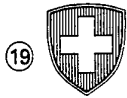




⑪ **CH 684715 A5**

⑤① Int. Cl.⁵: **G 01 N 33/53**



CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

⑫ **FASCICULE DU BREVET** A5

②① Numéro de la demande: 766/94

⑥② Demande scindé de: 3938/90

②② Date de dépôt: 12.12.1990

③③ Priorité(s): 18.12.1989 US 456982

②④ Brevet délivré le: 30.11.1994

④⑤ Fascicule du brevet
publié le: 30.11.1994

⑦③ Titulaire(s):
Princeton Biomeditech Corporation, Somerset/NJ
(US)
Miwon Co., Ltd, Seoul (KR)

⑦② Inventeur(s):
Kang, Jemo, Princeton/NJ (US)
Youn, Byungwoo, Wyckoff/NJ (US)
Oh, Young Ho, Edison/NJ (US)

⑦④ Mandataire:
Kirker & Cie SA, Thônex (Genève)

⑤④ **Procédé d'essai immunochimique et dispositif pour sa mise en oeuvre.**

⑤⑦ L'invention concerne un dispositif d'essai immuno-
chimique, utilisable pour des tests de grossesses ou de
diagnostic de divers maladies (SIDA, rubéole, hépatite,
etc). Pour le dispositif de l'invention, on prépare un mar-
queur immunochimique constitué de fines particules de
noir de carbone sur lesquelles est immobilisé par adsorp-
tion un ligand immunologiquement actif ou une molécule
se liant à un ligand.



CH 684715 A5

Description

On a décrit divers procédés pour détecter la présence d'un analyte (substance faisant l'objet d'une analyse) dans un échantillon de fluide biologique, grâce à l'utilisation de l'immunochimie. Par exemple, dans ce que l'on appelle le procédé «sandwich», un analyte cible, comme un antigène, est pris en sandwich entre un anticorps marqué et un anticorps immobilisé sur un support solide. On effectue l'essai en observant la présence d'un complexe d'antigène lié et d'anticorps marqué et en déterminant la quantité. Dans le procédé d'immuno-essai par compétition, un anticorps fixé sur une surface solide est mis en contact avec un échantillon contenant une quantité inconnue d'un analyte antigène et avec un antigène marqué du même type. On détermine ensuite la quantité d'antigène marqué fixé sur la surface solide, ce qui donne une mesure indirecte de la quantité d'analyte antigène dans l'échantillon.

Puisque ces procédés, ainsi que d'autres discutés ci-dessous, permettent de détecter aussi bien des anticorps que des antigènes, on les appelle généralement «essais immunochimiques ligand-récepteur» ou, plus simplement, «immuno-essais».

Les dispositifs d'immuno-essais en phase solide, qu'ils soient du type sandwich ou du type par compétition, permettent une détection sensible d'un analyte dans un échantillon de fluide biologique comme du sang ou de l'urine. Les dispositifs d'immuno-essais en phase solide comprennent un support solide sur lequel est fixé un élément d'une paire ligand-récepteur, habituellement un anticorps, un antigène ou un haptène. Au début, les supports solides revêtaient habituellement les formes de plaques, de tubes ou de perles de polystyrène, bien connues dans les domaines des essais radio-immunologiques et des essais immuno-enzymatiques. Plus récemment, on a utilisé comme supports solides un certain nombre de matériaux poreux, comme le nylon, la nitrocellulose, l'acétate de cellulose, les fibres de verre et d'autres polymères poreux.

On a décrit un certain nombre de trousseaux intégrales d'immuno-essais, qui font appel à des matériaux poreux comme phases solides supportant des composants immunochimiques comme des antigènes, des haptènes ou des anticorps. Ces trousseaux sont généralement de conception «à tige plongeante», «à écoulement traversant» ou «à migration».

Dans les formes les plus courantes d'essais du type à tige plongeante, tels que représentés par les trousseaux de tests domestiques de détection d'ovulation et de grossesse, des composants immunochimiques tels que des anticorps sont fixés sur une phase solide. Le dispositif d'essai est plongé, pour une incubation, dans un échantillon suspecté de contenir un analyte antigène inconnu. On ajoute alors un anticorps marqué par une enzyme, soit en même temps, soit après une période d'incubation. Le dispositif est ensuite lavé, puis introduit dans une seconde solution contenant un substrat pour l'enzyme. L'enzyme de marquage, si elle est présente, interagit avec le substrat, en provoquant la formation de produits colorés qui se déposent sous forme d'un précipité sur la phase solide ou bien provoquent un changement visible de la couleur de la solution de substrat. Dans EP-A 0 125 118, Baxter et coll. décrivent un tel immuno-essai à tige plongeante du type sandwich. Dans EP-A 0 282 192, Kali et coll. décrivent un dispositif à tige plongeante, à utiliser dans des essais du type par compétition.

On a conçu les dispositifs d'immuno-essais du type à écoulement traversant pour s'affranchir des nécessités d'une incubation poussée et d'étapes ennuyeuses de lavage, associées aux essais à tige plongeante. Dans le brevet US N° 4 632 901, Valkirs et coll. décrivent un dispositif comprenant un anticorps (spécifique d'un analyte antigène cible) fixé sur une membrane poreuse ou sur un filtre, auquel on ajoute un échantillon liquide. Quand le liquide s'écoule à travers la membrane, l'analyte cible se lie à l'anticorps. L'addition de l'échantillon est suivie de l'addition d'un anticorps marqué. La détection visuelle de l'anticorps marqué donne une indication de la présence de l'analyte antigène cible dans l'échantillon.

Dans EP-A 0 299 359, Korom et coll. décrivent une variante d'un dispositif à écoulement traversant, dans laquelle l'anticorps marqué est incorporé dans une membrane qui joue le rôle d'un système de libération de réactifs.

Le fait que les dispositifs d'immuno-essais des types à tige plongeante et à écoulement traversant exigent de multiples étapes d'addition et de lavage augmente le risque de voir un personnel et des utilisateurs domestiques très peu habitués à ces manipulations obtenir des résultats d'essais erronés.

Dans les essais du type à migration, une membrane est imprégnée avec les réactifs nécessaires à la réalisation de l'essai. Une zone de détection de l'analyte est ménagée, dans laquelle l'analyte marqué est fixé et un indice de résultat de l'essai est lu. Voir par exemple le brevet US N° 4 366 241 de Tom et coll. et la demande EP-A 0 143 574 de Zuk.

Toutefois, la sensibilité des essais du type à migration est souvent réduite par la présence ou la formation, dans l'échantillon, de composants solides indésirables qui empêchent le passage de l'analyte marqué vers la zone de détection. La sensibilité de l'essai diminue également quand on utilise une quantité trop importante d'échantillon de liquide dans les dispositifs d'essai à migration.

Les dispositifs d'essai à migration contiennent habituellement des réactifs qui ont été fixés à des marqueurs colorés, ce qui permet la lecture visuelle des résultats de l'essai, sans addition de substances supplémentaires. Voir par exemple le brevet US N° 4 770 853 de Bernstein, la demande WO-88/08534 de May et coll., et la demande EP-A 0 299 428 de Ching et coll.

Parmi ces marqueurs, on peut citer des particules de sol d'or, comme celles décrites par Leuvinger

dans le brevet US N° 4 313 734, des particules de sol de colorant, comme celles décrites par Gribnau et coll. dans le brevet US N° 4 373 932 et par May et coll. dans la demande WO-88/08534, un latex coloré, comme celui décrit par May, *supra*, et par Snyder dans les demandes EP-A 0 280 559 et 0 281 327, et des colorants enfermés dans des liposomes, comme le décrivent Campbell et coll. dans le brevet US N° 4 703 017. En ce qui concerne les procédés convenables d'immobilisation, ces marqueurs colorés sont généralement limités. En outre, ils nécessitent une quantité relativement grande de molécules de ligand et peuvent impliquer des réactifs chers, ce qui augmente les coûts.

La présente invention concerne un dispositif pour détecter la présence d'un analyte dans un échantillon de fluide biologique, grâce à l'utilisation de réactions immunochimiques ligand-récepteur et de matériaux-filtres spécialement choisis, traités et disposés. La nature de l'invention apparaîtra à la lecture de la description suivante et des dessins annexés, dans lesquels:

la fig. 1 est une vue en coupe d'un dispositif d'essai monodirectionnel typique;

la fig. 2 est une vue en coupe d'un second mode de réalisation d'un dispositif d'essai monodirectionnel;

la fig. 3 est une vue en coupe d'un dispositif bidirectionnel typique;

la fig. 4 est une vue en perspective d'un dispositif d'essai, tel que représenté sur la fig. 2 (indiqué par la silhouette en pointillés), enfermé dans un étui en matière plastique muni d'une ouverture unique;

la fig. 5 est une vue de dessus d'un dispositif d'essai multidirectionnel; et

la fig. 6 est une vue en perspective d'un dispositif d'essai tel que représenté sur la fig. 2 (indiqué par la silhouette en pointillés), enfermé dans un étui en matière plastique muni de deux ouvertures.

Si l'on se reporte maintenant à la fig. 1, on voit un tampon réservoir 10, un élément filtre 12 et une membrane 16 à effet de mèche, qui contient, dans une zone indicatrice définie 18, une substance immobilisée, le tout étant disposé sur un support 20. Le tampon réservoir 10, qui peut s'étendre au-delà du support 20, présente une porosité et un volume suffisants pour recevoir et contenir un échantillon liquide sur lequel on va réaliser l'essai. L'élément filtre 12 est adjacent au tampon réservoir 10 et est en contact avec lui sur une surface relativement petite, par rapport au volume du tampon 10, de façon à régler le passage de l'échantillon liquide, sortant du tampon réservoir 10, dans l'élément filtre 12.

