

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

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

2 561 661

(21) N° d'enregistrement national :

84 04587

(51) Int Cl⁴ : C 12 N 11/08; C 12 M 1/40; C 12 Q 1/56; G 01 N 33/577.

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 23 mars 1984.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° 39 du 27 septembre 1985.

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(71) Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (Etablissement public). — FR.

(72) Inventeur(s) : Eduardo Ricardo Angles-Cano.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Cabinet Plasseraud.

(54) Pellicule moléculaire supportée d'un réseau de fibrine permettant la rétention sélective, à sa surface, de l'activateur du plasminogène tissulaire et applications en découlant.

(57) L'invention concerne une pellicule moléculaire supportée d'un réseau de fibrine en phase solide formée à la surface d'un support, plus particulièrement à la surface des godets d'une microplaque. Cette pellicule se prête à toutes les applications qui mettent en œuvre la capacité de fixation sélective de activateurs tissulaires du plasminogène, le cas échéant du plasminogène lui-même, notamment à leurs dosages quantitatifs respectifs et à la détection d'anticorps monoclonaux spécifiques de ces activateurs tissulaires et du plasminogène.

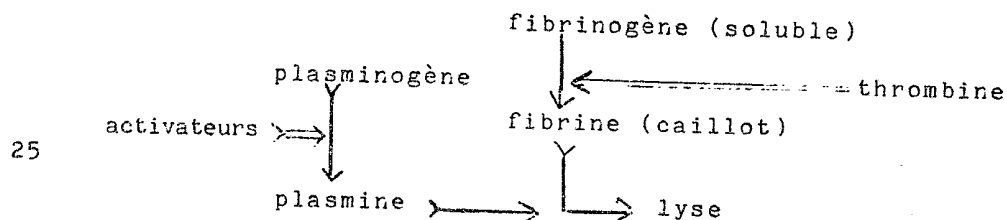
FR 2 561 661 - A1

Pellicule moléculaire supportée d'un réseau de fibrine permettant la rétention sélective, à sa surface, de l'activateur du plasminogène tissulaire et applications en découlant.

L'invention concerne une pellicule moléculaire supportée d'un réseau de fibrine en phase solide, fixée à la surface d'un support, de préférence de façon covalente, à sa mise en oeuvre pour la rétention sélective d'activateur tissulaire du plasminogène et aux applications découlant de cette rétention sélective. L'invention concerne encore des moyens pour l'obtention de telles pellicules moléculaires supportées.

Il est tout d'abord rappelé que les activateurs du plasminogène (AP) sont des enzymes ayant pour fonction la conversion du plasminogène, une proenzyme de distribution ubiquitaire, en plasmine, l'enzyme protéolytique active. La plasmine est une sérine-protéase capable de lyser la fibrine, son principal substrat, et d'autres protéines.

La plasmine est donc l'enzyme effectrice du système fibrinolytique qui permet la dissolution du caillot. On peut de façon schématique résumer les principales réactions impliquées dans le système fibrinolytique comme suit :



Les AP sont secrétés par une variété de types cellulaires sous le contrôle de stimuli spécifiques (Cash, J.D., Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis, eds. J.F. Davidson, M.M. Samama and P.C. Desnoyers (raven Press, N.Y.), p. 97, 1975) ; ils sont, par contre, librement secrétés par des cellules néoplasiques et par des cellules transformées (Christman J.K. et al, Proteinase in mammalian cells and tissues, ed. Barrett (Elsevier/North Holland, Amsterdam), p. 91, 1977).

Les AP peuvent être classés en deux types différents suivant leurs caractéristiques moléculaires et fonctionnelles et leur réactivité vis-à-vis des anticorps polyclonaux conventionnels.

Les activateurs de type urokinase (u-PA) de poids moléculaire 54.000 sont produits par les cellules épithéliales et sont capables d'activer le plasminogène aussi bien en phase liquide (plasma) qu'en phase solide (caillot). Ces enzymes ne possèdent presque pas d'affinité pour la fibrine (Thorsen S. et al, Differences in the binding to fibrin of urokinase and tissue plasminogen activator. Thromb. Diathes. Haemorrh. 28:65-73, 1972) et leurs propriétés à l'égard de l'activation du plasminogène peuvent aboutir à la production de fibrinolyse et fibrinogénolyse simultanées.

L'autre type d'AP est l'AP d'origine endothéliale ou activateur tissulaire (t-PA) ; c'est une protéine de poids moléculaire 70.000 qui est considérée comme l'AP physiologique de la fibrinolyse plasmatique et de la thrombolyse. L'absence de son activité dans le plasma a été liée au développement de thromboses (Johansson et al, Acta Med. Scand. 203:477, 1978, et Angles-Cano E. et al, J. Lab. Clin. Med. 94:312, 1979).

La détection et le dosage plasmatique de l'activateur endothélial sont donc de primordiale importance

dans l'étude de la fibrinolyse normale et pathologique.

L'activateur endothélial possède une très haute affinité pour la fibrine lui permettant, d'une part, son absorption spécifique sur un caillot et, d'autre part, de développer son activité enzymatique. En effet, cet activateur n'est capable d'activer le plasminogène que s'il est absorbé sur un caillot de fibrine. Le t-PA ré-
gule par conséquent une véritable fibrinolyse sans fi-
brinogénolyse. Dans ces conditions, les méthodes actuel-
lement d'utilisation courante, permettant la détection
de cet activateur, sont des méthodes faisant appel à la
lyse d'un caillot (Kluft C. et al, Screening of fibrinolytic activity in plasma euglobulin fractions in the
fibrin plate, Progress in chemical fibrinolysis and
thrombolysis, J.F. Davidson, M. M. Samama, P.C. Des-
noyers, Raven Press, New York, 1976, vol. 2:57) ou ayant
pour but la mesure des temps de lyse des euglobulines
plasmatiques ou des aires de lyse sur plateau de fi-
brine. Ces tests sont qualitatifs, non spécifiques (en
raison de la diffusion du t-PA et d'autres protéines
dans l'épaisseur des plateaux de fibrine utilisés à ce
jour). Ils nécessitent en outre un temps de réalisation
très prolongé (de 8 à 24 heures). Un test permettant le
dosage spécifique et quantitatif de l'activité enzyma-
tique de l'activateur du plasminogène d'origine endo-
théliale n'est pas encore disponible.

