RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 500 166**
(A n'utiliser que pour les commandes de reproduction).

A1

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

(21) **N° 82 02669**

(54) **Réactif et procédé pour dosage immunologique d'antigènes.**

(51) Classification internationale (Int. Cl. ³). G 01 N 33/58.

(22) Date de dépôt..... 18 février 1982.
(33) (32) (31) Priorité revendiquée : *Japon, 18 février 1981, n° 22415.*

(41) Date de la mise à la disposition du public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 33 du 20-8-1982.

(71) Déposant : Société dite : MOCHIDA SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, résidant au Japon.

(72) Invention de : Takashi Kudo, Toshiyuki Sugawara et Ei Mochida.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Lavoix,
2, place d'Estienne-d'Orves, 75441 Paris Cedex 09.

Les progrès en immunochimie de ces dernières années ont conduit à des recherches poussées sur des anticorps encore peu connus dans le passé et on a étudié en détail le mécanisme gouvernant la production d'anticorps, les structures biochimiques et les propriétés des anticorps.

En 1975, C. Milstein et al ont réussi à produire un anticorps monoclonal par fusion cellulaire de cellules myélomateuses de souris avec des cellules de rate, produisant de des anticorps. L'anticorps monoclonal est supposé contribuer grandement au développement des recherches fondamentales en immunologie, et des études dans ce domaine ont été sérieusement entreprises.

On a déjà utilisé le dosage enzymo-immunologique(EIA) comme méthode de dosage immunologique très sensible et quantitative. En particulier, la méthode du "sandwich" basée sur ce dosage est fréquemment utilisée en raison de la simplicité du procédé et de sa sensibilité élevée. Cependant, étant donné que la méthode du "sandwich" demande de 1 à 4 jours pour la réaction, il est souhaitable de réduire le temps de réaction nécessaire. De plus, en raison des récents progrès en médecine clinique, une évaluation rapide des résultats d'essai est demandée pour donner un traitement immédiat au patient. De ce point de vue également, une réduction du temps de réaction est sérieusement désirée. Mais, selon la méthode classique du sandwich, une réduction du temps de réaction se traduit par une diminution de la sensibilité et de la précision du dosage, comme on l'expliquera ci-après, de sorte qu'il n'est pas possible de réduire le temps de réaction de façon significative.

La méthode du sandwich, classique, sera maintenant décrite en détail. Bien que la méthode soit expliquée en rapport avec l'EIA tout au cours de cette demande, dans un but de commodité, l'explication peut s'appliquer également à la méthode basée sur le dosage fluoroimmunologique (FIA).

La méthode du sandwich, classique, est effectuée selon la séquence suivante, illustrée sur le schéma de la figure 1 des dessins annexés.

i) On fait réagir un anticorps insolubilisé 2', obtenu par fixation d'un anticorps opposé à un antigène 3 à doser sur un support insoluble (phase solide) 4, avec l'antigène 3 pour fixer l'antigène 3 de l'anticorps 2' sur la phase solide (première réaction).

ii) On lave la phase solide 4 pour éliminer les substances qui n'ont pas réagi.

iii) On fait réagir la phase solide 4 ainsi lavée avec un anticorps marqué 1', obtenu en fixant une enzyme 5 sur un anticorps opposé à l'antigène 3 à doser, pour fixer l'anticorps marqué 1' avec un site anti énique libre de l'antigène 3 qui a été fixé sur la phase solide 4 (deuxième réaction).

iv) On lave la phase solide 4 pour éliminer l'excès d'anticorps marqué 1', puis on ajoute un substrat pour l'enzyme et on soumet à une réaction enzymatique.

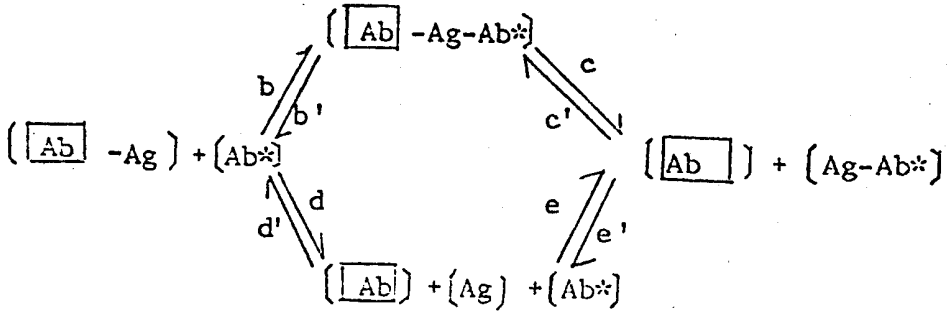
Etant donné que l'antigène 3 et l'anticorps marqué 1' ont été fixés sur la phase solide 4, la réaction enzymatique est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente. La quantité d'antigène 3 à doser est déterminée à partir de la quantité du produit de réaction résultant.

Etant donné que la méthode du sandwich est généralement classée comme un dosage non-compétitif, on peut supposer qu'elle n'implique pas de réaction compétitive. Mais, cette classification n'exprime pas nécessairement l'état exact des réactions. C'est ainsi qu'en fait, un état d'équilibre peut exister dans la méthode du sandwich, tel qu'il est illustré schématiquement ci-dessous.

Première réaction:

$$\left(\boxed{Ab}\right) + \left(Ag\right) \underset{a'}{\overset{a}{\rightleftharpoons}} \left(\boxed{Ab} - Ag\right) \qquad a \gg a'$$

Deuxième réaction:



(Dans le schéma ci-dessus, [Ab] représente l'anticorps insolubilisé; Ag représente l'antigène à doser, Ab^* représente l'anticorps marqué; a, a', b, b', c, c', d, d', e et e' représentent les constantes d'équilibre; et - indique que l'antigène et l'anticorps sont reliés ensemble).

Lorsque le complexe de l'anticorps insolubilisé et de l'antigène à doser réagit avec l'anticorps marqué dans la deuxième réaction, l'anticorps insolubilisé et l'anticorps marqué se fixent compétitivement sur l'antigène à doser selon leur affinité pour l'antigène (étant donné que les propriétés de l'anticorps solubilisé et de l'anticorps marqué sont presqu'identiques, leurs taux d'affinité pour l'antigène à doser sont considérés comme presqu'équivalents) et en raison de la compétition, le complexe anticorps insolubilisé-antigène formé par la première réaction se dissocie en formant des complexes de diverse combinaison, tel que montré ci-dessus.

Ceci est mis en évidence par l'expérience suivante.

On fait réagir un tube à essai en matière plastique sur lequel est fixé un anticorps anti-sous-unité β de l'HCG avec de l'HCG-β (HCG = gonadotrophine chorionique humaine) marquée avec de la peroxydase, puis on lave. Lorsqu'elle réagit avec un anticorps anti-HCG-β, la HCG-β marquée avec une enzyme qui a été fixée sur la phase solide, se dissocie

peu à peu de la phase solide et migre dans la phase liquide. Cet état est illustré sur la figure 2 des dessins annexés.

Toutefois, si le temps de la première réaction est suffisamment long, la liaison entre l'antigène et l'anticorps devient partiellement irréversible et le complexe antigène-anticorps ne se dissocie pas facilement, même lorsqu'on y ajoute l'anticorps marqué. On sait d'autre part que si le temps de la deuxième réaction devient suffisamment long, la réaction conduit à la formation d'un complexe de" l"anticorps insolubilisé, l'antigène à doser et l'anticorps marqué". Pour ces raisons, il est indispensable dans la méthode du sandwich, classique, de poursuivre la réaction pendant un temps suffisamment long. En conséquence, si la méthode du sandwich est effectuée sans la première réaction ou si la durée de temps de la première réaction est extrêmement réduite (par exemple, lorsque l'anticorps insolubilisé et l'anticorps marqué réagissent simultanément avec l'antigène à doser), la deuxième réaction doit être prolongée et la sensibilité et la précision du dosage sont cependant moindres. Si la durée de la deuxième réaction est réduite, la sensibilité et la précision sont encore plus réduites. C'est pourquoi il a été impossible dans la méthode classique de réduire le temps de réaction sans entraîner une diminution de la sensibilité et de la précision. A cet égard, Ichihara et al (The Japanese Journal of Clinical Pathology 26, 1027 (1978)) ont rapporté qu' une telle réaction compétitive existe bien et que la réaction ne devient partiellement irréversible que si la réaction est poursuivie suffisamment longtemps.

