CH 621 873 A5

(19) CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

(51) Int. Cl.³: G 01 N 33/50

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

ETH-BIBLIOTHEK ZÜRICH

(12) **FASCICULE DU BREVET** A5

(11) **621 873**

(21) Numéro de la demande: 10424/75

(22) Date de dépôt: 11.08.1975

(30) Priorité(s): 12.08.1974 US 497167
30.06.1975 US 591386

(24) Brevet délivré le: 27.02.1981

(45) Fascicule du brevet publié le: 27.02.1981

(73) Titulaire(s):
Syva Company, Palo Alto/CA (US)

(72) Inventeur(s):
Edwin F. Ullman, Atherton/CA (US)
Moshe Schwarzberg, Palo Alto/CA (US)

(74) Mandataire:
A. Braun, Braun, Héritier,
Eschmann AG, Patentanwälte, Basel

(54) Procédé pour détecter dans une solution à titrer, la présence d'un coordinat dans une substance inconnue susceptible de le contenir.

(57) On entend par coordinat une molécule réceptrice, apte à reconnaître de façon spécifique une molécule d'une configuration spatiale et polaire donnée. Dans la conduite du titrage, la substance inconnue et un anticorps spécifique du coordinat intéressant auquel est lié un composant de la paire corps fluorescent-corps extincteur, sont réunis dans un milieu aqueux tamponné. Selon le procédé, on utilise différents réactifs de titrage dans le milieu aqueux tamponné. La composition est irradiée, de la lumière de longueur d'onde étant absorbée par la molécule fluorescente, et la quantité de fluorescence est déterminée. En utilisant des étalons convenables, on peut effectuer l'analyse qualitative et quantitative du coordinat.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour détecter, dans une solution à titrer, la présence d'un coordinat, ou d'un anti-coordinat, dans une substance inconnue susceptible de contenir ledit coordinat, ou anti-coordinat, qui présente au moins un site épitopique, procédé caractérisé par le fait qu'il consiste à utiliser, comme réactifs principaux, deux chromophores Ch_1 et Ch_2 qui forment une paire corps fluorescent-corps extincteur, en sorte que dans la solution à titrer la quantité de corps fluorescent venant à la distance d'extinction du corps extincteur est en relation avec la quantité de coordinat, ou d'anti-coordinat, présente dans la solution, à former une solution à titrer avec la substance inconnue dans un milieu aqueux tamponné, à faire incuver la solution à titrer pour combiner une portion au moins des compositions et corps en présence, à irradier la solution à titrer, après l'incubation, avec de la lumière de longueur d'onde entrant dans le spectre d'absorption du corps fluorescent et à mesurer la quantité de fluorescence émise par la solution à titrer comparativement à une solution à titrer contenant une quantité connue de coordinat ou d'anti-coordinat.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il consiste à détecter la présence d'un coordinat, à rassembler dans le milieu aqueux contenant la substance inconnue une source de Ch_1 sous la forme de Ch_1 en liaison de co-valence avec une première composition de récepteur capable d'une liaison spécifique sans co-valence avec ledit coordinat et une source de Ch_2 sous la forme de Ch_2 en liaison de co-valence avec une seconde composition de récepteur susceptible d'une liaison spécifique sans co-valence avec le coordinat ou sous la forme de Ch_2 en liaison de co-valence ou non de co-valence avec un équivalent du coordinat, lequel équivalent est un radical monovalent ou polyvalent, dont une proportion importante définit un ou plusieurs sites épitopiques capables d'entrer en compétition avec le coordinat pour occuper les sites de liaison dudit récepteur.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il consiste à utiliser l'un des chromophores, Ch_1, qui est lié au récepteur du coordinat pour former un ensemble récepteur-Ch_1, ledit récepteur présentant des sites de liaison capables d'une liaison spécifique avec les sites épitopiques dudit coordinat, l'autre chromophore, Ch_2, étant lié au récepteur du coordinat pour former un ensemble récepteur-Ch_2 ou à l'équivalent du coordinat, qui est ou bien un équivalent simple de coordinat en liaison de co-valence avec un ou plusieurs chromophores pour former un ensemble équivalent de coordinat-$(Ch_2)_x$, dans lequel x est en moyenne au moins égal à 1, ou qui comprend plusieurs équivalents de coordinat et plusieurs chromophores en liaison de co-valence avec une molécule nucléaire poly-fonctionnelle pour former un ensemble poly (équivalent de coordinat)-poly(Ch_2) dans lequel l'équivalent de coordinat est un radical monovalent ou polyvalent dont une proportion importante définit un ou plusieurs sites épitopiques capables d'entrer en compétition avec le coordinat pour occuper les sites de liaison dudit récepteur, et à rassembler dans le milieu aqueux tamponné contenant la substance inconnue, l'ensemble-récepteur-Ch_1 et une source de Ch_2 capable d'une liaison, à la distance d'extinction, avec l'ensemble-récepteur-Ch_1 sous l'une des formes suivantes: (a) équivalent de coordinat-$(Ch_2)_x$; (b) poly(équivalent de coordinat)-poly(Ch_2); (c) poly-(équivalent de coordinat) et récepteur-Ch_2; le poly(équivalent de coordinat) présentant plusieurs équivalents de coordinat en liaison de co-valence avec une molécule nucléaire poly-fonctionnelle; ou bien, lorsque le coordinat présente plusieurs sites épitopiques, (d) l'ensemble récepteur-Ch_2.

4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il consiste à utiliser l'un des chromophores, Ch_1, qui est lié au récepteur du coordinat pour former un ensemble récepteur-Ch_1, le récepteur présentant un site de liaison capable d'une liaison spécifique avec le site épitopique dudit coordinat, l'autre chromophore étant en liaison de co-valence avec un équivalent du coordinat pour former un ensemble équivalent de coordinat-Ch_2, l'équivalent de coordinat étant un radical monovalent dont une proportion importante définit un site épitopique capable d'entrer en compétition avec le coordinat pour un site de liaison dudit récepteur, à rassembler dans un milieu aqueux tamponné ayant un pH compris entre 5 et 10 et contenant la substance inconnue l'ensemble récepteur-Ch_1, l'ensemble équivalent de coordinat-Ch_2, les concentrations de récepteur-Ch_1 et d'équivalent de coordinat-Ch_2 produisant 20 à 80% d'extinction de la fluorescence en l'absence du coordinat et à incuber la solution à titrer à une température comprise entre 0 et 45°C.

5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il consiste à utiliser l'un des chromophores, Ch_1, qui est attaché au récepteur du coordinat qui présente plusieurs sites épitopiques pour former l'ensemble récepteur-Ch_1, ledit récepteur présentant des sites de liaison susceptibles d'une liaison spécifique avec les sites épitopiques du coordinat, l'autre chromophore étant en liaison avec un récepteur du coordinat pour former l'ensemble récepteur-Ch_2, à rassembler dans le milieu aqueux tamponné ayant un pH compris entre 5 et 10 et contenant la substance inconnue l'ensemble récepteur-Ch_1 et l'ensemble récepteur-Ch_2 et à incuber la solution à titrer à une température comprise entre 0 et 45°C.

6. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il consiste à utiliser l'un des chromophores, Ch_1, qui est lié au récepteur du coordinat, pour former un ensemble récepteur-Ch_1, ledit récepteur présentant des sites de liaison susceptibles d'une liaison spécifique avec les sites épitopiques du coordinat, l'autre chromophore étant lié au récepteur du coordinat pour former un ensemble récepteur-Ch_2, à rassembler dans le milieu aqueux ayant un pH de 5 à 10 et contenant la substance inconnue l'ensemble récepteur-Ch_1, le poly(équivalent de coordinat) et le récepteur-Ch_2 l'équivalent du coordinat étant un radical mono- ou polyvalent dont une proportion importante définit un ou plusieurs sites épitopiques capables d'entrer en compétition avec le coordinat pour les sites de liaison du récepteur et le poly(équivalent de coordinat) comportant plusieurs équivalents de coordinat en liaison de co-valence avec une molécule nucléaire poly-fonctionnelle et à incuber la solution à titrer à une température comprise entre 0 et 45°C.

7. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il consiste à détecter la présence d'un coordinat ou d'un anti-coordinat présentant plusieurs sites épitopiques, à utiliser un anti (anti-coordinat) dont une portion est liée à Ch_1 et une portion est liée à Ch_2, à unir avec la substance inconnue un anti-coordinat pour détecter la présence d'un coordinat, ou un coordinat pour détecter la présence d'un anti-coordinat, à séparer l'anti-coordinat lié au coordinat de l'anti-coordinat non lié et à combiner dans la solution aqueuse tamponnée à titrer l'anti-coordinat lié avec les anti-(anti-coordinats).

8. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il consiste à détecter la présence d'un coordinat qui présente plusieurs sites épitopiques, à utiliser un a-(anti-coordinat), un b-(anti-coordinat), und anti(a-(anti-coordinat)-Ch_1, et un anti(b-(anti-coordinat)-Ch_2 où a et b désignent des sources spécifiques différentes de l'anti-coordinat, à réunir dans le milieu aqueux tamponné contenant la substance inconnue le a-(anti-coordinat), le b-(anti-coordinat), l'anti-(a-(anti-coordinat)-Ch_1 et l'anti-(b-(anti-coordinat)-Ch_2 et à faire incuber la solution à titrer pour qu'au moins une portion

des anti-coordinats et des anti-(anti-coordinats) s'associe avec le coordinat et respectivement à l'anti-coordinat.

9. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il consiste à détecter la présence d'un anti-coordinat relatif à un coordinat, à utiliser l'ensemble (anti-coordinat)-Ch_1 et l'ensemble (anti-coordinat)-Ch_2, et à réunir dans le milieu aqueux contenant la substance inconnue le coordinat, lorsqu'il est polyépitopique, ou le poly(équivalent de coordinat), lorsqu'il est mono-épitopique, l'ensemble (anti-coordinat)-Ch_1 et l'ensemble (anti-coordinat)-Ch_2.

10. Réactif combiné permettant de réaliser le procédé selon la revendication 8, consistant en anti-(a-anti-coordinat)-Ch_1 et anti-(b-anti-coordinat)-Ch_2, dans lequel a et b désignent des anti-coordinats de deux espèces différentes pour le même coordinat, ce dernier présentant plusieurs sites épitopiques et Ch_1 et Ch_2 désignant une paire corps fluorescent-corps extincteur.

On recherche continuellement des procédés rapides et précis de dosage de petites quantités de composés organiques. Diverses techniques ont été mises au point à cette fin. Parmi les techniques du commerce, on mentionne le titrage radio-immunologique, le titrage immunologique avec marquage des spins, pour lequel des réactifs sont vendus sous la marque déposée «FRAT», le titrage immunologique enzymatique homogène pour lequel des réactifs sont vendus sous la marque déposée «EMIT» et l'hémoagglutination (HI). Ces techniques sont efficaces pour doser des quantités de substances dans la gamme de 10^{-6} à 10^{-10} M ou moins.

Ces techniques impliquent toute l'aptitude d'une molécule réceptrice, habituellement un anticorps, à reconnaître une organisation spécifique spatiale et polaire d'une molécule. Excepté l'hémo-agglutination, les techniques sont basées sur la présence d'un réactif qui peut entrer en compétition avec la molécule en cours de titrage pour s'unir au récepteur. Etant à même de faire la distinction entre le réactif qui est attaché au récepteur et celui qui n'est pas attaché, on peut déterminer la quantité présente du composé intéressant.

Dans la mise au point de titrages immunologiques, on est limité par la disponibilité et les propriétés d'un récepteur approprié. Toutefois, en ce qui concerne les autres réactifs et la technique de mesure, il existe plusieurs considérations différentes qui permettent d'effectuer avec plus de précision un titrage pratique ou désirable du point de vue commercial. Tout d'abord, il est avantageux qu'il y ait un nombre minimal de mesures des divers réactifs, ainsi que de transferts de ces derniers. Deuxièmement, l'appareillage nécessaire pour la mesure doit être raisonnablement économique, de manière à être abordable pour une large gamme d'utilisateurs. Troisièmement, les réactifs utilisés doivent être relativement stables, de manière à pouvoir être entreposés et expédiés. Quatrièmement, le procédé ne doit pas subir d'interférences importantes de la part d'autres matières qui peuvent être présentes accidentellement dans l'échantillon à titrer. D'autres considérations comprennent la facilité de l'apprentissage des techniciens, l'absence de risques du point de vue de l'hygiène, la sensibilité, la reproductibilité et la possibilité d'application à une grande variété de coordinats.

L'invention est basée sur le phénomène du transfert de l'énergie entre deux chromophores. Lorsqu'un chromophore fluorescent est irradié en absorbant de la lumière, il peut dissiper l'énergie lumineuse absorbée en émettant de la lumière de plus grande longueur d'onde, c'est-à-dire une lumière fluorescente. Si un autre chromophore est à moins de 100 Å du corps fluorescent et absorbe de la lumière à la longueur d'onde d'émission, il existe, sous la dépendance d'autres facteurs, la probabilité selon laquelle le corps fluorescent transfère à l'autre chromophore l'énergie qui aurait autrement été émise sous la forme de lumière, en produisant en fait l'extinction du corps fluorescent.

Le brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 3 709 868 donne un exemple de titrage radio-immunologique. Le brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 3 690 834 donne un exemple de titrage immunologique par l'intermédiaire des spins. Les brevets des Etats-Unis d'Amérique N° 3 654 090 et N° 3 817 837 donnent des exemples de titrages immunologiques d'enzymes. Parmi les articles intéressants, on mentionne un article de Ludwig Brand et James R. Gohlke, intitulé «Fluorescence Probes for Structure», Annual Review of Biochemistry, 41, 843–868 (1972); et Stryer, «Science», 162, 526 (1968). On pourra consulter également la demande de brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 402 693 déposée le 2 octobre 1973.

L'invention concerne un procédé de détection de la présence ou de dosage de la quantité d'un composé organique pour lequel un récepteur, habituellement un anticorps, est disponible ou peut être préparé. Le composé organique sera appelé ci-après coordinat.

