RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 498 331**
(A n'utiliser que pour les commandes de reproduction).

A1

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

(21) **N° 81 00986**

(54) **Récipient réactif pour analyse notamment immunologique.**

(51) Classification internationale (Int. Cl. ³). **G 01 N 31/22, 33/54.**

(22) Date de dépôt ..... 20 janvier 1981.
(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du public de la demande ..... B.O.P.I. — « Listes » n° 29 du 23-7-1982.

(71) Déposant : KADOUCHE Jean, résidant en France.

(72) Invention de : Jean Kadouche.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : André Netter, conseil en brevets d'invention,
40, rue Vignon, 75009 Paris.

2498331

L'invention concerne un récipient pour l'exécution de réactions, notamment de nature immunologique, par contact entre un liquide et des molécules de réactif fixées sur la paroi du récipient.

Dans le domaine des analyses immunologiques (endocrinologie, hématologie, cancérologie), par exemple pour la recherche ou le dosage d'antigènes ou d'anticorps, on utilise depuis quelque temps des récipients jouant également le rôle de réactif grâce à la fixation sur leur paroi interne de molécules de réactif.

Ainsi, par exemple pour déterminer si un liquide biologique contient un antigène déterminé, le liquide est placé dans un récipient sur la paroi duquel sont fixées des molécules de l'anticorps spécifique dudit antigène.

Habituellement, le transfert du liquide dans le récipient n'est pas réalisé directement afin d'éviter une contamination. On fait appel, pour ce faire, à des cônes ou pointes de prélèvement fixés à l'extrémité d'une pipette; après le prélèvement d'une quantité déterminée du liquide à analyser et transfert dans le récipient d'analyse, le cône est jeté.

Les méthodes de prélèvement utilisées jusqu'à ce jour obligent donc à une suite de manipulations délicates et à l'utilisation d'un matériel de laboratoire très diversifié. Par ailleurs, chaque opération de prélèvement et de transfert d'échantillon peut être la source d'erreur par suite de la perte d'une quantité plus ou moins importante de liquide. Ces opérations impliquent en outre l'utilisation de quantités de réactif ou d'échantillons qui, bien que faibles, demanderaient à être encore réduites, en raison du coût élevé et/ou de la rareté du réactif et des échantillons.

C'est un but de l'invention de fournir un récipient-réactif pour des réactions faisant appel au contact entre un liquide et des molécules de réactif fixées sur la paroi d'un récipient qui ne présente pas les inconvénients rappelés ci-dessus des récipients réactifs connus.

Le récipient réactif selon l'invention est constitué par un cône du type de ceux utilisés habituellement en conjonction avec une pipette de prélèvement, notamment une pipette automatique, et sur la face interne de la paroi duquel sont fixées lesdites molécules de réactif.

L'invention tire parti de la particularité qu'ont les pipettes automatiques de permettre non seulement de pipeter et de rejeter un prélèvement liquide, mais également de le conserver. La combinaison avec une pipette automatique d'un cône ou pointe de prélèvement selon l'invention permet de réaliser la réaction d'analyse dans le cône lorsqu'il est adjoint à ladite pipette.

Pour une analyse à l'aide d'un cône selon l'invention, il n'est plus besoin des récipients d'analyse habituels tels que les tubes à essais.

Par ailleurs, un récipient de transfert n'est plus nécessaire, ce qui supprime pratiquement les risques de contamination.

De plus, les pertes éventuelles d'échantillon ou d'un réactif liquide nécessaire à l'analyse sont supprimées ou, tout au moins, réduites à un minimum.

L'invention prévoit d'utiliser une pipette automatique connue à plusieurs canaux, et de fixer sur ces derniers plusieurs pointes de prélèvement dont la paroi est revêtue de molécules de réactif de sorte que plusieurs réactions d'analyse peuvent être réalisées simultanément.

Dans les analyses du type auquel s'applique le récipient selon l'invention, le résultat de l'analyse est souvent déterminé - par exemple si on recherche la présence d'un antigène particulier - par le comptage du nombre de molécules de l'anticorps correspondant, marquées par un isotope ou un enzyme ou un autre signal, qu'on introduit en fin de réaction et qui se sont éventuellement fixées sur les molécules de l'antigène recherché déjà liées aux molécules d'anticorps fixées sur le récipient (dosage de type "sandwich" ou IRMA). Le résultat de l'analyse peut également être déterminé par le comptage du nombre de molécules du même antigène, mais marquées par un isotope, un enzyme ou un autre signal et qui se sont fixées sur les sites anticorps restant libres, liés aux parois du récipient (dosage de type compétitif).

Lorsqu'on utilise des pipettes automatiques munies de pointes de prélèvement usuelles des erreurs peuvent se produire en raison du fait que les pipettes, même automatiques, se dérèglent parfois et ne prélèvent plus la quantité de liquide précise pour laquelle elles ont été réglées.

Les pointes de prélèvement selon l'invention, grâce au fait qu'elles constituent elles-mêmes les récipients réactifs, permettent une vérification immédiate et éventuellement une correction des résultats d'analyse.