C'est ainsi que le système de réaction dans la méthode classique est compliqué et inefficace et demande un long temps de réaction.

La présente invention a pour objet de fournir un réactif pour un dosage immunologique qui permet une réduction remarquable du temps requis pour le dosage sans diminuer la sensibilité et la précision.

Spécifiquement, la présente invention a pour objet de fournir un réactif pour la méthode du sandwich, qui comprend un anticorps insolubilisé et un anticorps marqué préparés à partir d'anticorps monoclonaux.

L'invention a encore pour objet de fournir une méthode du sandwich perfectionnée qui permet une réduction remarquable du temps requis pour un dosage, sans diminuer la sensibilité et la précision.

La figure 1 des dessins annexés représente un schéma illustrant le mode de réaction dans une méthode du sandwich classique,

les figures 2 et 3 sont des diagrammes montrant la présence ou l'absence de compétition entre les anticorps,

la figure 4 est un diagramme montrant le mode de réaction conformément à l'invention ,

la figure 5 représente un diagramme illustrant une comparaison entre la présente invention et la méthode classique,

la figure 6 est un diagramme montrant les résultats de l'exemple 1 ,

la figure 7 est un diagramme montrant les résultats de l'exemple 2, et

la figure 8 est un diagramme montrant les résultats de l'exemple 3.

Les buts ci-dessus de l'invention sont atteints en utilisant des anticorps monoclonaux pour préparer un anticorps insoluble et un anticorps marqué qui se distinguent et se fixent à différents déterminants antigéniques sur le même antigène, alors que, dans la méthode classique, on utilise des anticorps dits polyclonaux (obtenus à partir d'animaux immunisés avec le même antigène) pour préparer ces deux anticorps , de sorte qu'ils entrent en compétition pour les mêmes déterminants antigéniques de l'antigène.

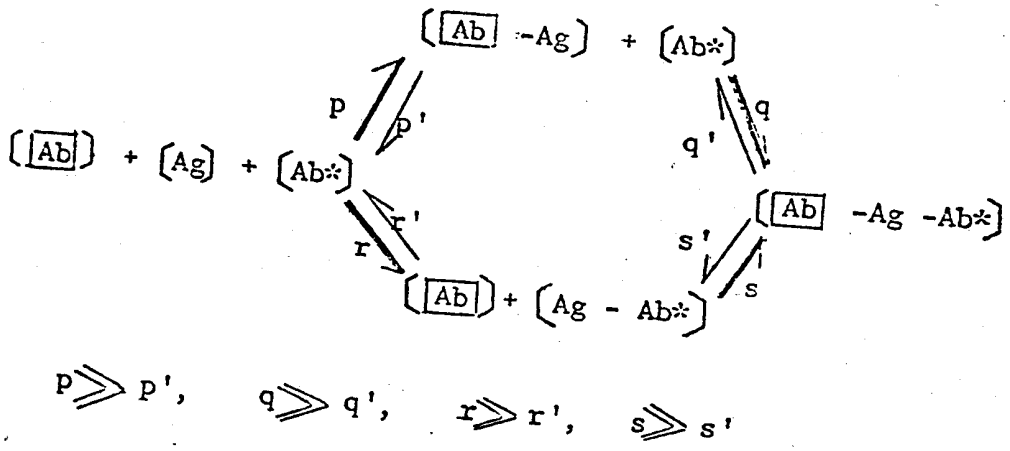
C'est ainsi que l'invention est caractérisée en ce que l'anticorps insolubilisé et l'anticorps marqué comprennent respectivement des anticorps capables de reconnaître, et de

se fixer sur différents déterminants antigéniques du même antigène à doser, ou ils comprennent des anticorps qui distinguent les différents déterminants antigéniques de l'antigène de sorte qu'il est possible d'obtenir que les deux anticorps respectifs se fixent sur différents sites antigéniques sur le même antigène à une distance suffisante l'un de l'autre de façon à ne pas perturber la fixation de l'autre.

Comme exemples de tels anticorps, les anticorps monoclonaux s'avèrent les mieux appropriés.

Les anticorps monoclonaux sont obtenus par une fusion cellulaire entre des cellules myélomateuses et des cellules produisant des anticorps par le procédé de Milstein et al (Nature, 256, 495 (1975)). Du fait que ces anticorps sont produits à partir de cellules produisant des anticorps d'un clone unique, ils sont totalement homogènes et leur spécificité pour les déterminants antigéniques est totalement identique. Comme l'antigène à doser comporte généralement plusieurs déterminants antigéniques, si on utilise des anticorps monoclonaux capables de reconnaître, et de se fixer sur, différents déterminants antigéniques de l'antigène, comme anticorps insolubilisé et anticorps marqué, il n'existe aucune compétition entre ces anticorps et on peut parvenir à un dosage très spécifique de l'antigène. C'est ainsi qu'on peut utiliser également un mélange de deux, ou plus de deux, anticorps monoclonaux qui se fixent sur différents déterminants antigéniques, comme anticorps insolubilisé et/ou anticorps marqué, à condition que ces anticorps n'engendrent pas une telle compétition.

Le dosage selon l'invention peut être effectué de la même manière que dans la technique antérieure. On doit souligner, cependant, que le mécanisme de réaction est alors plus simple que dans la méthode classique car l'anticorps insolubilisé n'entre pas en compétition avec l'anticorps marqué, tel que montré ci-dessous.



$p \gg p'$, $q \gg q'$, $r \gg r'$, $s \gg s'$

($\overline{Ab}$, Ag, Ab* et - ont les mêmes significations que ci-dessus, et p, p', q, q', r, r', s, s' représentent respectivement des constantes d'équilibre).

Comme il n'existe pas de compétition entre l'anticorps insolubilisé et l'anticorps marqué lorsqu'ils ont différents sites de fixation sur un antigène, la réaction se déroule de telle sorte que les constituants dans la solution de réaction forment un complexe "anticorps insolubilisé - antigène - anticorps marqué".

Ceci peut être mis en évidence par l'expérience suivante. Dans le même système de réaction que la méthode du sandwich classique, on utilise deux anticorps anti-HCG monoclonaux différents, capables de reconnaître différents déterminants antigéniques de HCG, en tant qu'anticorps insolubilisé et anticorps marqué et on effectue l'expérience de la même manière. Tel que représenté sur la figure 3, le résultat indique qu'une fois que l'antigène est fixé sur l'anticorps insolubilisé, il ne se dissocie pas de l'anticorps insolubilisé (phase solide) lorsqu'on y ajoute un anticorps anti-HCG correspondant à des déterminants antigéniques différents. C'est ainsi qu'il est évident qu'il ne se produit pas de compétition entre les anticorps pour de mêmes sites antigéniques. En conséquence, selon l'invention, on

obtient des résultats semblables lorsque l'anticorps insolubilisé, l'antigène à doser et l'anticorps marqué réagissent simultanément, ou lorsque l'anticorps insolubilisé et l'antigène sont d'abord mélangés, puis réagissent avec l'anticorps marqué, ou lorsque l'anticorps insolubilisé réagit avec l'antigène et quelques temps après on fait réagir le mélange avec l'anticorps marqué. C'est ainsi qu'il n'y a aucune restriction quant à la séquence réactionnelle.