Dans la conduite du titrage, on utilise deux chromophores qui constituent une paire comprenant un corps fluorescent et un corps extincteur. La quantité de corps fluorescent à la distance d'extinction du corps extincteur est affectée par la quantité de coordinat présente dans le milieu à titrer.

Le procédé selon l'invention est caractérisé par le fait qu'il consiste à utiliser, comme réactifs principaux, deux chromophores Ch_1 et Ch_2 qui forment une paire corps fluorescent-corps extincteur, en sorte que dans la solution à titrer la quantité de corps fluorescent venant à la distance d'extinction du corps extincteur est en relation avec la quantité de coordinat, ou d'anti-coordinat, présente dans la solution, à former une solution à titrer avec la substance inconnue dans un milieu aqueux tamponné, à faire incuber la solution à titrer pour combiner une portion au moins des compositions et corps en présence, à irradier la solution à titrer, après l'incubation, avec de la lumière de longueur d'onde entrant dans le spectre d'absorption du corps fluorescent et à mesurer la quantité de fluorescence émise par la solution à titrer comparativement à une solution à titrer contenant une quantité connue de coordinat ou d'anti-coordinat.

Un chromophore est introduit dans le milieu à titrer en liaison de covalence avec une composition réceptrice qui se fixe spécifiquement au coordinat. Le second chromophore peut être introduit dans le milieu à titrer de différentes façons: (1) par liaison de covalence avec un récepteur qui est identique au récepteur en conjugaison avec le premier chromophore ou qui en est différent, mais qui se fixe spécifiquement au coordinat dans les deux cas, et en présence ou en absence d'un poly-coordinat; ou (2) en liaison de covalence avec l'équivalent d'un coordinat, lorsque cet équivalent peut entrer en compétition avec le coordinat relatif au récepteur. Le choix des modes d'introduction dépend à un haut degré du nombre de sites épitopiques ou hapténiques indépendants présent dans le coordinat.

Lorsque le coordinat ne présente qu'un site épitopique indépendant (mono-épitopique), un seul chromophore est habituellement en liaison de covalence avec un récepteur du coordinat, et l'autre chromophore est en liaison de covalence avec un équivalent du coordinat ou une association entre plusieurs équivalents du coordinat et le chromophore en liaison de covalence avec le récepteur du coordinat.

Lorsque le coordinat présente plusieurs sites épitopiques indépendants (polyépitopiques), les modes d'introduction indiqués ci-dessus peuvent être utilisés en plus des modes suivants. Dans l'un de ces modes, les deux chromophores sont liés individuellement au récepteur du coordinat. Dans un autre mode, le récepteur du coordinat est obtenu à partir de corps différents et un chromophore est attaché au récepteur de l'ensemble coordinat-récepteur d'une catégorie, tandis que l'autre chromophore est attaché au récepteur de l'ensemble coordinat-récepteur de l'autre catégorie. Ce dernier procédé améliore la souplesse d'application du titrage en question en permettant l'utilisation de réactifs usuels dans une grande variété de titrages, simplifie les opérations de purification et permet de déceler la présence d'ensembles, que l'on doit distinguer des composants.

Les diverses matières sont mises en présence dans un milieu aqueux tamponné, puis elles sont soumises à une incubation et irradiées, de la lumière étant adsorbée par les molécules du corps fluorescent. En déterminant le degré de fluorescence après incubation pendant un intervalle prédéterminé de temps ou après que le système s'est approché de l'équilibre, et en comparant les résultats obtenus avec un ou plusieurs étalons connus, on peut détecter la présence ou déterminer la quantité de coordinat.

Un coordinat est une molécule ou un assemblage organique, de poids moléculaires normalement supérieur à 100 et ayant au moins une fonction, de nature normalement polaire et pour lequel un récepteur est naturellement disponible ou peut être préparé.

Un équivalent de coordinat est un radical monovalent ou polyvalent dont une proportion importante a la même organisation spatiale et polaire que le coordinat, pour définir un ou plusieurs sites déterminants ou épitopiques capables d'entrer en compétition avec le coordinat pour occuper les sites de liaison d'un récepteur, et il diffère du coordinat par l'absence d'un atome ou d'un groupe fonctionnel au niveau du site de liaison avec une autre molécule ou par la présence d'un groupe de liaison qui a été introduit à la place d'un ou plusieurs atomes initialement présents dans le coordinat. Le précurseur d'un équivalent de coordinat est le composé utilisé pour la conjugaison du coordinat ou de son équivalent avec une autre molécule, par exemple le chromophore.

Un ensemble ou assemblage est une association de molécules organiques liées les unes aux autres par des liaisons autres que des liaisons de covalence, ayant généralement des poids moléculaires supérieurs à 600, dépassant habituellement 1000 et pouvant atteindre ou dépasser 1 000 000, et pour laquelle un récepteur est naturellement disponible ou peut être préparé; un exemple d'ensemble est donné par un antigène et un anticorps; ou bien il s'agit d'une molécule préparée à partir de deux entités distinctes, normalement liées par des liaisons faibles, par exemple des liaisons polaires ou des liaisons disulfure, qui sont capables, dans les conditions du système, d'être en équilibre avec les entités individuelles.

Un chromophore est une molécule fluorescente ou une molécule extinctrice; dans la présente invention, le corps fluorescent et le corps extincteur sont en relation l'un avec l'autre. La molécule fluorescente est un chromophore qui est capable d'absorber de la lumière d'une longueur d'onde et d'émettre de la lumière d'une plus grande longueur d'onde. La molécule du corps extincteur est capable d'inhiber la fluorescence, à une courte distance, habituellement inférieure à environ 100 Å, du corps fluorescent, en captant l'énergie qui serait autrement émise en tant que lumière fluorescente. En ce qui concerne la molécule ou le composé auquel les chromophores sont attachés, dans la plupart des cas, le corps fluorescent et le corps extincteur sont interchangeables, bien qu'il y ait souvent une certaine préférence. Par conséquent, en général, les deux molécules seront appelées chromophores, et seront désignées individuellement par les symboles Ch_1 et Ch_2.

Equivalent de coordinat – chromophore (équivalent de coordinat-$(Ch_2)_x$)– – l'équivalent de coordinat est en liaison de covalence avec une ou plusieurs molécules fluorescentes ou molécules extinctrices. Dans le cas de petits coordinats, de poids moléculaire inférieur à environ 10 000, habituellement inférieur à environ 2000, l'équivalent de coordinat est habituellement attaché à moins de 10 chromophores, ordinairement à 1–10 chromophores, et il n'y a pas plus d'environ 1 chromophore par 1000 unités de poids moléculaire. Dans le cas d'un grand coordinat, de poids moléculaire au moins égal à 2000, habituellement au moins égal à 10 000, plusieurs chromophores peuvent être en liaison de covalence avec un équivalent de coordinat. Le nombre de chromophores présents est limité par le nombre de chromophores qui peuvent être introduits sans masquer un trop grand nombre de sites épitopiques du coordinat et par la nécessité de l'existence d'un nombre suffisant de chromophores pour garantir un degré appréciable d'extinction lorsque l'ensemble récepteur-Ch_1 est lié à l'ensemble équivalent de coordinat-$(Ch_2)_x$.

Poly(équivalent de coordinat)-poly(chromophore)[poly-(équivalent de coordinat)-poly(Ch_2)]– – L'équivalent de coordinat et le chromophore sont liés à une molécule centrale ou molécule nucléaire hydrosoluble à plusieurs fonctions, de haut poids moléculaire (comparativement à l'équivalent de coordinat et de chromophore), de manière qu'il y ait plusieurs groupes équivalents de coordinats et plusieurs groupes chromophores espacés à la surface de la molécule, si bien que lorsque l'ensemble récepteur-Ch_1 est lié au coordinat analogue, certains groupes Ch_1 sont présents dans les limites de la distance d'extinction des groupes Ch_2.

Poly(équivalent de coordinat) – Des groupes d'équivalent de coordinat sont liés à une molécule centrale ou molécule nucléaire polyfonctionnelle hydrosoluble de haut poids moléculaire (comparativement à l'équivalent de coordinat), de manière qu'il y ait un nombre suffisant d'équivalents de coordinat par unité de surface pour que l'extinction ait lieu lorsque le poly(équivalent de coordinat) est saturé avec l'ensemble récepteur-Ch_1 et l'ensemble récepteur-Ch_2 dans des proportions convenables.

Récepteur-chromophore (récepteur-Ch_1 et récepteur-Ch_2) – Un récepteur est une molécule qui est capable de reconnaître un site épitopique et de se lier à ce site. Habituellement, les récepteurs ont des constantes de liaison supérieures à 10^4 et souvent supérieures à 10^6. La plupart des récepteurs sont des anticorps, bien que des enzymes, des acides nucléiques et certaines globulines puissent aussi se comporter comme des récepteurs. Dans la présente invention, la plupart des récepteurs sont des anticorps auxquels un ou plusieurs, habituellement deux ou plusieurs groupes chromophores sont attachés.

Composition réceptrice – Une composition réceptrice est une composition homogène ou hétérogène capable d'une liaison spécifique sans covalence avec un coordinat et un équivalent de coordinat; il s'agit d'une composition qui reconnaît spécifiquement l'ensemble coordinat (anti-coordinat) et une combinaison de l'anti-coordinat et d'une composition qui reconnaît spécifiquement l'anti-coordinat [anti-(anti-coordinat)].

Le procédé est basé sur l'utilisation de deux chromophores qui forment une paire entre un corps fluorescent et un corps extincteur. Du fait que l'on dispose d'une compo-

sition (récepteur) qui reconnaît spécifiquement ou s'associe avec un coordinat auquel l'un des chromophores est lié par covalence, et que le second chromophore est attaché à l'équivalent de coordinat ou au récepteur, la quantité de coordinat présente dans la solution à titrer affecte la quantité de corps extincteur à la distance d'extinction du corps fluorescent. Le titrage peut être effectué de façon compétitive, l'équivalent de coordinat entrant en compétition avec le coordinat pour se lier au récepteur, l'équivalent de coordinat étant présent sous la forme d'un poly(équivalent de coordinat) ou en liaison de covalence avec un chromophore. Le titrage peut aussi être effectué de façon non compétitive avec des coordinats présentant plusieurs sites épitopiques, lorsqu'un récepteur ayant chacun des chromophores est en liaison avec le coordinat.

Selon le protocole particulier qui est utilisé et le coordinat présentant un intérêt, un ou plusieurs des réactifs suivants peuvent être utilisés dans le milieu à titrer: équivalent de coordinat-chromophore, poly(équivalent de coordinat)-poly(chromophore), poly(équivalent de coordinat), un ou deux récepteurs et un ou deux ensembles récepteur-chromophore. La première composition que l'on étudiera est la composition équivalent de coordinat-chromophore.

Equivalent de coordinat-chromophore et poly(équivalent de coordinat)-poly(chromophore)

L'ensemble équivalent de coordinat-chromophore peut être subdivisé en deux groupes. Le premier est celui dans lequel cet ensemble a un seul équivalent de coordinat et un seul chromophore liés ensemble par un groupe de liaison relativement court. Dans ces cas, l'équivalent de coordinat est le plus souvent hapténique, au lieu d'être antigénique, et il a généralement un poids moléculaire inférieur à environ 10 000, notamment inférieur à environ 6000 et souvent compris dans la gamme d'environ 125 à 1000, si l'on exclut le groupe de liaison utilisé pour la liaison avec le chromophore. Le plus souvent, l'équivalent de coordinat diffère du coordinat par le fait qu'une fonction particulière y est remplacée par une liaison, un atome d'hydrogène qui est remplacé par une liaison ou une courte chaîne carbonée y est remplacée également par une liaison (on entend désigner par liaison aussi bien des liaisons multiples que des liaisons simples) s'attachant au groupe de liaison du chromophore. Les divers coordinats hapténique ou de bas poids moléculaire seront définis dans ce qui suit.

Le groupe de liaison n'a normalement pas plus d'environ 10 atomes dans la chaîne entre le coordinat et le chromophore, et il présente le plus souvent une liaison ou environ 1 à 6 atomes dans la chaîne. Les atomes sont presque toujours des atomes de carbone, d'oxygène, d'azote et de soufre, notamment de carbone, d'oxygène et d'azote.

Les fonctions impliquées dans le groupe de liaison sont normalement des groupes carbonyle non-oxo (y compris imino et thionocarbonyl)-oxy, amino (en particulier amino tertiaire ou quaternaire) ou leurs associations, par exemple amido, carbamyle et amidino.

Les deux chromophores, fluorescent ou extincteur, ont normalement une fonction amino ou une fonction alcool destinée à réagir avec une fonction carbonyle non-oxo (y compris les homologues azotés et sulfurés), ou bien ils n'ont pas de fonction carbonyle non-oxo aptes à réagir avec une fonction amino ou alcool.

Lorsque le coordinat a un poids moléculaire au moins égal à 2000, plusieurs groupes chromophores peuvent y être attachés. Habituellement, il y a au moins un groupe chromophore par 20 000 unités de poids moléculaire, plus souvent au moins un groupe chromophore par 10 000 unités de poids moléculaire et un maximum d'un groupe chromophore par 1000 unités de poids moléculaire, notamment un maximum d'un groupe chromophore par 2000 unités de poids moléculaire. Les considérations concernant le nombre de chromophores en conjugaison avec le coordinat ont été énumérées dans ce qui précède. Les groupes de liaison sont ceux qui ont été définis ci-dessus. Ordinairement, le coordinat est un polypeptide ou une protéine antigénique ayant plusieurs groupes amino. Un halogène actif ou un groupe carbonyle non-oxo (y compris les homologues azotés et sulfurés) peut être utilisé pour la formation par conjugaison d'une liaison de covalence ou d'amides, d'amidines, de thionoamides, d'urées, de guanidines et de thiourées.