Au cours des quatre dernières années, l'étude de
la coagulation et de la fibrinolyse s'est vue considéra-
blement modifiée par le développement de substrats syn-
thétiques (Hemker H.C. et al, Handbook of synthetic sub-
strats. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, 1983).
Ces substrats permettent, à l'aide d'un spectrophoto-
mètre, le dosage quantitatif de composants de ces systè-
mes.

Des tests utilisant un substrat synthétique pour
le dosage des u-PA en phase liquide ont été décrits

(Drapier I.C. et al, Regulation of plasminogen activator secretion in mouse peritoneal macrophages. *Biochimie* 61:463-471, 1979, et Searls D.B., An improved colorimetric assay for plasminogen activator. *Analytical Biochem.* 107:64-70, 1980) ; le principe utilisé n'est pas, cependant, applicable à la détection des t-PA.

D'importants efforts ont été effectués par plusieurs chercheurs dans le monde pour mettre au point un test permettant la détection enzymatique du t-PA, à l'aide d'un substrat chromogène sensible à la plasmine (Ranby M. et Wallen P., A sensitive parabolic rate assay for the tissue plasminogen activator, *Progress in fibrinolysis*, Davidson J.F. Nilson, I.M., Astedt B. (eds), Churchill Livingstone, Edinburgh, 5:233-235, 1981, et Wiman B. et al, Plasminogen activator release during venous stasis and exercise as determined by a new specific assay. *Clin. Chim. Acta.* 127:279-288, 1983, Eriksson B. et al, Tissue plasminogen activator activity after total hip replacement and its correlation to post-operative deep vein thrombosis. *Thromb. Haemostas.* 50:57, 1983, et Verheijen J.H. et al, A simple, sensitive spectrophotometric assay for extrinsic (tissue-type) plasminogen activator applicable to measurements in plasma. *Thromb. Haemostas.* 48:266-269, 1983). Ces tests utilisent comme stimulateur du t-PA des composés proches de la fibrine pouvant mimétiser son action stimulatrice sur le t-PA : monomères de fibrine en solution (articles déjà cités de Ranby et Wallen, 1981, et de Wiman et al, 1983), fragments de fibrinogène en solution (article déjà cité de Verheijen et al, 1983). Dans d'autres cas (article déjà cité de Eriksson et al, 1983), le stimulateur choisi (poly-L-lysine ; Allen R.A., An enhancing effect of polylysine on the activation of plasminogen. *Thromb. Haemostas.* 47:41-45, 1982) n'a aucun lien structurel avec la fibrine. La détection du t-PA en absence de stimulateur (Campbell E.E. et al, A colorimetric

assay for releasable plasminogen activator. Clin. Chem. 28:1125-1128, 1982) a été également rapportée. Mais ces méthodes ne sont pas toujours d'une mise en oeuvre simple et ne présentent pas toujours la stricte spécificité requise.

A l'absence de techniques précises pour le dosage quantitatif du t-PA, s'ajoutent les difficultés de l'isoler en quantité suffisante pour l'étudier. L'acquisition de connaissances sur sa structure moléculaire, sa localisation tissulaire et sur le rapport structure-fonctions serait donc de première importance pour comprendre son rôle physiologique et son rôle dans le développement de thromboses ; ce type d'information peut être obtenu à l'aide des procédés immunochimiques. Mais le caractère polyclonal des anticorps conventionnels ne permet pas cependant la réalisation de type d'études.

Au cours des huit dernières années, le développement de la technique d'hybridation cellulaire (Köhler G. et Milstein C., Nature (London), 256:495, 1975) a ouvert des possibilités nouvelles pour la réalisation de ce type de travaux d'immunochimie fine : la production et l'utilisation d'anticorps monoclonaux monospécifiques. Dans ce type de techniques, le facteur limitant semble être le test de dépistage des hybrides produisant les anticorps de la spécificité désirée. En effet, l'immunisation des souris pouvant être effectuée avec de toutes petites quantités d'antigène semi-purifiés, les tests de détection mettant notamment en jeu des essais radio-immunologiques souvent désignés par l'expression et l'abréviation anglaises "radioimmunoassay" (RIA), demande l'utilisation de quantités beaucoup plus importantes de l'antigène purifié ; l'utilisation de produits semi-purifiés pouvant introduire des protéines "parasites", elle peut conduire à la sélection d'anticorps non désirés. Ceci est particulièrement problématique quand on utilise la même préparation antigénique aussi

bien pour l'immunisation que pour le test de détection. En raison des difficultés rencontrées (difficultés techniques et coûts) pour obtenir du t-PA purifié en quantités suffisantes pour son utilisation dans un RIA, l'utilisation d'un tel test pour la détection d'anticorps monoclonaux anti-t-PA s'est avérée presque impossible. C'est ainsi que la plupart des auteurs (Kalil et al, Prot. Biol. Fluids 28:587, 1980, Kaltorft K. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 3720, 1982 ; et NIELSEN L.S. et al, Embo J., 2, 1983) désirant fabriquer des anticorps monoclonaux anti-t-PA ont été obligés de choisir un test d'inhibition de l'activité enzymatique. ces tests anti-activité permettent de choisir uniquement des anticorps dirigés contre des épitopes localisés au niveau du site actif de la protéine ou situés de façon très proche de celui-ci. Mais l'obtention d'anticorps dirigés contre d'autres épitopes de la molécule n'a guère pu être envisagée jusqu'à ce jour. Il n'existe donc guère encore de techniques qui pourraient donner accès à l'étude de la configuration structurale de la molécule plasmatique ou d'origine endothéliale, à la réalisation d'études cytochimiques, au développement d'un "radioimmunoassay" pour l'activateur vasculaire et sondes de détection de l'activateur dans des études de biologie moléculaire et de génie génétique.

L'invention a pour but de remédier aux difficultés qui ont été évoquées ci-dessus et plus particulièrement de fournir des moyens permettant à la fois d'extraire et de doser quantitativement des t-PA initialement contenus dans des échantillons biologiques, notamment des plasmas ou fractions enrichies de plasmas, telles que des euglobulines, et en outre de mettre à la disposition des spécialistes un matériel permettant de mettre en oeuvre de façon pratique les propriétés, par exemple enzymatiques ou immunologiques du t-PA, même lorsque celui-ci n'est isolé ou isolable qu'en quantités

infimes.