A cet effet, conformément à l'invention et dans le cas d'un dosage de type dit "sandwich", après que le milieu réactif contenant, par exemple, l'anticorps marqué, ait été laissé à incuber pendant la durée appropriée avec les molécules d'antigène éventuellement liées aux molécules d'anticorps fixées sur la paroi de la pointe, on compte les molécules d'anticorps marquées qui sont restées libres dans ce milieu. En calculant par ailleurs la quantité de molécules d'anticorps marquées qui se sont liées aux molécules d'antigène éventuellement présentes dans l'échantillon analysé, on peut calculer l'activité réelle de l'échantillon, même si le volume pipeté n'est pas précisément égal à la quantité pour laquelle la pipette était réglée.

Dans un dosage de type dit par compétition, de façon analogue, après que le milieu réactif contenant les molécules d'antigène marquées ait été laissé à incuber pendant la durée appropriée avec les molécules d'anticorps fixées sur la paroi de la pointe et qui sont restées libres, on compte les molécules d'antigène marquées et restées libres. On compte par ailleurs la quantité de molécules d'antigène marquées, liées aux molécules d'anticorps fixées sur la paroi du récipient.

L'invention sera décrite plus en détail ci-après en référence aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 est une vue schématique d'un type connu de matériel de laboratoire pour micro-analyse, par exemple de nature immunologique ;
- la figure 2 est une vue d'une pipette munie d'un récipient réactif selon l'invention ;
- la figure 3 est une vue en coupe d'un premier type de récipient réactif selon l'invention ;
- la figure 4 est une vue en élévation d'un second type de récipient réactif selon l'invention ;
- la figure 5 représente un schéma de réaction immunologique ;
- la figure 6 représente un autre schéma de réaction immunologique ;

- la figure 7 représente un schéma de réaction immuno-enzymatique;

- la figure 8 représente un autre schéma de réaction immuno-enzymatique; et

- la figure 9 est une vue schématique d'une pipette à pointes multiples.

L'invention va être décrite ci-après pour la recherche ou l'évaluation d'un antigène (ou d'un anticorps) dans un milieu biologique liquide mais il est clair qu'elle s'applique à tout autre type d'analyse dont la réaction spécifique prévoit un contact entre un liquide à analyser et des molécules protéiques d'un réactif fixées sur la paroi d'un récipient.

Actuellement, on utilise couramment en laboratoire, pour ce type d'analyse, des pipettes du type de celle représentée en 10 sur la figure 1. Sur le tube d'aspiration 11 d'une telle pipette, qui peut être réglée pour prélever différentes quantités volumiques, on fixe une pointe ou cône de prélèvement 12 susceptible de contenir, dans sa totalité, le volume de l'échantillon à prélever. La pipette est actionnée par l'intermédiaire d'un bouton-poussoir 13 situé à la partie supérieure du corps de la pipette et le volume prélevé par aspiration à la suite d'un premier enfoncement du poussoir est ensuite rejeté dans un tube à essai 14 dans lequel est réalisée l'analyse. Lorsque cette dernière consiste à déterminer si un milieu biologique liquide prélevé contient un antigène particulier, on utilise un tube à essai dont la partie inférieure de la paroi intérieure est revêtue de molécules, représentées schématiquement en 15, de l'anticorps spécifique dudit antigène.

L'invention prévoit une pointe de prélèvement 16 (figures 2 et 3) dont la face interne de la paroi est revêtue de molécules d'anticorps représentées schématiquement en 17 ou d'autres molécules ayant des propriétés du même type, - telles que des protéines liantes (par exemple haptoglobine, facteur intrinsèque, etc.),substrats enzymatiques, récepteurs (hormonaux, membranaires, nucléaires, etc.)-,spécifiques de l'antigène ou autre corps à rechercher,- par exemples protéines, enzymes, vitamines, virus, haptènes, médicaments, etc. Le matériau constitutif du récipient est choisi pour permettre la fixation des molécules du réactif, par exemple par une

liaison covalente ou non spécifique par simple adsorption.

La pointe de prélèvement 16 est destinée à être fixée sur la tige d'aspiration 11 d'une pipette ou micro-pipette usuelle, automatique ou non, 10.

En utilisation dans le cas d'un dosage du type "sandwich", la pointe 16 est montée sur la pipette, on actionne le bouton-poussoir 13 et on prélève la quantité voulue du milieu biologique à analyser, le liquide montant jusqu'au niveau 18 et recouvrant la paroi sur la totalité de la hauteur de celle-ci sur laquelle sont fixées les molécules d'anticorps 17. Le milieu de réaction liquide 19 est conservé dans la pointe pendant le temps d'incubation approprié puis il est rejeté; si l'échantillon contient l'antigène recherché, voir figure 5, les molécules de cet antigène, représentées schématiquement en 20 par des petits hexagones, se sont liées spécifiquement aux molécules d'anticorps 17. On introduit alors, après lavage, un milieu réactif contenant des molécules 21 de l'anticorps spécifique de l'antigène à rechercher, mais marquées, par exemple, par un isotope ou par un enzyme : après une incubation d'une durée appropriée, les molécules d'anticorps marquées 21, dans le cas d'une réaction positive, se lient spécifiquement aux molécules d'antigène 20 déjà liées aux molécules d'anticorps 17 fixées sur la paroi de la pointe de prélèvement. En comptant les molécules 21 d'anticorps marquées fixées sur les parois de la pointe par l'intermédiaire d'une molécule d'antigène 20 et d'une molécule d'anticorps 17, on détermine la concentration d'antigène que contenait l'échantillon à analyser.