Dans la zone définie 18 de la membrane 16 à effet de mèche, se trouve une substance immobilisée qui peut fixer tout complexe ligand-récepteur particulier contenu dans l'échantillon traversant l'élément filtre 12.

Dans ce mode de réalisation, un réactif pouvant donner un complexe ligand-récepteur spécifique est ajouté à l'échantillon, dans lequel il réagira pour former le complexe (si l'échantillon contient l'analyte approprié), et l'échantillon est ensuite mis en contact avec le tampon réservoir 10. L'échantillon migre à travers l'élément filtre 12, où sont piégés tous les composants indésirables éventuellement présents dans l'échantillon, et celui-ci poursuit sa migration en pénétrant dans la membrane 16 à effet de mèche. L'analyte marqué, s'il est présent, est fixé dans la zone indicatrice 18, où il produit un signal visuellement détectable.

Dans le mode de réalisation représenté sur la fig. 2, il y a, en plus du tampon réservoir 10, de l'élément filtre 12 et de la membrane 16 à effet de mèche, un second élément filtre 14 qui est disposé sur le support 20. Le tampon réservoir 10 présente une porosité et un volume suffisants pour recevoir et contenir un échantillon liquide sur lequel on va réaliser l'essai. Le premier élément filtre 12 est adjacent au tampon réservoir 10 et est en contact avec lui sur une surface relativement petite, de façon à régler le passage de l'échantillon liquide, sortant du tampon réservoir 10, dans le premier élément filtre 12. Dans ce mode de réalisation, un réactif capable de produire un complexe spécifique ligand-récepteur imprègne uniformément tout le premier élément filtre 12. Quand l'échantillon liquide sort du tampon réservoir 10, il entre en contact avec le réactif qui imprègne le premier élément filtre 12, où il va réagir pour former le ou les complexes spécifiques ligand-récepteur (si l'échantillon contient le ou les analytes appropriés). Grâce à l'utilisation du premier élément filtre comme système de libération de réactif, il n'est plus nécessaire d'effectuer une étape séparée d'addition de réactif.

Le second élément filtre 14, adjacent au premier élément filtre 12 et en position distale par rapport au tampon réservoir 10, a pour fonction de permettre le passage de tout complexe spécifique ligand-récepteur contenu ou formé dans l'échantillon liquide, tout en empêchant le passage des composants plus volumineux contenus dedans, ces composants pouvant être soit présents dans l'échantillon original, soit formés par la suite, par exemple dans le premier élément filtre 12.

La membrane 16 à effet de mèche est adjacente au second élément filtre 14 et en position distale par rapport au premier élément filtre 12. La membrane 16 à effet de mèche présente une porosité et un volume suffisants pour absorber une proportion importante de l'échantillon introduit dans le tampon réservoir 10, après passage à travers le premier élément filtre 12 et le second élément filtre 14.

Dans la zone définie 18 de la membrane 16 à effet de mèche, est disposée une substance immobilisée dont le rôle est de fixer tout complexe spécifique ligand-récepteur formé et contenu dans l'échantillon traversant le premier élément filtre 12 et le second élément filtre 14.

Lors de l'utilisation, un échantillon liquide est appliqué sur le tampon réservoir 10 du dispositif représenté sur la fig. 2. L'échantillon migre à travers le premier élément filtre 12, dans lequel les analytes ci-

bles, s'il y en a dans l'échantillon, se lient au réactif marqué. L'échantillon poursuit sa migration à travers le second élément filtre 14, dans lequel est piégé tout composant indésirable éventuellement présent dans l'échantillon, et pénètre ensuite dans la membrane 16 à effet de mèche. L'analyte marqué, s'il y en a, se fixe alors sur la zone indicatrice 18, en y produisant un signal visuellement détectable.

5 En variante, on peut effectuer des essais immunostatiques en déposant l'échantillon sur le second élément filtre 14 du dispositif représenté sur la fig. 2. On introduit ensuite une solution tampon dans le tampon réservoir 10, et cette solution migre à travers le premier élément filtre 12, en reconstituant les réactifs marqués. La solution et les réactifs migrent à travers le second élément filtre 14, dans lequel l'analyte cible, s'il y en a, se lie aux réactifs marqués, et pénètrent ensuite dans la membrane 16 à effet de mèche. L'analyte marqué, s'il y en a, se fixe alors dans la zone indicatrice 18, ce qui donne un signal visuellement détectable.

10 Si l'on se reporte maintenant à la fig. 3, on y voit un tampon réservoir commun 110, des premiers éléments filtres 112A et 112B, des seconds éléments filtres 114A et 114B, et des membranes 116A et 116B à effet de mèche, qui contiennent des substances immobilisées, disposées dans les zones indicatrices définies 118A et 118B, le tout étant disposé sur le support 120. Le tampon réservoir commun 110 présente une porosité et un volume suffisants pour recevoir et contenir un échantillon liquide sur lequel on va réaliser l'essai. Les premiers éléments filtres 112A et 112B sont adjacents au tampon réservoir commun 110 et sont en contact avec celui-ci sur une surface relativement petite, par rapport au volume du tampon 110, afin de régler le passage de l'échantillon liquide depuis le tampon réservoir 110 vers les premiers éléments filtres 112A et 112B. Un réactif pouvant produire un complexe spécifique ligand-récepteur imprègne uniformément et entièrement les premiers éléments filtres 112A et 112B. Les seconds éléments filtres 114A et 114B sont adjacents aux premiers éléments filtres 112A et 112B respectivement, en position distale par rapport au tampon réservoir commun 110, et ils ont pour fonction de permettre le passage de tous les complexes spécifiques ligand-récepteur formés dans l'échantillon liquide, mais d'empêcher le passage des composants plus gros contenus dans celui-ci. Les membranes 116A et 116B à effet de mèche présentent une porosité et un volume suffisants pour absorber une proportion importante de l'échantillon introduit dans le tampon réservoir commun 110. Des substances immobilisées, situées dans les zones 118A et 118B, ont pour rôle de fixer tout complexe spécifique ligand-récepteur formé.

15 Lors de l'utilisation, on introduit un échantillon liquide dans le tampon réservoir commun 110, l'échantillon migre à travers les premiers éléments filtres 112A et 112B, dans lesquels les analytes cibles, s'il y en a dans l'échantillon, se lient aux réactifs marqués dont les éléments filtres sont imprégnés, puis il migre à travers les seconds éléments filtres 114A et 114B, dans lesquels sont piégés tous les composants indésirables de l'échantillon liquide, et il pénètre ensuite dans les membranes 116A et 116B à effet de mèche. Les analytes cibles marqués, s'il y en a, sont fixés dans les zones indicatrices 118A et 118B. Par conséquent, le mode de réalisation de la fig. 3 permet de réaliser simultanément et indépendamment un essai sur deux analytes ou deux essais parallèles sur le même analyte, en utilisant dans chaque cas un échantillon unique.

20 Si l'on se reporte à la fig. 4, on y voit un dispositif d'essai, tel que celui représenté sur la fig. 2, enfermé dans un étui 222. L'étui 222 comporte une ouverture 224, située directement au-dessus du tampon réservoir 210, et une fenêtre 226, située directement au-dessus de la zone indicatrice 218 et de la zone indicatrice témoin 228. La fenêtre 226 peut être une simple ouverture ou comporter un matériau transparent qui protège les zones 218 et 228, mais permet un examen visuel. L'échantillon liquide est introduit par l'ouverture 224 et absorbé par le tampon réservoir 210. Il migre ensuite à travers le premier élément filtre 212, qui supporte les réactifs marqués appropriés, puis à travers le second élément filtre 214, dans lequel sont piégés tous les composants indésirables de l'échantillon, et pénètre dans la membrane 216 à effet de mèche dans laquelle l'analyte marqué, s'il y en a, se fixe dans la zone indicatrice 218. Le réactif marqué non lié se fixe dans la zone indicatrice témoin 228. Les deux zones indicatrices 218 et 228 peuvent être observées à travers la fenêtre 226.

25 Si l'on se reporte à la fig. 5, on y voit un support 320, fabriqué en un matériau résistant à l'humidité, tel qu'une matière plastique, et divisé en plusieurs régions semblables 311A, 311B, 311C, 311D, 311E et 311F par des séparateurs 322. Chaque région comprend un premier élément filtre 312, un second élément filtre 314, et une membrane 316 à effet de mèche, tous disposés sur le support 320 entre les séparateurs 322. Le même réactif ou des réactifs différents peuvent être déposés dans chacun des premiers éléments filtres 312, ce qui permet de réaliser, sur le même échantillon, soit des essais parallèles sur le même analyte, soit plusieurs essais différents. Chaque membrane 316 à effet de mèche contient une substance immobilisée, appropriée pour le réactif associé avec elle dans le premier élément filtre, et déposée dans la zone indicatrice définie 318. Le tampon réservoir commun 310 sur lequel est déposé l'échantillon occupe une position centrale par rapport auxdites plusieurs régions.

30 Lors de l'utilisation, un échantillon fluide placé sur le tampon réservoir 310 migre simultanément à travers les premiers éléments filtres 312 dans lesquels les analytes cibles, s'il y en a, se lient aux anticorps marqués. L'échantillon traverse ensuite les seconds éléments-filtres 314 et pénètre dans les membranes 316 à effet de mèche, dans lesquelles les analytes cibles marqués, s'il y en a, se lient aux substances correspondantes immobilisées dans les zones indicatrices 318, en donnant chacun un signal visuellement détectable.