La réaction effectuée selon l'invention est illustrée par un schéma sur la figure 4. Etant donné que l'anticorps insolubilisé 2 et l'anticorps marqué 1 n'entrent pas mutuellement en compétition, une plus grande quantité de l'anticorps marqué 1 peut se fixer sur l'antigène 3 en une plus courte période de temps, et il devient alors possible non seulement de réduire la durée du dosage, mais également d'augmenter la précision et la sensibilité du dosage.

Le tableau 1 résume les avantages du procédé selon l'invention par rapport à la méthode classique utilisant des anticorps polyclonaux dans le dosage de l'α-foetoprotéine (AFP). D'après le tableau, il est évident qu'on peut obtenir de nombreux avantages, tels que la nette réduction de la durée du dosage, la simplification du procédé de dosage et l'augmentation de la précision et de la sensibilité du dosage.

TABLEAU 1

	Procédé de l'invention	Méthode classique
Mode opératoire	Réaction → lavage → réaction enzymatique	1ère réaction → lavage → 2ème réaction lavage → réaction enzymatique
Anticorps utilisés	Anticorps monoclonaux	Anticorps polyclonaux
Temps requis	30 minutes	270 minutes
Sensibilité	3 ng/ml	10 ng/ml
Précision: Erreur intra-expérimentale C.V. dans 10 répétitions	1,2 %	2,5 %
Erreur inter-expérimentale C.V. dans 5 répétitions	3,7 %	5,6 %

On a effectué le dosage au moyen d'un photomètre à fluorescence sur le sérum d'une femme enceinte comme échantillon à doser, en utilisant un tube à essai en polystyrène comme phase solide, de la peroxydase de raifort comme enzyme de marquage et de l'acide phlorétique comme substrat.

Il est également possible que l'un seulement de l'anticorps insolubilisé ou de l'anticorps marqué soit préparé à partir d'un anticorps monoclonal et que l'autre soit préparé à partir d'un anticorps polyclonal ordinaire. Mais, dans un tel cas, il se produit une compétition sur un déterminant antigénique commun à l'anticorps monoclonal et à l'anticorps polyclonal et parfois l'affinité du déterminant antigénique pour l'anticorps polyclonal peut être plus forte, ce qui entraîne une diminution de la précision et de la sensibilité du dosage par rapport à la méthode classique elle-même et non pas seulement à la méthode où les deux anticorps sont monoclonaux.

La figure 5 représente des courbes témoin dans le dosage du CEA (antigène carcinoembryonnaire) lorsque l'anti-

corps insolubilisé et l'anticorps marqué sont combinés tel qu'indiqué dans le Tableau 2. Il est évident que le système de dosage basé sur la combinaison conformément à l'invention donne le meilleur résultat.

TABLEAU 2

	Anticorps insolubilisé	Anticorps marqué
Procédé de l'invention	Monoclonal	Monoclonal
Méthode comparative 1	Monoclonal	Polyclonal
Méthode comparative 2	Polyclonal	Monoclonal
Méthode classique	Polyclonal	Polyclonal

Les anticorps monoclonaux utilisés sont obtenus par la technique de la fusion cellulaire à partir de cellules myélomateuses de souris selon l'exemple 2 donné ci-dessous et proviennent de clones correspondant aux différents sites antigéniques. Les anticorps polyclonaux utilisés sont des produits commerciaux de Dako Company (Danemark). Des tubes à essai en polystyrène sont utilisés en tant que support insoluble; l'enzyme est de la peroxydase de raifort; et le substrat de l'o-phénylènediamine.

Tout combinaison de cellules myélomateuses et de cellules produisant des anticorps peut être utilisée pour obtenir des anticorps monoclonaux et l'espèce de l'animal dont proviennent les cellules n'est pas limitée, dans la mesure où les deux types de cellules entrant en combinaison peuvent ensemble former des hybridomes et produire un anticorps au cours du développement.

Tous les supports insolubles utilisés dans les dosages immunologiques classiques peuvent être employés dans l'invention. Comme exemples de supports insolubles, on citera le polystyrène, le polyéthylène, les résines acryliques, le polytétrafluoroéthylène (Teflon®),le papier, le verre et la gélose. Le support insoluble peut avoir la forme d'une pièce en forme de roue dentée,d'une bille,d'une baguette,d'un disque ou d'une cuvette. Par exemple, ce peut être une cellule optique, un

tube à essai, etc. Il peut également avoir d'autres formes.

Comme agents de marquage normalement utilisés, on citera par exemple, la peroxydase, la β-D-galactosidase et la phosphatase alcaline pour l'EIA et l'isothiocyanate de fluorescéine pour le FIA.

Lorsque l'agent de marquage est une enzyme, un substrat s'avère nécessaire pour mesurer son activité. Le substrat peut être tel que lorsqu'il réagit avec l'enzyme correspondante, la quantité du produit résultant ou la quantité du substrat résiduel peut facilement être mesurée. Par exemple, on peut citer l'acide 5-aminosalicylique-H_2O_2, l'o-phénylènediamine-H_2O_2, l'acide phlorétique-H_2O_2, etc. comme substrats pour la peroxydase, et la fluorescéine-di(β-D-galactopyranoside), l'o-nitrophénol-β-D-galactopyranoside, le 4-méthylombélliféryle-β-D-galactoside, etc. comme substrats pour la β-D-galactosidase.

Les substances qu'on peut doser par le réactif de l'invention doivent avoir au moins deux déterminants antigéniques dans la molécule. Comme les substances qui ont été dosées par la méthode du sandwich possèdent au moins deux déterminants antigéniques, pratiquement la totalité des substances qui peuvent être dosées par la méthode classique, peut être dosée selon la présente invention. Comme exemples de ces substances, on mentionnera des enzymes telles que la γ-glutamyl transpeptidase (γ-GTP), la phosphatase alcaline et la transglycosidase; des hormones protéiques telles que l'hormone thyréotrope (thyréostimuline)(TSH), l'hormone lutéinisante (gonadostimuline)(LH), la gonadotrophine chorionique humaine (HCG), l'insuline, la secrétine et l'hormone de croissance (GH); des protéines plasmatiques telles que le produit de dégradation de la fibrine (FDP), la protéine C-réactive (CRP), la α_1-glycoprotéine acide (α_1-AG), la α_1-antitrypsine (α_1-AT), l'α_2-antiplasmine (α_2-PI), la β_2-microglobuline (β_2-MG) et l'immunoglobuline; des protéines carcinoembryonnaires telles que l'α-foetopro-

téine (AFP), l'antigène carcinoembryonnaire (CEA) et la ferritine embryonnaire; et des lymphocytes et des cellules bactériennes, des antigènes de surface cellulaire, des fractions cellulaires, etc.

Etant donné que selon le réactif de l'invention, la séquence des réactions entre l'anticorps insolubilisé, l'antigène à doser et l'anticorps marqué, n'est pas du tout limitée, il est également possible de mélanger à l'avance l'anticorps insolubilisé et l'anticorps marqué. Plus spécifiquement, il est possible qu'un anticorps insolubilisé fixé sur un support, c'est à dire des billes de plastique, etc. et un anticorps marqué soient contenus dans le même récipient, par exemple un tube à essai, ou il est également possible de fixer un anticorps sur la paroi interne d'un récipient approprié, par exemple un tube à essai, qui sert lui-même de support insoluble, puis d'y introduire un anticorps marqué. L'anticorps marqué peut être sous la forme d'une solution ou d'un produit lyophilisé à partir d'une solution, ou être présent sous forme de comprimés, de granules ou de poudres.

