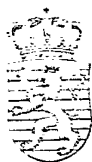


Breve: \

du 5 juin 1987

Titre délivré 11 NOV. 1987



Monsieur le Ministre
de l'Économie et des Classes Moyennes
Service de la Propriété Intellectuelle
LUXEMBOURG

Demande de Brevet d'Invention

(1)

I. Requête

Le sieur Lance A. LIOTTA, 9027 Mistwood Drive, Potomac, Maryland 20854, Etats-Unis d'Amérique

représenté par E. Meyers & E. T. Freylinger, Ing. conseils en pi, (3)
46 rue du Cimetière, Luxembourg, agissant en qualité de mandataires
dépose(nt) ce cinq juin mil neuf cent quatre vingt sept (4)
⁰⁰
à 15 heures, au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, à Luxembourg:

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant:

Immuno-dosage en couches faisant appel à des anticorps liés (5)
à des particules transporteuses pour déterminer la présence
d'un antigène.

2. la description en langue française de l'invention en trois exemplaires:

3. **trois** planches de dessin, en trois exemplaires:

4. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg, le 5 juin 1987 :

5. la délégation de pouvoir, datée de le

6. le document d'avant cause (autorisation):

déclare(nt) en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont) :

Lance A. LIOTTA, 9027 Mistwood Drive, Potomac, Maryland 20854 USA

revendique(nt) pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de brevet déposée(s) en (8) Etats-Unis d'Amérique

le (9) neuf juin mil neuf cent quatre vingt six

sous le N° (10) **871,857**

au nom de (11) Lance A. LIOTTA

élit(élisent) domicile pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg
46 rue du Cimetière, Luxembourg (12)

solicite(nt) la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les annexes susmentionnées
avec ajournement de cette délivrance à _____ mois. (13)

Le déposant / mandataire: **Ernest Meyers** (14)

II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes.
Service de la Propriété Intellectuelle à Luxembourg, en date du: **5 juin 1987**

à 15⁰⁰ heures

Pr. le Ministre de l'Économie et des Classes Moyennes
p. d.

Le chef du service de la propriété intellectuelle.



Revendication de la priorité d'une demande
de brevet déposée aux Etats-Unis d'Amérique
le 9 juin 1986 sous le No 871,857

pour "Immuno-dosage en couches faisant appel à
des anticorps liés à des particules trans-
porteuses pour déterminer la présence d'un
antigène"

par Lance A. Liotta
9027 Mistwood Drive
Potomac Maryland 20854
Etats-Unis d'Amérique

*Revendication de la priorité d'une demande de brevet
déposée aux Etats-Unis d'Amérique le 9 juin 1986
sous le No 871,857*

Immuno-dosage en couches faisant appel à des anticorps
liés à des particules transporteuses pour déterminer
la présence d'un antigène.

5 L'invention concerne un procédé et un dispositif en vue de déterminer la présence d'un antigène dans des prises d'essai moyennant l'adoption d'une technique d'immuno-dosage à "site double" marqué d'une enzyme spécialement conçue.

10 Des techniques d'immuno-dosage marqué d'une enzyme et dans lesquelles on emploie des anticorps réagissant avec différents domaines sur le même antigène, ont été décrites dans la littérature scientifique. En règle générale, tous ces immuno-dosages à "site double" sont effectués de la manière suivante : un
15 membre de la paire d'anticorps est fixé à un support solide tel que la paroi d'un tube en matière plastique ou la surface d'un batonnet en matière plastique. Le second anticorps est conjugué avec une marque d'enzyme. La prise d'essai contenant l'antigène et
20 l'élément conjugué du second anticorps sont mélangés ensemble avec le premier anticorps lié au support solide. En présence de l'antigène, l'anticorps conjugué vient se fixer au support solide à l'intervention du membre opposé de la paire d'anticorps.

25 Le support solide est ensuite lavé convenablement pour éliminer tout élément conjugué non lié.

Enfin, le support solide est incubé avec un substrat d'enzyme chromogène. La réaction chromogène peut être alors observée visuellement ou à l'aide d'un instrument pour indiquer la présence et la quantité de l'antigène. De tels immuno-dosages à deux sites peuvent être spécifiques et rapides, mais ils nécessitent des étapes multiples de lavage et d'incubation chromogène.