Le mode de réalisation représenté sur la fig. 6 peut être utilisé dans des essais immunostatiques. Un dispositif d'essai tel que celui représenté dans la fig. 2 est enfermé dans un étui 522. L'étui 522 comporte une première ouverture 524 située directement au-dessus du tampon réservoir 510, une seconde ouverture 530 située directement au-dessus du second élément filtre, et une fenêtre 526 située directement au-dessus de la zone indicatrice 518 et de la zone indicatrice témoin 528. La fenêtre 526 peut être une simple ouverture, ou elle peut être constituée d'un matériau transparent qui protège les zones 518 et 528, mais permet un examen visuel. Lors de l'utilisation, un échantillon (comme du sérum par exemple) est introduit directement sur le second élément filtre 514 par la seconde ouverture 530. Une solution tampon est alors introduite dans le tampon réservoir 510 par la première ouverture 524, et la solution migre à travers le premier élément filtre 512, en reconstituant les réactifs marqués qui s'y trouvent. La solution et les réactifs migrent à travers le second élément filtre 514, dans lequel l'analyte cible, s'il y en a, se lie aux réactifs marqués, et pénètrent dans la membrane 516 à effet de mèche. L'analyte marqué, s'il y en a, se fixe alors sur la zone indicatrice 518, en donnant un signal visuellement détectable. Le réactif marqué non lié se fixe sur la zone indicatrice témoin 528. Les deux zones indicatrices 518 et 528 peuvent être observées à travers la fenêtre 526.

En ce qui concerne la configuration générale, les éléments filtres et les tampons sont mis bout à bout ou se chevauchent les uns les autres, de façon à définir une interface pour le passage de l'échantillon. Il s'est révélé avantageux que la membrane à effet de mèche présente un rapport surface/épaisseur élevé, alors que l'élément filtre qui lui est adjacent présente un rapport surface/épaisseur relativement faible. Pour garantir l'obtention d'une interface adéquate, il est donc avantageux de placer l'élément filtre adjacent à la membrane à effet de mèche de telle façon qu'ils se chevauchent.

En incorporant au moins un élément filtre avant la zone indicatrice, on obtient une augmentation de la sensibilité par rapport aux essais précédents du type à migration. Le filtre, qui a subi de préférence un traitement destiné à diminuer son caractère hydrophobe inhérent, piège les composants indésirables dans l'échantillon fluide et permet à l'analyte marqué de passer sans encombre. Par conséquent, une proportion plus élevée de l'analyte est fixée dans la zone indicatrice, et l'on obtient des résultats d'essais plus précis.

En outre, si l'on choisit une membrane présentant une texture et une dimension de pores appropriées, on peut faire jouer au second élément filtre le rôle d'un système permettant de maîtriser la lyse cellulaire. Par exemple, lors d'un essai immunostatique réalisé sur un échantillon de sang complet, il est avantageux de choisir, comme second élément filtre, une membrane qui préservera l'intégrité des cellules du sang complet, tandis que le sérum passera au travers. Ceci empêche la propagation, dans la zone indicatrice, des défauts de coloration associés à la lyse des cellules du sang.

Quand le dispositif est utilisé pour réaliser un essai immunostatique, cet élément filtre supplémentaire peut également servir à recevoir directement des échantillons. Généralement, on réalise ces essais sur des échantillons de sang complet ou de sérum, que l'on dépose en taches, directement sur le filtre. On introduit ensuite une solution tampon dans le tampon réservoir. Des solutions tampons typiques englobent, sans y être limitées, une solution tampon phosphate, du sérum physiologique, un tampon Tris-HCl et de l'eau. Des exemples d'anticorps que l'on peut détecter de cette façon englobent, sans y être limités, les anticorps associés au sida, à la rubéole, à l'hépatite et à la Lyme.

On évite également, grâce à l'incorporation du tampon réservoir dans le dispositif, une autre cause de la diminution de la sensibilité de l'essai, à savoir l'introduction d'une trop grande quantité d'échantillon. En effet, le tampon réservoir peut contenir une grande quantité d'échantillon qui est ensuite libérée régulièrement dans le dispositif, grâce à l'efficacité des interfaces entre les zones successives. Cet aspect de l'invention la rend particulièrement adaptée, par exemple, à une utilisation domestique selon laquelle le dispositif peut être placé dans un courant d'urine, sans que l'on ait besoin de mesurer la quantité de l'échantillon introduite dans le dispositif.

Le tampon réservoir, le premier élément filtre, le second élément filtre et la membrane à effet de mèche sont fabriqués en un certain nombre de matières filtrantes. Des matières filtrantes typiques que l'on peut utiliser pour le tampon réservoir englobent, sans y être limitées, des matières fixant les protéines de faible poids moléculaire, comme la cellulose, les polyesters, les polyuréthanes et les fibres de verre, et présentant des dimensions de pores situées dans l'intervalle allant de 0,45 à 60 μm . Des matières typiques que l'on peut utiliser pour le premier élément filtre englobent, sans y être limitées, des matières cellulosiques (par exemple le papier Whatman ET31) ou des fibres de verre, qui présentent des dimensions de pores situées dans l'intervalle allant de 0,45 à 60 μm . Des matières typiques que l'on peut utiliser pour le second élément filtre sont des matières hydrophiles qui englobent, sans y être limitées, les polyuréthanes, les polyacétates, la cellulose, les fibres de verre et le nylon, et qui présentent des dimensions de pores situées dans l'intervalle allant de 0,45 à 60 μm . Des matières typiques que l'on peut utiliser dans la membrane à effet de mèche englobent, sans y être limitées, le nylon, la cellulose, les polysulfones, le poly(difluorure de vinylidène), les acétates de cellulose, les polyuréthanes, les fibres de verre et la nitrocellulose.

Tout l'ensemble de tampons et de membranes est fixé sur un matériau solide, qui constitue le support du dispositif et assure son intégrité. Ce support peut être fabriqué à partir d'une mince feuille de verre ou de matière plastique, que l'on découpe aux dimensions appropriées pour y faire tenir tout le dispositif d'essai, tout en assurant une certaine commodité d'emploi pour l'utilisateur du dispositif d'essai.

Un autre mode de réalisation de la présente invention permet de détecter des analytes multiples dans un échantillon unique de fluide, grâce à la présence de plusieurs types spécifiques de réactifs marqués et du même nombre de types de réactifs immobilisés correspondants. Le dispositif peut être agencé de façon monodirectionnelle, avec de multiples réactifs marqués imprégnant un seul premier élément filtre et de multiples substances immobilisées correspondantes dans plusieurs zones indicatrices définies sur la membrane à effet de mèche. Dans un mode de réalisation bidirectionnel ou multidirectionnel, plusieurs jeux de composants comprenant un premier élément filtre, un second élément filtre et une membrane à effet de mèche sont associés à un tampon réservoir commun.

Dans chaque cas, les réactifs qui sont incorporés dans le premier élément filtre sont séchés ou lyophilisés sur ou dans l'élément, afin de pouvoir être reconstitués à la suite du contact avec un échantillon liquide. D'autres réactifs utiles pour renforcer la spécificité ou pour augmenter le nombre de complexes ligand-récepteur formés et liés, et par conséquent, pour augmenter la sensibilité du dispositif d'essai, peuvent également être contenus dans le tampon filtre ou dans le premier des deux tampons filtres qui contiennent également le réactif. Ces réactifs auxiliaires englobent, sans y être limités, des tampons, des détergents et des anticoagulants.

Une zone indicatrice supplémentaire, destinée à servir de témoin, placée sur la membrane à effet de mèche, adjacente à la première zone et en position distale par rapport au second élément filtre, constitue, pour le dispositif d'essai, un élément interne de surveillance qui indique si l'échantillon liquide a migré tout le long du dispositif. Ces zones indicatrices témoins font généralement appel à des anticorps immobilisés (par exemple des anti-immunoglobulines), dirigés contre les réactifs marqués qui ont été ajoutés à l'analyte ou incorporés dans le premier élément filtre. Si l'on fait référence au mode de réalisation représenté sur la fig. 2, par exemple, un échantillon liquide migre à travers le premier élément filtre dans lequel il reconstitue le réactif marqué et le transporte vers la membrane à effet de mèche. Le réactif marqué qui n'est pas lié à l'analyte cible se fixe sur la zone indicatrice témoin, en donnant une indication visuellement détectable de la réalisation correcte de l'essai.

Le dispositif d'essai entier, qu'il soit de structure monodirectionnelle, bidirectionnelle ou multidirectionnelle, peut être enfermé dans un étui de matière plastique imperméable aux liquides. Cet étui comporte normalement une ouverture située au-dessus du filtre réservoir, destinée à recevoir l'échantillon. L'étui entier peut être transparent, ou bien une partie de cet étui, située au-dessus de la zone de détection de l'analyte, peut être transparente de façon que l'on puisse observer les résultats de l'essai. Les dispositifs enrobés dans des matières plastiques sont particulièrement utiles et commodes à employer dans des trousseaux domestiques de diagnostic, mais on peut également utiliser d'autres matériaux, comme du papier traité.

En outre, la surface supérieure entourant l'ouverture peut être courbe et s'étendre vers le bas, de façon à former un réceptacle en forme de coupe dont l'extrémité se situe au niveau du tampon réservoir, une partie de celui-ci étant encastrée dans ce réceptacle. De cette façon, la quantité d'échantillon introduite dans le dispositif est convenablement ajustée, et l'échantillon ne peut pas contourner un composant quelconque du dispositif.

On peut utiliser la présente invention aussi bien pour des essais par compétition que pour des essais «sandwich». Dans les essais par compétition, une quantité supplémentaire d'un antigène marqué (qui est le même que l'antigène cible) est introduite soit séparément, soit comme constituant du premier élément filtre. Cet antigène marqué entre en compétition avec l'antigène provenant de l'échantillon, pour se fixer sur la zone de détection.