A titre de variante, le coordinat et le chromophore (Ch_1 ou Ch_2) peuvent être attachés à une molécule centrale [poly-(équivalent de coordinat)-poly(chromophore)]. La molécule centrale ou molécule nucléaire peut être utilisé avantageusement pour diverses raisons. La molécule nucléaire est généralement une molécule polymère de poids moléculaire relativement haut, dépassant normalement 20 000, souvent égal à 60 000 et pouvant atteindre ou dépasser 10 000 000. La molécule nucléaire est normalement hydrosoluble ou dispersible dans un milieu aqueux pour former une dispersion stable, dans laquelle la matière dispersible ne perturbe pas l'absorption de la lumière ou l'irradition. La molécule nucléaire peut être une matière naturelle, une matière naturelle modifiée ou une matière synthétique. Parmi les molécules nucléaires, on mentionne des poly-peptides, des protéines, des polysaccharides, des polymères synthétiques, etc. La nature de la molécule centrale est très variable, pour autant que cette molécule porte suffisamment de fonction pour permettre l'introduction des molécules de coordinat et de chromophore.

Parmi les protéines que l'on peut utiliser, on mentionne les albumines, les globulines, les protéoglycanes, etc., parmi les polysaccharides, on mentionne l'amylose, la cellulose, l'agarose, les dextranes, etc., tels qu'on les obtient ou après dégradation partielle; parmi les polymères synthétiques, on mentionne l'alcool polyvinylique, des acrylates, leurs copolymères, etc.

Normalement, il n'y a pas moins d'environ une molécule conjuguée (équivalent de coordinat ou chromophore) par 50 000 unités de poids moléculaire, habituellement pas moins d'environ une molécule conjuguée par 25 000 unités de poids moléculaire et notamment pas moins d'environ une molécule conjuguée par 1000 unités et, mieux encore, par 2000 unités de poids moléculaire.

Le rapport des molécules de chromophore au coordinat est généralement compris entre environ 0,05 et 20 : 1, par exemple entre environ 0,5 et 20 : 1, de préférence entre environ 1 et 10 : 1 et notamment entre environ 2 et 8 : 1.

Lorsque le chromophore est la molécule fluorescente aux fins de l'invention, il y a généralement au moins environ 0,5 à 20, de préférence environ 1 à 10 et notamment environ 2 à 7 molécules fluorescentes par molécule de coordinat. Lorsque le chromophore est la molécule extinctrice, le nombre de molécules extinctrices par coordinat est généralement d'environ 0,5 à 20, de préférence d'environ 1 à 20 et notamment d'environ 2 à 15.

Les conjugués relatifs à la molécule centrale ont le même type de groupe de liaison que celui qui a été utilisé pour attacher le chromophore au coordinat. Le choix particulier de la fonctionnalité dépend des groupes fonctionnels disponibles sur la molécule nucléaire.

Etant donné que dans la plupart des cas, le récepteur est un anti-corps, on choisira dans le présent mémoire l'anticorps comme exemple de récepteur. Les anticorps présentent plusieurs groupes amino actifs qui peuvent être utilisés pour la conjugaison par covalence du chromophore avec l'anti-

corps. Avantageusement, le chromophore peut porter une fonction carbonyle non-oxo (y compris ses homologues azotés et sulfurés) ou une fonction α-halogénocarbonyle active. Des exemples de fonctions pour la liaison du chromophore à l'anticorps comprennent des halogénures d'acyle, des anhydrides mixtes, des esters alkyliques d'imidates, des isothiocyanates, les groupes chloro-, bromo- et iodacétyle, etc.

Les conditions de conjugaison impliquent des températures modérées de 0 à 40 °C et l'utilisation de milieux aqueux à un pH modéré. La conjugaison de chromophores à une protéine est connue en pratique (voir The et collaborateurs, «Immunology», 18, 865 (1970); Cebra et collaborateurs, «J. Immunol.», 95, 230 (1965); Goldman, «Fluorescent Antibody Methods», Academic Press, New York (1968)).

On peut faire varier dans une gamme relativement large le nombre de groupes chromophores en conjugaison avec l'anticorps, selon le chromophore impliqué. Il y a au moins un groupe chromophore par anticorps et habituellement, en moyenne, environ 2 à 30, et notamment environ 3 à 25 groupes chromophores par anticorps. Lorsque le chromophore est le groupe fluorescent, le nombre moyen de groupes chromophores par anticorps est d'environ 1 à 20, de préférence de 2 à 15 et notamment de 2 à 10. Lorsque le chromophore est le corps extincteur, le nombre moyen de groupes chromophores par anticorps est d'environ 2 à 30, de préférence de 3 à 25 et notament de 5 à 25.

Il y a lieu de remarquer que lorsque des anticorps sont préparés pour un coordinat présentant plusieurs sites épitopiques, la composition réceptrice n'est pas homogène. Cela veut dire que le récepteur a des anticorps qui reconnaissent des sites épitopiques différents. En ce qui concerne le récepteur, il comprend tous les anticorps qui sont capables d'une liaison spécifique avec l'un quelconque des sites épitopiques du coordinat.

Poly(équivalent de coordinat)

Le poly(équivalent de coordinat) diffère de l'ensemble équivalent de coordinat-chromophore et de l'ensemble poly-(équivalent de coordinat)-poly(chromophore) en ce qu'il n'y a pas de chromophore et seulement un équivalent de coordinat. Les mêmes types de molécules nucléaires et le même degré de conjugaison s'appliquent au poly(équivalent de coordinat). Toutefois, l'équivalent de coordinat peut être présent dans un rapport bien plus fort que celui dans lequel le noyau central peut se lier au récepteur. Par conséquent, tandis qu'un nombre minimal de groupes d'équivalent de coordinat est essentiel, le nombre maximal est une question de pratique. Le facteur important est que des molécules de récepteur, en liaison avec un poly(équivalent de coordinat), puissent se rapprocher suffisamment pour amener les chromophores dans les limites de l'intervalle d'extinction.

Plusieurs considérations exercent une influence sur le choix d'une molécule nucléaire. Bien qu'il ne soit pas essentiel que cette molécule soit hydrosoluble, cela est désirable dans la plupart des cas. La molécule ou composition nucléaire doit toujours donner une dispersion stable dans un milieu aqueux. En deuxième lieu, elle ne doit pas absorber la lumière à la longueur d'onde d'émission du corps fluorescent, pour produire une extinction appréciable. En troisième lieu, la molécule nucléaire ne doit pas être fluorescente aux longueurs d'ondes d'émissions du corps fluorescent lorsqu'elle est irradiée par la lumière d'excitation. Par conséquent, toute absorption notable par la molécule nucléaire doit se situer au-dessous d'environ 520 nm et de préférence au-dessous d'environ 450 nm.

La molécule nucléaire doit être très fonctionnelle; de préférence elle doit porter des groupes amino ou hydroxyle, bien que d'autres fonctions réactives soient également intéressantes, par exemple la fonction carboxy. En quatrième lieu, la molécule nucléaire doit être stable dans les conditions de conservation et d'utilisation. Une cinquième particularité de la molécule nucléaire réside dans son inertie vis-à-vis des fonctions présentes dans le chromophore et le coordinat, autres que la fonction servant à la liaison. Enfin, la molécule nucléaire ne doit pas perturber le titrage immunologique, par exemple par des récepteurs naturels qui peuvent être présents dans les liquides physiologiques qui sont étudiés.

Bien qu'on puisse utiliser une molécule de grandeur quelconque, des molécules ou des cellules très grandes engendrent des problèmes d'ordre pratique. Par exemple, le passage d'une très grande molécule dans le faisceau lumineux du fluoromètre pourrait provoquer une élévation subite de la hauteur de pic. Par conséquent, on devrait prendre la moyenne du signal obtenu pendant une période raisonnable. De grandes molécules ont aussi pour conséquence d'augmenter la diffusion, mais cette dernière pourrait être compensée par un système optique approprié. De préférence, la plupart des molécules que l'on utilise ont un poids moléculaire à environ 10 000 000, et notamment compris entre environ 30 000 et 1 000 000.

Chromophore

Etant donné que des anticorps sont normalement présents dans le milieu à titrer et que des protéines absorbent la lumière de longueur d'ondes atteignant environ 310 nm, le corps fluorescent a une absorption notable supérieure à 310 nm, normalement supérieure à 350 nm et de préférence supérieure à environ 400 nm. Le choix du corps fluorescent est également dicté par le coordinat particulier dont il s'agit. Le corps fluorescent doit absorber la lumière à une plus grande longueur d'onde que le coordinat ou l'équivalent de coordinat dont il est question. Un grand coefficient d'extinction est désirable; il doit largement dépasser 10 et, de préférence, être supérieur à 10^3 et même à 10^4. Le corps fluorescent doit disposer d'un bon rendement quantique dans le milieu aqueux. Pour la commodité, le pic d'absorption du corps fluorescent ne doit pas varier dans une mesure appréciable avec le variation du coordinat.

Plusieurs corps fluorescents différents sont décrits dans les articles précités; voir, notamment, Stryer, supra et Brand et collaborateurs, supra.

Un groupe de corps fluorescents offrant plusieurs des propriétés désirables définies ci-dessus comprend les colorants de la classe du xanthène, qui englobent les fluorescéines dérivées du 3,6-dihydroxy-9-phényl-xanthydrol et les rosamines et rhodamines dérivées du 3,6-diamino-9-phénylxanthydrol. Les rhodamines et les fluorescéines portent un groupe 9-o-carboxyphényle et sont des dérivés du 9-o-carboxyphényl-xanthydrol.

Ces composés sont disponibles dans le commerce sous des formes portant des substituants sur le groupe phényle, que l'on peut utiliser comme site de liaison ou comme fonction de liaison. Par exemple, on dispose de dérivés de fluorescéine portant des substituants amino et isothiocyanato.

Un autre groupe de composés fluorescents comprend les naphtylamines portant un groupe amino en position alpha ou bêta, habituellement en position alpha. Parmi les composés naphtylaminés, on mentionne le 5-sulfonate de 1-diméthylaminonaphtyle, le sulfonate de 1-anilino-8-naphtalène et le sulfonate de 2-p-toluidinyl-6-naphtalène.

D'autres colorants comprennent la 3-phényl-7-isocyanatocoumarine, les acridines telles que la 9-isothiocyanatoacridine et l'orangé d'acridine; le N-(p-(2-benzoxazolyl)-phényl)-maléimide; les benzoxadiazoles tels que le 4-chloro-7-nitro-

benzo-2-oxa-1,3-diazole et le 7-(p-méthoxybenzylamino)-4-nitrobenzo-2-oxa1,3-diazole; les stilbènes tels que le 4-diméthylamino-4'-isothiocyanatostilbène et le 4-diméthylamino-4'-maléimidostilbène; le p-toluènesulfonate de N,N'-dioctadécycloxacarboxyanine; les pyrènes tels que l'acide 8-hydroxy-1,3,6-pyrènetrisulfonique et l'acide 1-pyrènebutyrique, la mérocyanine 540, le rose Bengale, la 2,4-diphényl-3(2H)-furannone, ainsi que d'autres molécules fluorescentes faciles à obtenir. Ces colorants ont des fonctions actives ou peuvent être pourvues aisément de ces fonctions.

Des conditions similaires impliquées avec la molécule du corps fluorescent sont applicables à la molécule extinctrice, excepté le fait qu'un bon rendement quantique de fluorescence n'est pas requis lorsque la fluorescence du corps fluorescent est en cours de mesure. Une autre considération concernant la molécule extinctrice est que cette molécule doit avoir son absorption à une longueur d'onde d'émission du corps fluorescent. Un bon recouvrement de l'émission du corps fluorescent et de l'absorption du corps extincteur est désirable.

Il y a lieu de remarquer que les caractéristiques d'absorption et d'émission du colorant peuvent varier de la forme libre en solution à la forme liée à une protéine ou un coordinat. Par conséquent, lorsqu'on fait allusion aux diverses gammes et caractéristiques des colorants, il doit s'agir du colorant tel qu'on l'utilise et non du colorant qui est non conjugué et caractérisé dans un solvant arbitraire. Dans la zone de recouvrement entre fluorescence et extinction, le corps extincteur doit avoir des coefficients d'extinction au moins du même ordre que ceux qui sont indiqués pour l'absorption par la molécule fluorescente.

Coordinant

Comme indiqé, le coordinat varie dans une large mesure, et il a normalement un poids moléculaire au moins égal à 110, plus souvent au moins égal à 125, avec un maximum illimité, bien qu'il ne dépasse pas ordinairement 10 000 000. Le plus souvent, le facteur important concernant un coordinat réside dans le fait qu'un récepteur peut être créé pour ce coordinat ou est disponible. Normalement, des récepteurs peuvent être créés pour la plupart des composés organiques à fonctionnalité polaire. Des composés pour lesquels des anticorps peuvent être formés par liaison d'un composé à un autre doué de propriétés antigéniques sont appelés haptènes. Les composés qui provoquent la formation d'anticorps sans modification chimique sont appelés antigènes. Voir Kabat et collaborateurs, «Experimental Immunochemistry», Charles C. Thomas, Springfield, Illinois 1967.

Les coordinats non polymères offrant un intérêt ont normalement un poids moléculaire compris entre environ 125 et 2000. Ces composés comprennent une grande variété de corps de structure, fonctionnalité et propriétés physiologiques diverses. Ces composés peuvent être acycliques, alicycliques ou hétérocycliques, aussi bien monocycliques que polycycliques. Les hétéro-atomes impliqués comprennent des atomes d'oxygène, d'azote, de soufre, des halogènes (fluor, chlore, brome et iode), du bore, du phosphore, des cations métalliques des Groupes 1A et 2A du tableau périodique, des métaux de transition, etc.

Les fonctions sont celles d'alcools, d'éthers, d'acides carboxyliques, d'esters et amides, d'amines (primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires), d'halogènes, de nitriles, de mercaptans, etc. Normalement, les composés sont formés uniquement de carbone, d'hydrogène, d'oxygène, d'azote, d'un halogène et de phosphore, notamment de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et d'azote et lorsque des sels sont impliqués, ils comprennent l'ion complémentaire métallique ou ammonium approprié.

Des noyaux hétérocycliques qui sont présents comprennent les noyaux de pyrrole, pyridine, pipéridine, indole, thiazole, pipérazine, pyranne, coumarine, pyrimidine, purine, triazine, imidazole, etc.