En dehors de l'anticorps insolubilisé et de l'anticorps marqué, le réactif de l'invention peut contenir divers auxiliaires afin d'augmenter son utilité. Ce peut être par exemple un agent de dissolution pour l'anticorps marqué (lorsqu'il est utilisé sous forme d'un produit lyophilisé), un liquide de lavage pour laver la phase solide après la réaction entre l'anticorps insolubilisé et l'antigène à doser et après l'autre réaction de l'anticorps marqué, un substrat pour mesurer l'activité enzymatique de l'agent de marquage (lorsque c'est une enzyme) et un agent de blocage de la réaction pour la réaction enzymatique.

Des exemples illustrant l'invention sont décrits ci-après.

Exemple 1

Réactif pour le dosage de l'AFP

a) Préparation d'AFP purifiée

On obtient 16,2 g d'extrait d'AFP brut à partir de 5

litres d'ascite de patients souffrant d'hépatome, par relargage, avec du sulfate d'ammonium (en fraction, entre 45% et 70% de saturation est recueillie). On purifie l'extrait brut par chromatographie d'affinité en utilisant 50 ml de Sepharose 4 B sur laquelle on a fixé un anticorps de lapin anti-AFP (1 mg/ml de Sepharose) pour obtenir 924 mg d'AFP purifiée.

b) Préparation d'anticorps anti-AFP monoclonaux

On immunise une souris femelle BALB/C par injection sous-cutanée de 50 µg de l'AFP purifié produit en a) ci-dessus avec de l'adjuvant complet de Freund. On répète 4 fois l'immunisation à intervalles d'une semaine. On prélève la rate le quatrième jour après l'immunisation finale et on recueille les cellules sphléniques. On lave les cellules sphléniques avec un milieu de culture MEM modifié de Dulbecco (désigné en abrégé par D-MEM ci-après). On compte 1×10^8 de ces cellules et on mélange avec 1×10^7 de cellules myélomateuses de souris (P3-NSI/1-Ag 4,1). On soumet le mélange à une fusion cellulaire pendant 1 minute à 37°C dans 1 ml de D-MEM contenant 42,5 % de polyéthylène glycol 1540 et 7,5 % de diméthyl sulfoxyde. Aux cellules ainsi soumises à la fusion cellulaire, on ajoute 20 ml de milieu HAT (milieu de RPMI-1640 contenant de l'hypoxanthine, de l'aminoptérine, de la thymidine et 10 % de sérum foetal de boeuf). Après avoir transvasé des parties aliquotes de 0,2 ml du mélange de cellules dans une microplaque à 96 puits et cultivé pendant 2 semaines, on détermine les titres d'anticorps des produits surnageants dans les puits.

Puis, on ajoute les cellules des puits où on a observé les anticorps respectivement à 40 ml de milieu RPMI-1640 contenant 10 % de sérum foetal de boeuf et des thymocytes de souris BALB/c. On transvase des parties aliquotes de cette nouvelle suspension de cellules dans deux microplaques à 96 puits et on cultive pendant une semaine pour obtenir 9 clones d'hybridomes produisant des anticorps anti-AFP. On transfère dans des cultures à grande échelle et on soumet

10 litres de chacun des produits surnageants à une chromatographie d'affinité en utilisant 50 ml de Sepharose 4 B sur lequel on a fixé de l'AFP purifié (0,5 mg d'AFP/ml de Sepharose). En résultat, on obtient de 4,2 à 11,6 mg d'anticorps monoclonaux qu'on désigne comme lots n° 1 à 9.

c) Identification des sites de reconnaissance antigéniques

i) Préparation de tubes à essai sensibilisés avec l'anticorps anti-AFP

Dans des tubes à essai en polystyrène lavés avec du PBS (solution saline physiologique tamponnée avec du phosphate 0,05 M, pH 6,4), on introduit 2 ml de solutions de PBS contenant respectivement 0,2 mg de chacun des lots 1 à 9 d'anticorps anti-AFP monoclonaux. Puis on incube les tubes à 56°C pendant 20 minutes et on lave au PBS pour obtenir des tubes à essai sensibilisés.

ii) Préparation des anticorps anti-AFP marqués avec une enzyme

On dissout 5 mg de peroxydase de raifort (Qualité 1 de Boehringer Mannheim GmbH ; désignée en abrégé HRPO ci-après) dans 1,0 ml de tampon de bicarbonate de sodium 0,03M et à cette solution on ajoute 0,1 ml d'une solution éthanolique de 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène à 1 %, puis on laisse le mélange réagir pendant 1 heure.

On ajoute au mélange 1,0 ml d'une solution de periodate de sodium 0,06 M et on laisse réagir pendant 30 minutes. On ajoute alors 1,0 ml d'une solution d'éthylène glycol 0,16 M et on laisse réagir pendant 1 heure. On dialyse le mélange réactionnel contre une solution de carbonate de sodium 0,01 M à pH 9,5. A la solution résultante, on ajoute chacun des neuf lots d'anticorps anti-AFP produits en b) ci-dessus, en une quantité de 5 mg et on fait réagir le mélange à la température ambiante pendant 3 heures. Puis, on ajoute 5 mg de borohydrure de sodium et on laisse réagir pendant une nuit. On dialyse respectivement les mélanges réactionnels contre du PBS 0,01 M à pH 7,2 pour obtenir des anticorps anti-AFP marqués à la HRPO.

iii) Identification des sites de reconnaissance de l'antigène

Dans chacun des tubes à essai sensibilisés avec l'anticorps anti-AFP produits en i) ci-dessus, on ajoute 1,5 ml de PBS, 0,1 ml de solution de référence d'AFP produite en a) ci-dessus qu'on a diluée avec du PBS à 100 ng/ml et 0,4 ml d'anticorps anti-AFP marqués à la HRPO produits en ii) ci-dessus et on dilue 100 fois, puis on fait réagir le mélange pendant 30 minutes. Après la réaction, on lave les tubes à essai avec du liquide de lavage, et on ajoute dans chacun d'eux 3 ml de la solution de substrat contenant 100 mg/dl d'o-phénylènediamine et 0,01 % de peroxyde d'hydrogène. On effectue la réaction enzymatique pendant 30 minutes, et on ajoute 0,05 ml d'acide sulfurique 4 M pour arrêter la réaction enzymatique. On mesure l'absorbance du mélange réactionnel à 450 nm. Dans le tableau 3, les combinaisons induisant des réactions positives sont marquées du signe + et celles n'induisant pas de réaction du signe -.

TABLEAU 3

Anticorps Insolubilisé	Anticorps marqué à la HRPO								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	-	-	-	+	-	+	-	+	+
2	-	-	-	+	-	+	-	+	+
3	-	-	-	+	-	+	-	+	+
4	+	+	+	-	+	+	+	-	-
5	-	-	-	+	-	+	-	+	+
6	+	+	+	+	+	-	+	+	+
7	-	-	-	+	-	+	-	+	+
8	+	+	+	-	+	+	+	-	-
9	+	+	+	-	+	+	+	-	-

Selon les différences relatives aux sites de reconnaissance de l'antigène, les 9 lots d'anticorps anti-AFP monoclonaux obtenus en b) ci-dessus peuvent être divisés en 3

groupes, le premier groupe étant constitué des lots n° 1,2, 3,5 et 7, le second groupe étant constitué du lot n°6 et le troisième groupe étant constitué des lots n° 4, 8 et 9. Ces groupes d'anticorps sont désignés respectivement comme les anticorps /A/, /B/ et /C/.

d) Préparation d'un réactif pour le dosage de l'AFP

On prépare des tubes à essai sensibilisés avec un anticorps anti-AFP selon le procédé c-i) ci-dessus utilisant l'anticorps /A/ monoclonal.