La présente invention concerne un immuno-dosage à deux sites n'impliquant aucune étape de lavage ou de réaction chromogène séparée. La prise d'essai contenant l'antigène est mélangée avec les deux réactifs d'anticorps et le mélange obtenu est appliqué à la surface d'un dispositif d'essai à deux couches. La couche inférieure contient le substrat chromogène. En présence de l'antigène, l'élément conjugué est entraîné vers la couche inférieure et il provoque une réaction chromogène. En absence de l'antigène, la totalité de l'élément conjugué est emprisonnée dans la couche supérieure en phase solide et elle ne parvient pas à atteindre la couche chromogène inférieure. Le principe de l'invention est exactement l'opposé des immuno-dosages à deux sites antérieurs, étant donné que l'élément conjugué qui ne parvient pas à lier l'antigène, est emprisonné sur la phase solide. L'élément conjugué qui est lié à l'antigène, s'infiltré à travers la zone en phase solide jusqu'à la couche chromogène.

Les avantages ci-dessus de la présente invention, ainsi que d'autres, apparaîtront plus clairement à l'homme de métier à la lecture de la spécification et des revendications ci-après.

Sous un aspect, la présente invention concerne un dispositif en vue de déterminer la présence d'un antigène, ce dispositif comprenant une zone d'emprison-

nement contenant une matière capable de capturer des anticorps reliés à des enzymes et s'écoulant librement, mais non des anticorps liés à une particule transporteuse et s'écoulant librement à travers la zone

5 d'emprisonnement pour parvenir dans la zone du substrat, ainsi qu'une zone de substrat contenant une matière capable de réagir avec les anticorps reliés à des enzymes, pour provoquer une réaction indiquant la présence de l'enzyme et, partant, de l'antigène concerné.

10 Sous un autre aspect, la présente invention concerne une méthode exceptionnelle en vue de déterminer la présence d'antigènes dans une prise d'essai, ce procédé comprenant l'étape consistant à mettre la prise d'essai en contact avec deux classes d'anticorps

15 qui sont spécifiques à l'antigène devant être soumis à l'essai, cependant que chaque classe d'anticorps réagit avec un domaine différent dans l'antigène pour former un complexe capable de s'écouler à travers la couche d'emprisonnement pour provoquer, dans la

20 couche de substrat, une réaction indiquant la présence de l'antigène devant être soumis à l'essai.

On donnera ci-après une brève description des dessins annexés donnés dans le but d'illustrer l'invention sans aucunement la limiter.

25 Dans les dessins annexés :

la figure 1 est une illustration schématique du dispositif A de la présente invention. Ce dispositif comprend deux couches distinctes, à savoir, une zone d'emprisonnement 18 et une zone de substrat 20. Des

30 anticorps 10 de classe un et des anticorps 12 de classe deux sont représentés à proximité immédiate du dispositif A. Les anticorps 10 de classe un sont fixés à la surface de particules transporteuses 14, tandis que les anticorps 12 de classe deux

35 sont conjugués avec des enzymes 16.

La zone d'emprisonnement 18 est formée à partir d'une matière poreuse qui capture les anticorps 12 de classe deux conjugués avec l'enzyme 16, sans cependant parvenir à capturer les particules transporteurs 14 qui sont liées aux anticorps 10 de classe un. De même, la zone de substrat 20 est réalisée à partir d'une matière poreuse et elle contient un réactif chromogène lié 22, c'est-à-dire une matière qui réagit avec l'enzyme 16 conjuguée aux anticorps 12 de classe deux pour produire une couleur. Le dispositif A est représenté sur un organe support 24.