En raison de la grande diversité des composés qui peuvent être décelés dans le titrage faisant l'objet de l'invention, les différents groupes seront décomposés en diverses catégories souvent artificielles, soit par la présence d'une fonction ou d'une structure cyclique particulière, soit à cause du partage d'une fonction particulière ou de la formation reconnue d'une classe.

La première classe de composés présentant un intérêt comprend les composés porteurs d'un groupe amino, soit comme élément hétérocyclique, soit comme fonction sur une chaîne aliphatique. Ces composés ont normalement un poids moléculaire d'environ 110 à 800 et notamment d'environ 125 à 650. Ils portent fréquemment un groupe amino séparé d'un noyau benzénique par 2 ou 3 atomes aliphatiques de carbone.

Le premier groupe de composés intéressants comprend les alcaloïdes et les métabolites des alcaloïdes qui sont ingérés. Le premier groupe d'alcaloïdes importants comprend les alcaloïdes du type de la morphine. Ce groupe renferme la morphine, la codéine, l'héroïne, le glucuronide de morphine etc.

Le groupe suivant est celui des alcaloïdes de la cocaïne, qui comprend, notamment comme métabolites, le benzoylecgonine et l'ecgonine.

Un autre groupe d'alcaloïdes renferme les alcaloïdes du type cinchona tels que la quinine.

Le groupe d'alcaloïdes de l'isoquinoléine comprend la mescaline.

Le groupe des alcaloïdes du type benzylisoquinoléine comprend la papavérine.

Le groupe d'alcaloïdes du type phtalide-isoquinoléine comprend la narcotine, la narcéine et la cotarnine.

Le groupe d'alcaloïdes du type indolopyridocholine comprend l'yohimbine et la réserpine.

Le groupe des alcaloïdes de l'ergot comprend l'ergotamine et l'acide lysergique.

D'autres groupes d'alcaloïdes comprennent les groupes de la strychnine, de la pyridine, de la pipéridine, de la pyrrolizidine, etc.

Les alcaloïdes d'intérêt primordial comprennent ceux qui entrent dans la catégorie des médicaments dont il fait un emploi abusif, tels que la morphine, la cocaïne, la mescaline et l'acide lysergique, qui se prêtent à une analyse portant sur le composé lui-même ou sur son métabolite, selon le liquide physiologique dans lequel on recherche leur présence.

Plusieurs médicaments synthétiques miment les propriétés physiologiques, en partie ou en totalité, des médicaments naturels faisant l'objet d'un abus. Parmi ces médicaments, on mentionne la méthadone, la mépéridine, l'amphétamine, la méthamphétamine, le glutéthimide, la diphénylhydantoïne et les médicaments qui entrent dans la catégorie des benzodiazocycloheptanes, des phénothiazines et des barbiturates.

Des médicaments qui présentent un intérêt du fait de leurs propriétés physiologiques comprennent ceux que l'on appelle catécholamines. Parmi les catécholamines, on mentionne l'épinéphrine, l'éphédrine, le L-dopa et la norépinéphrine.

D'autres médicaments intéressants comprennent le tranquilisant appelé Méprobamate, le Tergitol et les succinimides tels que l'Ethoxsumide.

D'autres composés intéressants comprennent le tétrahydrocannabinol, le cannabinol et ses dérivés, notamment les composés dérivés de la marijuana, ses modifications synthétiques et ses métabolites.

Un autre groupe de composés de grand intérêt comprend

les stéroïdes. Les stéroïdes sont des oestrogènes, des gestogènes, des androgènes, des hormones adrénocorticales, des acides biliaires, des glycoïdes cardiotoniques, des algycones, des saponines et des sapogénines.

Une autre classe de composés comprend les vitamines telles que la vitamine A, le groupe B, par exemple les vitamines B_1, B_6 et B_{12}, les vitamines E, K, etc.

Une autre classe de composés comprend les sucres, aussi bien monosaccharides que polysaccharides, notamment des polysaccharides d'ordre deux et plus.

Une autre classe de composés comprend les prostaglandines.

Les amino-acides, les polypeptides et les protéines constituent encore une autre classe. Les polypeptides renferment habituellement environ 2 à 100 motifs amino-acide (poids molécualire ordinairement inférieur à 12 000). Les polypeptides supérieurs sont arbitrairement appelés protéines et sont ordinairement composés d'environ 1 à 20 chaînes polypeptidiques. Le terme poly(amino-acide) est utilisé comme terme générique pour désigner à la fois des polypeptides et des protéines. Parmi les amino-acides offrant un intérêt particulier, on mentionne les thyronines, tant tri-iodées que tétra-iodées. Les poly(amino-acides) utilisés dans la présente invention lorsqu'on utilise deux anticorps comme réactifs ont un poids moléculaire généralement compris entre environ 5000 et 10^7, notamment entre 10^4 et 10^6. Des substances particulièrement intéressantes parmi les polypeptides et les protéines [poly(amino-acides)] comprennent des hormones, des globulines, des antigènes et des compositions douées d'activités physiologiques spécifiques.

La grande variété des protéines peut être considérée sur la base des familles des protéines ayant des caractéristiques structurales similaires, des protéines ayant des fonctions biologiques particulières, des protéines en relation avec des micro-organismes spécifiques, notamment des micro-organismes pathogènes, etc.

On indique ci-après des classes de protéines apparentées par leur structure:

protamines
histones
albumines
globulines
scléroprotéines
phosphoprotéines
mucoprotéines
chromoprotéines
lipoprotéines
nucléoprotéines
protéines non classifiées, par exemple somalotropine, prolactine, insuline, pepsine.

Plusieurs protéines rencontrées dans le plasma humain sont importantes du point de vue clinique et comprennent les suivantes:

préalbumine
albumine
α_1-lipoprotéine
α_1-glycoprotéine acide
α_1-antitrypsine
α_1-glycoprotéine
transcortine
4,6S-post-albumine
tryptophan-faible
α_1-glycoprotéine
α_1X-glycoprotéine
globuline fixant la thyroxine
inter-α-trypsine-inhibiteur
Gc-globuline
(Gc 1–1)
(Gc 2–1)
(Gc 2–2)
Haptoglobine
(Hp 1–1)
(Hp 2–1)
(Hp 2–2)
Céruloplasmine
cholinestérase
α_2-lipoprotéine(s)
α_2-macroglobuline
α_2-HS-glycoprotéine
Zn-α_2-glycoprotéine
α_2-neuramino-glycoprotéine
érythropoïétine
β-lipoprotéine
transferrine
hémopexine
fibrinogène
plasminogène
β_2-glycoprotéine I
β_2-glycoprotéine II
Immunoglobuline G
(IgG) ou γ G-globuline
Formule moléculaire:
γ_2K_2 ou $\gamma_2\lambda_2$
Immunoglobuline A (IgA)
ou γ A-globuline)
Formule moléculaire:
$(\alpha_2K_2)^n$ ou $(\alpha_2\lambda_2)^n$
Immunoglobuline M
(IgM) ou γ M-globuline
Formule moléculaire:
$(\mu_2K_2)^5$ ou $(\mu_2\lambda_2)^5$
Immunoglobuline D(IgD)
ou γ D-globuline (γ) D)
Formule moléculaire:
(δ_2K_2) ou $(\delta_2\lambda_2)$
Immunoglobuline E (IgE)
ou γ E-globuline (γ E)
Formule moléculaire:
(ε_2K_2) ou $(\varepsilon_2\lambda_2)$
Chaînes courtes libres

Facteurs complémentaires:
C'1
C'1q
C'1r
C'1s
C'2
C'3
β_1A
α_2D
C'4
C'5
C'6
C'7
C'8
C'9

Les facteurs importants dans la coagulation du sang comprennent les suivants:

Tableau VII

Facteurs de coagulation du sang

Désignation internationale	Nom
I	Fibrinogène
II	Prothrombine

Tableau VII (suite)
Facteurs de coagulation du sang

Désignation internationale	Nom
IIa	Thrombine
III	Thromboplastine tissulaire
V et VI	Proaccélérine, globuline d'accélération
VII	Proconvertine
VIII	Globuline anti-hémophilique (AHG)
IX	Facteur Christmas, composant de la thromboplastine du plasma (PTC)
X	Facteur Stuart-Prower, autoprothrombine III
XI	Antécédent de thromboplastine du plasma (PTA)
XII	Facteur Hagemann
XIII	Facteur de stabilisation de la fibrine

Des hormones protéiniques importantes comprennent les suivants:

Hormones peptidiques et protéiniques
hormone parathyroïde
(parathormone)
thyrocalcitonine
Insuline
glucagon
relaxine
érythropoïétine
mélanotropine
(hormone mélanocyto-stimulante; intermédine)
somatotropine
(hormone de croissance)
corticotropine
(hormone adrénocorticotrope)
thyrotropine
hormone folliculo-stimulante
hormone lutéinisante
(hormone stimulant les cellules interstitielles)
hormone lutéomammotrope
(lutéotropine, prolactine)
gonadotropine
(gonadotropine chorionique)

Hormones tissulaires
Sécrétine
Gastrine
Angiotensine I et II
Bradykinine
lactogène placentaire humain

Hormones peptidiques issues de la neurohypophyse
Oxytocine
Vasopressine
Facteurs de déclenchement (RF)
CRF, LRF, TRF, Somatotropine-RF
GRF, FSH-RF, PIF, MIF
D'autres matières polymères intéressantes comprennent les mucopolysaccharides et les polysaccharides.

Des exemples de polysaccharides antigéniques dérivés de micro-organismes comprennent les composés suivants:

Nom spécifique du micro-organisme	Corps renfermant l'hémosensitive
Streptococcus pyogenes	Polysaccharide
Diprococcus pneumoniae	Polysaccharide
Neisseria meningitidis	Polysaccharide
Neisseria gonorrhoeae	Polysaccharide
Corynebacterium diphtheriae	Polysaccharide
Actinobacillus mallei; Actinobacillus whitemori	Extrait brut
Francisella tularensis	Lipopolysaccharide Polysaccharide
Pasteurella pestis	
Pasteurella pestis	Polysaccharide
Pasteurella multocida	Antigène capsulaire
Brucella abortus	Extrait brut
Haemophilus influenzae	Polysaccharide
Haemophilus pertussis	Brut
Treponema reiteri	Polysaccharide
Veillonella	Lipopolysaccharide
Erysipelothrix	Polysaccharide
Listeria monocytogenes	Polysaccharide
Chromobacterium	Lipopolysaccharide
Mycobacterium tuberculosis	Extrait en solution saline de mycobactéries extraites au phénol à 90% et de la fraction polysaccharidique de cellules et de tuberculine
Klebsiella aerogenes	Polysaccharide
Klebsiella cloacae	Polysaccharide
Salmonella typhosa	Lipopolysaccharide Polysaccharide
Salmonella typhi-murium; Salmonella derby Salmonella pullorum	Polysaccharide
Shigella dysenteriae Shigella flexneri	Polysaccharide
Shigella sonnei	Polysaccharide brut
Rickettsiae	Extrait brut
Candida albicans	Polysaccharide
Entamoeba histolytica	Extrait brut

Un autre groupe de composés comprend les antibiotiques tels que la pénicilline, l'actinomycine, la chloromycétine, etc.

Des composés individuels intéressants comprennent la sérotonine, la spermine et l'acide phénylpyruvique.

Enfin, des composés qui sont des pesticides, tels que des fongicides, des insecticides, des bactéricides et des nématicides, peuvent aussi être intéressants à titrer.

Hormis les substances offrant un intérêt, on peut aussi titrer des cellules, des virus et d'autres ensemble biologiques qui sont antigéniques ou pour lesquels on peut trouver des récepteurs naturels.

Les micro-organismes qui sont détectés peuvent être intacts, lysés, broyés ou autrement fragmentés, et la composition ou portion résultante, obtenue par exemple par extraction, peut être titrée. Les micro-organismes intéressants comprennent les suivants:

Corynébactéries
Corynebacterium diphtheriae

Pneumococci
Diplococcus pneumoniae

Streptococci
Streptococcus pyogenes
Streptococcus salivarius

Staphylococci

Staphylococcus aureus
Staphylococcus albus

Neisseriae

Neisseria meningitidis
Neisseria gonorrheae

Enterobactériaceae

Escherichia coli
Aerobacter aerogenes
Klebsiella pneumoniae
} Bactéries coliformes

Salmonella typhosa
Salmonella choleraesuis
Salmonella typhimurium
} Salmonellae

Shigella dysenteriae
Shigella schmitzii
Shigella arabinotarda
Shigella flexneri
Shigella boydii
Shigella Sonnei
} Shigellae

Autres bactéries intestinales

Proteus vulgaris
Proteus mirabilis
Proteus morgani
} Espèces du genre Proteus

Pseudomonas aeruginosa
Alcaligenes faecalis
Vibrio cholerae

Groupe Hemophilus-Bordetella

Hemophilus influenzae
H. ducreyi
H. hemophilus
H. aegypticus
H. parainfluenzae

Bordetella pertussis

Pasteurellae

Pasteurella pestis
Pasteurella tularensis

Brucellae

Brucella melitensis
Brucella abortus
Brucella suis

Bacilles aérobies sporogènes

Bacillus anthracis
Bacillus subtilis
Bacillus megaterium
Bacillus cereus

Bacilles anaérobies sporogènes

Clostridium botulinum
Clostridium tetani
Clostridium perfringens
Clostridium novyi
Clostridium septicum
Clostridium histolyticum
Clostridium tertium
Clostridium bifermentans
Clostridium sporogenes

Mycobactéries

Mycobacterium tuberculosis hominis
Mycobacterium bovis
Macobacterium avium
Mycobacterium leprae
Mycobacterium paratuberculosis

Actinomycètes (bactéries fongiques)

Actinomyces israelii
Actinomyces bovis
Actinomyces naeslundii
Nocardia asteroides
Nocardia brasiliensis

Spirochètes

Treponema pallidum
Treponema pertenue
Treponema carateum
Borrelia recurrentis
Leptospira icterohemorrhagiae
Leptospira canicola
Spirillum minus
Streptobacillus moniliformis

Mycoplasmes

Mycoplasma pneumoniae

Autres micro-organismes pathogènes

Listeria monocytogenes
Erysipelothrix rhusiopathiae
Streptobacillus moniliformis
Donvania granulomatis
Bartonella bacilliformis