Dans un dosage du type dit compétitif, au lieu d'introduire après incubation de l'échantillon à analyser, un milieu réactif contenant des molécules 21 d'anticorps marquées, on introduit un milieu réactif contenant des molécules 20' du même antigène que celui dont on recherche la présence, mais marquées, par exemple, par un isotope ou par un enzyme (voir figure 6) : après une incubation d'une durée appropriée, des molécules d'antigène 20' se lient sur les sites des molécules d'anticorps 17' fixées sur la paroi de la pointe de prélèvement laissées libres après la première réaction d'incubation. En comptant les molécules 20' d'antigène marquées fixées sur les parois de la pointe, on déter-

mine, par différence, le nombre des molécules d'antigène 20 qui se sont éventuellement fixées sur les molécules d'anticorps 17 de la paroi de la pointe et, ainsi, la concentration d'antigène que contenait l'échantillon à analyser.

Dans l'un et l'autre cas, l'analyse est ainsi effectuée sans qu'un tube à essai ait été utilisé.

La pointe selon l'invention permet un comptage précis d'anticorps ou d'autres molécules marquées. A cet effet, pour un dosage de type "sandwich", le milieu réactif contenant lesdites molécules d'anticorps marquées, au lieu d'être rejeté, est récupéré après la réaction d'analyse. On effectue alors le comptage, d'une part, des molécules d'anticorps marquées liées à la paroi de la pointe de prélèvement et, d'autre part, des molécules d'anticorps marquées restées libres dans le milieu réactif.

De même, dans un dosage par compétition, on récupère le milieu réactif contenant les molécules d'antigène marquées et on effectue, d'une part, le comptage des molécules d'antigène marquées liées à la paroi de la pointe de prélèvement par l'intermédiaire des molécules d'anticorps laissées libres après l'incubation de l'échantillon et, d'autre part, le comptage des molécules d'antigène marquées restées libres dans le milieu réactif. On peut ainsi vérifier, et éventuellement réajuster, les résultats de l'analyse qui restent exacts, même si la micro-pipette utilisée s'est légèrement déréglée de sorte qu'au lieu de prélever les micro-volumes précis pour lesquels elle était réglée, elle prélève une quantité légèrement supérieure ou légèrement inférieure.

Une telle vérification est possible, selon l'invention, en raison du fait que le volume d'un liquide prélevé à l'aide d'une micro-pipette et conservé dans la pointe de prélèvement associée à la pipette est très précis et peut être rejeté dans sa totalité, sans perte appréciable. Un tel résultat ne peut être atteint dans le cas d'une réaction effectuée dans un tube à essai, un milieu réactif contenu dans ce dernier ne pouvant être récupéré dans sa totalité d'une façon précise, en raison des pertes provoquées, notamment, par l'effet de la capillarité ou de la tension superficielle.

L'invention prévoit de fixer, sur la paroi d'une pointe de prélèvement, non seulement un type unique de molécules de

réactif mais des molécules de deux types différents ou même en plus grand nombre, et cela en des emplacements différents de ladite paroi. Comme représenté sur la figure 4, la partie inférieure de la paroi de la pointe de prélèvement 26 est revêtue d'un premier type de molécules de réactif, par exemple des molécules d'un anticorps spécifique d'un premier antigène, jusqu'à un niveau schématisé par la section transversale 23. Au-dessus, la paroi de la pointe est revêtue de molécules 24 d'un anticorps spécifique d'un deuxième antigène, et ce jusqu'au niveau de la section transversale schématisée en 25, le volume défini entre l'extrémité de la pointe et la première section 23 et celui défini entre les sections 23 et 25 étant égaux.

Une telle pointe de prélèvement permet de réaliser, sur un même échantillon, deux analyses différentes successives, sans gêner en aucune façon la lecture ou l'exploitation du résultat de chacune des analyses. On règle une pipette automatique pour qu'elle aspire la quantité de liquide correspondant au volume contenu entre la pointe de la pipette et la section 23, on fixe sur la pipette la pointe 26. On prélève par la pipette la quantité voulue de l'échantillon à analyser. Ce dernier atteint dans la pointe 26 le niveau de la section transversale 23. Il est maintenu en contact pendant une durée d'incubation appropriée avec la partie de paroi revêtue de molécules d'anticorps 22, de façon que les molécules du premier antigène éventuellement présent puissent s'y fixer. On règle ensuite la pipette pour qu'elle aspire une quantité de liquide double de celle correspondant au premier réglage. L'actionnement ultérieur de la pipette fait monter le liquide jusqu'au niveau de la section transversale 25. La deuxième analyse s'effectue immédiatement : les molécules du deuxième antigène éventuellement présent dans l'échantillon se lient alors, au cours d'une deuxième période d'incubation, aux molécules d'anticorps 24 fixées sur la deuxième partie de paroi.