La figure 2 est une illustration schématique représentant le procédé de l'invention dans lequel on utilise le dispositif A de la figure 1. Spécifiquement, un liquide désigné d'une manière générale par le chiffre de référence 26 et contenant un antigène libre 28, est mélangé avec les anticorps 10 de classe un liés aux particules transporteurs 14, ainsi qu'avec les anticorps 12 de classe deux conjugués avec l'enzyme 16. Les anticorps 10 de classe 1, liés aux particules transporteurs 14 viennent se lier à des sites spécifiques de reconnaissance sur les antigènes 28. De la même manière, les anticorps 12 de classe deux, qui sont conjugués avec l'enzyme 16, viennent se lier à d'autres sites récepteurs spécifiques sur les antigènes 28 fixés aux anticorps 10 de classe un qui, à leur tour, sont liés aux particules transporteurs 14 pour former ainsi des complexes résultants 32. A mesure que le liquide se diffuse à travers la zone d'emprisonnement 18, tous les anticorps 12 de classe deux qui sont conjugués avec l'enzyme 16 et qui n'ont pas formé de complexes résultants 32, sont capturés dans la zone d'emprisonnement 18, tandis que tous les anticorps

12 de classe deux qui sont conjugués avec l'enzyme 16 et qui ont formé des complexes résultants 32, s'écoulent à travers la zone d'emprisonnement 18 pour parvenir dans la zone de substrat 22 où l'enzyme conjuguée 16 réagit avec le réactif chromogène 22 pour produire une couleur distinctive indiquant la présence de l'antigène 28 dans le liquide appliqué 26.

La figure 3 est une illustration schématique montrant le procédé de l'invention dans lequel on utilise le dispositif A de la figure 1, cette figure montrant également les résultats obtenus lorsque le liquide d'essai 26 est exempt d'antigène 28. Spécifiquement, un liquide désigné d'une manière générale par le chiffre de référence 26 est appliqué à la surface 30 de la zone d'emprisonnement 18. A mesure que le liquide se diffuse à travers la zone d'emprisonnement 18, tous les anticorps 12 de classe deux conjugués avec l'enzyme 16 sont capturés par la zone d'emprisonnement 18. En conséquence, aucun anticorps relié à une enzyme n'atteint le réactif chromogène 22 dans la zone de substrat 20 et l'on n'observe aucun changement de couleur, indiquant ainsi l'absence d'antigène 28 dans le liquide d'essai 32.

La figure 4 illustre l'emprisonnement de l'élément conjugué enzyme/anticorps libre en utilisant une matière constituée de tamis moléculaires comme couche d'emprisonnement.

La figure 5 illustre l'emprisonnement de l'élément conjugué enzyme/anticorps libre en utilisant de la nitrocellulose enduite de Protéine A comme couche d'emprisonnement.

La figure 6 illustre l'emprisonnement de l'élément conjugué enzyme/anticorps libre en utilisant une résine échangeuse de cations comme couche d'emprisonnement.

sonnement.

La présente invention implique l'utilisation des éléments suivants : des anticorps de classe un et de classe deux qui reconnaissent des sites différents sur le même antigène ; une particule transporteuse sur laquelle sont fixés des anticorps de classe un ; des enzymes conjuguées avec les anticorps de classe deux ; ainsi qu'un dispositif d'immuno-dosage constitué d'une zone d'emprisonnement qui lie les anticorps de classe deux, mais non les anticorps de classe un, ainsi qu'une zone de substrat qui réagit avec l'enzyme conjuguée avec les anticorps de classe deux pour produire une couleur distinctive (voir figure 1).

Les anticorps sont constitués d'anticorps de classe un qui sont fixés à une particule transporteuse, ainsi que d'anticorps de classe deux qui sont conjugués avec un élément de marquage tel qu'une enzyme. Bien que les deux classes d'anticorps soient spécifiques pour le même antigène, différents groupements déterminants ou sites de liaison sont reconnus par chaque classe d'anticorps. Dès lors, les anticorps de chaque classe peuvent venir se fixer sur le même antigène, facilitant ainsi l'adoption d'un immuno-dosage à site double.

Le concept fondamental de la présente invention est centré sur l'interrelation existant entre la particule support, les deux classes d'anticorps et un dispositif d'immuno-dosage constitué de zones d'emprisonnement et de substrat en couches. La zone d'emprisonnement est hautement spécifique pour l'élément conjugué d'anticorps libre constitué d'anticorps de classe deux, tandis que la particule transporteuse passe librement entre les deux couches. La zone de substrat provoque une réaction chromogène

en présence de l'enzyme.