On marque l'anticorps /C/ monoclonal avec de la HRPO par le procédé c-ii) ci-dessus et on dilue dans le rapport 1:10 avec du PBS. Dans le tube à essai sensibilisé, on introduit 2 ml de l'anticorps marqué, dilué. Après avoir lyophilisé le contenu du tube à essai, on scelle pour obtenir un réactif pour le dosage de l'AFP.

e) Dosage de l'AFP

Dans le tube à essai sensibilisé avec un anticorps anti-AFP produit en d) ci-dessus, on ajoute 1,8 ml de PBS et 0,1 ml de la solution de référence d'AFP produite en a) ci-dessus et on dilue à des concentrations de 1000, 100, 10, 1 et 0 ng/ml avec le sérum d'un sujet bien portant, puis on ajoute encore 0,1 ml d'une solution d'anticorps anti-AFP marqué à la HRPO produite en d) ci-dessus dans 2 ml d'eau distillée. On laisse réagir pendant 20 minutes. Après la réaction, on lave le tube à essai avec une solution saline physiologique contenant 0,005% de Tween 20 (appelée ci-après agent de lavage). Puis, on ajoute 3 ml d'une solution de substrat pour l'enzyme contenant 5 mg/ml d'o-phénylènediamine et 0,01 % de peroxyde d'hydrogène et on laisse réagir pendant 10 minutes. Au mélange réactionnel, on ajoute 0,05 ml d'acide sulfurique 4 N pour arrêter la réaction enzymatique. On mesure l'absorbance du mélange réactionnel à 450 nm avec un photomètre. La courbe de référence résultante est reproduite sur la figure 6.

Exemple 2

Réactif pour le dosage du CEA

a) Préparation de C E A purifié

On homogénéise 40 g de tissus cancéreux du gros intestin avec un homogénéiseur après addition d'eau distillée. On ajoute à l'homogénéisat la même quantité d'acide perchlorique 1,2M, et on extrait pendant 30 minutes en agitant. On dialyse le surnageant centrifugé contre de l'eau distillée pour obtenir un extrait de CEA brut.

On concentre l'extrait brut à 10ml, on lui fait subir une filtration sur gel en utilisant du Sepharose 4B équilibré avec une solution saline physiologique et on recueille la première fraction. On procède à nouveau à une filtration sur gel sur du Sephadex G-200 équilibré de la même manière et on recueille la seconde fraction. On la concentre à 2 ml dans lesquels on obtient 135 µg de CEA purifié.

b) Préparation d'anticorps monoclonaux anti-CEA

Huit clones d'hybridomes producteurs d'anticorps anti-CEA sont obtenus en utilisant le CEA purifié produit en a) ci-dessus, par un procédé similaire à celui de l'exemple 1b).

On immunise des souris en utilisant 30 µg du CEA purifié à chaque immunisation. On inocule 1 x 10^6 hybridomes par voie intrapéritonéale à une souris femelle BALB/c à qui on administré par voie intrapéritonéale 0,5 mole de pristane (2,6,10,14-tétraméthylpentadécane ; produit de Wako Pure Chemicals, CO., Ltd.). Deux semaines plus tard, on recueille les ascites. On soumet les ascites à une chromatographie sur DEAE-cellulose équilibrée avec un tampon de phosphate 0,01 M à pH 7,0, et on obtient une fraction non adsorbée comme anticorps monoclonal anti-CEA.

Par un test d'identification des sites de reconnaissance antigéniques pratiquement comme décrit à l'exemple 1-c), on peut classer les anticorps obtenus en trois groupes, à savoir 5 lots, 2 lots et 1 lot qui sont désignés respectivement comme anticorps anti-CEA /A/, /B/ et /C/

c) Préparation de tubes à essai sensibilisés avec un

anticorps anti CEA.

On lave des tubes à essai en polystyrène avec du PBS et on introduit dans chacun d'eux 2 ml de l'anticorps anti-CEA /A/ (1 mg/ml) produit en b) ci-dessus, puis on fait réagir à 56°C pendant 20 minutes. Après la réaction, on lave le tube à essai avec du PBS pour produire un tube à essai sensibilisé avec un anticorps anti-CEA /A/.

d) Préparation d'un réactif pour le dosage du CEA

On obtient un anticorps anti-CEA /B/ marqué à la HRPO en utilisant l'anticorps anti-CEA /B/ produit en b) ci-dessus, selon l'exemple 1-c-ii). On dilue l'anticorps marqué à 1:50 avec une solution saline physiologique et dans chacun des tubes à essai sensibilisés avec l'anticorps anti-CEA /A/ obtenus en c) ci-dessus, on ajoute 0,2 ml de l'anticorps dilué et on lyophilise pour former un réactif pour le dosage du CEA.

e) Dosage du CEA

On dilue le CEA purifié préparé en a) ci-dessus avec le sérum d'un sujet en bonne santé à des concentrations de 100, 30, 10, 3 et 1 ng/ml, respectivement. Au réactif pour le dosage du CEA produit en d) ci-dessus, on ajoute simultanément 0,2 ml du CEA dilué et 0,8 ml d'eau distillée et on laisse réagir pendant 20 minutes en agitant. Après la réaction, on lave le tube à essai avec l'agent de lavage et on ajoute 3 ml d'une solution de substrat contenant 300 mg/dl d'acide phlorétique et 0,01 % de peroxyde d'hydrogène. On fait réagir pendant 10 minutes, puis on ajoute 0,1 ml de sulfite de sodium à 5 % pour arrêter la réaction enzymatique. On mesure ensuite l'intensité de la fluorescence à une longueur d'onde d'excitation de 323 nm et une longueur d'onde de fluorescence de 420 nm au moyen d'un fluorophotomètre. La courbe de référence résultante obtenue est représentée sur la figure 7.

Exemple 3

Réactif pour le dosage de l'HCG-β

a) Préparation de la sous-unité β de l'HCG

On dissout 1 g d'HCG (2000 UI/mg) dans 2 ml d'un tampon de phosphate 0,025 M (pH 5,6) et on fractionne la solution par chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex A-50 (3 g), préalablement équilibrée avec le même tampon. On recueille la fraction éluée avec un tampon de phosphate 0,05 M (pH 5,6) et on dialyse contre de l'eau distillée pour obtenir une solution contenant 308 mg d'HCG purifiée qu'on lyophilise ensuite. On dissout 300 mg de l'HCG lyophilisée dans 10 ml d'urée 10 M (pH 4,5) et on fait réagir pendant 1 heure à 40°C. On fractionne le mélange réactionnel par chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex A-50 (2 g) préalablement équilibrée avec une solution contenant 0,03 M de glycine et 10 M d'urée. On dialyse la fraction éluée avec une solution contenant 0,2 M de glycine, 1 M de NaCl et 8 M d'urée, contre une solution saline physiologique pour obtenir 146 mg de sous-unité β de l'HCG.

b) Préparation des anticorps anti-HCG-β

On prépare 11 lots d'anticorps anti-HCG-β selon le procédé de l'exemple 2-b), si ce n'est qu'on utilise des rats de souche Wistar comme animaux pour l'administration de l'antigène au lieu de souris BALB/c. On identifie les sites de reconnaissance de l'antigène pratiquement selon le procédé de l'exemple 1-c). Les anticorps résultants sont classés en deux groupes, à savoir un groupe constitué de 8 lots d'anticorps anti-HCG-β /A/ et un autre groupe constitué de 3 lots d'anticorps anti-HCG-β /B/.

c) Préparation de billes sensibilisées avec un anticorps anti-HCG-β (support insoluble)