Ce processus signifie un gain de temps considérable et une diminution, également considérable, des volumes d'échantillon nécessaires pour les analyser.

L'invention prévoit de fixer sur la paroi d'une pointe de prélèvement un nombre de types de molécules protéiques réactives supérieur à deux.

La pointe de prélèvement selon l'invention peut en outre permettre de réaliser la séquence totale d'un dosage immuno-enzymatique. A cet effet, on fixe sur la paroi d'une pointe 28 comprise entre l'extrémité et un premier niveau 27 (figures 7 et 8) des molécules d'anticorps 29 spécifiques de l'antigène à rechercher et, sur la partie de la paroi comprise entre ce premier niveau 27 et un deuxième niveau 30, des molécules de substrat spécifique de l'enzyme utilisé pour l'exploitation du résultat d'analyse.

Dans le cas où le dosage immunologique proprement dit est du type "sandwich" (figure 7), on introduit dans un premier temps l'échantillon à analyser jusqu'au niveau 27 et, au cours de l'incubation, les molécules d'antigène 31 éventuellement présentes se lient aux molécules d'anticorps 29 fixées sur la paroi. Après rejet de l'échantillon et lavage on prélève jusqu'au même niveau 27 un milieu réactif contenant des molécules 32 du même anticorps que celui utilisé comme réactif mais marquées par l'enzyme indicateur et on laisse incuber ce milieu réactif de façon que les molécules d'anticorps marquées 32 se fixent sur les molécules d'antigène 31 déjà liées aux molécules d'anticorps 29. Par actionnement ultérieur de la pipette, on fait passer le volume contenu entre la pointe et le niveau 27 dans la partie supérieure comprise entre le niveau 27 et le niveau 30 et on laisse incuber de façon que les molécules d'anticorps marquées 32 en excès, et donc libres dans le liquide, puissent réagir par l'intermédiaire de l'enzyme qu'elles portent avec les molécules 33 du substrat spécifique de l'enzyme fixées sur les parois de la pointe. On développe ensuite une coloration dans cette partie supérieure de la pointe de prélèvement par toute réaction colorimétrique appropriée, la coloration obtenue étant proportionnelle à la quantité de molécules d'anticorps marquées restées libres dans le milieu réactif. La lecture peut être réalisée par spectrophotométrie dans le spectre visible, l'UV, en fluorescence, etc.

Dans le cas où le dosage immunologique est du type compétitif (figure 8), on introduit, après incubation de l'échantillon et lavage, un milieu réactif contenant des molécules 31' d'antigène marquées par tout enzyme approprié. Après une phase d'incubation au cours de laquelle ces molé-

cules d'antigène marquées 31' se lient aux molécules d'anticorps 29' laissées libres sur les parois de la partie inférieure de la pointe de prélèvement 28, on fait monter, par actionnement de la pipette, le liquide dans la partie supérieure de la pointe comprise entre le niveau 27 et le niveau 30. Les molécules d'antigène marquées 31' en excès, et donc encore libres dans le milieu réactif, réagissent alors par l'enzyme qu'elles portent avec les molécules 33 de substrat enzymatique qui sont fixées sur les parois de la partie supérieure de la pointe. On exploite le résultat par réaction colorimétrique, comme dans le dosage du type sandwich.

L'invention prévoit l'application de pointes réactives à une pipette 34 prévue pour le prélèvement à l'aide de pointes multiples 35, comme montré sur la figure 9. On peut ainsi réaliser simultanément plusieurs analyses, à savoir soit la même analyse mais portant sur des échantillons différents, en nombre correspondant à celui des pointes de la pipette, -auquel cas ces dernières sont toutes revêtues de molécules du même réactif-, soit des analyses différentes portant sur un même échantillon, -auquel cas les molécules fixées sur la face interne de la paroi des pointes sont celles de réactifs différents d'une pointe à l'autre.

REVENDICATIONS

1. Récipient réactif pour réactions, notamment de nature immunologique, faisant appel à un contact entre un liquide et des molécules d'un réactif fixées sur la paroi d'un récipient, caractérisé en ce qu'il est constitué par un cône de prélèvement du type de ceux habituellement utilisés en liaison avec une pipette pour le transfert d'un échantillon du milieu à analyser à un ou des tubes à essais ou analogues, mais sur la face interne de la paroi duquel sont fixées lesdites molécules de réactif.

2. Récipient réactif selon la revendication 1, caractérisé en ce que les molécules de réactif fixées sur la face interne de la paroi du cône sont des protéines.