Lorsque les anticorps des deux classes sont mélangés avec une prise d'essai exempte d'antigène et lorsque ce mélange est mis en contact avec les zones d'emprisonnement et de substrat en couches, on n'observe aucun changement de couleur (voir figure 3). Par suite de l'absence d'antigène, la reconnaissance du site double ne peut avoir lieu et tous les éléments conjugués indicateurs d'anticorps libres de classe deux sont capturés par la zone d'emprisonnement. Dès lors, il ne se produit aucune réaction enzyme/substrat et l'on n'observe aucun changement de couleur.

Toutefois, en présence d'une prise d'essai contenant un antigène, les anticorps de classe deux de l'élément conjugué viennent se lier à la particule support via l'antigène (voir figure 2). Par suite de la reconnaissance du site double, l'enzyme conjuguée aux anticorps ne peut être capturée dans la zone d'emprisonnement, étant donné que la particule transporteuse protège l'élément conjugué contre sa capture par la couche d'emprisonnement. Dès lors, la particule transporteuse entraîne l'élément conjugué vers la couche chromogène uniquement si l'antigène est présent.

Lors de la mise en oeuvre préférée de l'invention, les anticorps utilisés font partie de deux classes qui sont spécifiques à l'antigène faisant l'objet de l'essai. Toutefois, chaque classe d'anticorps est hautement spécifique pour des groupements déterminants ou des sites de reconnaissance différents sur l'antigène en question, si bien qu'aucune réactivité croisée ni aucun chevauchement ne peuvent se produire. De plus, les deux classes d'anticorps qui sont spécifiques à l'antigène faisant l'objet de l'essai, peuvent se trouver dans la zone d'emprisonnement du dispositif,

si bien qu'il n'est plus nécessaire de procéder à un mélange avant l'application.

Les matières utilisées pour construire le dispositif de la présente invention sont bien connues dans la technique. La couche d'emprisonnement peut être n'importe quelle matière à base de tamis moléculaires qui capture l'élément conjugué de faible poids moléculaire, mais qui ne parvient pas à capturer la particule transporteuse.

Le mécanisme d'emprisonnement peut être basé sur, mais non limité, aux caractéristiques suivantes : les dimensions, c'est-à-dire moyennant l'utilisation de particules de tamis moléculaires comportant de petites crevasses qui emprisonnent uniquement les petits éléments conjugués anticorps/enzymes et non les complexes de particules transporteuses qui sont trop gros pour pénétrer dans les crevasses de la matière à base de tamis moléculaires; la charge, c'est-à-dire que l'élément conjugué anticorps/enzyme vient se lier à des groupes de charges opposées se trouvant dans la zone d'emprisonnement et que la particule transporteuse ne parvient pas à lier, étant donné que sa charge moyenne est différente de celle de la matière se trouvant dans la zone d'emprisonnement ou dans la solution d'essai, et étant donné également que la masse des particules transporteuses est beaucoup plus grande que celle des autres protéines ; de même que le fait que les protéines possèdent des affinités naturelles pour leurs sites de liaison, c'est-à-dire que la Protéine A viendra se lier uniquement à la portion Fc des anticorps et, dès lors, lorsque les portions Fc des anticorps sont liées à la surface de la particule transporteuse, il devient physiquement impossible, à la Protéine A, de se lier à ces anticorps, si bien que le complexe des particules transporteuses peut

s'écouler à travers la zone d'emprisonnement, tout en capturant les anticorps s'écoulant librement.

Parmi les exemples de matières appropriées en phase solide pour la construction de la zone d'emprisonnement, il y a les matières résineuses et fibreuses, les gels d'agrose, ainsi que n'importe quelle autre matière contenant suffisamment d'espaces vides pour emprisonner les anticorps s'écoulant librement, mais non les particules transporteuses.

De plus, des substrats ou des réactifs chromogènes appropriés que l'on utilise dans la présente invention, sont également bien connus dans la technique. A cet égard, on peut utiliser un certain nombre de différents types d'enzymes purifiées qui agissent directement ou indirectement avec l'agent chromogène se trouvant dans le substrat. Un exemple d'une telle enzyme et de son substrat correspondant est la peroxydase de raifort et le phosphate de p-nitrophényle. Les anticorps peuvent également être marqués avec des marqueurs radio-actifs ou fluorescents.