Le moyen principal selon l'invention consiste en une pellicule moléculaire supportée d'un réseau de fibrine en phase solide, de préférence fixée de façon covalente à la surface - ou en certaines régions de la surface - d'un support.

Dans une forme avantageuse de l'invention, la pellicule du réseau de fibrine est fixée à au moins certaines régions de la surface du support par l'intermédiaire d'un réseau de polyglutaraldéhyde, lui-même fixé à ce support.

Avantageusement, le support consiste en une plaque de titration comprenant un ou plusieurs godets, les surfaces intérieures de ces godets définissant les régions sur lesquelles sont formées des pellicules moléculaires du réseau de fibrine selon l'invention. La plaque de titration peut être constituée en toute matière appropriée à laquelle le polyglutaraldéhyde peut être fixé directement ou indirectement, par des liaisons covalentes ou non, cependant stables. Un tel résultat peut être obtenu plus particulièrement avec des supports en matière plastique, de préférence le chlorure de polyvinyle ou le polystyrène. On constate en effet qu'il est possible de réaliser des pellicules fixées de façon extrêmement stable à des surfaces de polyvinyle, par exemple par incubation d'une solution de glutaraldéhyde au contact de ces surfaces. Du fibrinogène peut alors être déposé sur ces surfaces ou régions de surfaces, notamment à partir d'une solution de fibrinogène dont on a constaté la capacité de réagir avec les fonctions libres du glutaraldéhyde, notamment les fonctions aldéhyde, sans perdre en aucune façon ses propriétés de fibrinoformation. En particulier, la conservation de cette caractéristique se manifeste par la capacité du fibrinogène d'être transformé en fibrine par incubation en présence de thrombine à la température et dans les

conditions appropriées pour former une pellicule moléculaire, voire même monomoléculaire, dans lesquelles sont néanmoins reconstituées des caractéristiques structurales de la fibrine sous la forme d'un polymère constituant un réseau (tel qu'on le trouve dans les caillots).

La pellicule moléculaire supportée de l'invention met à profit la propriété fondamentale de l'activateur endothélial du plasminogène, d'être adsorbé sur un réseau de fibrine lui permettant d'exprimer son activité enzymatique. Ceci permet, dans les conditions appropriées de détecter uniquement l'activateur endothélial à l'exclusion d'autres activateurs n'ayant pas cette propriété physiologique. En outre, cette pellicule moléculaire peut être mise en oeuvre dans des tests effectués en phase solide sur un réseau moléculaire de fibrine et non en phase liquide, qui ne détecteront pas les activateurs de type urokinase. Il a en effet été constaté que le réseau de fibrine de la pellicule ou couche moléculaire est en tous points comparable à la fibrine générée dans le plasma par activation de la coagulation. C'est d'ailleurs la capacité de cette pellicule de fibrine de fixer le t-PA de façon sélective qui atteste de la structure en réseau typique de la fibrine que possède ladite pellicule.

Cette fixation sélective est également quantitative en ce qu'elle est détectable dans sa totalité par sa capacité à être pratiquement entièrement impliquée dans l'activation du plasminogène qui peut être amené à son contact, notamment à l'intérieur d'un godet de microplaque, la quantité de plasminogène activé pouvant à son tour être détectée in situ, par exemple à l'aide de tout substrat synthétique transformable par la plasmine.

L'invention surmonte complètement l'inconvénient mentionné plus haut qui résidait dans la diffusion incontrôlée de t-PA dans l'épaisseur des plaques de fibrine

qui étaient utilisées jusqu'à ce jour. C'est en outre la totalité du t-PA adsorbé aux surfaces intérieures limitées des godets des plaques de titration qui est mise en jeu dans la réaction ultérieure avec une solution de plasminogène, de sorte que la proportion de plasminogène
5 alors activée (dosable par un substrat synthétique) est directement corrélable à la quantité de t-PA retenue dans le godet concerné.

Comme il résulte déjà de ce qui précède, la pellicule selon l'invention est moléculaire, voire monomoléculaire. En particulier, elle comprend d'environ 50 à environ 500 ng de fibrine par cm^2 de surface, de préférence de 120 à 180, par exemple de 145 à 150 ng de fibrine par cm^2 de surface. On appréciera que des proportions de fibrine plus faibles que les valeurs inférieures des limites sus-indiquées pourraient résulter en l'absence de la formation d'un "réseau", absence qui se manifesterait par l'absence d'adsorption possible du t-PA, dans les conditions sus-indiquées ou encore dans
15 celles qui seront illustrées plus loin à titre d'exemples.

Les taux maximum de fibrine par unité de surface seront en général limités par le nombre des points de fixation, notamment par l'intermédiaire de groupes fonctionnels disponibles à la surface du support et qui interviennent dans la fixation des molécules de fibrinogène amenées au contact de cette surface, par l'intermédiaire de groupes fonctionnels complémentaires portés par le fibrinogène.

Les réseaux de fibrine pelliculaires de l'invention peuvent être mis en oeuvre pour le dosage de t-PA (même non purifié) provenant des sources les plus diverses : surnageant de cellules endothéliales en culture, surnageant de glomeruli isolés, et suspensions d'euglobulines. On peut également utiliser le plasma
35 humain complet, ce qui jusqu'à présent n'était guère

possible.

Le t-PA absorbé sur la fibrine en phase solide peut, après élimination par lavages des contaminants et des inhibiteurs, être ensuite détecté par activation du plasminogène à l'aide d'un substrat synthétique sensible à la plasmine (méthode indirecte) ; l'utilisation d'un substrat synthétique sensible au t-PA permettrait un dosage direct.

La lecture spectrophotométrique de la réaction (libération de paranitroanilide de substrats synthétiques tels que le dihydrochlorure de H-D-isoleucyl-L-prolyl-L-arginine-p-nitroanilide (substrat S-2288) ou le dihydrochlorure de H-D-valyl-L-leucyl-L-lysine nitroanilide (substrat S-2251), tous deux commercialisés par AB KABI) est effectuée à 405 nm de longueur d'onde. Ces lectures pourront être transformées en unités fibrinolytiques en faisant référence à un étalon international de t-PA.