3. Récipient réactif selon la revendication 2, caractérisé en ce que les molécules sont des molécules de substances ayant des propriétés de type antigénique (protéines, enzymes, vitamines, virus, haptènes,médicaments, etc.) ou de type anticorps (anticorps, protéines liantes, substrats enzymatiques, récepteurs hormonaux, membranaires ou nucléaires, etc.).

4. Récipient réactif selon la revendication 1, caractérisé en ce que le réactif est constitué par des molécules fixables sur la paroi du cône par liaison covalente ou par liaison non spécifique, par exemple par simple adsorption, le matériau constitutif du récipient étant choisi pour permettre une telle liaison.

5. Récipient réactif selon l'une quelconque des revendications précédentes,caractérisé en ce que le cône de prélèvement est divisé en plusieurs zones superposées définies par des sections transversales, chacune desdites zones étant revêtue de molécules d'un réactif différent.

6. Utilisation de récipients réactifs selon l'une quelconque des revendications précédentes en liaison avec une pipette à pointes multiples, pour effectuer une même analyse sur plusieurs échantillons différents, tous les récipients étant revêtus de molécules du même réactif.

7. Utilisation de récipients réactifs selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 avec une pipette à pointes multiples, pour effectuer différentes analyses sur un même échantillon liquide, les récipients étant revêtus de

molécules de réactif d'un type différent.

8. Utilisation de récipients réactifs selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, avec une pipette mise en oeuvre dans un appareillage à fonctionnement manuel, semi-automatique ou automatique.

9. Procédé d'analyse par contact entre un liquide et des molécules de réactif fixées sur la paroi d'un récipient, mettant en oeuvre un dosage immunologique de type sandwich, ou par compétition, un dosage radio-immunométrique, ou tout autre dosage utilisant un anticorps ou une autre substance marquée ou non par un signal, caractérisé en ce que les réactions d'analyse sont réalisées dans un récipient réactif unique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

10. Procédé de dosage immuno-enzymatique, caractérisé en ce que les réactions d'analyse sont réalisées dans un même récipient réactif selon la revendication 5, la zone inférieure du cône de prélèvement portant sur sa surface interne des molécules du réactif spécifique du corps à rechercher et la zone supérieure du cône de prélèvement portant sur sa surface interne des molécules d'un substrat spécifique d'un enzyme utilisé pour marquer les molécules utilisées pour exploiter le résultat de l'analyse.

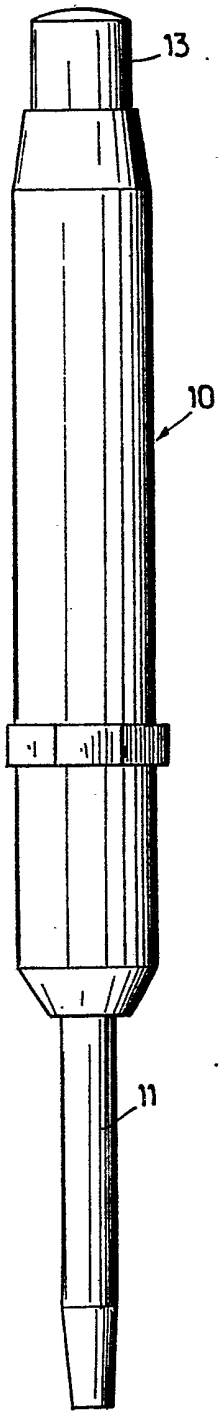
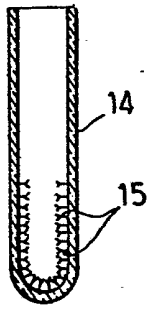