Rickettsiae
(parasites semblables à des bactéries)

Rickettsia prowazekii
Rickettsia mooseri
Rickettsia rickettsii
Rickettsia conori
Rickettsia australis
Rickettsia sibiricus
Rickettsia akari
Rickettsia tsutsugamushi
Rickettsia burnetii
Rickettsia quintana

Chlamydia
(parasites bactériens/viraux ne pouvant pas être classifiés)

Agents du type Chlamydia
(dénomination incertaine)

Champignons

Cryptococcus neoformans
Blastomyces dermatidis
Histoplasma capsulatum
Coccidioides immitis
Paracoccidioides brasiliensis
Candida albicans
Aspergillus fumigatus
Mucor corymbifer (Absidia corymbifera)
Rhizopus oryzae
Rhizopus arrhizus
Rhizopus nigricans
} Phycomycètes

Sporothrichum schenkii
Fonsecaea pedrosoi
Fonsecaea compacta
Fonsecaea dermatitidis
Cladosporium carrionii
Phialophora verrucosa
Aspergillus nidulans
Madurella mycetomi
Madurella grisea
Allescheria boydii
Phialosphora jeanselmei
Microsporum gypseum
Trichophyton mentagrophytes
Keratinomyces ajelloi
Microsporum canis
Trichophyton rubrum
Microsporum andouini

Virus

Adénovirus
Herpès-virus

Herpès simplex
Varicelle (petite vérole volante)
Herpès Zoster (zona)
Virus B
Cytomegalovirus

Virus de la vaccine
Variole (petite vérole)
Vaccine
Virus de la vaccine du bœuf
Paravaccine
Acné varioliforme

Picornavirus
Poliovirus
Coxsackievirus
Echovirus
Rhinovirus

Myxovirus
Grippe (A, B et C)
Parainfluenza (1–4)
Virus des oreillons
Virus de la maladie de Newcastle
Virus de la rougeole
Virus de la peste bovine
Virus de la maladie des chiens
Virus syncytial respiratoire
Virus de la rubéole

Arbovirus
Virus de l'encéphalite équine de l'Est
Virus de l'encéphalite équine de l'Ouest
Sindbis-virus
Chikungunya-virus
Semliki Forest-virus
Mayora-virus
Virus de l'encéphalite de Saint-Louis
Virus de l'encéphalite de California
Virus de la fièvre à tiques du Colorado
Virus de la fièvre jaune
Virus de la dengue

Réovirus
Réovirus types 1–3

Hépatite
Virus de l'hépatite A
Virus de l'hépatite B

Virus responsables de tumeurs
Virus de la leucémie de Rauscher
Virus de Gross
Virus de la leucémie de Maloney
Virus de la leucémie de Friend
Virus de la tumeur mammaire de la souris
Virus de la leucose aviaire
Virus du sarcome de Roux
Virus du polyome
Virus Simien 40
Virus du papillome.

Les préparations de micro-organismes comprennent les préparations suivantes:
Protéine de Streptococcus pyogenes
Toxine protéinique de Pasteurella pestis
Toxoïde de Clostridium tetani
α-lécithinase de Clostridium perfringens
Filtrats d'Escherichia coli
Extrait protéinique de Treponema reiteri
Toxine et toxoïde de Corynebacterium diphtheriae
Protéine de Mycobacterium tuberculosis
Cytoplasme de M. tuberculosis
Filtrat de culture et tuberculine de M. tuberculosis
Antigène «brut» de Mycoplasma pneumoniae.

Titrage immunologique

Les titrages immunologiques en question sont basés sur le degré d'extinction qui se manifeste dans une solution dans laquelle des molécules fluorescentes sont irradiées avec absorption de lumière par le corps fluorescent, de préférence dans les limites du pic d'absorption, en fonction de la quantité de coordinat contenue dans le milieu. Ainsi, le nombre de molécules de corps fluorescent et de corps extincteur qui sont rassemblées dans un intervalle dans lequel l'extinction peut avoir lieu, est en relation avec la quantité de coordinat qui est présente dans le milieu à titrer.

Le tirage peut être effectué avec des récepteurs du coordinat (anti-coordinat) conjugués au chromophore (anti-coordinat-chromophore) ou au récepteur de l'anti-coordinat (anti-(anti-coordinat)) conjugué au chromophore [anti(anti-coordinat)-chromophore]. Pour des raisons qui seront exposées dans ce qui suit, cette dernière technique (technique du double récepteur) offre des avantages du point de vue de la mise en œuvre, tout en offrant possibilités de titrage que ne permet pas la technique à un seul récepteur. La technique du double récepteur attache l'ensemble récepteur-chromophore indirectement au coordinat par un récepteur (anti-coordinat) intermédiaire qui offre alors un plus grand degré de liberté dans la variation des réactifs.

Dans la mise en œuvre du titrage en utilisant la technique à un seul récepteur, l'équivalent de coordinat utilisé comme réactif a lui-même un équivalent attaché directement (par covalence) à un chromophore, équivalent de coordinat $-(Ch_2)_x$ ou poly(équivalent de coordinat)-poly(Ch_2), ou indirectement (par l'intermédiaire de l'ensemble récepteur-Ch_2) à un chromophore (Ch_2). Le titrage est ensuite effectué en combinant dans le milieu à titrer, le coordinat attaché à Ch_2, l'ensemble récepteur-Ch_1 et la substance inconnue. Divers ordres d'addition peuvent être admis. Lorsque l'équivalent de coordinat doit être lié indirectement à Ch_2, l'ensemble récepteur-Ch_1 et l'ensemble récepteur-Ch_2 peuvent être ajoutés par étapes ou à peu près simultanément.

L'ensemble récepteur-Ch_1 et l'ensemble récepteur-Ch_2 peuvent être combinés avantageusement en un seul réactif dans le rapport correct. Ainsi, le rapport des deux récepteurs communs peut être réglé avec soin et les deux récepteurs peuvent être ajoutés avec précision au mélange à titrer. Le mélange peut être un mélange lyophilisé anhydre d'une solution aqueuse normalement tamponnée (pH 5–10; habituellement 6,5–8,5) de toute concentration désirée.

La concentration du coordinat impliqué varié généralement d'environ 10^{-4} à 10^{-14}, de préférence d'environ 10^{-6} à 10^{-12} et notamment de 10^{-6} à 10^{-10} M. Les concentrations des réactifs reflètent la concentration intéressante du coordinat.

Le milieu est normalement aqueux; il renferme 0 à 40 et notamment 0 à 20% en volume d'un solvent organique polaire. Des exemples de solvants organiques polaires comprennent l'éthylène-glycol, l'éthanol, le carbitol, le diméthylformamide, le diméthylsulfoxyde, etc. De préférence, le milieu aqueux est sensiblement exempt d'autres solvants polaires. Il est normalement tamponné dans la gamme d'environ 5 à 10, de préférence d'environ 6,5 à 8,5 et notamment d'environ 7 à 8,5. On peut utiliser divers tampons tels qu'un borate,

un phosphate, un carbonate, l'acide barbiturique, le tampon tris, etc. Le tampon particulier que l'on utilise n'est pas déterminant aux fins de l'invention mais dans des titrages particuliers, un tampon peut être préféré à un autre. La concentration du tampon est normalement comprise entre environ 0,005 et 0,5 M, notamment entre environ 0,01 et environ 0,1 M.

Pendant le titrage, on utilise normalement des températures modérées, allant généralement d'environ 0 à 45°C, notamment d'environ 15 à 40°C. La température particulière choisie dépend de la commodité et de l'éffet exercé par la température sur le rendement de fluorescence, ainsi que de la constante de liaison du récepteur au coordinat. La conduite du titrage est plus pratique aux basses températures, attendu que le rendement de fluorescence et les constantes de liaison sont améliorés.

Par convention, les titrages à un seul récepteur sont divisés en titrages dans lesquels le coordinat est attaché par co-valence au chromophore et ceux dans lesquels le coordinat est attaché indirectement au chromophore par l'intermédiaire d'un récepteur.

Le premier titrage à considérer est celui que l'on effectue avec des compositions dans lesquelles le chromophores est en liaison de co-valence avec le coordinat. Comme indiqué ci-dessus, un chromophore unique peut être attaché à un seul coordinat, ou bien en utilisant une molécule nucléaire, plusieurs coordinats peuvent être liés à plusieurs groupes chromophores. A titre de variante, dans le cas de grands coordinats tels que des protéines, plusieurs groupes chromophores peuvent être attachés au coordinat.

L'ensemble équivalent de coordinat-chromophore est généralement présent à une concentration n'excédant pas 100 fois la concentration maximale et ne s'abaissant pas au-dessous de 0,01 fois la concentration minimale dans la gamme intéressante, la concentration étant de préférence de l'ordre de grandeur ou de l'ordre d'un facteur 10 de la concentration minimale intéressante. La concentration de l'ensemble récepteur-chromophore est ensuite déterminée par l'addition d'une quantité suffisante du récepteur pour obtenir une extinction d'au moins 10%, de préférence d'au moins 20% et pouvant atteindre 100%, habituellement de 20 à 80% et de préférence d'environ 50 à 80%. La quantité d'ensemble récepteur-chromophore que l'on utilise est en relation avec la constante de liaison, la concentration intéressante affectant la concentration de l'ensemble coordinat-chromophore, la sensibilité de l'instrument, etc.

Bien que le chromophore lié au coordinat puisse être le corps extincteur, il s'agit le plus souvent du corps fluorescent. Cela n'est pas une question de possibilité, mais plutôt de pratique. Dans la plupart des cas, le récepteur est l'anticorps qui est un mélange protéinique complexe, renfermant l'anticorps pour le coordinat, ainsi que d'autres anticorps et d'autres protéines. Lorsque la composition d'anticorps est marquée avec le chromophore, une proportion sensible de ce dernier est liée à une protéine autre que l'anticorps relatif au coordinat (anticorps relatif au coordinat (anti-coordinat). Par conséquent, si le corps fluorescent était lié au récepteur, cela engendrerait une grande fluorescence de fond dans le milieu à titrer. A titre de variante, lorsqu'un échantillon relativement pur de l'anti-coordinat est disponible le mode opératoire préféré consisterait à lier le coordinat au corps extincteur plutôt qu'au corps fluorescent.

L'ordre particulier d'addition des diverses substances au milieu à titrer n'est pas déterminant, aux fins de l'invention. La substance inconnue et l'ensemble équivalent de coordinat-chromophore peuvent être combinés en même temps que l'ensemble récepteur-chromophore, ou bien les substances peuvent être ajoutées successivement. De préférence, la substance inconnue est associée avec l'ensemble récepteur-chromophore et le tout est soumis à une incubation pendant une période suffisante pour que l'équilibre soit à peu près atteint. Par conséquent, les sites disponibles de liaison du récepteur sont réduits proportionnellement à la quantité de substance inconnue présente dans le milieu à titrer. L'ensemble équivalent de coordinat-chromophore peut ensuite être ajouté et le tout peut être soumis à une incubation, puis la solution est transférée dans un fluorimètre et l'intensité de fluorescence est déterminée par excitation, de la lumière à une ou plusieurs longueurs d'ondes étant absorbée par le corps fluorescent.

Les durées d'incubation dépendant de la température, de la constante de liaison du récepteur et des concentrations des substances présentes dans le milieu à titrer. Normalement, les durées d'incubation sont d'au moins environ 5 secondes et ne dépassent pas de préférence environ 6 heures; elles sont plus souvent comprises entre environ 30 secondes et 2 heures et notamment entre 1 et 30 minutes. Les températures d'incubation varient généralement d'environ 15 à 40°C.

En utilisant une série de solutions ayant des concentrations connues en coordinat, on peut tracer une courbe d'étalonnage établissant une relation entre la fluoresence ou le pourcentage d'extinction et la concentration en coordinat. La fluorescence qui résulte d'un milieu à titrer contenant une substance inconnue peut ensuite être mise en relation directe avec la concentration de ladite substance inconnue dans le milieu à titrer.

Dans un second mode opératoire dans lequel le coordinat est attaché indirectement à un chromophore, l'anti-coordinat est divisé en deux parties et une partie est conjuguée avec le corps fluorescent tandis que l'autre est conjuguée avec le corps extincteur. Ce mode opératoire requiert que le coordinat présente plusieurs sites déterminants ou épitopiques, ou bien qu'un poly(équivalent de coordinat) soit préparé lorsque le coordinat présente un seul site épitopique ou en présente deux. Cela veut dire que les coordinat ne peut s'associer simultanément qu'avec un petit nombre d'anticorps, habituellement environ 1 ou 2. Comme indiqué ci-dessus, un poly(équivalent de coordinat) est préparé par conjugaison d'un équivalent de coordinat avec une molécule nucléaire de haut poids moléculaire.

Dans un titrage dans lequel le coordinat est en conjugaison par covalence avec un chromophore, la réponse du titrage, allant de l'absence de coordinat à des concentrations croissantes de ce dernier, est une courbe uniforme indiquant une fluorescence qui croît jusqu'à ce que le maximum de fluorescence ait été atteint. On observe un résultat similaire lorsqu'on utilise un poly(équivalent de coordinat) pour doser le coordinat et les ensembles récepteur-corps fluorescent et récepteur-corps extincteur. Toutefois, avec un antigène qui présente plusieurs sites déterminants et pour lequel un ensemble récepteur-corps extincteur et un ensemble récepteur-corps fluorescent sont seuls ajoutés à la substance inconnue à titrer, à la concentration nulle en antigène, il existe une fluorescence maximale qui diminue, lorsque la concentration en antigène croît, jusqu'à un minimum et qui augmente ensuite de nouveau jusqu'à une fluorescence maximale.