Les réseaux de fibrine pelliculaires selon l'invention permettent non seulement des dosages quantitatifs de t-PA, par exemple dans les conditions sus-indiquées, mais également et à l'inverse le dosage quantitatif de plasminogène contenu dans des milieux biologiques semblables. Il est en effet observé que la pellicule de fibrine selon l'invention peut également adsorber du plasminogène, notamment par retenue sur la fibrine, en des sites de fixation distincts de ceux du ou des t-PA. Le dosage du plasminogène adsorbé peut alors intervenir par activation de ce dernier, par l'intermédiaire de l'un de ses activateurs, qu'il s'agisse d'un t-PA approprié ou d'un activateur non adsorbé, tel que l'urokinase ou la streptokinase. Le dosage du plasminogène ainsi activé peut mettre en jeu les substrats sus-indiqués.

Le réseau de fibrine selon l'invention non seulement permet la rétention rigoureusement sélective des

t-PA (ou de plasminogènes), en vue de leur dosage, mais rend d'une façon générale ces derniers accessibles aux réactifs susceptibles de les activer ou de façon plus générale encore de réagir avec eux. A ce titre, 5 l'invention concerne par conséquent également le matériau obtenu en tant que tel, à savoir la pellicule que forme le réseau de fibrine, retenant par adsorption sélective un activateur tissulaire du plasminogène (ou la pellicule comportant un complexe fibrine-t-PA). Le 10 niveau de pureté atteint est tel que l'ensemble du matériau est par exemple utilisable en tant que réactif pour la détection spécifique d'anticorps anti-t-PA. C'est une telle propriété qui est à la base de l'une des applications préférées du matériau selon l'invention, 15 savoir la détection d'anticorps monoclonaux rigoureusement spécifiques du t-PA. L'invention ouvre par conséquent tout un champ d'investigation, celui de la détection et de l'étude de divers épitopes du t-PA, qu'il s'agisse de sites actifs ou non de l'enzyme.

20 Les complexes fibrine-t-PA supportés de l'invention peuvent donc être mis en oeuvre dans la réalisation de tests spécifiques, très sensibles et de réalisation rapide, pour la détection d'anticorps monoclonaux anti-t-PA dirigés contre les divers épitopes de 25 cette molécule et non seulement contre le site actif. Ces tests peuvent être réalisés sous la forme de "radio-immunoassay" (RIA) utilisant un deuxième anticorps (habituellement des immunoglobulines de mouton anti-immunoglobuline de souris : GamIg, de l'anglais "goat-anti-mouse immunoglobulin") marqué à l'iode 125, ou sous la 30 forme d'un essai immunoenzymatique (ELISA : de l'anglais "enzyme-linked immunosorbent assay") en utilisant du GamIg conjugué à une enzyme, par exemple à la peroxydase ou à la phosphatase alcaline. Il va de soi que 35 l'invention n'est pas limitée à la nature du marqueur utilisé.

La sensibilité du test est liée à l'absorption sélective et de très haute affinité du t-PA sur un support de fibrine en phase solide. Ceci, comme dans l'inter-action physiologique fibrine-t-PA, proportionne
5 une structure moléculaire qui conserve ses caractéristiques antigéniques et fonctionnelles. Cet "immunoassay" est basé sur la capacité du complexe fibrine-t-PA à détecter des anticorps anti-t-PA présents soit dans du sérum, soit dans des surnageants de culture des hybri-
10 domes.

Il va de soi que l'on s'assurera dans tous les cas de l'absence préalable de tout contaminant possible adsorbé de façon non spécifique, tel que des sérums albumine ou certains facteurs de coagulation, ceux-ci
15 pouvant être éliminés par lavage des surfaces supportant les pellicules du complexe fibrine-t-PA avec les tampons appropriés. Le cas échéant, les surfaces seront également traitées avec une solution de lysine, dont est connue la capacité de se substituer à d'éventuelles traces
20 de plasminogène ou plasmine, éventuellement adsorbées par l'intermédiaire de groupes lysine sur lesdites surfaces.

L'invention concerne également le procédé de fabrication d'une pellicule moléculaire de fibrine en réseau, ce procédé comprenant les étapes qui consistent à
25 mettre en contact une solution de fibrinogène avec du glutaraldéhyde adsorbé ou fixé à la surface d'un support, notamment en matière plastique et, de préférence, en chlorure de vinyle, puis à faire réagir la pellicule retenue de fibrinogène avec de la thrombine ou analogue
30 dans des conditions propices à l'activation in situ du fibrinogène en fibrine insoluble, pour former la susdite pellicule de fibrine en réseau.

Avantageusement, les quantités de glutaraldéhyde
35 initialement fixées ou adsorbées sur les régions ou surfaces du support et les concentrations ou quantités de

fibrinogène contenues dans les solutions amenées au contact desdites régions ou surfaces sont réglées de façon à obtenir en définitive une concentration de 120 à 180, de préférence de 145 à 150 nanogrammes de fibrine par cm^2 de surface. A ce titre, l'invention concerne également les pellicules supportées de fibrinogène elles-mêmes, ces pellicules comportant de préférence des doses par cm^2 de fibrinogène équivalentes à celles qui ont été indiquées pour la fibrine.

Le couplage du fibrinogène à une surface portant des groupes polyglutaraldéhyde est de préférence réalisé à une température comprise entre 0°C et la température ambiante, de préférence à une température inférieure à 10°C , par exemple à 4°C , le contact étant maintenu pendant le temps requis pour le couplage. Il est avantageux, pour réaliser le dépôt du fibrinogène, d'avoir recours à des solutions qui permettront la "saturation" de la surface, par exemple des solutions contenant de 50 à 200 microgrammes, avantageusement 100 microgrammes, par millilitre de fibrinogène. Le pH intervient peu au niveau du couplage du fibrinogène. Il a cependant été constaté que les adsorptions de t-PA les plus efficaces étaient obtenues lorsque la fixation initiale du fibrinogène sur lesdites surfaces avait été réalisée avec des solutions ayant un pH légèrement basique, notamment compris entre 7 et 9,5, de préférence de l'ordre de 8,5.