Les dispositifs et procédés de diagnostic décrits dans la présente invention peuvent être utilisés pour n'importe quelle réaction ligand-récepteur, et ils conviennent particulièrement pour les réactions mettant en jeu des composants immunochimiques comme des anticorps, des antigènes et des haptènes. Dans les essais dans lesquels on souhaite détecter des molécules contenant des ligands, comme des antigènes ou des haptènes, le réactif marqué et la substance immobilisée dans la zone indicatrice sont tous deux des molécules se liant aux ligands. Plus précisément, quand les ligands sont des antigènes, aussi bien les réactifs marqués que les réactifs immobilisés sont des anticorps.

Les anticorps peuvent être monoclonaux ou polyclonaux, et l'on connaît bien dans la technique les procédés à utiliser pour les produire. Il est préférable d'utiliser des anticorps monoclonaux marqués dans le premier élément filtre et des anticorps polyclonaux dans la zone indicatrice, afin de réaliser la liaison avec une efficacité maximale. Toutefois, on peut utiliser toute combinaison d'anticorps polyclonaux et monoclonaux. Dans le cas de trousseaux pour des tests domestiques de grossesse ou de prédiction d'ovulation, on incorpore dans le dispositif des anticorps dirigés respectivement contre la gonadotrophine chorionique humaine ou contre les hormones lutéinisantes.

Dans les cas où l'on souhaite détecter une molécule se liant à un ligand, comme un anticorps, on utilise un anticorps marqué anti-immunoglobuline G humaine de souris, en guise de réactif qui, comme indiqué, peut être incorporé dans le premier élément filtre, et un antigène spécifique pour l'anticorps cible est immobilisé dans la zone indicatrice. On peut utiliser n'importe quel antigène naturel ou synthétique, ainsi que des chaînes polypeptidiques qui ont une activité antigénique. Des exemples d'antigènes que l'on peut immobiliser dans le dispositif englobent, sans y être limités, ceux de la rubéole, de la Lyme, du sida, de l'hépatite, de la toxoplasmose, ainsi que le cytomégalovirus et le virus d'Epstein-Barr.

Dans les essais où l'on souhaite détecter simultanément plusieurs anticorps dans un échantillon uni-

que, puisque le même anticorps marqué anti-immunoglobuline humaine (réactif) reconnaît tous les anticorps humains présents dans l'échantillon et se lie à chacun d'eux, il est seulement nécessaire d'incorporer des antigènes pour chaque anticorps cible dans des zones indicatrices distinctes sur la membrane à effet de mèche.

5 Les marqueurs utilisés dans le dispositif peuvent être directs ou indirects. On préfère les marqueurs directs, parce qu'ils n'exigent pas d'étapes supplémentaires pour la visualisation des résultats de l'essai. Des exemples de marqueurs directs englobent, sans y être limités, des sols de métaux, des sols de colorants, des latex à particules, des indicateurs colorés, des substances colorées contenues dans des liposomes, et des sols de non-métaux, comme un sol de carbone.

10 Selon un autre aspect, l'invention concerne un marqueur immuno-chimique qui est particulièrement bien adapté pour être utilisé dans le dispositif précédent, mais qui peut aussi bien être utilisé dans d'autres essais immunologiques, et en particulier, un marqueur immuno-chimique dans lequel un ligand immunologique ou des molécules se liant à un ligand sont fixés, directement ou indirectement, à la surface d'un noir de carbone divisé en fines particules.

15 Le marqueur immunologique peut être schématiquement représenté par C-L ou C-X:L, où C représente le noir de carbone divisé en fines particules, «-» représente une fixation par adsorption, L représente un composant contenant un ligand ou un motif se liant au ligand, X représente un agent de fixation, et «:» représente une liaison covalente.

20 L peut ne consister qu'en le ligand ou le motif se liant au ligand, auquel cas il est adsorbé directement sur le carbone. En variante, le ligand ou le motif se liant au ligand peut être lié à un élément pontant, soit par liaison covalente, soit par liaison immunologique (désignée ci-après par «*»). Par exemple, le ligand ou le motif se liant au ligand peut être lié de façon covalente à un agent de fixation comme le glutaraldéhyde, qui est à son tour lié de façon covalente à un élément pontant de nature protéinique, comme l'albumine de sérum de bovin (ASB), qui est à son tour adsorbé sur le carbone. De la même façon, l'avidine ou la streptavidine peut être liée, par l'intermédiaire de la biotine, au ligand ou à la molécule se liant au ligand, et l'avidine ou la streptavidine peut être adsorbée sur les particules de carbone. En variante, un anticorps primaire, servant de ligand ou de motif se liant au ligand, est immunologiquement lié à un anticorps secondaire, et l'anticorps secondaire est adsorbé sur les particules de carbone. Les structures caractéristiques de l'ensemble C-L englobent donc:

30 C-(ligand),
C-(molécule se liant au ligand),
C-(protéine:X:ligand),
C-(protéine:X:molécule se liant au ligand),
35 C-(2°Ab*1°Ab), et
C-(protéine:X:2°Ab*1°Ab).

40 Selon un second mode de réalisation, un agent de fixation Y est à la fois adsorbé sur la particule de carbone et lié de façon covalente au ligand ou au motif se liant au ligand, pour former un marqueur de formule générale C-Y:L. L'agent de fixation Y peut être une espèce moléculaire unique, Y', comme on le décrit ci-dessous de manière plus détaillée, ou bien ce peut être un composite, par exemple de structure (agent de fixation):protéine:(agent de fixation):

45 C-Y':(ligand),
C-Y':(molécule se liant au ligand),
C-Y':protéine:X:(ligand), et
C-Y':protéine:X:(molécule se liant au ligand).

50 On remarquera que la différence principale entre les deux modes de réalisation est la suivante: dans le premier mode de réalisation, un ligand, une molécule se liant au ligand, ou une protéine (comme un anticorps, de l'albumine de sérum de bovin ou de l'avidine) est adsorbé sur les particules de carbone, alors que dans le second mode de réalisation, un membre d'une classe particulière de composés organiques, servant d'agent de fixation, est adsorbé sur les particules de carbone et lié de façon covalente à un ligand, une molécule se liant au ligand ou une protéine.

55 Les sols de carbone mentionnés ci-dessus peuvent être préparés selon un certain nombre de procédés. On peut simplement ajouter le ligand ou les molécules se liant au ligand à une suspension de particules de carbone, pour produire des structures C-(ligand) et C-(molécule se liant au ligand). Dans les cas où le ligand ou la molécule se liant au ligand est lié indirectement, on peut préparer la structure de particule complète non-carbonée, comme (protéine:X:ligand), (protéine:X:molécule se liant au ligand), (2°Ab*1°Ab), ou (protéine:X:2°Ab*1°Ab), et l'ajouter ensuite à une suspension de particules de carbone, pour réaliser l'adsorption. En variante, la partie terminale de la structure de particule non-carbonée peut d'abord être adsorbée sur les particules de carbone, et le reste de la structure de particule non-carbonée peut alors être introduit par voie chimique. Par exemple, une protéine comme l'albumine de sérum de bovin, l'avidine ou la streptavidine peut être adsorbée sur les particules de carbone et ensuite reliée, par exemple à l'aide de glutaraldéhyde pour l'albumine de sérum de bovin ou de biotine pour l'avi-

dine ou la streptoavidine, au ligand ou à la molécule se liant au ligand. De façon similaire, un anticorps N° 2 peut être adsorbé sur les particules de carbone, et un anticorps N° 1 peut ensuite y être fixé de façon immunologique.

Les réactifs de fixation Y' convenables pour un ligand se fixant de façon covalente et les molécules se liant au ligand comme des haptènes, des antigènes ou des anticorps, ou pour des groupes pontants de protéines se fixant de façon covalente, englobent imides, azides, isothiocyanates, imidoesters et dialdéhydes, comme par exemple le maléimide, le succinimide, le phénylazide, le glutaraldéhyde, un N-hydroxysuccinimidoester, le phénylisothiocyanate, l'acide 4,4'-diisothiocyanatostilbène-2,2'-disulfonique, le 4-N,N-diméthylamino-azobenzène-4'-isothiocyanate, l'isothiocyanate de fluorescéine, l'isothiocyanate de rhodamine, etc.

Comme dans le cas du premier mode de réalisation, la structure complète de particule non-carbonée, préparée par réaction du ligand (ou de la molécule se liant au ligand), d'une protéine pontante quelconque et d'un agent de fixation, peut être adsorbée sur la surface des fines particules de noir de carbone. En variante, le réactif de fixation peut d'abord être adsorbé seul sur les fines particules de noir de carbone, puis lié de façon covalente au ligand, à la molécule se liant au ligand et/ou à la protéine pontante.

Dans n'importe lequel des modes opératoires ci-dessus, il est généralement souhaitable d'ajouter un adjuvant de mise en suspension à la suspension aqueuse de fines particules de noir de carbone, comme par exemple un polyalkylèneglycol ou un polysaccharide. Comme on le verra ci-dessous, des substances similaires sont ensuite ajoutées comme agent protecteur, après fixation du ligand immunologique ou des molécules se liant au ligand aux fines particules de noir de carbone. Par conséquent, la quantité ajoutée lors de cette étape est relativement faible, et c'est généralement celle qui suffit seulement pour aider à la mise en suspension des particules de carbone.

On fait ensuite subir au réactif de fixation, simultanément ou l'une après l'autre, (i) une réaction de liaison covalente avec le ligand immunologique ou les molécules se liant au ligand, et (ii) une adsorption sur les fines particules de noir de carbone. Bien que cela dépende du réactif de fixation particulier utilisé, la réaction de fixation est généralement effectuée en plusieurs heures, à des valeurs de pH d'environ 7,0 à environ 9,5.

On peut utiliser divers noirs de carbone en fines particules, disponibles dans le commerce, comme Monarch 1000, 120 ou 880, Vulcan XC72 ou XC72R, ou encore Regal 250R ou 500R. On peut facilement déterminer le caractère convenable de n'importe quelle source particulière, en homogénéisant le matériau dans un tampon et en mesurant la densité optique.