La cause de ce double résultat est très nette. A mesure que l'antigène est ajouté, le corps extincteur et le corps fluorescent sont rassemblés à la surface de l'antigène, en sorte qu'une certaine extinction a lieu. Lorsque la concentration en antigène augmente, les deux récepteurs se rassemblent en quantité de plus en plus grande à la surface de l'antigène et l'extinction augmente. Toutefois, pour une certaine concentration, l'extinction atteint un maximum (la fluoresence

passe par un minimum). Lorsque la quantité d'antigène augmente, la quantité de récepteur lié à tout antigène diminue, si bien que le degré d'extinction diminue également. Enfin, pour de fortes concentrations en antigène, la quantité de récepteur lié à tout antigène est insuffisante pour produire une extinction. Par conséquent, lorsqu'on effectue le titrage d'un antigène, il est nécessaire de conduire ce titrage à deux dilutions différentes de l'antigène. De cette façon, on peut savoir si l'on se trouve sur la partie décroissante ou sur la partie croissante de la courbe.

La concentration en poly(équivalent de coordinat), sur la base de l'équivalent disponible, tombe dans les mêmes gammes que celles qui ont été indiquées pour le coordinat lié par covalence au chromophore.

Dans la conduite du titrage avec les deux récepteurs conjugués, par exemple des anticorps, l'antigène est combiné avec les anticorps habituellement en présence d'environ 0,1 à 1 mg/ml d'une protéine, par exemple d'une albumine, et on le fait incuber pendant une période suffisante, généralement pendant environ 5 secondes à 6 heures, de préférence pendant environ 0,5 minute à 2 heures et notamment pendant 1 à 30 minutes, à une température comprise dans la gamme d'environ 15 à 40°C. Les facteurs déterminant la durée d'incubation ont été définis dans ce qui précède.

Avec un poly(équivalent de coordinat), les deux anticorps conjugués sont associés avec la substance inconnue à titrer, soumis à une incubation, et le poly(équivalent de coordinat) est ajouté puis le mélange est soumis à une nouvelle incubation. Les durées et les températures indiquées ci-dessus s'appliquent également dans ce titrage.

L'échantillon est ensuite introduit dans un fluorimètre et la fluorescence est déterminée par excitation avec une lumière de la longueur d'onde appropriée. La fluorescence peut provenir du corps fluorescent ou du corps extincteur selon la bande de longueur d'onde qui est mesurée. Le titrage peut être effectué à la main ou peut être rendu automatique.

Le procédé de l'invention est facile à adapter à la détection de la présence d'anticorps ou d'antigène dans un liquide physiologique humain en utilisant une méthode à deux étapes et des ensembles récepteur-chromophores (Ch_1 et Ch_2) pour la gamma-globuline, par exemple la gamma-globuline humaine. On peut aisément faire la distinction par la différence de poids moléculaire entre l'agglutination d'anticorps ou d'autres molécules réceptrices qui sont liées à un antigène et les anticorps ou d'autres récepteurs qui sont libres en solution.

Selon que l'on désire déceler la présence ou l'absence d'un antigène ou d'anticorps dans un liquide physiologique humain, par exemple du sang, on doit ajouter la substance complémentaire, habituellement en excès important par rapport à la concentration maximale intéressante. Par exemple, si l'on désire déceler la présence d'anticorps dans du sérum relativement à un antigène particulier, on doit ajouter l'antigène au liquide physiologique et séparer les composants dont les poids moléculaires sont supérieurs aux poids moléculaires de l'anticorps (plus de 160 000), par exemple par centrifugation. Après séparation du précipité de la liqueur surnageante, le précipité est redispersé et titré conformément à l'invention pour déceler la présence de gamma-globuline humaine. Ce n'est qu'en présence d'antigène que la gamma-globuline humaine sera présente dans le précipité. Par conséquent, la présence de gamma-globuline humaine dans le précipité indique la présence d'anticorps relatif à l'antigène dans le sérum.

Le procédé à deux étapes peut être utilisé pour déceler une grande variété d'antigènes et d'anticorps utilisant les mêmes ensembles récepteur-chromophores. Le procédé permet une détection directe d'anticorps relatifs à des antigènes spécifiques. Des antigènes peuvent être décelés indirectement par addition d'anticorps au liquide susceptible de contenir l'antigène, puis titrage pour déceler la présence d'anticorps dans le précipité après séparation des anticorps liés et des anticorps non liés.

La technique à deux récepteurs est une technique homogène qui permet de déceler des haptènes, des antigènes et un anti-coordinat, notamment lorsque le coordinat est un antigène poly-épitopique.

Dans le mode opératoire le plus simple pour la détection d'un coordinat, le coordinat doit être conjugué avec un chromophore, notamment un corps fluorescent et un anti-coordinat et l'ensemble anti-(anti-coordinat)-chromophore, notamment le corps extincteur ajouté à la solution à titrer. Ainsi, on peut fixer un grand nombre de molécules de corps extincteur au coordinat, ce qui augmente la probabilité d'extinction. En effet, l'anti-coordinat permet d'accroître le nombre de molécules de corps extincteur capables de se fixer en coordinat.

Les concentrations des réactifs sont identiques à celles des réactifs analogues pour la technique à un seul récepteur, l'ensemble anti-(anti-coordinat)-chromophore étant en excès molaire par rapport à l'anti-coordinat, le rapport molaire étant généralement compris entre 1,5 et 10:1. Le cas échéant, on peut utiliser des motifs F_{ab} individuels plutôt que l'IgG intacte.

Le mode suivant présente deux chromophores indirectement liés au coordinat. Dans ce mode, l'anti-coordinat et les ensembles anti-(anti-coordinat)-Ch_1 et anti-(anti-coordinat)-Ch_2 sont seuls utilisés. Toutefois, avant l'introduction de ces réactifs, une portion de l'anti-coordinat est associée avec l'ensemble anti-(anti-coordinat)-Ch_1 et une autre portion avec l'ensemble anti-(anti-coordinat)-Ch_2, de manière à établir la liaison. De préférence, l'anti-(anti-coordinat) est monofonctionnel, par exemple F_{ab}. L'ensemble anti-(anti-coordinat)-Ch_1 et $-Ch_2$ lié à l'anti-coordinat constitue un réactif comparable pour l'ensemble récepteur-Ch_1 et, respectivement, l'ensemble récepteur-Ch_2. On peut utiliser pour les ensembles anti-(anti-coordinat)-chromophores et l'anti-coordinat les mêmes rapports que ceux qui ont été indiqués ci-dessus.

Dans une forme préférée de réalisation, on utilise des anti-coordinats venant de deux espèces différentes, par exemple des espèces de mammifères tels que moutons et vaches. Dans ce cas, les sites épitopiques ou hapténiques sont différents pour les deux anti-coordinats du même coordinat. Lorsqu'il est question d'un anti-coordinat venant de deux sources différentes, cet anti-coordinat est précédé d'une lettre minuscule, par exemple a-(anti-coordinat). L'anti-coordinat et l'anti-(anti-coordinat)-chromophore ne doivent alors pas être préalablement combinés. Les rapports des divers réactifs doivent être analogues à ceux des réactifs similaires utilisés dans les titrages décrits ci-dessus.

Les réactifs du chromophore doivent être l'anti-(a-anti-coordinat)-Ch_1 et l'anti-(b-anti-coordinat)-Ch_2. Ainsi, Ch_1 doit être associé uniquement avec un a-(anti-coordinat) et Ch_2 uniquement avec un b-(anti-coordinat).

Cette technique permet de doser les ensembles en solution, lorsque des constituants d'un ensemble diffèrent d'au moins un site épitopique. On peut préparer un a-(anti-coordinat) pour un constituant de l'ensemble et un b-(anti-coordinat) pour un autre constituant de cet ensemble. Le corps extincteur et le corps fluorescent ne doivent être mis en présence que lorsque les deux constituants sont liés ensemble.

L'utilisation d'un anti-coordinat venant de deux sources

différentes s'applique aussi avantageusement dans le cas d'un coordinat pour éviter de devoir combiner préalablement un anti-coordinat avec l'anti-(anti-coordinat)-chromophore et lorsque une liaison de covalence apparaît entre deux entités qui peuvent exister indépendamment, par exemple lorsqu'elles subissent une réaction chimique.

Les corps réactionnels peuvent être contenus dans des fioles séparées ou bien ils peuvent être mélangés à l'état lyophilisé ou en solution aqueuse normalement tamponnée (pH 5–10; habituellement 6,5–8,5) à toute concentration désirée. De préférence, l'anti-(a-anti-coordinat) ne doit pas être associé avec le a-(anti-coordinat) en solution en tant que réactif, pendant une longue période de temps avant l'application. On pourrait avantageusement associer les deux anti-coordinats et les deux anti-(anti-coordinats).

Un avantage particulier de l'utilisation du procédé à deux récepteurs réside dans le fait que la même paire d'anti-(anti-coordinat)-chromophores peut être utilisée quel que soit le coordinat, les paires d'anti-coordinat variant seules avec le coordinat.

Pour déceler la présence d'anticorps relatifs à un antigène particulier, on doit effectuer le titrage comme si l'on décelait l'antigène, excepté qu'une quantité connue d'antigène devrait être ajoutée au milieu à titrer. Tout anticorps présent dans la substance inconnue aurait pour effet de réduire la quantité d'anti-(anti-coordinat)-chromophore attachée à l'antigène et d'abaisser ainsi le degré d'extinction qui se manifesterait en l'absence d'anticorps. Naturellement, l'anti-coordinat ne doit pas provenir de la même espèce (mammifère) que l'anticorps à déceler.

L'invention est illustrée par les exemples suivants, donnés à titre non limitatif.

Dans les exemples, toutes les températures sont exprimées en degrés centigrades, et toutes les parties sont exprimées en poids, sauf indication contraire.

Toutes les solutions tampons sont des tampons aqueux. Tous les symboles, sauf indication contraire, correspondent à la définition normale.

On a utilisé les symboles suivants:

IgG	= gamma-globuline
IgG(x)	= anti-x
R	= tétraméthylrhodamine, par exemple RIgG(x) = tétraméthylrhodamine conjuguée avec anti-x
F	= fluorescéine; par exemple FIgG(x) représente la fluorescéine conjuguée avec l'anti-x; et
hIgG	= gamma-globuline humaine.

Exemple 1

Produit de conjugaison de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et de la O³-aminoéthylmorphine (FLUMO'S')

A. On dissout 0,5 g de l'amine appelée fluorescéine (Sigma, Isomère I, pur, chromatographie en couche mince MeOH/$CHCl_3$ 1:3) dans 20 ml d'acétone anhydre (déshydratée sur du carbonate de potassium anhydre) et on ajoute la solution goutte à goutte, à la température ambiante, à 3 ml de thiophosgène dans 5 ml d'acétone, en agitant énergiquement (une demi-heure). On continue d'agiter pendant 1 heure et on filtre rapidement le précipité résultant, refroidi au bain de glace à 5°, sur un entonnoir en verre fritté à pores de très petit diamètre. On lave le précipité avec de l'acétone anhydre (3 ml) puis avec 5 fois 5 ml d'acide chlorhydrique 6N, en triturant avec une spatule jusqu'à ce que tout le précipité est viré au rouge intense, puis on effectue un séchage sous vide (KOH à 80°) pendant environ 16 heures. L'isothiocyanate obtenu est pur (chromatographie en couche mince, 50% de MeOH/DMF).

B. On dissout 100 mg de O³-amino-éthylmorphine dans 5 ml d'acétone et on ajoute la solution obtenue à un mélange de 20 ml d'acétone, 5 ml d'eau et 0,07 ml de triéthylamine. On ajoute goutte à goutte à cette solution une solution de 100 mg de FITC dans 5 ml d'acétone en agitant pendant 15 minutes. On continue d'agiter pendant encore 80 minutes, en ajustant le pH du mélange réactionnel à 9,5 par l'addition de quelques gouttes de solution diluée de triéthylamine dans de l'acétone (1,4 ml/10 ml d'acétone). L'acétone est ensuite partiellement chassée à l'évaporateur rotatif à la température ambiante. Le produit est ensuite précipité par barbotage d'anhydride carbonique dans la solution avec addition simultanée d'eau (jusqu'à 10 ml) jusqu'à ce que le pH s'abaisse à 6–6,5. Le précipité est rapidement filtré sur un entonnoir en verre fritté et lavé avec une solution aqueuse d'anhydride carbonique (2 ml, pH 6,0). Le rendement est de 60 mg. Le filtrat et les liqueurs de lavage sont rassemblés et on obtient une seconde récolte en répétant le barbotage de CO_2 comme indiqué ci-dessus. Le rendement est de 27 mg. Le produit est séché pendant environ 16 heures sous vide à 80° sur du pentoxyde de phosphore. Le rendement total est de 87 mg. Le produit présente une seule tache dans la chromatographie en couche mince (méthanol à 50% dans du diméthylformamide); Rf égale 0,45.

Exemple 2

Purification et marquage de l'anticorps relatif à la morphine (IgG(m)) avec l'isothiocyanate de tétraméthylrhodamine (TRITC)

A. (a) Préparation de l'immuno-adsorbant de la morphine

On combine du «Sepharose 4B» activé au bromure de cyanogène avec de l'hexaméthylènediamine (8–10 micromoles/1 ml de gel garni) en suivant les directives de la firme productrice («Pharmacia», Uppsala). On met en suspension 2,5 ml de gel humide dans un tampon au borate (10 ml, 0,1 N, pH 8,8), on ajoute l'anhydride mixte de O³-carboxyméthylmorphine et de chloroformiate d'isobutyle (0,1 millimole, grand excès) dans 2 ml de DMF, en opérant à froid (0°) et on laisse réagir le mélange pendant 3 heures. On filtre le gel et on le lave successivement avec 500 ml d'eau, 500 ml de tampon au borate 0,1 M (pH 9,0), 500 ml d'eau, de l'acide chlorhydrique dilué + du chlorure de sodium 0,1 M (pH 2,5, 1500 ml) et 1000 ml d'eau. On ne peut pas déceler la présence de morphine à la fin des lavages. L'évaluation de la morphine liée est effectuée par la méthode d'hydrolyse à l'acide acétique dilué (Failla et collaborateurs, «Anal. Biochem.», 52, 363 (1973). Le spectre ultraviolet a été comparé à celui de la O³-carboxyméthylmorphine. L'équivalent de morphine liée est de 5,05 µmoles/1 ml de gel garni.