L'utilisation de polyglutaraldéhyde pour réaliser le pontage entre la surface support et la pellicule de fibrinogène est particulièrement avantageuse. On peut utiliser toute méthode connue pour réaliser des dépôts de polyglutaraldéhyde sur les surfaces en cause. A titre d'exemple, on mentionnera celle décrite par MONZAN et al, 1975, Biochimie 57, 1281. Le glutaraldéhyde permet la fixation chimique du fibrinogène, par l'intermédiaire de liaisons imine stabilisées par résonance avec des

liaisons éthyléniques. La distribution des groupes aldéhyde sur le polymère et la flexibilité de ce dernier favorisent les liaisons covalentes par l'intermédiaire des groupes amine du fibrinogène, sans sensiblement
5 perturber la structure moléculaire de ce dernier.

Il va de soi que la formation d'un réseau d'abord de fibrinogène, puis de fibrine en une mince pellicule peut être réalisée à l'aide de tout autre agent, lui-même fixé et retenu sur un support, et permettant ensuite le couplage ou pontage, direct ou indirect, avec le fibrinogène, dès lors que ce couplage met en jeu des fonctions chimiques portées par le fibrinogène qui ne modifient pas la propriété majeure que celui-ci possède d'être ultérieurement activé en fibrine insoluble, sous l'action de la thrombine ou de
10 tout autre agent susceptible de conduire au même résultat. D'une façon générale, on peut mettre en oeuvre toute surface porteuse de suffisamment de fonctions libres réactives avec la fibrinogène pour en retenir des
15 quantités suffisantes pour former une pellicule moléculaire dans les conditions qui ont été décrites plus haut. Par exemple, on peut aussi avoir recours aux techniques classiques de fixation covalentes mettant en jeu le bromure de cyanogène. On peut également envisager
20 l'utilisation de surfaces sur lesquelles auront été préadsorbées ou fixées des protéines dans des conditions assurant la présence ainsi formée de groupes carboxyliques, lesquels peuvent alors être combinés chimiquement à tout groupe amine du fibrinogène, par
25 l'intermédiaire d'agents de couplage du type de ceux qui sont utilisés dans les techniques de synthèse des protéines pour former des liaisons CO-NH. Il résulte clairement de ce qui précède que l'invention réside essentiellement dans la formation des susdites
30 pellicules de fibrinogène, puis de fibrine présentant les caractéristiques qui ont été définies plus haut.
35

Des caractéristiques supplémentaires de l'invention apparaîtront encore à la lumière des exemples qui suivront de la fabrication de pellicules supportées de fibrine en réseau et des conditions dans lesquelles

5 celles-ci sont susceptibles d'être mises en oeuvre. Dans chaque cas, on présentera d'abord les matières et matériels qui sont mis en oeuvre. Il sera également fait référence dans ce qui suit aux dessins dans lesquels :

10 - la fig. 1 est une courbe représentative des variations d'absorbance (axe des ordonnées à droite) et des taux correspondants de t-PA fixés (en mU sur l'axe des ordonnées de droite) en fonction des teneurs en t-PA de solutions mises en contact avec une pellicule conforme à l'invention formée dans les godets d'une microplaque, en

15 fonction de la teneur en t-PA des solutions utilisées (en I.U./ml sur l'axe des abscisses) ;

- la fig. 2 représente de façon schématique les différentes étapes impliquées dans les fixations sur une pellicule de fibrine conforme à l'invention de t-PA,

20 d'anticorps formés contre le t-PA et dans la détection de ces anticorps ;

- la fig. 3 est représentative dans des conditions semblables d'un test visant à distinguer la nature des anticorps monoclonaux susceptibles d'être retenus sur une

25 pellicule conforme à l'invention.

EXEMPLE I : Application au dosage quantitatif du t-PA.

a) Matériel

1. Phase solide : plaques de microtitration en chlorure de polyvinyle (CPV), 96 godets en U (DYNATECH LABS).
2. Fibrinogène humain purifié à partir du fibrinogène humain grade L (KABI LABS chez FLOW LABS), par précipitation à l'éthanol, et par chromatographie sur lysine-sépharose et gélatine-sépharose.
3. Thrombine bovine (HOFFMANN-LA ROCHE).
4. Glutaraldéhyde (TAAB LABS.).

5. Plasminogène humain (KABI LABS.).
6. Substrats synthétiques S-2251 (KABI LABS) ; CBS. 3308 (Diagnostica stago).
7. tampons :
 - 5 A. Carbonate/bicarbonate 0,1 M pH 9,5
 - B. Carbonate/bicarbonate 0,1 M pH 8,5
 - C. Phosphate 5 mM 6,8 contenant 0,5 M NaCl
 - D. Phosphate 5 mM pH 6,8
 - E. Phosphate 50 mM pH 6,8
 - 10 F. PBS-BSA (1 mg/ml)-Tween 20 (0,05 %)
 - G. PBS-BSA-Tween 20-EDTA 1 mM.
8. Sources de t-PA
 - a. Surnageants de cultures cellulaires
 - b. Euglobulines plasmatiques
 - 15 c. Plasma
 - d. Autres sources d'activateur tissulaire.
- b) Fabrication du réseau de fibrine en phase solide
 1. 200 microlitres de tampon A sont déposés dans chaque godet de la plaque CPV. On incube pendant 30 minutes
 - 20 à la température de la pièce (22°C). La plaque est vidée.
 2. 100 microlitres de glutaraldéhyde 2,5 % dans du tampon A sont déposés dans chaque godet et incubés pendant deux heures à 22°C. La plaque est vidée et
 - 25 rincée trois fois à l'eau distillée.
 3. 100 microlitres d'une solution dans le tampon B de 100 microgrammes de fibrinogène par millilitre contenant 2 mM CaCl_2 sont déposés dans chaque godet. Incubation pendant 18 heures à +4°C.
 - 30 4. Le fibrinogène non fixé est retiré et la plaque est lavée une fois avec le tampon F. 100 microlitres d'une solution de thrombine 10 N.I.H. unités par millilitre dans du tampon G et contenant 2 mM CaCl_2 sont déposés dans chaque godet. Incubation 30 mi-
 - 35 nutes à 37°C.
 5. On effectue trois lavages avec du tampon C avec un

temps de rinçage de 5 minutes entre chaque lavage.