De préférence, les fines particules de noir de carbone, liées de façon covalente ou passive au ligand ou à la molécule se liant au ligand, subissent un traitement avec un agent protecteur du type polyalkylèneglycol ou polysaccharide, qui a pour but de minimiser leur caractère hydrophobe et de maximiser leur aptitude à la dispersion. Des matériaux convenant pour cet enrobage sont des polyéthylèneglycols présentant une masse moléculaire d'environ 100 à environ 20 000, de préférence d'environ 5000 à environ 12 000, et des polysaccharides protecteurs comme un dextrane présentant une masse moléculaire d'environ 10 000 à environ 500 000, de préférence d'environ 10 000 à environ 50 000. On peut facilement réaliser cet enrobage en mettant le noir de carbone lié en contact avec une solution aqueuse à 0,5-5% p/v de polyéthylèneglycol ou de dextrane.

Dans un autre mode de réalisation, le marqueur immunochimique subit un traitement avec au moins un tensioactif ionique ou non, biologiquement acceptable, comme un sel de triméthyl-(alkyl à longue chaîne)-ammonium, du désoxychoiate de sodium, les produits Triton, Tween, etc, dans l'intervalle de concentration allant d'environ 0,01 à environ 0,5%. Après chacun de ces traitements, qui peuvent être effectués à plusieurs reprises, avec des détergents de types identiques ou différents, on lave le marqueur immunochimique pour éliminer l'excès de détergent.

Le marqueur immunochimique résultant peut ensuite être mis en suspension dans un milieu aqueux. Ces suspensions aqueuses de marqueur immunochimique sont particulièrement utiles dans la fabrication de dispositifs d'essais immunologiques, aussi bien ceux de la présente invention que ceux présentant d'autres structures. De préférence, la suspension aqueuse comprend au moins un tampon qui a pour fonction de fournir un pH auquel le ligand immunologique marqué ou la molécule se liant au ligand est stable; par exemple, un pH situé dans l'intervalle allant d'environ 6 à environ 9, et de préférence d'environ 6,5 à environ 8,5.

Les exemples suivants servent à illustrer plus avant la nature de cette invention, mais ne doivent pas être compris comme en limitant le cadre.

Essai de Sensibilité

Dans les exemples suivants, on détermine les sensibilités en préparant des solutions standard de gonadotrophine chorionique humaine, à des concentrations de 25 mUI/ml, 50 mUI/ml, 75 mUI/ml et 100 mUI/ml. On introduit des échantillons de 0,15 à 0,20 ml des solutions standard dans le dispositif d'essai, et on évalue la sensibilité de celui-ci par sa capacité à détecter une concentration donnée de gonadotrophine chorionique humaine.

Exemple 1A. Préparation du Marqueur

Des particules de sol d'or sont dissoutes dans 750 ml d'eau distillée que l'on porte ensuite à l'ébullition. On ajoute de l'acide hydroaurique (70 à 75 mg), et on poursuit l'ébullition pendant 5 minutes. Du citrate de sodium (80 mg), dissous dans 10 ml d'eau distillée, est versé dans la solution d'or, et on fait bouillir la solution pendant 5 autres minutes. Après avoir laissé la solution refroidir à la température ambiante, on en ajuste le pH à une valeur proche du point isoélectrique (déterminé par électrophorèse sur gel) pour l'anticorps monoclonal dirigé contre la gonadotrophine chorionique humaine. On ajoute 20 mg de cet anticorps monoclonal à la solution, que l'on agite pendant 2 heures à la température ambiante. On ajoute 705 mg d'albumine de sérum de bovin, et on agite la solution continuellement pendant environ 12 heures à la température ambiante. On récupère le conjugué d'or colloïdal et d'anticorps monoclonal par centrifugation à 10 000 t/min dans une centrifugeuse GSA pendant 20 minutes, on jette le surnageant et on met le culot résultant en suspension dans 30 ml d'une solution tampon de phosphate (pH 7,4) contenant 1% d'albumine de sérum de bovin. On soumet ensuite cette suspension à une centrifugation à 16 000 t/min pendant 15 minutes dans une centrifugeuse Sorvall SS-34. On jette à nouveau le surnageant et on met le culot en suspension dans 15 ml de solution à 1% d'albumine de sérum de bovin. Après un bref traitement aux ultrasons, on filtre la suspension à travers un filtre de 0,2 µm.

B. Préparation du Dispositif

On découpe un échantillon de membrane de nylon préactivée (Pall Immunodyne), présentant une dimension de pores de 5 µm, aux dimensions de 180 mm × 25 mm, et on le fixe au bas d'une plaque mince de matière plastique (100 mm × 180 mm), en guise de membrane à effet de mèche. On définit sur la membrane une zone indicatrice, où est immobilisé un anticorps, en pulvérisant, sur une ligne située à environ 1,5 cm du bas, à l'aide d'un appareil Camag Linomat IV, 36 µl d'une solution tampon de phosphate de sodium 0,1 M (pH 7,6) contenant 3 mg/ml d'anticorps de mouton anti-gonadotrophine chorionique humaine (hCG) et 5% de saccharose. Après pulvérisation, on sèche la membrane à 37°C pendant 30 minutes, puis on la traite avec une solution tampon de phosphate de sodium 0,1 M contenant 2% de lait en poudre dégraissé (Carnation) et 2% de saccharose. La membrane est ensuite lavée avec du tampon de phosphate de sodium 0,1 M contenant 2% de saccharose, et on la laisse reposer à température ambiante pendant environ 12 heures pour la faire sécher. Le support et la membrane à effet de mèche peuvent être conservés dans un dessiccateur jusqu'au traitement suivant.

On fait subir à deux membranes de cellulose (Whatman ET31) un traitement préalable par une solution tampon de phosphate de sodium 0,1 M (pH 7,4) contenant 0,1% d'albumine de sérum de bovin, 0,5% de lait en poudre dégraissé, 2% de saccharose et 0,05% d'azoture de sodium, et on les fait ensuite incuber pendant 30 minutes à la température ambiante.

On prépare le second élément filtre et le tampon réservoir en faisant sécher les deux membranes de cellulose ayant subi le traitement préalable, dans un dessiccateur sous vide, pendant 1 heure à la température ambiante.

On prépare le premier élément filtre en faisant incuber un morceau rectangulaire de membrane de cellulose (Schleicher & Schuell), mesurant 5 mm × 180 mm, à la température ambiante pendant 30 minutes dans une solution de conjugué d'or colloïdal et d'anticorps monoclonal anti-gonadotrophine chorionique humaine dans du tampon de phosphate de sodium 0,1 M (pH 7,6) contenant 5% de saccharose. La membrane est ensuite placée sur une plaque de verre et séchée par voie thermique, à 36°C, sous vide constant, dans un appareil de lyophilisation, puis conservée au sec dans un dessiccateur jusqu'à ce que l'on s'en serve.

Le premier élément filtre est fixé en position adjacente au second élément filtre, et le second élément filtre est fixé au support en matière plastique, en position adjacente à la membrane à effet de mèche. Enfin, le tampon réservoir est fixé en position adjacente au premier élément filtre. La plaque de matière plastique est ensuite découpée en plusieurs bandes de 100 mm de long sur 7,5 mm de large, de sorte que chacune contient, alignés, un tampon réservoir, un premier élément filtre, un second élément filtre et une membrane à effet de mèche.

Exemple 2

On suit le même protocole que dans l'Exemple 1B, sauf que le matériau utilisé pour la membrane à effet de mèche est une membrane de cellulose (Schleicher & Schuell) présentant une dimension de pores de 12 µm. Après une pulvérisation d'un anticorps selon une ligne, on place la membrane dans un dessiccateur pendant 24 heures pour assurer au maximum la fixation de l'anticorps sur la membrane. On fait ensuite incuber la membrane dans un tampon de blocage, c'est-à-dire un tampon de borate 0,1 M contenant 1% d'albumine de sérum de bovin, 0,5% de lait en poudre dégraissé, 5% de tréhalose, 0,05% de Tween 20, et 0,05% d'azoture de sodium (pH 8,5–9,0). La membrane bloquée est séchée à

nouveau dans un dessiccateur sous vide, pendant 1 heure, puis conservée dans un dessiccateur ordinaire jusqu'à ce qu'on l'incorpore dans le dispositif d'essai.

Exemple 3

5

On prépare une bande conformément au protocole de l'Exemple 1B.

Quand on place le tampon réservoir dans un jet d'urine, un signal détectable commence à apparaître dans la zone indicatrice au bout d'environ 3 minutes. La sensibilité de l'essai vaut environ 50 mUI/ml.

Exemple 4

On prépare une bande conformément au protocole de l'Exemple 1B, mais en omettant le premier élément filtre et le tampon réservoir. On introduit la bande dans un tube contenant 100 µl d'urine de femme et 10 µl de conjugué d'or colloïdal et d'anticorps monoclonal antigonadotrophine chorionique humaine, préparé conformément à l'Exemple 1. Quand le liquide migre le long de la bande, un signal détectable apparaît dans la zone indicatrice en 2 minutes environ, et ce signal devient plus intense au moment où le liquide atteint le bout de la bande (environ 4 minutes). La sensibilité de ce protocole d'essai pour la gonadotrophine chorionique humaine présente vaut 25 mUI/ml.