Fig.1





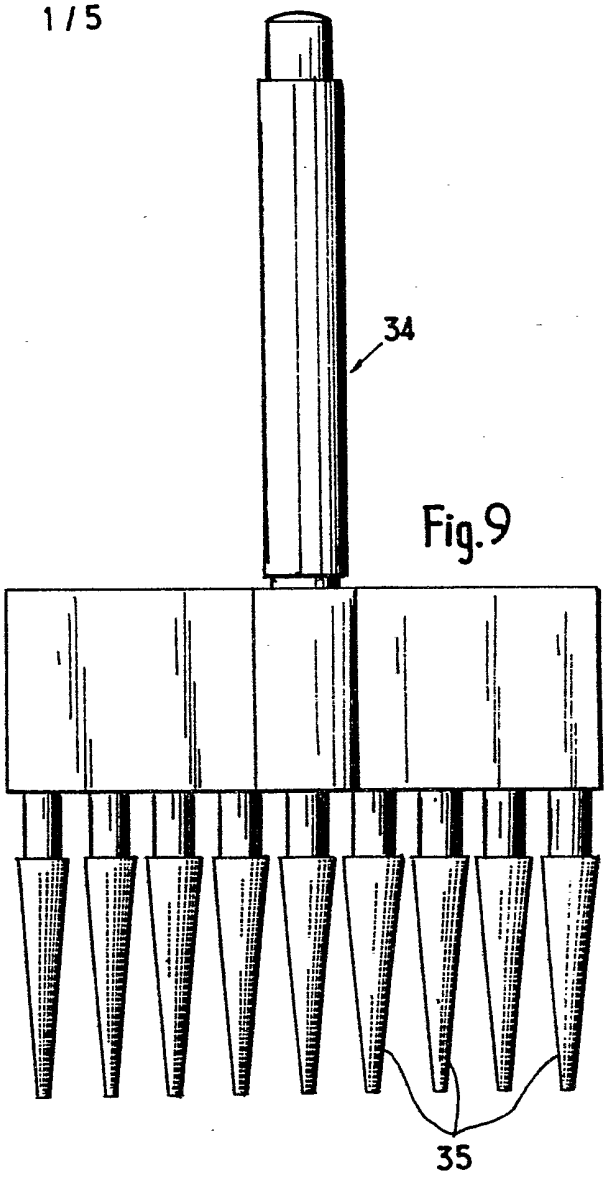


Fig.9

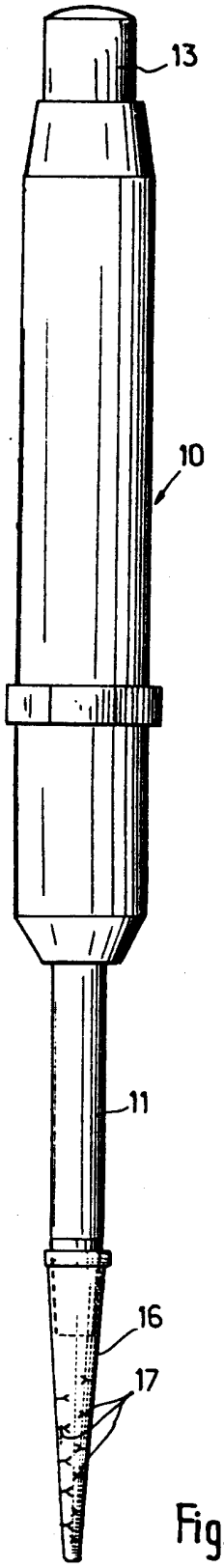


Fig. 2

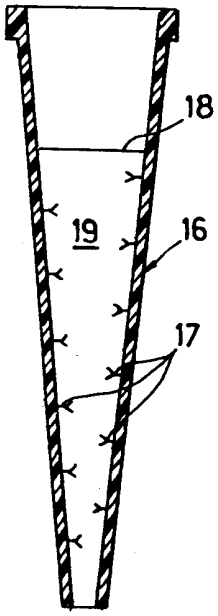


Fig. 3