(b) Purification de l'anticorps relatif à la morphine

Le conjugué morphine-«Sepharose» (2,5 ml) est utilisé pour garnir une colonne de 6,35 mm de diamètre extérieur et lavé successivement avec 100 ml de tampon au borate 0,1 M (pH 9,0), 100 ml d'eau, 100 ml d'acide chlorhydrique dilué (pH 1,5), 100 ml d'eau et 100 ml du même tampon au borate. On fait passer 7 ml de solution-mère d'IgG de mouton ($2{,}18 \times 10^{-4}$ M sites de liaison) sur la colonne puis on effectue un lavage avec le tampon au borate 0,1 M (pH 9,0) jusqu'à ce qu'on ne puisse plus déceler de protéine dans l'effluent (uv). Toute l'activité anti-morphine est retenue par la colonne, comme l'indique le dosage de la morphine par marquage des spins (voir le brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 3 690 834). On continue le lavage avec un tampon de chlorhydrate de glycine 0,1 N (pH 4,0) pour qu'il n'y ait pas d'élution de protéine. L'anticorps est ensuite élué avec

le tampon au chlorhydrate de glycine 0,1 N (pH 1,5) et des fractions de 3 ml sont recueillies à la température ambiante dans des tubes contenant 1 ml de tampon au borate 1N (pH 9,0). Presque tout l'anticorps est recueilli en trois fractions qui sont rassemblées et dialysées pendant 24 heures contre un tampon au phosphate 0,1 N (pH 7,5) (2×2000 ml). On détermine l'activité antimorphine de la fraction isolée, par la méthode de marquage des spins de la morphine, et on trouve 70% de l'activité antimorphine initialement liée. Cette fraction est pure à 100% d'après le titre d'activité antimorphine, comparativement à la teneur en protéine estimée d'après le spectre ultraviolet à 280 nm.

B. (a) Purification de l'anticorps relatif à la morphine par chromatographie sur «Sephadex»

La solution d'antimorphine IgG(m) (2 ml, environ 50 mg/ml de protéine totale) est séparée sur une colonne de «Sephadex G-200» (2×30 cm) avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) 0,01 M de pH égal à 7,4 (vitesse d'écoulement 1 ml/10 nm). L'IgG se sépare nettement de l'IgM et de l'albumine et on recueille des fractions de 2–3 ml. L'IgG obtenue ne renferme pas d'albumine d'après l'électrophorèse sur acétate de cellulose (tampon Tris-barb. pH 8,8, $\eta = 0{,}1$) et consiste en IgG de teneur en antimorphine égal à 32–35%. Le taux de séparation dépend de la largeur de section du pic IgG recueilli et est ordinairement de 50% de l'activité totale d'antimorphine chargée sur la colonne. La fraction recueillie d'IgG est dialysée contre un tampon au phosphate 0,01 M de pH égal à 7,5.

(b) Traitement de l'immuno-adsorbant de sérum albumine de bœuf (BSA)

On combine de la BSA avec le produit «Sepharose 4B» (Pharmacia) activé au bromure de cyanogène d'après les instructions données par la firme productrice (on utilise un excès de 50% de BSA par rapport à la quantité recommandée). On fait passer 5 ml de la solution (20 mg/ml) d'IgG chromatographiée sur «Sephadex» sur la colonne d'immuno-adsorbant de BSA (1×15 cm) et on procède à l'élution avec un tampon au phosphate de 0,01 M de pH égal à 7,5. La protéine recueillie sort dans un volume de 20 ml; on titre la teneur en protéine (uv) et l'activité d'antimorphine (méthode de marquage des spins). Le taux de séparation de la protéine est de 70% et celui de l'activité d'antimorphine est de 90–92%.

(c) Antimorphine (IgG(m)) marquée au TRITC (RIgG(m))

On ajoute à une solution de 7 mg/0,5 ml d'IgG(m) dans un tampon au phosphate 0,01 M (pH 7,5) des cristaux de carbonate de potassium jusqu'à ce que le pH soit égal à 10,0–10,5, en agitant à la température ambiante. On ajoute ensuite 15 à 1000 µg de TRITC (isothiocyanate de tétraméthylrhodamine) dissous dans 3 à 30 µl d'acétone et on continue d'agiter pendant 3 heures. Initialement, le pH tombe à 9,0 puis se stabilise et on le maintient à 9,0–9,5, le cas échéant, en ajoutant avec précaution des cristaux de carbonate de potassium. On fait ensuite passer le mélange sur une colonne (1×15 cm) de «Sephadex» G-25 (M) avec un tampon au phosphate 0,01 M (pH 7,5) et on recueille en 10–15 minutes l'éluat de la première bande colorée qui se sépare totalement des autres bandes. La séparation est répété deux fois pour assurer l'enlèvement total du colorant libre. Dans le cas de la formation d'un précipité, ce dernier est éliminé par centrifugation avant la séparation sur «Sephadex». Le tableau suivant illustre la préparation de conjugués avec divers degrés de marquage par la méthode décrite ci-dessus:

Protéine (antimorphine %)	Concentration mg/0,5 ml	Colorant (TRITC) µg	D/P* (M/M)	Pourcentage d'activité récupéré
IgG (45)	7,1	15	0,9	86
IgG (45)	7,1	50	2,2	89
IgG (45)	7,1	150	4,4	75
IgG (45)	7,1	400	15–16	75
IgG (45)	7,1	750	20–23	70

* D/P = colorant/protéine

Exemple 3

Anticorps relatif à la morphine (FIgG(m)) marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC)

(a) Conduite de la conjugaison

On ajuste à 9,5 avec des cristaux de carbonate de sodium Na_2CO_3. le pH de 4 fractions de 1 ml d'anticorps relatif à la morphite chromatographiée par affinité (3,06 mg de protéine/ml) (voir exemple 2) dans un tampon au phosphate 0,01 M de pH égal à 7,5. On ajoute respectivement 10, 20, 30 et 50 µl d'une solution acétonique de FITC (2 mg/300 µl) aux quatre fractions d'anticorps à la température ambiante, en agitant. Au bout de 3 heures, on rassemble les mélanges réactionnels puis on les divise en 8 portions égales dont on fait passer chacune sur une colonne de «Sephadex G-25» (1×15 cm) équilibrée avec un tampon au phosphate 0,01 M de pH égal à 7,5. L'élution avec le même tampon donne (première bande colorée) le conjugué qui est exempt de colorant n'ayant pas réagi.

(b) Séparation du conjugué de FITC sur colonne de DEAE-cellulose

(Voir M. Goldman, «Fluorescent Antibody Methods» Academic Press ed., 1968, pages 104–107). Le conjugué FITC-antimorphine est appliqué à une colonne de DEAE cellulose (1×3 cm) équilibrée avec un tampon au phosphate 0,01 M de pH égal à 7,3. L'élution avec le même tampon et du chlorure de sodium à concentration croissante donne des fractions dont la teneur en colorant augmente. La teneur en colorant D/P des diverses fractions est déterminée d'après le nomographe de Wells (A. F. Wells, C. E. Miller et M. K. Nadel, «Appl. Microbiol.», 14, 271 (1966). L'activité d'antimorphine est déterminée comme d'habitude par marquage des spins de la morphine. On obtient les fractions suivantes:

N° de la fraction	Protéine mg	D/P moles/mole
1	1,75	1,5
2	1,3	3,0
3	1,15	6,0
4	1,42	9,0

Exemple 4

Purification de l'anticorps relatif à la gamma-globuline humaine (IgG(hIgG) et conjugaison avec FITC (FIgG(hIgG)) et TRITC (RIgG(hIgG))

(a) Purification de l'anticorps relatif à la gamma-globuline humaine par chromatographie par affinité

On combine 2 g de «Sepharose-4B» avec 18 g de gamma-globuline humaine (hIgG) en suivant les prescriptions de la firme productrice (Pharmacia, Uppsala). On se procure 50 ml d'antisérum de lapin relatif à hIgG (5 mg d'anticorps/ml) (IgG(hIgG)) de la firme Antibodies Incorporated. On prépare une colonne (1×3 cm) du conjugué «Sepharose-hIgG» indiqué

ci-dessus en utilisant un tampon au borate 0,01 M (pH 8,0). On fait passer l'antisérum sur la colonne puis on effectue un lavage avec le même tampon jusqu'à ce qu'on ne puisse plus déceler de protéine dans l'éluat. On lave encore la colonne avec un tampon de chlorhydrate de glycine 0,1 M (pH 5,0). On élue ensuite l'anticorps avec un tampon de chlorhydrate de glycine 0,1 M (pH 2,5); on recueille des fractions de 3 ml qu'on neutralise immédiatement avec un tampon au borate 0,5 M (pH 9,0). Le volume total recueilli de solution d'anticorps est de 30 ml. La solution d'anticorps est dialysée pendant environ 16 heures contre un tampon au phosphate 0,05 M (pH 8,0) puis concentrée avec de l'«Aquacid» et dialysée de nouveau. Le volume final est de 11 ml et la teneur en protéine-anticorps est de 3,76 mg/ml, comme déterminé d'après le spectre d'absorption à 280 nm. Le taux de séparation de l'anticorps est de 83%.

(b) Préparation de FIgG(hIgG)

(i) Le pH de la solution d'anticorps (1 ml) ci-dessus dans le tampon au phosphate 0,05 M (pH 8,0) est ajusté à 9,5 avec des cristaux de carbonate de sodium. On ajoute 100 µg de FITC dans 10 µl d'acétone à la température ambiante et on agite pendant 3 heures. Le conjugué est ensuite séparé sur «Sephadex G-25» (M) (colonne de 1×10 cm) équilibré avec du tampon au phosphate 0,05 M de pH égal à 8,0. Le conjugué est recueilli en une fraction de 1,5 ml; il a un rapport D/P de 4,3 (M/M) (colorant/protéine) et titre 2,05 mg/ml d'après le nomographe de Wells.

(c) Préparation de RIgG(hIgG)

(i) On ajuste à 9,5 le pH de la solution d'anticorps indiquée ci-dessus (1 ml) dans le tampon au phosphate 0,05 M (pH 8,0) en utilisant des cristaux de carbonate de sodium. On ajoute 0,5 mg de TRITC dans 20–30 µl d'actétone à la température ambiante et on agite le mélange pendant 3 heures. Il se forme un précipité qu'on recueille par centrifugation et qu'on jette. Le conjugué est ensuite séparé deux fois sur une colonne de «Sephadex G-25» (1×10 cm) équilibrée avec le tampon au phosphate 0,05 M (pH 8,0). Le produit est recueilli dans un volume de 2 ml; il a un rapport D/P égal à 10 et titre 0,7 mg/ml comme déterminée d'après le spectre d'absorption à 280 et 516 nm.

(ii) On se procure 27,6 mg/ml de fraction d'IgG, séparée sur DEAE-cellulose, d'antisérum de lapin relatif à hIgG (6,4 mg d'anticorps/ml) de la firme Antibodies Inc. On ajuste à 9,5 le pH de la solution (0,5 ml) de protéine indiquée ci-dessus en utilisant des cristaux de carbonate de sodium et on ajoute 3 mg de TRITC dans 50 µl d'acétone +0,5 ml d'eau en agitant à froid (4°). Au bout de 3 heures, il se forme un précipité qu'on élimine par filtration. La solution violette résultante est séparée successivement deux fois sur une colonne (2×30 cm) de «Sephadex G-25» (M) équilibrée avec un tampon au phosphate 0,07 M (pH 8,0). Le conjugué résultant titre 0,1 mg d'anticorps/ml et a un rapport D/P de 12–15 (M/M), d'après le spectre d'absorption.

Exemple 5

Conjugaison de gamma-globuline humaine (hIgG) avec la fluorescéine (FhIgG)

On dissout 1 mg de HIgG (IgG humaine) dans 0,4 ml de tampon au phosphate 0,1 M (pH 7,5) et on ajuste le pH à 9,5 avec des cristaux de Na_2CO_3. On ajoute, en agitant, une solution (10 µl) de FITC (70 µg) dans l'acétone et on agite pendant 3 heures à la température ambiante. La solution résultante est séparée deux fois sur colonne de «Sephadex G-25» (M) (1×15 cm) équilibrée avec le tampon au phosphate 0,05 M (pH 8,0). La solution éluée de conjugué FITC-hIgG a une concentration de 0,58 mg/ml et un rapport D/P de 5,5 (M/M), comme déterminée par le nomographe de Wells.

Exemple 6

Morphine conjuguée à la sérum-albumine de bœuf (BSA-44 m)

On combine 4,43 g de O^3-carboxyméthylmorphine et 1,31 ml de chloroformiate d'isobutyle dans 30 ml de DMF à 0°.

à 0°. La solution claire résultante est ensuite ajoutée à une solution sous agitation de 2,88 g de BSA et 13 g de $NaHCO_3$ dans 600 ml d'eau à 0°. L'addition est effectuée au moyen d'une seringue dont la pointe se trouve au-dessous de la surface de la solution. Cette dernière est agitée au refrigérateur pendant environ 16 heures.

Après passage de la solution sur une grande colonne de «Sephadex», on concentre l'effluent à un volume de 60 ml pendant environ 16 heures avec le produit «HFD/1 de la firme Dow et lyophilisé; le rendement est de 3,1 g. L'analyse en lumière ultraviolette montre que le produit renferme en moyenne environ 44 groupes de morphine.

Pour démontrer l'efficacité des titrages conformes à l'invention en utilisant l'extinction de fluorescente comme méthode de détection de la présence d'un coordinat, on a effectué plusieurs titrages différentes en utilisant des protocoles divers.

Le premier titrage à considérer est le titrage de la morphine et de la codéine en utilisant le produit de conjugaison de l'isothiocyanate de fluorescéine à la O^3-aminoéthylmorphine (FLUMO'S').