Dans une forme de réalisation de l'invention, par suite de la liaison physique de l'élément conjugué à la particule transporteuse, il est empêché de venir se lier à une Protéine A fixée sur la surface de la couche d'emprisonnement. Le moyen par lequel la couche d'emprisonnement capture l'élément conjugué, n'est pas limité à ces formes de réalisation spécifiques. On peut également adopter d'autres moyens proposés en variante tels que la formation d'un complexe biotine-avidine.

Toutefois, la présente invention n'est nullement limitée à l'utilisation de cette enzyme et de ses substrats correspondants. On peut également utiliser d'autres combinaisons enzyme/substrat bien

connues dans la technique.

La particule transporteuse peut également être réalisée de diverses manières. Par exemple, la particule transporteuse peut être une substance colloïdale d'un poids moléculaire élevé telle que le dextrane, des particules solides constituées de matières plastiques, de verre, de résines ou de matières métalliques, ou encore un polymère de poids moléculaire élevé. En outre, la particule support peut également exprimer un changement superficiel anionique net protégeant l'élément conjugué en l'empêchant d'être capturé par une charge cationique se trouvant sur la couche d'emprisonnement.

La présente invention sera décrite ci-après plus en détail en se référant à l'exemple suivant.

EXEMPLE

Essai : Détermination de la possibilité d'appliquer la présente invention pour la détection de la grossesse moyennant la détection de l'antigène de gonadotrophine chorionique humaine (GCH).

Matières utilisées :

- A. Antigène : gonadotrophine chorionique humaine (GCH) provenant d'un contrôle positif d'urine avec "Pregnospia Kit 150 mIU/ml".
- 25 B. Anticorps : i) anticorps de classe un fixés à des particules transporteuses ; anticorps monoclonaux de souris contre GCH (Lot 4284148 fourni lyophilisé) liés à des particules d'or colloïdal Pregnospia.
- 30 ii) Anticorps de classe deux conjugués avec l'enzyme : Anti-GCH "Miles Yeda Inc." (lot 1064 bêta-subunité source spécifique ascite clone PC-2)
Concentration en peroxydase : 0,53 mg/ml
Souris IgG 1,01 mg/ml
- 35 Affinité : $5,3 \times 10$ litres/mole

C. Zones d'emprisonnement

5 A. "Preswollen Sephadex G-100 M" garnissant une chambre clonique de 0,4 cm au sommet, de 0,4 cm de haut, de 0,1 cm à la base et d'un volume de 75 microlitres.

10 B. Nitrocellulose, dimension des pores, 5 micromètres, Millipore, 4 couches empilées dans un modèle de réservoir immunologique enduit de Protéine A (S. aureus, souche "Cowan", "Vector Labs") : 10 mg/ml bloqué avec de l'albumine de sérum de boeuf.

C. Résine échangeuse de cations ("Beckman FPLC Mono C"), préparée comme décrit sub A) ci-dessus.

15 D. Substrat d'enzyme chromogène : oxydase de glucose 2,0 mg/ml + tétraméthylbenzidine (TMB) 20,0 mg/ml, dissous dans du méthanol absolu et séché à l'air sur un papier de Whatman N° 5.

Mode opératoire

20 Etape 1 : Préparation des deux classes d'anticorps et de leurs agents fixés :

Des anticorps de classe un, constitués d'anticorps monoclonaux contre un site récepteur spécifique sur l'antigène de GCH, sont fixés à des particules transporteuses constituées de particules d'or colloïdal Pregnospi.

25 Des anticorps de classe deux constitués d'anticorps monoclonaux de bêta-subunité spécifique qui reconnaissent, sur l'antigène de GCH, un domaine différent de celui des anticorps de classe un, sont conjugués à la peroxydase de raifort (PR).

30 Etape 2 : Préparation de différents dispositifs d'immuno-dosage. On a employé trois types d'immuno-dosages (du type décrit ci-dessus sous la rubrique "Zones d'emprisonnement"). Dans

35

chaque dispositif, on a utilisé un type différent de zone d'emprisonnement que l'on a placée au-dessus de la couche de substrat par des méthodes connues dans la technique.