A 100 ml de PBS contenant 50 mg de l'anticorps anti-HCG-β /A/ produit en b) ci-dessus, on ajoute 100 billes de polyéthylène et on fait réagir à 56°C pendant 20 minutes. Puis, on lave les billes de polyéthylène pour obtenir des billes sensibilisées avec un anticorps anti-HCG-β /A/.

d) Préparation d'anticorps anti-HCG-β marqués avec une enzyme

On répète le procédé de l'exemple 1-c-ii) en utilisant

les anticorps anti-HCG-β /B/ produits en b) ci-dessus. Après avoir dilué à 200 fois le volume avec du PBS, on obtient des anticorps anti-HCG-β /B/ marqués à l'HRPO.

e) Préparation de l'agent de lavage

On pèse avec précision 9 g de NaCl et 50 µl de Tween 20 et on dissout dans de l'eau désionisée pour former 100 ml de solution. On verse la solution dans une fiole qui est ensuite bouchée ; l'agent de lavage est ainsi préparé.

f) Préparation du substrat pour l'enzyme

On mélange 26,40 g d'acide 5-aminosalicylique, 54,34 g de phosphate monopotassique et 5,72 g de phosphate disodique et on pulvérise dans un mortier. On pèse avec précision 550 mg du mélange et on verse dans une fiole. On dilue 1,5 ml de peroxyde d'hydrogène (solution à 30 %) avec de l'eau désionisée pour obtenir 100 ml de solution. On introduit 1 ml de la solution dans une ampoule qu'on scelle par fusion. Le substrat pour l'enzyme est alors prêt.

g) Préparation d'un agent de blocage pour la réaction enzymatique

On pèse avec précision 2 g d'azoture de sodium et on dissout dans 100 ml d'eau distillée. On introduit 2 ml de la solution dans une ampoule qu'on scelle par fusion pour obtenir un agent de blocage pour la réaction enzymatique.

h) Préparation d'un réactif de dosage de l'HCG

On prépare un réactif de dosage pour l'HCG en combinant les matériaux produits en c) à g) de la manière suivante.

1. Billes sensibilisées avec un anticorps anti-HCG-β /A/
2. Anticorps anti-HCG-β /B/ marqué à l'HRPO
3. Agent de lavage (solution 10 fois concentrée)
4. Substrat pour l'enzyme (acide 5-amino-salicylique - peroxyde d'hydrogène)
5. Agent de blocage pour la réaction enzymatique

i) Dosage de l'HCG

On effectue le dosage suivant en utilisant le réactif pour le dosage de l'HCG préparé en h) ci-dessus. Dans un

tube à essai, on introduit 0,4 ml de l'anticorps anti-HCG-β(B) marqué à l'HRPO et on ajoute un morceau d'une bille sensibilisée avec un anticorps anti-HCG-β(A). On ajoute respectivement 0,1 ml d'une solution de référence obtenue en diluant de l'HCG, décrite dans Japanese Pharmacopoeia, avec le sérum d'un sujet bien portant à des concentrations de 10 000, 1 000, 100, 10 et 1 mUI/ml, et on fait réagir pendant 15 minutes. Après la réaction, on dilue l'agent de lavage à 10 fois son volume avec de l'eau distillée et on lave la bille avec l'agent de lavage dilué. Puis, on ajoute 3 ml de la solution de substrat préparée en dissolvant la totalité du substrat pour l'enzyme dans 150 ml d'eau distillée et on fait réagir pendant 30 minutes. On ajoute alors 0,025 ml de l'agent de blocage pour arrêter la réaction et on mesure l'absorbance du milieu réactionnel à 500 nm. La courbe étalon résultante est représentée sur la figure 8.

REVENDICATIONS

1. Réactif pour un dosage immunologique d'antigènes basé sur la méthode du sandwich, caractérisé en ce qu'il comprend un anticorps monoclonal insolubilisé et un anticorps monoclonal marqué, lesdits anticorps monoclonaux étant respectivement capables de distinguer, et de se fixer sur, les différents déterminants antigéniques de l'antigène à doser.

2. Réactif selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on utilise comme support de l'anticorps insolubilisé des billes ou un récipient en matière plastique ou en verre.

3. Réactif selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'une enzyme est utilisée comme agent de marquage pour produire l'anticorps marqué.

4. Réactif selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on utilise une substance fluorescente comme agent de marquage pour produire l'anticorps marqué.

5. Réactif selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'anticorps marqué et l'anticorps insolubilisé sont contenus dans le même récipient.

6. Réactif selon la revendication 1 ou 5, caractérisé en ce que l'anticorps marqué est contenu dans un récipient en matière plastique ou en verre qui est utilisé comme support pour l'anticorps insolubilisé.

7. Réactif selon l'une quelconque des revendications 1, 5 et 6, caractérisé en ce que l'anticorps marqué est lyophilisé.

8. Réactif pour un dosage immunologique d'antigènes basé sur la méthode du sandwich, caractérisé en ce qu'il comprend un anticorps monoclonal insolubilisé et un anticorps monoclonal marqué, lesdits anticorps monoclonaux étant respectivement capables de distinguer, et de se fixer sur, les différents déterminants antigéniques d'un antigène à doser, et de 1 à 4 agents auxiliaires choisis parmi un agent de dissolution, un agent de lavage, un substrat et un agent de blocage de la réaction.

9. Méthode du sandwich perfectionnée pour le dosage immunologique d'antigènes, caractérisée en ce que le perfectionnement consiste à faire réagir simultanément l'anticorps insolubilisé et l'anticorps marqué avec un antigène à doser, lesdits anticorps insolubilisé et anticorps marqué étant des anticorps monoclonaux capables de distinguer, et de se fixer respectivement sur, différents déterminants antigéniques dudit antigène.

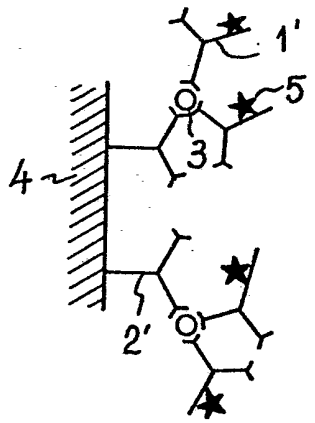

1'
5
3
4
2'

FIG. 1

FIG. 2

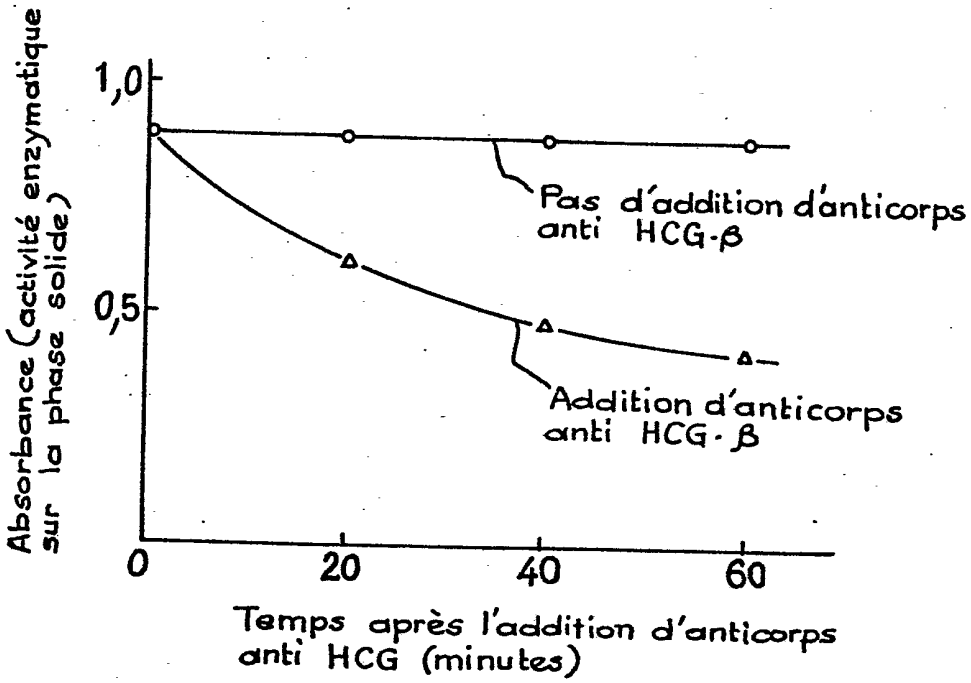

Absorbance (activité enzymatique sur la phase solide)
1,0
0,5
0
20
40
60
Pas d'addition d'anticorps anti HCG-β
Addition d'anticorps anti HCG-β
Temps après l'addition d'anticorps anti HCG (minutes)