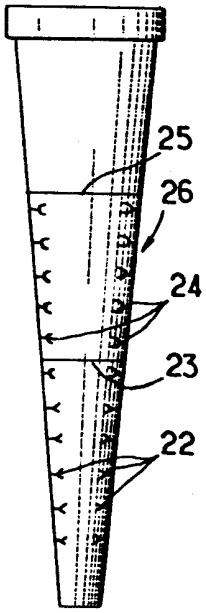


Fig. 4

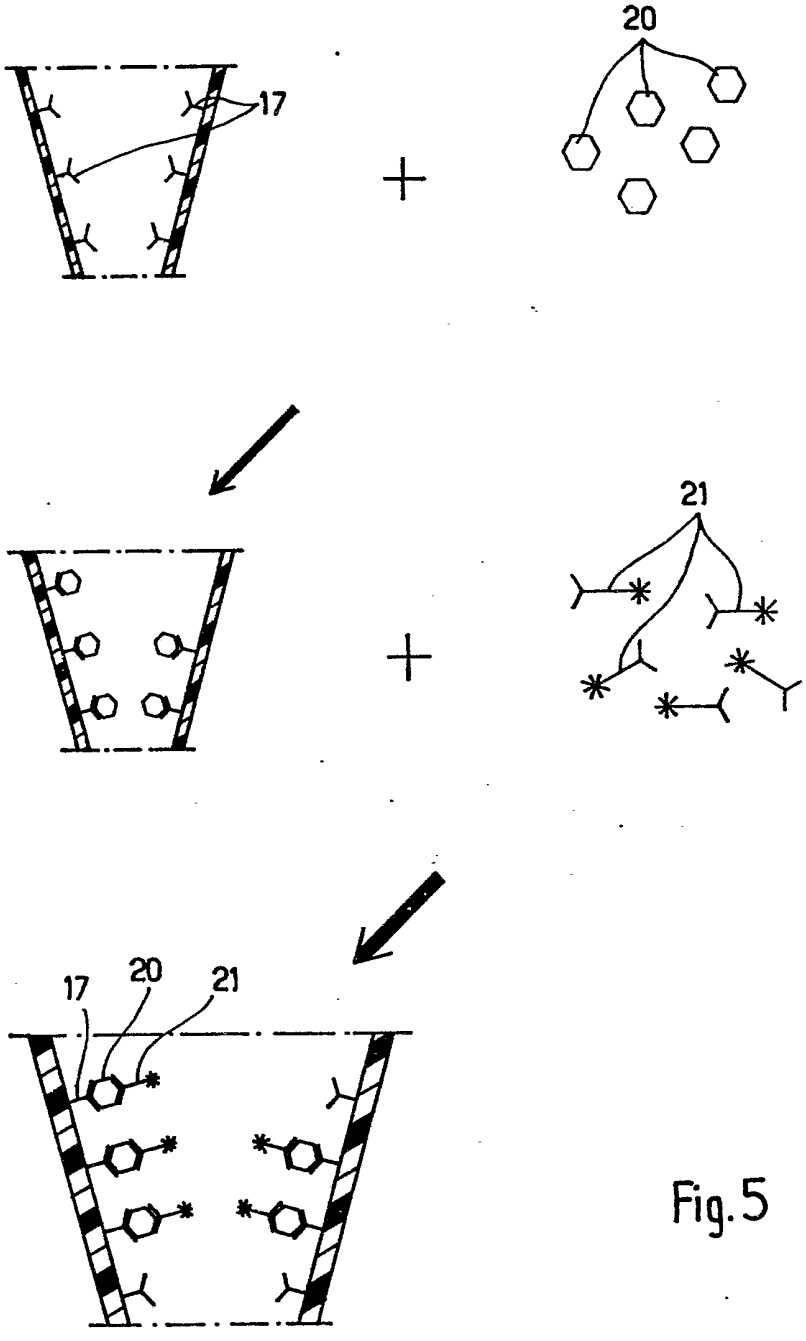


Fig. 5

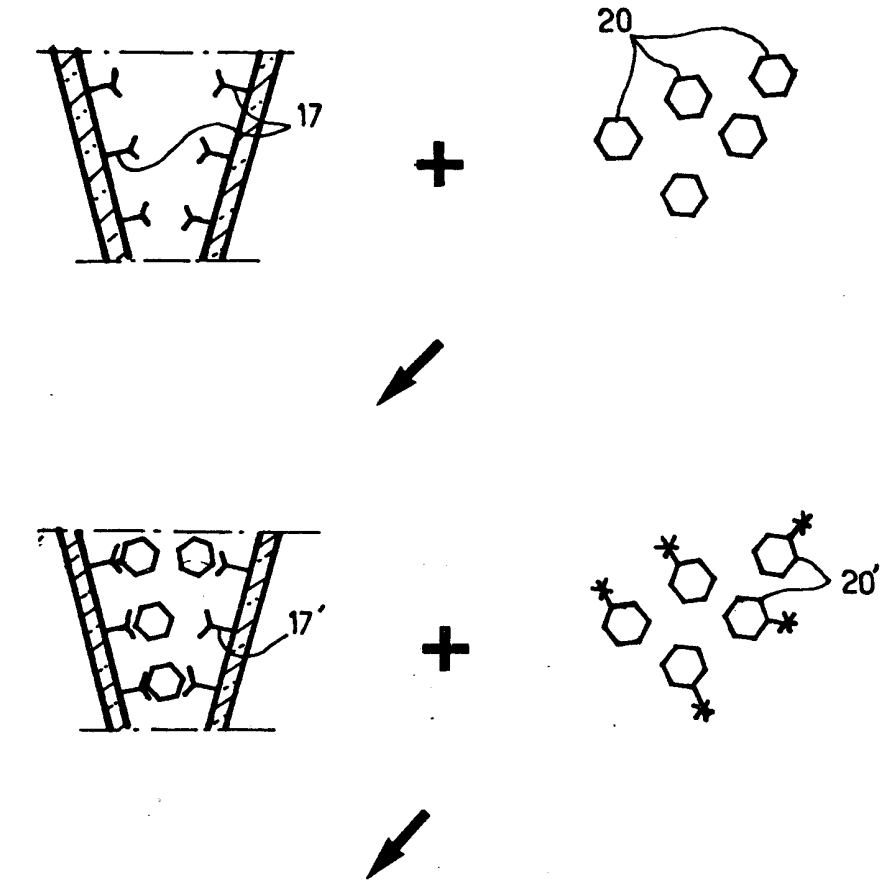


Fig. 6

Fig. 7

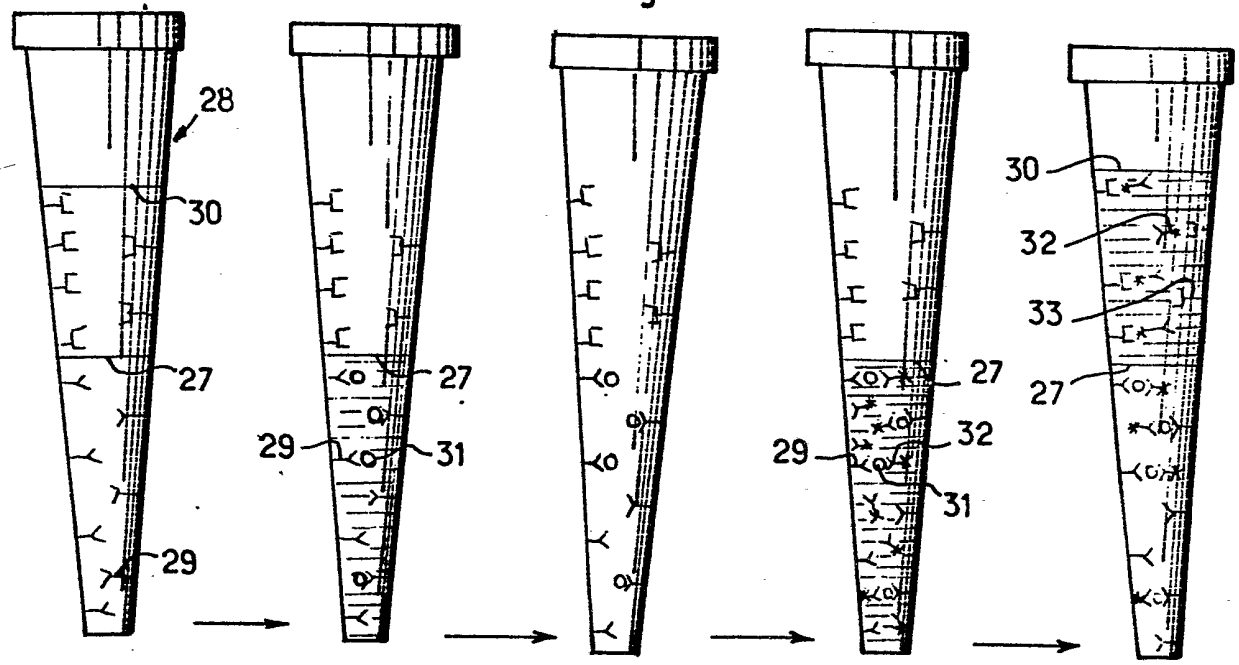