6. On effectue trois lavages avec le tampon D et un dernier lavage avec le tampon F.

La plaque est prête et elle peut être conservée à ce stade en ajoutant 100 microlitres de tampon F contenant 0,01 % d'azoture de sodium dans chaque godet.

c) Réalisation du test

1. La plaque est vidée et on effectue trois lavages avec du tampon E.
2. On effectue une dilution des euglobulines ou de la source de t-PA à tester, dans du tampon E. La source de t-PA est, par exemple, constituée par un plasma veineux prélevé chez un patient, après stimulation des cellules endothéliales, notamment comme suite au placement d'un garrot (préalablement à la réalisation du prélèvement). On ajoute 100 microlitres de cette solution dans les godets et on incube pendant 1 heure à 37°C. Cette dilution tient compte des capacités d'adsorption éventuelle du t-PA par la pellicule de fibrine mise en oeuvre.
3. La plaque est vidée et lavée trois fois avec du tampon F.
4. Les réactifs de la réaction sont ajoutés dans l'ordre suivant :
 - a. 50 microlitres tampon 50 mM Tris, 12 mM NaCl pH 7,4,
 - b. 25 microlitres plasminogène (60 microgrammes/millilitre) dans du tampon Tris-NaCl,
 - c. 25 microlitres 2 mM S-2251 ou CBS-3308.
5. La plaque est protégée avec un plastique adhésif et on la maintient à 37°C pendant 1 heure.
6. On "lit" ensuite la réaction à 405 nm en utilisant un lecteur micro-ELISA.
7. On rapporte les résultats en unités d'absorbance à 405 nm et on les compare à des lectures préalablement obtenues avec des témoins normaux et avec des

solutions qui contenaient des quantités connues de t-PA.

Les résultats peuvent également être rapportés en unités fibrinolytiques par rapport à une courbe effectuée avec un standard international de t-PA.

La fig. 1 est représentative des résultats qui peuvent être obtenus avec une pellicule type de fibrine mise en contact avec des solutions types de t-PA, dans les conditions qui ont été indiquées plus haut. Il résulte également de cette courbe qu'à partir d'une certaine dose de t-PA, une saturation des pellicules de fibrine formées dans chacun des godets de la microplaque peut être observée, d'où la dilution éventuellement nécessaire de l'échantillon à tester, comme on l'indiquait plus haut dans le paragraphe c)2. Par exemple ces dilutions sont ajustées de façon à ce qu'elles puissent a priori être considérées comme étant comprises entre 1 et 10 I.U./ml.

EXEMPLE II : Application à la détection d'anticorps
monoclonaux dirigés contre des épitopes
du t-PA.

a) Matériel

1. Plaques de microtitration en chlorure de polyvinyle (CPV), 96 godets en U (DYNATECH LABS).
2. Fibrinogène humain purifié. Matériel de départ : fibrinogène humain KABI (FLOW LABS), purifié par précipitation à l'éthanol, chromatographie sur lysine sépharose et gélatine-sépharose.
3. Thrombine bovine (HOFFMANN-LA ROCHE).
4. Glutaraldéhyde (TAABS LABS).
5. tampons.
 - A. Carbonate/bicarbonate 0,1 M pH 9,5.
 - B. Carbonate/bicarbonate 0,1 M pH 8,5.
 - C. Phosphate 5 mM pH 6,8 contenant 0,5 M NaCl.
 - D. Phosphate 5 mM pH 6,8.

E. Phosphate 50 mM pH 6,8.

F. PBS-BSA (1 mg/ml)-Tween 20 (0,05 %) EDTA 1 mM.

6. t-PA de différentes origines, soit non purifié, soit semi-purifié, soit sous forme purifiée.

5 7. Immunoglobulines de mouton anti-immunoglobuline de souris (GamIg) marquée à l'iode 125 (AMERSHAM)) ou à la peroxydase (AMERSHAM).

b) Incorporation du complexe moléculaire t-PA-fibrine sur un support (phase solide).

10 1. 200 microlitres de tampon A sont déposés dans chacun des godets de la plaque CPV. Après 30 minutes à 22°C, la plaque est vidée.

2. 100 microlitres d'une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % dans du tampon A sont déposés dans chaque godet
15 et incubés à la température de la pièce (22°C) pendant 2 heures. La plaque est vidée et rincée trois fois à l'eau distillée.

3. 100 microlitres d'une solution de fibrinogène à 100 microgrammes par millilitre (dans le tampon B) contenant 2 mM CaCl_2 sont déposés dans chaque godet. Incu-
20 bation 18 heures à +4°C.

4. Le fibrinogène non fixé est retiré, la plaque lavée une fois avec du tampon F et 50 microlitres d'une solution de thrombine 10 N.I.H. unités par millilitre
25 dans du tampon F contenant 2 mM CaCl_2 sont déposés dans chaque godet. Incubation 30 minutes à 37°C.

5. On effectue trois lavages avec du tampon C (temps de rinçage de 5 minutes entre chaque lavage).

6. On effectue trois lavages avec du tampon D et un der-
30 nier lavage avec le tampon F. Ce support de fibrine en phase solide peut être conservé à ce stade en ajoutant 100 microlitres de tampon F contenant 0,01% d'azoture de sodium dans chacun des godets. Il est recommandé de former le complexe fibrine-t-PA juste
35 avant son utilisation pour le RIA.

7. On effectue un lavage avec le tampon E et on ajoute

50 microlitres d'une solution de t-PA dans le tampon E, contenant 10 U.I. par millilitre d'activateur. De préférence, la solution contient aussi de la lysine (par exemple à une concentration 20 mM) pour
5 prévenir toute absorption de plasminogène. On incube pendant la nuit (18 heures) à +4°C.

8. On retire le t-PA non fixé et on fait trois lavages avec le tampon F.

La plaque est prête pour l'immuno-assay.

10 c) Réalisation de l'immuno-assay (RIA ou ELISA).