FIG. 3

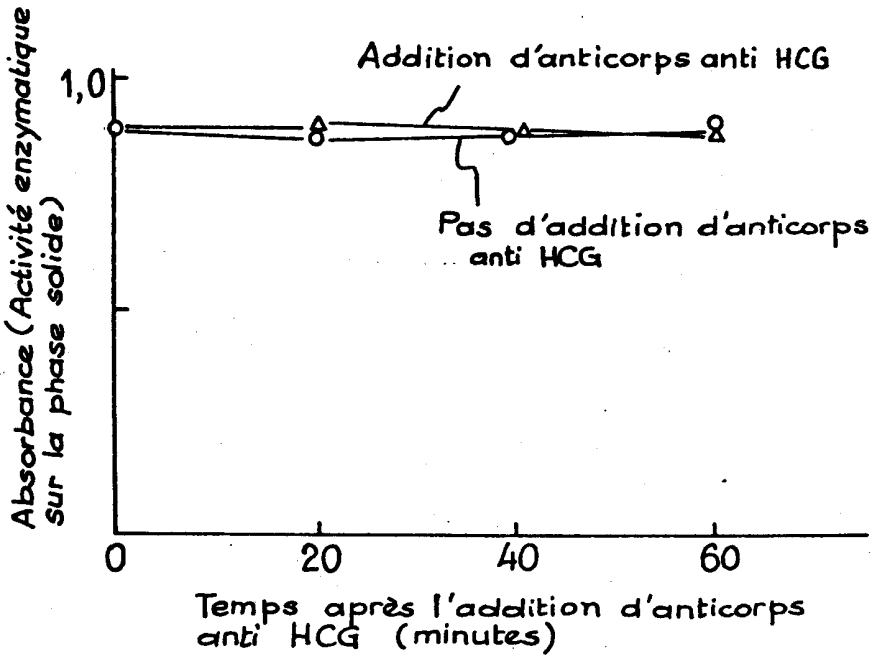

Addition d'anticorps anti HCG
1,0
Pas d'addition d'anticorps anti HCG
Absorbance (Activité enzymatique sur la phase solide)
0
20
40
60
Temps après l'addition d'anticorps anti HCG (minutes)

FIG. 4

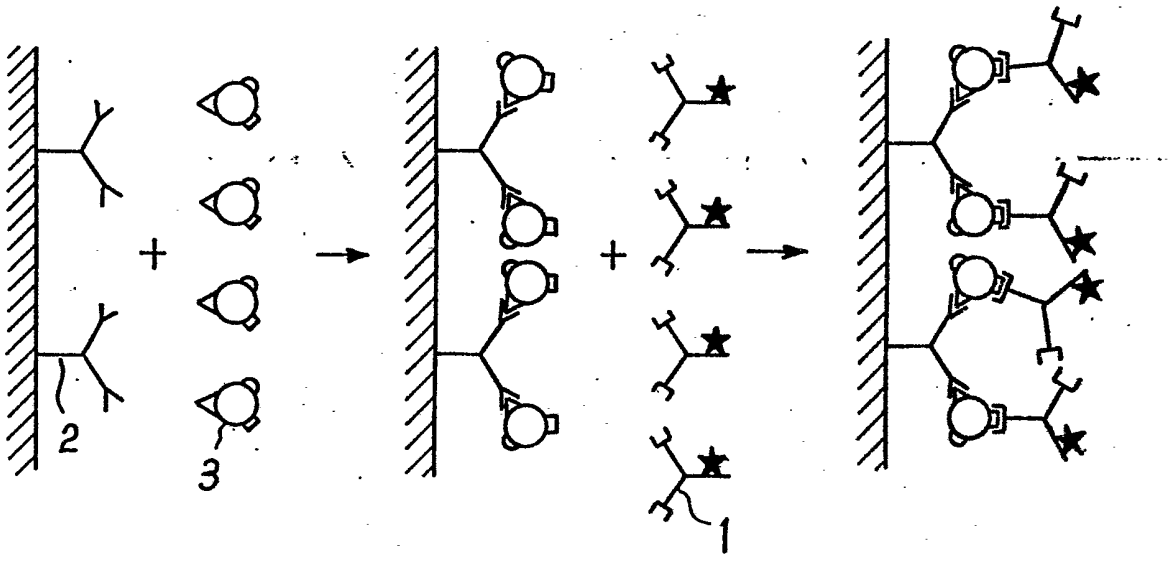


FIG. 5

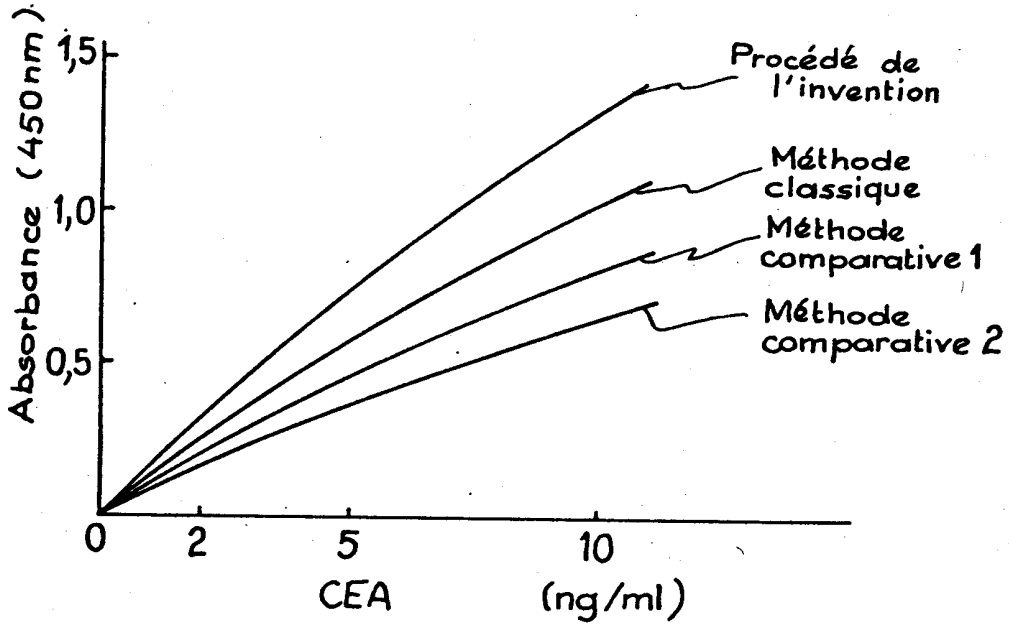

Absorbance (450nm)
1,5
1,0
0,5
0
2
5
10
CEA
(ng/ml)
Procédé de l'invention
Méthode classique
Méthode comparative 1
Méthode comparative 2