5 Etape 3 : On mélange la solution d'essai avec les deux classes d'anticorps. Ensuite, on place le mélange en contact avec la couche superficielle des différents dispositifs d'immuno-

10 dosage.

RESULTATS

La figure 4 représente l'emprisonnement de l'élément conjugué libre par la zone de tamis moléculaires. En absence d'antigène, on n'a observé

15 aucune formation importante de coloration pour une dilution de 1/1.000 et un volume de 100 microlitres. Après application directe sur la couche de substrat, on a obtenu une densité de coloration de 0,47 unité dans les deux minutes. En présence d'une pré-incubation

20 pendant 2 minutes avec l'antigène, il s'est produit une importante réaction chromogène de 0,31 unité.

La figure 5 illustre la forme de réalisation dans laquelle on utilise une couche d'emprisonnement de nitrocellulose enduite de Protéine A. La couche d'emprisonnement était modérément efficace. En absence

25 d'antigène, on a observé uniquement une couleur de 0,13 unité au-dessus du fond. En présence de l'antigène, le signal de couleur était de 0,25 unité, indiquant ainsi que la liaison de l'élément conjugué à la particule

30 transporteuse l'a nettement protégé contre son emprisonnement par la Protéine A.

La figure 6 montre l'utilisation d'une résine échangeuse de cations comme couche d'emprisonnement. Cette forme de réalisation était moins efficace que

35 les autres formes de réalisation mentionnées ci-dessus,

mais elle a servi à déterminer la présence ou l'absence d'antigène. En absence de l'antigène, il s'est produit une importante coloration à toutes les dilutions d'anticorps. En présence de l'antigène, on a observé
5 un accroissement quantitatif de coloration, indiquant ainsi que la particule transporteuse a assuré une certaine protection contre la liaison à la résine.

D'après la description qui précède, il est clair que le dispositif et le procédé de la présente
10 invention sont très efficaces pour déterminer l'existence éventuelle d'un antigène spécifique dans une prise d'essai donnée. L'homme de métier spécialisé dans la technique à laquelle se rapporte l'invention, reconnaîtra aisément les nombreuses applications pour
15 lesquelles la présente invention peut être mise en oeuvre.

Bien que l'on ait décrit ce que l'on considère actuellement comme étant les formes de réalisation préférées de la présente invention, l'homme de métier
20 reconnaîtra de toute évidence que différentes modifications et différents changements peuvent y être apportés sans se départir de l'invention et, par conséquent, il est entendu que les revendications ci-après couvrent toutes ces modifications et tous ces changements rentrant
25 dans l'esprit et le cadre réels de l'invention.

REVENDICATIONS

1. Dispositif en vue de déterminer la présence d'antigènes dans une prise d'essai, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 5 a. une zone d'emprisonnement contenant une matière capable de capturer des anticorps reliés à une enzyme et s'écoulant librement, mais non des anticorps liés à une particule transporteuse s'écoulant librement à travers cette zone d'emprisonnement ; et
- 10 b. une zone de substrat contenant une matière capable de réagir avec des anticorps reliés à une enzyme pour provoquer une réaction indiquant la présence de ces anticorps.

2. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que les zones d'emprisonnement et de substrat sont dans une relation de juxtaposition.

3. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que la réaction se produisant dans la zone de substrat et indiquant la présence de ces anticorps reliés à une enzyme, est une réaction chromogène.

4. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que la zone d'emprisonnement est réalisée à partir de nitrocellulose enduite de Protéine A.

25

5. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que la zone d'emprisonnement est réalisée à partir de gel d'agrose.