On peut opérer, notamment comme suit, sur une plaque t-PA-fibrine-support CPV :

1. Dans chaque godet de la plaque, on ajoute 50 microlitres d'une dilution choisie de sérum de souris
15 immunisée avec du t-PA ou 50 microlitres d'un surnageant de culture d'un hybridome obtenu par fusion d'une lignée myélomateuse de souris avec les splénocytes d'une souris immunisée avec du t-PA. On incube pendant 1 heure à 37°C ou 18 heures à +4°C.

20 2. On effectue trois lavages avec le tampon F.

La détection des anticorps monoclonaux éventuellement fixés peut être réalisée selon l'une quelconque des méthodes qui suivent.

3. Pour le RIA :

25 a. On ajoute 50 microlitres (50.000 cpm) d'une dilution du GamIg marqué à l'iode 125. On incube pendant 1 heure à 37°C et on retire le GamIg non fixé.

b. On effectue six lavages avec du tampon F.

30 c. On vide et on sèche les plaques et, après avoir découpé les godets, on mesure la radioactivité liée au support solide.

La radioactivité liée est proportionnelle au titre de l'anticorps anti-t-PA présent dans le sérum ou
35 dans les surnageants de culture des hybridomes. Un blanc est effectué avec du tampon F ou du surnageant de cu-

ture de la lignée myélomateuse parentale.

4. Pour l'ELISA :

- a. On ajoute 50 microlitres d'une dilution appropriée d'un conjugué (habituellement 1:800) de GamIg et de peroxydase. On incube 1 heure à 37°C.
- b. On vide la plaque et on lave trois fois avec du tampon F.
- c. On ajoute 200 microlitres d'une solution 1 mM ABTS (2,2'-azino-di-3-éthylbenz-thiazoline-6-sulphonate) et on incube pendant 1 heure à 37°C.
- d. On lit la réaction à 405 nm à l'aide d'un lecteur pour réactions ELISA.

La fig. 2 fait apparaître les principales étapes de la sélection d'anticorps monoclonaux dans les conditions qui ont été indiquées ci-dessus.

On a représenté en (a) la surface activée par la glutaraldéhyde d'un godet d'une microplaque (PVC-GA), sur laquelle a au préalable été formée une pellicule de fibrine F.

En (b) a été schématisée une molécule de t-PA portant un site antigénique SA. Après mise en contact d'une solution contenant le t-PA avec la pellicule de fibrine, on peut constater la fixation des t-PA sur cette pellicule, comme schématisé en (c) de la fig. 2.

Par contact d'un surnageant d'hybridome contenant un anticorps monoclonal MoAb avec le t-PA fixé sur le réseau pelliculaire de fibrine, on obtient la fixation de l'anticorps monoclonal sur le t-PA comme schématisé en (b). La fixation de l'anticorps monoclonal est enfin détectée par un second anticorps AcM portant un marqueur radioactif ou enzymatique. Le résultat de la fixation du second anticorps est schématisé en (e) de la fig. 2. Après élimination des excédents de l'anticorps AcM, on constate la fixation éventuelle de l'anticorps monoclonal MoAb recherché après découpe du godet et introduction de celui-ci dans la cuve d'un détecteur de

radiations gamma ou d'un spectrophotomètre, selon la nature du marqueur utilisé. La spécificité de l'anticorps monoclonal MoAb peut faire l'objet de vérifications diverses.

5 On peut notamment vérifier qu'il ne se fixe pas sur une pellicule de fibrine formée sur une surface PVC-GA exempt de t-PA ou sur une surface sur laquelle aura été absorbée (de façon spécifique ou non) d'autres protéines telles que le plasminogène, la plasmine, des
10 sérums albumine ou des facteurs de coagulation en lieu et place du t-PA.

 Comme indiqué plus haut, les pellicules du réseau de fibrine retenant du t-PA permettent l'étude d'anticorps monoclonaux distincts et spécifiques de
15 sites antigéniques également distincts portés par le t-PA. La distinction des anticorps monoclonaux spécifiques intervenant dans l'activité du t-PA et de sites distincts peut naturellement être réalisée dans les conditions qui suivent, référence étant alors faite au
20 schéma de principe de la fig. 3.

 Un surnageant d'hybridome contenant l'anticorps monoclonal MoAb isolé selon la procédure sus-indiquée est mis en contact avec un anticorps GamIg, lui-même fixé sur un support, par exemple sur le support PVC-
25 GA (avant toute fixation de fibrinogène sur celui-ci). Cette étape est schématisée en (f) sur la fig. 3. Après saturation de la plaque avec de la sérum-albumine, on incube la plaque retenant les anticorps monoclonaux fixés avec une solution de t-PA (contenant par exemple
30 100 unités/ml de t-PA) pendant 1 heure à 37°C. L'opération correspondant à cette étape est schématisée en (g) dans la fig. 3. Le résultat de cette opération est schématisé en (h) de la fig. 3.

 On fait ensuite incuber la plaque retenant les
35 anticorps monoclonaux avec une solution de plasminogène

(Pg), de fibrine (Fn) et d'un substrat de la plasmine (par exemple S-2251) dans les conditions qui ont été indiquées plus haut. Ces anticorps monoclonaux obtenus, tous actifs contre le t-PA, sont alors considérés comme spécifiques ou
5 non spécifiques du site actif du t-PA, selon que l'on observe une activation ou une absence d'activation du plasminogène amené au contact de la plaque.

EXEMPLE III : Application au dosage quantitatif des plasminogènes.

10 Le réseau de fibrine en phase solide tel qu'obtenu par le procédé de fabrication décrit dans l'exemple I peut également être utilisé pour le dosage du plasminogène contenu dans un échantillon biologique, notamment dans un sérum sanguin. Celui-ci est notamment
15 susceptible d'être obtenu à partir de plasma (surnageant de sang après séparation de toutes les cellules) et après séparation de sa teneur en fibrinogène, de préférence sous forme de fibrine (par exemple après addition d'un sel de calcium ou de thrombine à ce plasma). Le sé-
20 rum peut aussi être obtenu directement à partir d'un prélèvement du sang, après séparation des caillots, une fois que ceux-ci se seront produits de façon spontanée et, éventuellement, d'autres cellules.