Exemple 5

On prépare une bande d'essai, essentiellement selon le protocole de l'Exemple 1B, mais en traitant le premier élément filtre avec un anticorps anti-gonadotrophine chorionique humaine, marqué de la façon suivante. On lave à trois reprises avec de l'eau distillée, par microcentrifugation, 0,1 ml d'une suspension à 10% de particules colorées de latex de polystyrène, disponibles dans le commerce et dont la taille vaut de 0,1 à 0,3 µm. Le culot final est mis en suspension dans 2 ml de solution tampon de chlorhydrate de glycine 0,1 M contenant 1 mg d'albumine de sérum de bovin. Après environ 12 heures d'incubation à la température ambiante dans un culbuteur, on lave la suspension de latex à trois reprises avec une solution tampon de phosphate de sodium 0,1% (pH 6,8) pour éliminer l'excès d'albumine de sérum de bovin. On complète la suspension résultante à 2 ml avec la même solution tampon de phosphate, et on ajoute une solution à 25% de glutaraldéhyde, jusqu'à une concentration finale de 1% de celui-ci. On fait incuber l'échantillon pendant 3 heures à la température ambiante, puis on le lave trois fois de plus avec la même solution tampon. On ajoute 100 µg d'anticorps antigonadotrophine chorionique humaine à 2 ml de la suspension de latex, et on fait incuber le tout pendant 3 heures supplémentaires à la température ambiante. On ajoute alors de la glycine jusqu'à une concentration finale de 2%. Après 1 heure supplémentaire d'incubation, on lave la suspension de latex à trois reprises avec la même solution tampon, et on la met en suspension dans la même solution tampon contenant 2% d'albumine de sérum de bovin. La suspension est soumise à un bref traitement aux ultrasons, puis conservée à 4°C jusqu'à ce qu'on l'utilise.

40

Exemple 6

On prépare une bande selon le protocole de l'Exemple 1B, en omettant le premier élément filtre et le tampon réservoir. La bande d'essai est ensuite introduite dans un tube à essais contenant 5 µl d'anticorps anti-gonadotrophine chorionique humaine, marqué conformément au protocole de l'Exemple 5, dans 100 µl d'urine de femme. Quand le liquide migre le long de la bande, un signal détectable apparaît dans la zone indicatrice en 2 minutes environ, et ce signal devient plus intense au moment où le liquide atteint l'extrémité de la bande (environ 4 minutes). La sensibilité de cet essai pour la gonadotrophine chorionique humaine vaut 25 mUI/ml.

50

Exemple 7

On homogénéise 10 mg de particules de carbone Vulcan XC72 dans 2 ml de solution tampon de Trischlorhydrate 20 mM (pH 6,8) contenant 40 mM de chlorure de sodium et 2% de dextrane 9400. Après 2 heures d'incubation à la température ambiante, on ajoute à cette solution une solution de 5 mg d'isothiocyanate de fluorescéine dans 1 ml de solution tampon de Trischlorhydrate. On soumet le mélange à un bref traitement aux ultrasons, et on le fait incuber pendant environ 12 heures à la température ambiante. Après incubation, on ajoute 20 ml d'une solution tampon de phosphate de sodium 0,1 M (pH 7,6) et du chlorure de sodium 0,1 M à la solution de carbone, et on soumet ensuite le tout à une centrifugation à 15 000 t/min à 4°C. On répète trois fois cette étape, et le culot résultant est mis en suspension dans 20 ml de tampon de phosphate. Après un bref traitement aux ultrasons, on ajoute à la suspension 3 mg d'un anticorps monoclonal contre la gonadotrophine chorionique humaine, et on fait incuber le mélange pendant 6 heures à la température ambiante. On soumet ensuite à trois reprises le mélange à une centrifugation à 15 000 t/min, pour éliminer l'anticorps qui n'a pas réagi. Le culot final est mis en suspension dans 20 ml de solution tampon de Hepes 0,1 M (pH 7,5) contenant 1% d'albu-

65

mine de sérum de bovin, 5% de saccharose, 0,1 M de chlorure de sodium et 0,05% d'azoture de sodium. On ajoute du bromure de cétyltriméthylammonium jusqu'à obtenir une concentration finale de 0,025%. On fait ensuite incuber le tout pendant 30 minutes, puis on effectue une centrifugation à 15 000 t/min. Le culot résultant est mis en suspension dans 20 ml de solution tampon de Hepes 0,1 M (pH 7,5) contenant 1% d'albumine de sérum de bovin, 5% de saccharose, 0,1 M de chlorure de sodium et 0,05% d'azoture de sodium, puis on effectue un bref traitement aux ultrasons et on ajoute à la suspension du désoxalate de sodium jusqu'à une concentration finale de 0,1%, après quoi on fait incuber le tout pendant 30 minutes à la température ambiante et on effectue une nouvelle centrifugation. Le culot est à nouveau mis en suspension dans 20 ml de solution tampon de Hepes 0,1 M (pH 7,5) contenant 1% d'albumine de sérum de bovin, 5% de saccharose, 0,1 M de chlorure de sodium et 0,05% d'azoture de sodium, et on soumet la suspension à un bref traitement aux ultrasons.

Ce sol de carbone est incorporé, à la place de l'or colloïdal, dans le premier élément filtre de bandes d'essais préparées selon l'Exemple 1B, le tampon réservoir étant omis. Les bandes d'essais sont séchées dans un appareil de séchage sous vide pendant environ une heure, puis conservées dans un dessiccateur à la température ambiante jusqu'à ce qu'on les utilise.

Pour effectuer des essais sur l'hormone lutéinisante ou la gonadotrophine chorionique humaine, on disperse 100 µl d'un échantillon d'urine dans un tube de culture, et on introduit ensuite la bande dans le tube. A la suite du contact avec l'échantillon d'urine, les conjugués d'anticorps et de particules de carbone se dissolvent immédiatement et migrent en direction de la membrane à effet de mèche. Un essai positif est indiqué par une coloration intense des particules de noir de carbone concentrées dans la zone indicatrice. La limite de détection vaut environ 25 mUI/ml pour les deux essais sur la gonadotrophine chorionique humaine et l'hormone lutéinisante.

Exemple 8

On prépare une bande selon le protocole de l'Exemple 1B, en omettant le premier élément filtre et le tampon réservoir. La bande d'essai est ensuite introduite dans un tube à essais contenant l'anticorps marqué au sol de carbone (5 µl) et un échantillon d'urine contenant de la gonadotrophine chorionique humaine (100 µl), qui sont soigneusement mélangés. Un signal détectable commence à apparaître au bout d'une minute environ. La sensibilité de cet essai vaut environ 25 mUI/ml.

Exemple 9

On lyophilise des réactifs de sol de carbone enrobés d'anticorps monoclonaux contre la gonadotrophine chorionique humaine ou l'hormone lutéinisante (5 µl par tube). Les tubes peuvent être conservés dans un dessiccateur à la température ambiante jusqu'à ce qu'on les utilise.

Pour réaliser des essais sur l'hormone lutéinisante ou la gonadotrophine chorionique humaine, on disperse 100 µl d'un échantillon d'urine dans un tube de culture contenant le sol de carbone lyophilisé ou séché. Le réactif au carbone se dissout immédiatement à la suite du contact avec l'échantillon d'urine. Une bande d'essai préparée comme dans l'Exemple 1B, mais ne comportant pas le premier élément filtre et le tampon réservoir et sur laquelle on a tracé, par pulvérisation, une ligne d'anticorps ovin anti-gonadotrophine chorionique humaine entière (3 µg par bande), en guise de zone indicatrice, est ensuite insérée dans le tube. Quand le mélange d'échantillons en migration atteint la zone indicatrice, une bande noire commence à apparaître si l'échantillon d'urine contient de la gonadotrophine chorionique humaine ou de l'hormone lutéinisante. La sensibilité de l'essai dans lequel on utilise le réactif au carbone séché ou lyophilisé vaut environ 25 mUI/ml dans les deux cas. Le réactif au carbone séché ou lyophilisé reste actif et présente la même sensibilité, même conservé pendant plus d'un an à la température ambiante.

Exemple 10

On prépare un dispositif d'essai selon l'Exemple 1B, en omettant le premier élément filtre et le tampon réservoir et en pulvérisant en ligne 1 mg/ml d'anticorps anti-thyroxine sur la membrane à effet de mèche.

Après introduction dans un mélange de 5 µl de sol de carbone lié à de la thyroxine (voir Exemple 21) et 100 µl de sérum (essai par compétition), la bande témoin commence à apparaître en 2 minutes environ. Pour des concentrations de thyroxine (non marquée) supérieures à environ 60 ng/ml dans l'échantillon de sérum, on ne perçoit aucune formation de bande (une bande à peine visible apparaît pour 59 ng/ml). Au contraire, pour produire une bande aussi intense que la bande témoin en l'absence de thyroxine dans l'échantillon de sérum, il faut moins de 10 ng/ml.

Exemple 11

On prépare un dispositif d'essai selon l'Exemple 1B, en omettant le premier élément filtre et le tampon réservoir et en pulvérisant en ligne 2 mg/ml de l'antigène de Lyme disponible dans le commerce (OEM Concepts) sur la membrane à effet de mèche.

Quand l'extrémité formant réservoir du dispositif est plongée dans un mélange de 100 µl de sérum humain et de 5 µl de particules de carbone marquées avec un conjugué d'isothiocyanate de fluorescéine et d'anticorps caprin anti-immunoglobuline G humaine (voir Exemple 21), un signal détectable apparaît en 4 minutes environ si l'échantillon est séropositif.

5

Exemple 12

On prépare un dispositif d'essai conforme à l'Exemple 11. 10 µl de sérum humain sont déposés en un point sur le second élément filtre. Le dispositif est inséré dans un tube contenant 100 µl d'une suspension de particules de carbone (5 µl) marquées avec un conjugué d'isothiocyanate de fluorescéine et d'anticorps caprin anti-immunoglobuline G humaine (voir Exemple 21) dans une solution d'éthylènediaminetétraacétate 20 mM. Un signal détectable apparaît en 5 minutes si l'échantillon est séropositif.

