électrode à un décapage électrochimique par action d'un courant continu ou alternatif.

5.- Procédé selon la revendication 4, caractérisé

en ce que, pour le décapage de l'électrode, on fait passer un courant continu dans une solution oxydante, entre l'électrode de dosage et une électrode de référence, avec une différence de potentiel comprise entre + 1,7
5 volt et 2,2 volts.

6.- Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que, pour le décapage de l'électrode, on utilise un courant alternatif, avec une différence de potentiel de ± 3 volts entre l'électrode de dosage et l'électrode
10 de décapage.

7.- Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que, pendant la phase de dosage, les ligands et/ou les conjugués antiligand-enzyme ou ligand-enzyme ne saturent qu'une fraction des sites des
15 antiligands ou ligands associés.

8.- Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la détection du produit libéré par ledit substrat pendant la phase de dosage est effectuée par mesure d'un courant s'écoulant entre ladite électrode
20 et une électrode de référence à potentiel contrôlé.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 87/00203

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁴		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. ⁴ G01N 33/53;G01N 33/551		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. ⁴	G01N;C12M	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	EP, A, 0150999 (SERONO DIAGNOSTICS LTD) 7 August 1985, see abstract; examples 4 and 5; claims 1-10 (cited in the application) --	1-3, 8
A	EP, A, 0142301 (SERONO DIAGNOSTICS LTD) 22 May 1985, see abstract; page 10, lines 14-31; table II (cited in the application) --	1, 8
A	EP, A, 0170446 (SERONO DIAGNOSTICS LTD) 5 February 1986, see abstract, line 28 - page 19; claims 1-6 --	1, 2
A	EP, A, 0155193 (SERONO DIAGNOSTICS LTD) 18 September 1985, see abstract; claims 1, 9. --	1, 8
X	Chemical Abstracts, Vol. 93, Nr. 25, 22 December 1980, (Columbus, Ohio, US), N. YAMAMOTO et al.: "Nature of chemically modified electrodes for ./.	
<p>⁹ Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
9 August 1987 (09.08.87)	12 October 1987 (12.10.87)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
European Patent Office		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
	detection of biological substances", see page 400, abstract 234279v, & Nippon Kagaku Kaishi, 1980, (10), 1562-7 -----	1, 2

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/ER 87/00203 (SA 17450)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 26/09/87

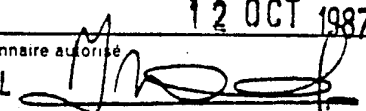
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0150999	07/08/85	JP-A- 60242361 AU-A- 3811585	02/12/85 01/08/85
EP-A- 0142301	22/05/85	AU-A- 3465184 JP-A- 60127450 CA-A- 1223922	02/05/85 08/07/85 07/07/87
EP-A- 0170446	05/02/86	AU-A- 4472685	16/01/86
EP-A- 0155193	18/09/85	AU-A- 4000285	19/09/85

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

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 87/00203

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB ⁴ : G 01 N 33/53; G 01 N 33/551		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁴	G 01 N; C 12 M	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie [*]	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
X	EP, A, 0150999 (SERONO DIAGNOSTICS LTD) 7 août 1985, voir l'abrégé; exemples 4 et 5; revendications 1-10 cité dans la demande --	1-3,8
A	EP, A, 0142301 (SERONO DIAGNOSTICS LTD) 22 mai 1985, voir l'abrégé; page 10, lignes 14-31; tableau II cité dans la demande --	1,8
A	EP, A, 0170446 (SERONO DIAGNOSTICS LTD) 5 février 1986, voir l'abrégé, ligne 28 - page 19; revendications 1-6 --	1,2
A	EP, A, 0155193 (SERONO DIAGNOSTICS LTD) 18 septembre 1985, voir l'abrégé; revendications 1,9 --	1,8
X	Chemical Abstracts, volume 93, no. 25, 22 décembre 1980, (Columbus, Ohio, US), N. Yamamoto et al.: "Nature of chemically modified electrodes for ./. ./.	
<p>[*] Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
9 août 1987	12 OCT 1987	
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé M. VAN MOL 	

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)
Catégorie *	Identification des documents cités, ¹⁵ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	N° des revendications visées ¹⁸
	detection of biological substances", voir page 400, abrégé 234279v, & Nippon Kagaku Kaishi, 1980, (10), 1562-7 -----	1,2

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE RELATIF

A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO. PCT/FR 87/00203 (SA 17450)

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche international visé ci-dessus. Lesdits membres sont ceux contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 26/09/87

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

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets	Date de publication
EP-A- 0150999	07/08/85	JP-A- 60242361	02/12/85
		AU-A- 3811585	01/08/85
EP-A- 0142301	22/05/85	AU-A- 3465184	02/05/85
		JP-A- 60127450	08/07/85
		CA-A- 1223922	07/07/87
EP-A- 0170446	05/02/86	AU-A- 4472685	16/01/86
EP-A- 0155193	18/09/85	AU-A- 4000285	19/09/85

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