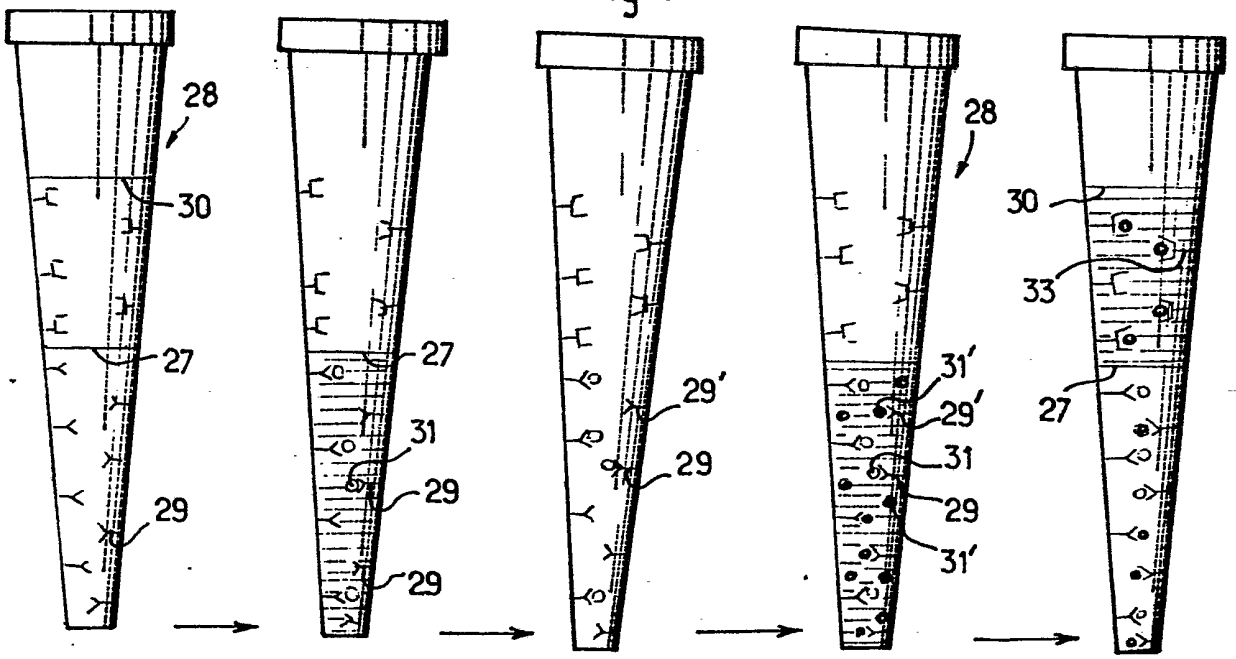

28
30
27
29
27
29
31
27
29
32
31
30
32
33
27

Fig. 8


28
30
27
29
27
31
29
29
29'
29
28
31'
29'
31
29
31'
30
33
27