FIG. 6

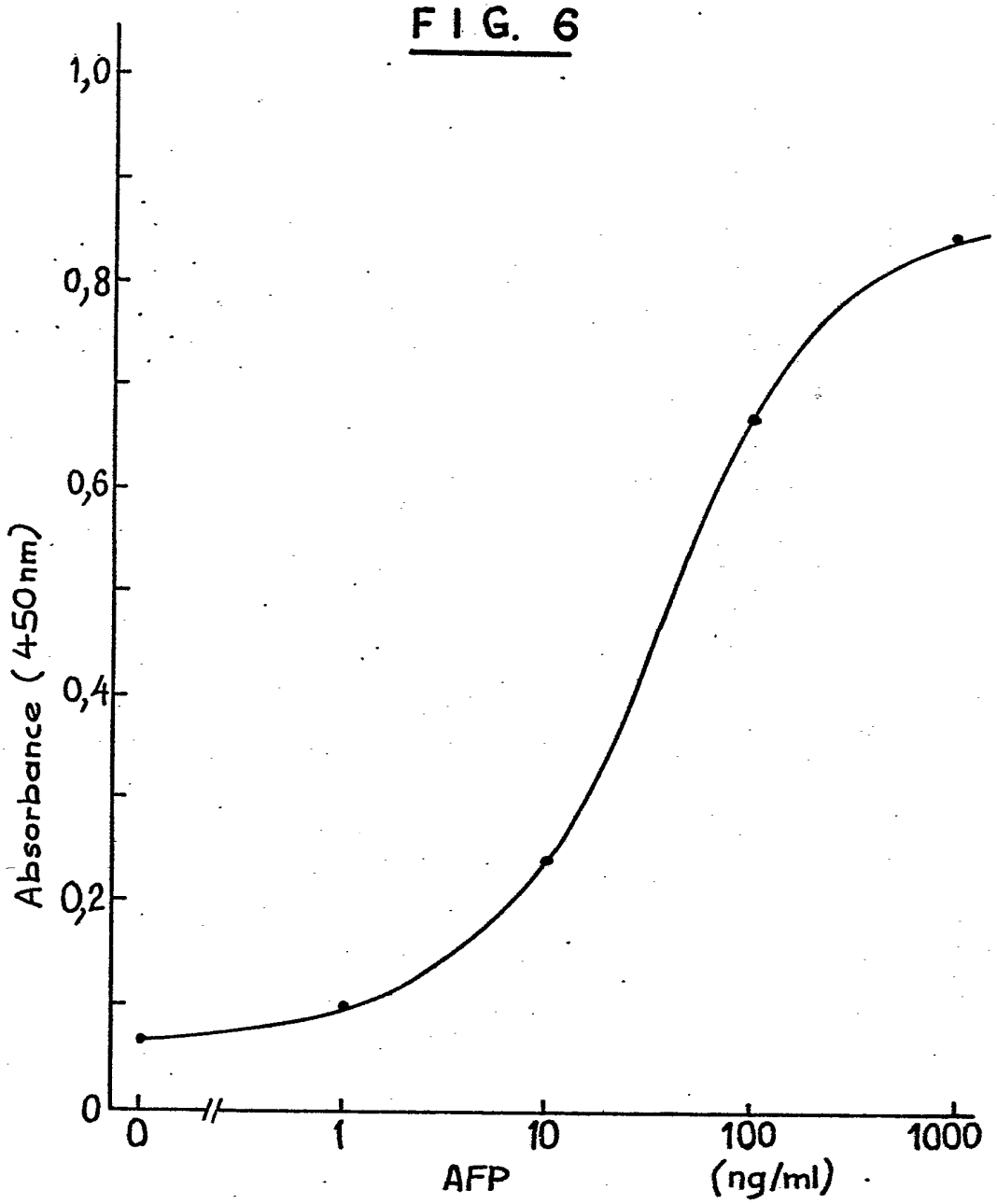


FIG. 7

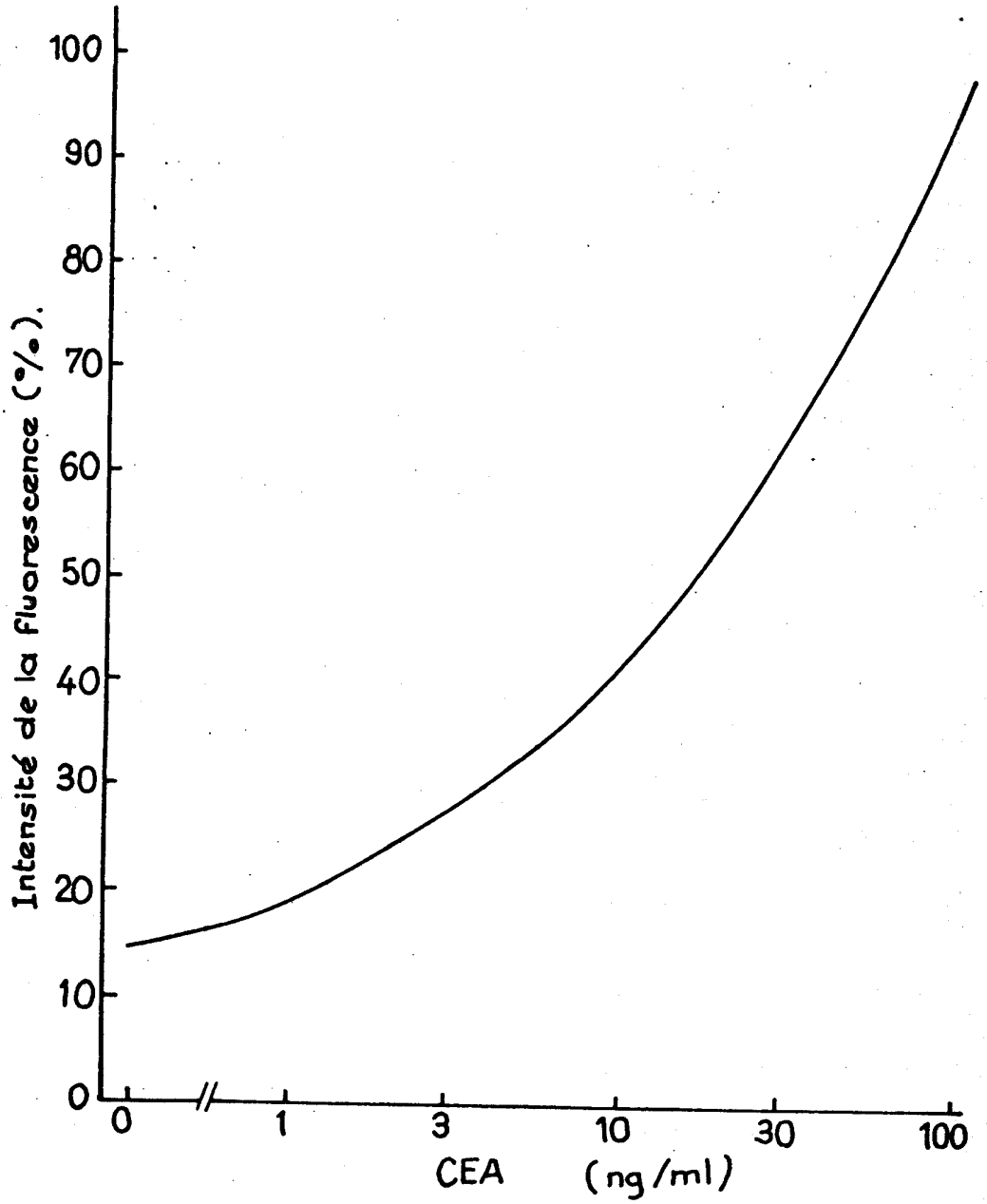

Intensité de la fluorescence (%).
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
1
3
10
30
100
CEA (ng/ml)

FIG. 8