L'échantillon de sérum, éventuellement dilué
25 dans du tampon E, est mis à incuber pendant 1 heure, notamment à une température de 37°C, au contact des pellicules de fibrine formées dans les godets de la microplaque. Le plasminogène absorbé est ensuite activé par mise en contact avec une solution d'un activateur approprié, tel que l'urokinase ou la streptokinase. Après
30 lavage de la plaque, la plasmine produite in situ est alors dosée par introduction dans les godets de la plaque d'un substrat spécifique de l'enzyme, dans les conditions qui ont déjà été décrites plus haut. On peut
35 également ajouter l'activateur et le substrat simultanément et ensuite effectuer la lecture dans les condi-

tions qui ont été indiquées. Il pourra être avantageux d'apprécier les résultats de ces dosages vis-à-vis des résultats obtenus dans des conditions analogues dans les godets d'une plaque distincte dans les mêmes conditions que précédemment, si ce n'est que l'on omet l'étape d'activation par l'activateur extérieur tel que l'urokinase ou la streptokinase. Cette dernière mesure permet d'apprécier le bruit de fond éventuel produit par les traces de t-PA qui pouvaient éventuellement être contenues dans le sérum testé. Les résultats du premier dosage peuvent alors être corrigés à la lumière de ceux obtenus du fait de l'éventuelle activation partielle du plasminogène testé par les traces de t-PA endogène qu'il pouvait contenir initialement.

Les pellicules de réseau de fibrine conformes à l'invention peuvent comme dans le cas précédent également être mises en oeuvre pour la sélection d'anticorps spécifiques du plasminogène, plus particulièrement d'anticorps monoclonaux spécifiques.

Le spécialiste de ces techniques est naturellement à même d'apprécier les modifications qu'il convient d'apporter aux techniques qui ont été décrites dans l'exemple II, afin de les rendre applicables à la détection et à l'isolement d'anticorps monoclonaux spécifiques du plasminogène.

Il va naturellement de soi que les techniques qui ont été décrites s'appliquent tout aussi bien à des enzymes (fibrinogène, fibrine, activateur tissulaire du plasminogène, plasminogène, plasmine, etc.) d'origine humaine ou animale.

Comme il va de soi et comme il résulte d'ailleurs déjà de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes d'application et de réalisation qui ont été plus spécialement envisagés ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes.

REVENDICATIONS

1 - Pellicule moléculaire supportée d'un réseau de fibrine en phase solide formée à la surface d'un support et apte à retenir à sa surface un activateur tissulaire du plasminogène.

5 2 - Pellicule supportée selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est également apte à retenir à sa surface du plasminogène.

 3 - Pellicule supportée selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle comprend d'environ 50 à environ 500 ng/cm², de préférence de 120 à 180, et de façon particulièrement avantageuse, de 145 à 150 ng/cm² de fibrine.

 4 - Pellicule supportée selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle est fixée de façon covalente à au moins certaines régions de la surface du support, notamment par l'intermédiaire d'un réseau de polyglutaraldéhyde, lui-même fixé à la surface de ce support.

 5 - Pellicule supportée selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le support consiste en une plaque de titration en matière plastique, notamment en chlorure de vinyle ou polystyrène, comprenant un ou plusieurs godets et en ce que la pellicule moléculaire du réseau de fibrine est formée sur les surfaces internes des godets.

 6 - Pellicule supportée selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée par la fixation sélective à sa surface de l'activateur tissulaire du plasminogène, notamment sous la forme d'un complexe fibrine-activateur tissulaire.

 7 - Pellicule supportée selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée par la fixation sélective à sa surface de plasminogène, notamment sous la forme d'un complexe fibrine-plasminogène.

8 - Application de la pellicule supportée selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 au dosage spécifique et quantitatif de l'activité enzymatique d'un activateur tissulaire du plasminogène contenu dans un échantillon biologique, cette application comprenant la mise en contact de ladite pellicule supportée de fibrine avec l'échantillon biologique contenant l'activateur tissulaire à doser et, après lavage du support avec une solution tamponnée appropriée, la mise en contact de l'activateur fixé sur la pellicule avec un plasminogène et le dosage de la plasmine résultant de l'activation du plasminogène activé en plasmine par l'activateur tissulaire alors fixé sur la pellicule, notamment par l'intermédiaire d'un substrat naturel ou synthétique spécifique de la plasmine.

9 - Application de la pellicule supportée selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 au dosage spécifique et quantitatif du plasminogène contenu dans un échantillon biologique, notamment un sérum sanguin, cette application contenant la mise en contact de ladite pellicule supportée de fibrine avec l'échantillon biologique contenant le plasminogène à doser, après lavage du support avec une solution tamponnée appropriée, la mise en contact du plasminogène fixé sur la pellicule avec un activateur du plasminogène et le dosage de la plasmine libérée résultant de l'activation du plasminogène antérieurement fixé sur la pellicule, notamment par l'intermédiaire d'un substrat spécifique de la plasmine.

10 - Application de la pellicule supportée selon la revendication 6 à la détection d'anticorps anti-activateurs tissulaires du plasminogène comprenant la mise en contact de ladite pellicule avec une solution contenant lesdits anticorps et la détection des anticorps fixés à la surface de ladite pellicule.

11 - Application selon la revendication 10, caractérisée en ce que la susdite pellicule est appliquée

à la détection d'anticorps monoclonaux anti-activateurs du plasminogène, par mise en contact de ladite pellicule avec le surnageant d'une culture d'hybridomes sécréteurs de tels anticorps.

5 12 - Application de la pellicule supportée selon la revendication 7, à la détection d'anticorps, notamment d'anticorps monoclonaux anti-plasminogène, la mise en contact de la susdite pellicule avec une solution contenant les anticorps anti-plasminogène, notamment
10 d'un surnageant d'une culture d'hybridome sécréteur de tels anticorps, et la détection des anticorps fixés à la surface de ladite pellicule.

15 13 - Pellicule moléculaire supportée de fibrinogène pour la fabrication du support conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 7.

 14 - Pellicule moléculaire supportée de fibrinogène selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle comprend d'environ 50 à environ 500 ng/cm², de préférence de 120 à 180, et de façon particulièrement
20 avantageuse de 145 à 150 ng/cm² de fibrinogène.