10

Exemple 13

15

On prépare un dispositif d'essai selon l'Exemple 11, sauf que l'on pulvérise en ligne, sur la membrane à effet de mèche, 2 mg/ml d'antigène de rubéole (Viral Antigens, Inc.).

20

Quand on met le tampon réservoir en contact avec 100 µl de sérum humain et 5 µl de particules de carbone marquées avec un conjugué d'isothiocyanate de fluorescéine et d'anticorps caprin anti-immunoglobuline G humaine (voir Exemple 21), un signal détectable apparaît en 2 minutes environ si l'échantillon est séropositif.

Exemple 14

25

On prépare un dispositif d'essai selon l'Exemple 13. On dépose 10 µl de sérum en un point sur le second élément filtre, et l'on introduit le dispositif dans un tube contenant 100 µl d'une suspension de particules de carbone marquées avec un conjugué d'isothiocyanate de fluorescéine et d'anticorps caprin anti-immunoglobuline G humaine (voir Exemple 21) dans une solution tampon d'éthylènediaminetétraacétate 20 mM.

30

Un signal détectable apparaît en 3 minutes environ si l'échantillon est séropositif.

Exemple 15

35

On prépare un dispositif d'essai selon l'Exemple 11, et on pulvérise une ligne supplémentaire d'antigène de rubéole, parallèle à la ligne d'antigène de Lyme et située à 7 mm environ de cette dernière.

40

On dépose en un point du second élément filtre 10 µl d'un échantillon séropositif pour la rubéole. On introduit le dispositif dans un tube contenant 100 µl d'une suspension de particules de carbone (10 µl) marquées avec un conjugué d'isothiocyanate de fluorescéine et d'anticorps caprin anti-immunoglobuline G humaine (voir Exemple 21) dans une solution d'éthylènediaminetétraacétate 20 mM.

40

Un signal détectable apparaît en 5 minutes environ le long de la ligne d'antigène de rubéole.

Exemple 16

45

On suit le protocole de l'Exemple 15, sauf que l'on dépose en un point de la membrane 20 µl d'un échantillon séropositif pour la rubéole et la Lyme. Deux signaux détectables commencent à apparaître en 5 minutes environ.

Exemple 17

50

On détermine facilement selon les techniques suivantes le caractère approprié de différents matériaux carbonés pour la préparation des sols de carbone, ainsi que celui des tampons pour ceux-ci.

55

A. Des mélanges de 5 mg de différents noirs de carbone (Monarch 1000, Monarch 880, Monarch 120, Regal 250R, Regal 500R, Vulcan XC72R et Vulcan XC72, tous fournis par Cabot) et de 100 µl de polyéthylèneglycol à 2% (6000-8000) sont moulus pendant 5 minutes et dilués jusqu'à 10 ml avec du tampon de solution saline phosphatée, contenant 2 mg d'un anticorps monoclonal contre la gonadotrophine chorionique humaine. Après un bref traitement aux ultrasons destiné à disperser les particules de carbone dans la solution d'anticorps monoclonal, on fait incuber les mélanges pendant 6 heures à la température ambiante et sous agitation. A la fin de l'incubation, on lave les échantillons à trois reprises par centrifugation, pour éliminer tout excès d'anticorps. Chaque centrifugation est effectuée à 15 000 t/min pendant 20 minutes, à l'aide de 10 ml de solution tampon de phosphate. Le culot final est mis en suspension dans 10 ml de solution tampon à 3% de phosphate, et soumis à un bref traitement aux ultrasons destiné à assurer une dispersion complète des particules de carbone.

60

Pour un essai concernant la gonadotrophine chorionique humaine, on disperse, dans un tube de culture (10 x 75 mm), 20 µl de sol de carbone et 200 µl d'un échantillon d'urine, et on mélange bien le tout. On laisse ensuite le mélange migrer dans une bande de papier Whatman 31ET, mesurant 5 mm

65

de largeur sur 100 mm de longueur, sur laquelle on a pulvérisé en ligne un anticorps ovin anti-gonadotrophine chorionique humaine, et que l'on a bloquée avec 1% d'albumine de sérum de bovin dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4).

Il apparaît que Vulcan XC72 donne le meilleur rapport signal/bruit, pour 200 mUI/ml de gonadotrophine chorionique humaine. On obtient des résultats semblables avec Vulcan XC72R, mais le signal positif est un peu plus faible.

B. On met 5 mg des mêmes noirs de carbone en suspension dans 2 ml de solution tampon de Tris-HCl 20 mM (pH 6,8) contenant 40 mM de chlorure de sodium et 2% (p/v) de dextrane 9400, par homogénéisation. Après 2 heures d'incubation à la température ambiante, on ajoute 1 ml d'une solution à 3% d'albumine de sérum de bovin à la suspension homogénéisée de carbone. On soumet le mélange à un bref traitement aux ultrasons, et on le fait encore incuber pendant environ 12 heures à la température ambiante. A la fin de l'incubation, on place 5 µl du mélange dans une cuvette contenant 1 ml d'eau distillée. On mesure l'absorbance à 700 nm pour chaque échantillon. Les résultats sont les suivants:

	Noir de carbone	DO à 700 nm
	Monarch 1000	0,2333
	Monarch 880	0,3129
	Vulcan XC72R	0,6878
	Vulcan XC72	0,7428
	Monarch 120	0,6225
	Regal 250R	0,3567
	Regal 500R	0,4372

C. Du noir de carbone Vulcan XC72 est mis en suspension dans plusieurs solutions tampons présentant différents pH. On homogénéise 5 mg de particules de carbone Vulcan XC72 dans 2 ml des différentes solutions tampons, contenant 2% de dextrane 9400, et on fait incuber le tout pendant 2 heures à la température ambiante. Après l'incubation, on ajoute 5 µl de chaque produit homogénéisé à 1 ml d'eau distillée. On ajoute au mélange 1 ml de solution à 3% d'albumine de sérum de bovin dans la même solution tampon, puis on soumet le tout à un traitement aux ultrasons et on le fait incuber pendant environ 12 heures à la température ambiante. A la fin de l'incubation, on met 5 µl du mélange en suspension dans 1 ml d'eau distillée et on mesure l'absorbance à 700 nm. Les résultats sont les suivants:

	Solutions tampons	Force ionique	pH	DO à 700 nm Dextrane	Albumine de sérum de bovin
	Phosphate de sodium	0,1 M	6,0	0,3335	0,6030
	Phosphate de sodium	0,1 M	6,8	0,5142	0,7462
	Tris-HCl	0,02 M	6,8	0,6277	0,8452
	Phosphate de sodium	0,003 M	7,0	0,4722	0,5389
	Phosphate de sodium	0,1 M	7,6	0,4348	0,6100
	Tris-HCl	0,02 M	8,0	0,6479	0,5220
	Glycine-HCl	0,1 M	8,3	0,4666	0,5197
	Tris-citrate	0,1 M	8,6	0,4284	0,4933

Comme on peut le voir, les solutions tampons présentant des pH d'environ 6,8 à 8 sont particulièrement bien adaptées pour la dispersion des particules de carbone.

Exemple 18

A un mélange de 1 mg d'anticorps anti-gonadotrophine chorionique humaine dans 1 ml de solution tampon de borate 0,3 M (pH 9,0), on ajoute sous agitation 50 µg d'isothiocyanate de fluorescéine. On poursuit l'agitation pendant une heure, puis on fait passer le mélange sur une colonne de Sephadex G-25 pour éliminer l'isothiocyanate n'ayant pas réagi ainsi que d'autres substances indésirables. Le rapport anticorps/isothiocyanate vaut environ 1/3. A une suspension aqueuse de 1 mg de noir de carbone

(Vulcan 72), on ajoute 0,5 mg du conjugué d'anticorps. On soumet le mélange à un traitement aux ultrasons, on le fait incuber pendant environ 12 heures à la température ambiante, et on le soumet à trois reprises à une centrifugation. Le culot final, mis en suspension dans une solution tampon comme celle décrite dans l'Exemple 12, peut être conservé à 4°C jusqu'à ce qu'on l'utilise.

- 5 On peut obtenir des produits semblables en utilisant un anticorps anti-hormone lutéinisante, ou des anticorps caprins anti-immunoglobuline G humaine et anti-immunoglobuline M.

Exemple 19

- 10 A 10 ml d'une suspension aqueuse de 5 mg de noir de carbone Vulcan 72, on ajoute 200 µl d'anti-sérum caprin anti-souris. On soumet le mélange à un traitement aux ultrasons, et on le fait incuber pendant environ 12 heures à la température ambiante. On y ajoute ensuite 1 mg d'anticorps anti-gonadotrophine chorionique humaine, et on fait incuber ce mélange pendant 2 heures à la température ambiante, puis on le soumet à trois reprises à une centrifugation. Le culot final, mis en suspension dans une solution tampon comme celle décrite dans l'Exemple 12, peut être conservé à 4°C jusqu'à ce qu'on l'utilise.

Exemple 20

- 20 A une suspension de 5 mg de noir de carbone dans 10 ml de solution tampon de phosphate (STP), on ajoute 2 mg d'avidine. Après incubation pendant 4 heures à la température ambiante, on ajoute 5 ml d'une solution à 3% d'albumine de sérum de bovin dans STP. Après 2 heures de repos, on ajoute 0,5 mg d'anticorps anti-gonadotrophine chorionique humaine, conjugué à de la biotine, dans une solution à 1% d'albumine de sérum de bovin dans STP. Après 1 heure supplémentaire d'incubation, on soumet le mélange à une centrifugation à trois reprises. Le culot final, mis en suspension dans une solution tampon comme celle décrite dans l'Exemple 12 et soumis ensuite à un bref traitement aux ultrasons, peut être conservé à 4°C jusqu'à ce qu'on l'utilise.