Dans la première partie de ce titrage, on associe plusieurs conjugués d'anticorps ayant divers degrés de marquage de rhodamine avec le produit FLUMO'S' pour déterminer l'extinction maximale. Le produit FLUMO'S' est utilisé à une concentration de $1{,}83\times10^{-9}$ M dans un tampon au borate de 0,05 M (pH 8,0). L'intensité relative de fluorescente à F_{max} = 516–518 nm est enregistrée par exploration de 490 nm à 530 nm, la raie d'excitation est de 462–464 nm et les fentes sont ajustées à l'aide d'un bouton de sensibilité pour maintenir le pic à l'échelle, avec un spectrophotomètre de fluorescente Perkin-Elmer Modèle «MPF-2A». La cellule du spectrophotomètre, dont la longueur de parcours est de 1 cm (volume de 3 ml) est installée dans un support comportant deux miroirs combinés. On fait incuber l'anticorps conjugué avec le produit FLUMO'S' à la température ambiante dans des fioles en «pyrex» pendant 30–40 minutes avant d'effectuer la lecture de fluorescente.

Le rapport colorant/protéine (D/P) (M/M) des conjugués est respectivement de 0,9, de 2,2, de 4,4, 15–16 et 20–22. Les résultats obtenus en ce qui concerne le rendement relatif (la moitié du quotient du pourcentage maximal d'extinction par le nombre correspondent d'équivalents de sites de liaison) sont respectivement de 6, 16,4, 24, 51,4, et 31,5.

Dans la conduite de ce titrage, on utilise les réactifs suivants: «FLUMO'S'-$1{,}38\times10^{-7}$ M; RIgG(m) D/P 30, $4{,}58\times10^{-7}$ M; tampon au borate 0,05 M, pH 8,0; solutions étalons de morphine ($1{,}5\times10^{-3}-1{,}5\times10^{-7}$ M). L'incubation est effectué dans des tubes de verre.

Mode opératoire: On dilue des quantités égales (40 µl) de RIgG(m) avec un tampon au borate 0,05 M de pH 8,0 (2940–2990 µl) et on les fait incuber à la température ambiante avec des quantités croissantes de morphine (5–10 µl des solutions étalons de morphine) pendant 1 heure. On ajoute ensuite 10 µl de produit «FLUMO'S'» et on fait incuber le mélange pendant encore 1 heure. Le volume final de chaque tube est de 3 ml. La concentration finale de «FLUMO'S'

est de $4,6 \times 10^{-10}$ M et celle de RIgG(m) est de $6,1 \times 10^{-9}$ M dans les sites de liaison. Les résultats sont indiqués sur le tableau suivant et expriment l'augmentation d'intensité de fluorescence par le pourcentage de fluorescence maximale possible («FLUMO'S'» sans anticorps extincteur).

Tableau I

Morphine (molarité)	Intensité des signaux	% de Fmax
0	27	33,33
$2,5 \times 10^{-9}$	28	34,5
5×10^{-9}	29,5	36,4
$2,5 \times 10^{-8}$	35	43,2
5×10^{-8}	38	46,9
$2,5 \times 10^{-7}$	54	66,6
5×10^{-7}	60	74
$2,5 \times 10^{-6}$	74	91,3
5×10^{-6}	78	96,3

On répète cet essai à la différence qu'on remplace la morphine par la codéine. On obtient les résultats suivants:

Tableau II

Codéine (molarité)	Intensité des signaux	% de Fmax
0	27	32,9
$2,5 \times 10^{-9}$	30,5	37,2
5×10^{-9}	36	43,9
$2,5 \times 10^{-8}$	51	62,2
5×10^{-8}	58	70,7
5×10^{-7}	75	91,5
$2,5 \times 10^{-6}$	80	97,5

On répète le titrage en remplaçant l'anticorps de morphine marqué à la rhodamine (RIgG(m)) de rapport D/P (colorant/protéine) (M/M) égal à 30 par un anticorps RIgG(m) de rapport D/P égal à 22. On obtient les résultats suivante en utilisant la morphine.

Tableau III

Morphine (molarité)	Intensité des signaux	% de Fmax
0	24,5	29,9
$2,5 \times 10^{-10}$	26,0	31,7
5×10^{-10}	26,5	32,3
$2,5 \times 10^{-9}$	28,0	34,1
5×10^{-9}	29,0	35,4
1×10^{-8}	33,5	40,8
$2,5 \times 10^{-8}$	40,0	48,8
5×10^{-8}	45,5	55,5
1×10^{-7}	53,0	64,6
$2,5 \times 10^{-7}$	63,0	76,8
5×10^{-7}	68,0	82,9
1×10^{-6}	72,5	88,4
$2,5 \times 10^{-6}$	80,0	97,5
5×10^{-6}	82,0	100

Dans l'étude suivante, on a utilisé un polycoordinat, à savoir la morphine conjuguée à la sérum-albumine de bœuf, ayant en moyenne 44 motifs de morphine par molécule d'albumine.

Dans un premier essai, le polycoordinat est utilisé comme une protéine synthétique, du fait qu'il présente de nombreux sites épitopiques relatifs à la morphine. Dans une seconde série d'essais, le polycoordinat est utilisé pour titrer la morphine ou la codéine. Dans ces deux essais, aucun chromophore n'est en liaison de covalence avec le site épitopique intéressant, mais chacun est plutôt lié par l'intermédiaire d'un anticorps. Ainsi, il y a une liaison sans ordre de l'anticorps à la morphine sur le polycoordinat. Aux concentrations intéressantes, dans une étude qui ne sera décrite dans le présent mémoire, on a trouvé qu'une extinction optimale est obtenue lorsque le rapport du corps extincteur sous la forme de l'ensemble récepteur-extincteur au corps fluorescent sous la forme de l'ensemble récepteur-corps fluorescent est d'environ 5:1.

Dans le premier essai, qui est un titrage du poly-(équivalent de coordinat), on prépare une série de tubes contenant chacun $6,4 \times 10^{-9}$ M dans les sites de liaison d'anti-morphine ayant un rapport D/P (fluorescéine/anticorps) égal à 9, et $3,47 \times 10^{-8}$ M (dans les sites de liaison) d'anti-morphine ayant un rapport D/P (rhodamine/anticorps) égal à environ 22, dans un tampon au phosphate 0,05 M (pH 8,0), contenant $1,2 \times 10^{-6}$ M de gamma-globuline de bœuf. On ajoute diverses quantités de la sérum-albumine de bœuf en combinaison avec la morphine (environ 44 motifs de morphine par mole d'albumine) (0,012–1,2 µg) dans un volume de 5 à 10 µl) à chacun des tubes de manière que le volume final soit de 0,5 ml et on fait incuber le mélange à la température ambiante pendant 30 minutes. On mesure ensuite la fluorescence de chacun des tubes et on exprime le résultat par un pourcentage par rapport à la fluorescence/maximale possible (lorsqu'il n'y a pas de sérum-albumine de bœuf en conjugaison avec la morphine). Les résultats sont indiqués sur le tableau suivant.

Tableau IV

44 m-BSA quantité ajoutée en µg	% de Fmax
0	100
0,012	84,5
0,024	72
0,048	64,5
0,084	61
0,12	66
0,24	74
0,48	83
1,20	92

Pour titrer la codéine, on utilise la méthode suivante. En se servant du même ensemble anti-morphine-fluorescéine (FIgG(m)) et du même ensemble antimorphine-rhodamine (RIgG(m)) que ci-dessus, on dilue 30 µl de FIgG(m)) ($2,64 \times 10^{-7}$ M) et 30 µl de RIgG(m) ($1,44 \times 10^{-6}$ M) dans une série de tubes avec un tampon au phosphate 0,05 M (pH 8,0), contenant $1,5 \times 10^{-6}$ M de gamma-globuline de bœuf (390–430 µl). On ajoute ensuite 10–40 µl de codéine à des concentrations croissantes ($1,5 \times 10^{-3} - 1,5 \times 10^{-6}$ M) et on fait incuber le mélange à la température ambiante pendant 0,5 heure. On ajoute ensuite à chacun des tubes 10 µl (0,24 µg) du produit de conjugaison de morphine et de sérum-albumine de bœuf utilisé ci-dessus et on fait incuber les tubes pendant encore 1 heure. Le volume final dans chaque tube est de 0,5 ml. On enregistre ensuite la fluorescence de chacun des tubes à 518 nm et on l'exprime par un pourcentage par rapport à la fluorescence maximale possible (lorsqu'il n'y a

pas de produit conjugué morphine-BSA). Le tableau suivant indiqué les résultats obtenus.

Tableau V

Codéine (M)	% de Fmax
0	49
3×10^{-9}	51
6×10^{-9}	54
$1{,}2 \times 10^{-8}$	56,5
3×10^{-8}	62
6×10^{-8}	70,5
$1{,}2 \times 10^{-7}$	81
3×10^{-7}	90,5
6×10^{-7}	94,5
$1{,}2 \times 10^{-6}$	100
3×10^{-6}	100

Les deux études suivantes impliquent la protéine naturelle que constitue la gamma-globuline humaine. Dans la première étude, on utilise l'ensemble gamma-globuline humaine-fluorescéine (FhIgG) de D/P égal à 5,5 pour doser la gamma-globuline humaine. On prépare une série de tubes contenant chacun 100 µl de conjugué anti-gamma-globuline humaine-rhodamine (RIgG(hIgG) de rapport D/P égal à 12–15 et de concentration égal à 0,017 mg/ml dans un tampon au phosphate 0,05 M de pH égal à 8,0 (330–380 µl) contenant 0,6 mg de BSA par ml. On ajoute ensuite des quantités croissantes de gamma-globuline humaine (dans un volume de 15 à 35 µl) et on fait incuber les mélanges pendant 30 minutes à la température ambiante. On ajoute ensuite aux solutions 30 µl de FhIgG de concentration égale à 0,014 mg/ml. Le volume final dans chaque cas est de 0,5 ml. La concentration finale de FhIgG est de $5{,}4 \times 10^{-9}$ M, tandis que les concentrations de gamma-globuline humaine vont de $4{,}84 \times 10^{-10}$ à $6{,}45 \times 10^{-8}$ M. Après une seconde période d'incubation de 30 minutes, on note la fluorescence des tubes à 522 nm, en exprimant par le pourcentage de fluorescence maximale possible. Le tableau suivant indique les résultats obtenus.

Tableau VI

HIgG (M)	% de Fmax
0	28
$4{,}84 \times 10^{-10}$	33
$8{,}06 \times 10^{-10}$	36
$1{,}13 \times 10^{-9}$	38
$1{,}61 \times 10^{-9}$	46
$3{,}22 \times 10^{-9}$	68
$4{,}84 \times 10^{-9}$	81
$8{,}06 \times 10^{-9}$	91
$1{,}13 \times 10^{-8}$	93
$1{,}61 \times 10^{-8}$	95,5
$3{,}22 \times 10^{-8}$	96
$6{,}45 \times 10^{-8}$	98

Dans l'étude suivante, on titre la gamma-globuline humaine en utilisant le conjugué anti-gamma-globuline humaine-fluorescéine (FIgG(hIgG)) et le conjugué anti-gamma-globuline humaine-rhodamine (RIgG(hIgG)). Le conjugué de fluorescéine a un rapport D/P égal à 4,3 et le conjugué de rhodamine a un rapport D/P égal à 10. Tous les réactifs sont dilués avec un tampon au phosphate 0,05 M de pH égal à 8,0, contenant 0,6 mg/ml de sérum-albumine de bœuf. On prépare une série de tubes contenant chacun 400 µl du tampon indiqué. On ajoute à chacun des tubes 30 µl de FIgG(hIgG) à une concentration de 2,7 µg/ml et 30 µl de RIgG(hIgG) à une concentration de 35 µg/pl. On agite le contenu des tubes et on y ajoute des quantités croissantes de gamma-globuline humaine (40 µl) de solutions et on soumet les mélanges à une incubation à la température ambiante pendant 1 heure. On mesure ensuite la fluorescence des tubes et on exprime les résultats par le pourcentage de la fluorescence totale en absence de gamma-globuline humaine. Le tableau suivant indique les résultats obtenus.

Tableau VII

IgG humaine (M)	% de Fmax
3×10^{-11}	100
6×10^{-11}	95,7
$1{,}2 \times 10^{-10}$	93,2
$1{,}8 \times 10^{-10}$	89,5
$2{,}4 \times 10^{-10}$	86,5
3×10^{-10}	82,2
6×10^{-10}	70,5
$1{,}2 \times 10^{-9}$	60,7
$1{,}8 \times 10^{-9}$	62
$2{,}4 \times 10^{-9}$	68,1
3×10^{-9}	69,3
6×10^{-9}	79
$1{,}2 \times 10^{-8}$	87,7
$1{,}8 \times 10^{-8}$	88,3
$2{,}4 \times 10^{-8}$	93,8

Comme le fait apparaître le tableau VII, lorsque la concentration en gamma-globuline humaine augmente, la fluorescence diminue jusqu'à un minimum puis augmente de nouveau. Par conséquent, avec une substance inconnue, il serait nécessaire d'effectuer deux dilutions pour déterminer la partie de la courbe qui est impliquée.

Les résultats indiqués ci-dessus démontrent l'extrême sensibilité et la large gamme des applications des titrages de l'invention. En utilisant le phénomène d'extinction de la fluorescence, on peut titrer directement une grande variété de composés différents, tant hapténiques qu'antigéniques. On peut utiliser des réactifs lorsque l'haptène ou l'antigène est en liaison de covalence avec le chromophore ou bien, à titre de variante, lorsque le composé intéressant présente plusieurs sites épitopiques, on peut utiliser des mélanges d'anticorps dans lesquels une partie des anticorps est lié au corps extincteur et une partie des anticorps est liée au corps fluorescent. Dans ce cas, des dérivés du coordinat ne sont pas requis pour préparer les réactifs lorsqu'un récepteur naturel est disponible ou lorsque le coordinat est antigénique.

De plus, on peut préparer des réactifs ayant plusieurs molécules hapténiques ou antigéniques liées à une molécule nucléaire. Cette dernière peut être attachée à un chromophore, et on utilise un anticorps qui est en conjugaison avec un autre constituant de la paire corps fluorescent-corps extincteur, ou bien on utilise le mélange d'anticorps indiqué ci-dessus. Le titrage est relativement rapide et en fonction des concentrations, diverses durées d'incubation sont requises. De plus, on peu utiliser des fluorimètres classiques qui sont relativement peut coûteux et qui permettent une lecture aisée.