Exemple 21

- 30 On homogénéise 10 mg de particules de carbone Vulcan XC72 dans 2 ml de solution tampon de Tris-chlorhydrate 20 mM (pH 6,8), contenant 40 mM de chlorure de sodium et 2% de dextrane 9400. Après 2 heures d'incubation à la température ambiante, on ajoute à la solution une solution de 5 mg d'isothiocyanate de fluorescéine dans 1 ml de solution tampon de Tris-chlorhydrate. On soumet le mélange à un bref traitement aux ultrasons et on le fait incuber pendant environ 12 heures à la température ambiante. Après incubation, on ajoute à la suspension de carbone 20 ml de solution tampon de phosphate de sodium 0,1 M (pH 7,6) et du chlorure de sodium 0,1 M, puis on soumet le tout à une centrifugation à 4°C et à 15 000 t/min. On répète cette étape à trois reprises, et on met le culot résultant en suspension dans 20 ml de solution tampon de phosphate.
- 40 On ajoute 2 mg d'albumine de sérum de bovin à 2 ml de la suspension ci-dessus, et on fait incuber le mélange pendant 6 heures, puis on le soumet à une centrifugation à trois reprises. On ajoute un excès de glutaraldéhyde (1%), et après incubation pendant 3 heures à la température ambiante, on le sépare par centrifugation. On ajoute une solution de 10 µg de thyroxine dans une quantité suffisante de diméthylformamide, et on fait incuber le mélange pendant 3 heures à la température ambiante, puis on le soumet à une centrifugation à trois reprises. Le culot final, mis en suspension dans une solution tampon comme celle décrite dans l'Exemple 12 et soumis ensuite à un bref traitement aux ultrasons, peut être conservé à 4°C jusqu'à ce qu'on l'utilise.

Revendications

- 50 1. Procédé d'essai immunochimique faisant appel à une réaction entre un ligand immunologique ou des molécules se liant au ligand et un analyte, caractérisé en ce que l'on utilise un marqueur immuno-chimique comprenant des fines particules de noir de carbone sur lesquelles est immobilisé par adsorption un composant qui comporte en son extrémité, en position distale par rapport au point d'adsorption, un ligand immunologiquement actif ou une molécule se liant au ligand, qui prend part à ladite réaction.
- 55 2. Dispositif d'essai immunochimique pour la mise en œuvre du procédé selon la revendication 1 caractérisé par le fait que l'on utilise un marqueur immunochimique comprenant des fines particules de noir de carbone sur lesquelles est immobilisé par adsorption un composant qui comporte en son extrémité, en position distale par rapport au point d'adsorption, un ligand immunologiquement actif ou une molécule se liant au ligand, qui prend part à ladite réaction.
- 60

FIG-1

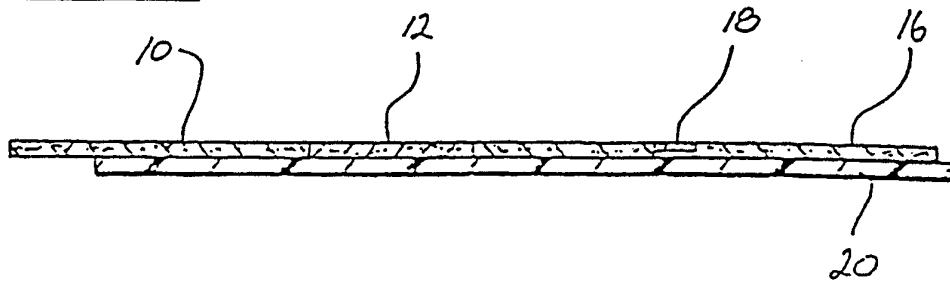


FIG-2

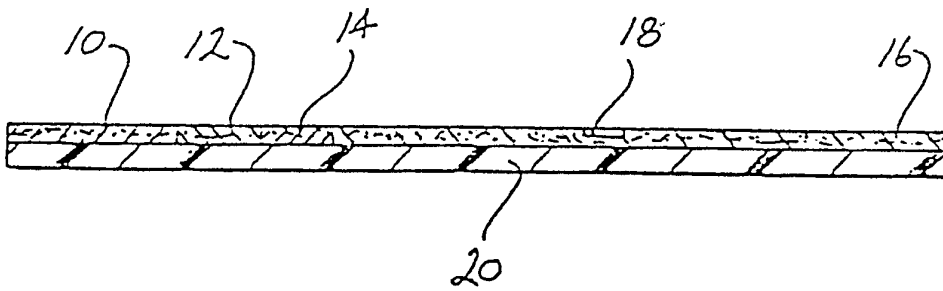


FIG-3

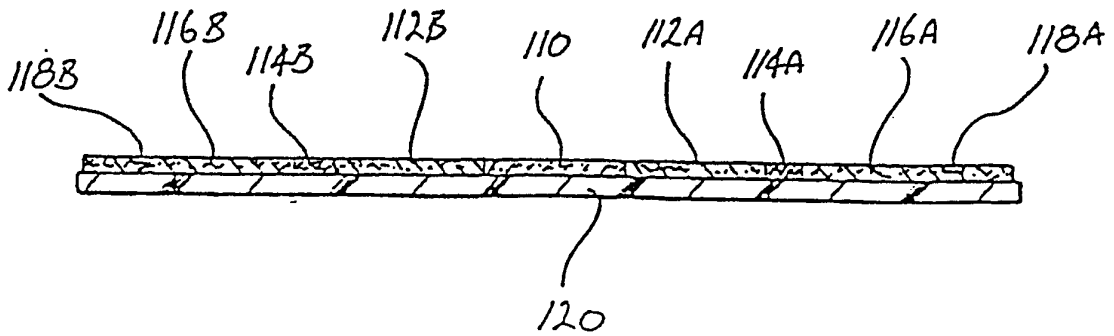


FIG-4

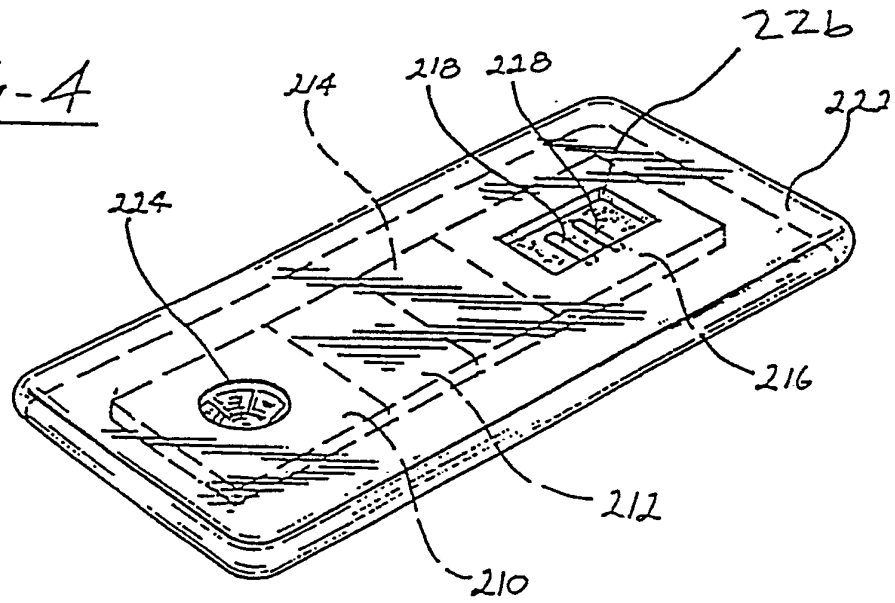


FIG-5

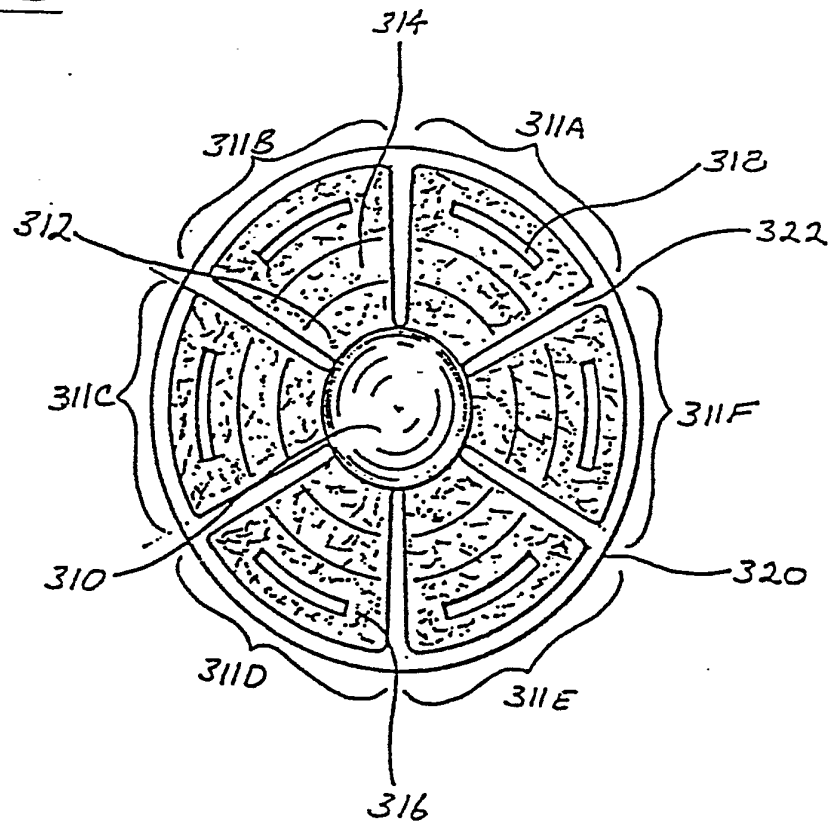


FIG 6