6. Procédé en vue de déterminer la présence
5 d'un antigène dans une prise d'essai, caractérisé en ce qu'il consiste à :

a. mettre la prise d'essai en contact avec un mélange d'anticorps de classe un et de classe deux qui sont tous deux spécifiques à cet antigène, mais
10 qui reconnaissent chacun des domaines différents sur cet antigène, les anticorps de classe un étant liés à une particule transporteuse, tandis que les anticorps de classe deux sont reliés à une enzyme de telle sorte qu'en présence de cet antigène, il se forme, dans
15 ce mélange, des complexes comprenant des anticorps de classe un liés à une particule transporteuse, l'antigène et des anticorps de classe deux reliés à une enzyme ;

b. mettre ce mélange en contact avec un
20 dispositif comprenant une zone d'emprisonnement et une zone de substrat, cette zone d'emprisonnement contenant une matière capable de capturer des anticorps libres, y compris des anticorps non liés de classe deux reliés à une enzyme, mais non des anticorps de classe un liés à une particule transporteuse
25 ou l'une ou l'autre substance liée à cette particule transporteuse, y compris ces complexes, la zone de substrat contenant une matière capable de réagir avec cette enzyme pour indiquer la présence de ces anticorps de classe deux reliés à une enzyme ;
30

c. laisser s'infiltrer le mélange à travers la zone d'emprisonnement à travers laquelle s'écoulent librement tous les anticorps liés à ces particules
35 transporteuses, y compris les complexes, pour parvenir ensuite dans la zone de substrat, tandis que tous

les anticorps non liés directement ou indirectement à ces particules transporteuses, y compris les anticorps de classe deux reliés à une enzyme et s'écoulant librement, sont capturés par cette zone d'em-
5 prisonnement ; et

d. observer la présence ou l'absence de tout changement survenant dans la zone de substrat afin de déterminer ainsi la présence ou l'absence de l'antigène soumis à l'essai dans cette prise
10 d'essai.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la zone d'emprisonnement et la zone de substrat sont placées dans une relation de juxtaposition.

15 8. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le changement survenant dans la zone de substrat pour déterminer ainsi la présence ou l'absence de l'antigène soumis à l'essai dans cette prise d'essai, est provoqué par un changement
20 de coloration.

9. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la zone d'emprisonnement est réalisée à partir de nitrocellulose.

10. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'antigène à déterminer est la gonadotrophine chorionique humaine.

11. Dispositif en vue de déterminer la présence d'antigènes dans une prise d'essai, caractérisé en ce qu'il comprend :

30 a. une zone d'emprisonnement comportant (i) des anticorps de classe un et de classe deux qui sont tous deux spécifiques à l'antigène faisant l'objet de l'essai, mais qui reconnaissent des domaines différents sur l'antigène, les anticorps de classe un étant
35 liés à une particule transporteuse et les anticorps

de classe deux étant reliés à une enzyme, de telle sorte qu'en présence de l'antigène soumis à l'essai, les anticorps de classe un et les anticorps de classe deux forment des complexes avec cet antigène à l'intérieur de la zone d'emprisonnement et comprenant des anticorps de classe un liés à une particule transporteuse, l'antigène et les anticorps de classe deux reliés à une enzyme, et (ii) une matière capable de capturer les anticorps de classe deux, mais non les anticorps de classe un ou l'une ou l'autre substance liée à cette particule transporteuse ; et

b. une zone de substrat contenant une matière capable de réagir avec les anticorps de classe deux reliés à une enzyme pour provoquer une réaction indiquant la présence de ces anticorps.

12. Dispositif selon la revendication 11, caractérisé en ce que les zones d'emprisonnement et de substrat sont dans une relation de juxtaposition.

13. Dispositif selon la revendication 11, caractérisé en ce que la réaction survenant dans la zone de substrat et indiquant la présence des anticorps reliés à une enzyme, est une réaction chromogène.

14. Dispositif selon la revendication 11, caractérisé en ce que la zone d'emprisonnement est réalisée à partir de nitrocellulose enduite de Protéine A.

15. Dispositif selon la revendication 11, caractérisé en ce que la zone d'emprisonnement est réalisée à partir de gel d'agrose.

16. Procédé en vue de déterminer la présence d'un antigène dans une prise d'essai, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes qui consistent à :

a. mettre la prise d'essai en contact avec un dispositif comprenant (i) une zone d'emprisonnement contenant des anticorps de classe un et des anticorps

de classe deux qui sont tous deux spécifiques à l'antigène, mais qui reconnaissent des domaines différents sur l'antigène, les anticorps de classe un étant liés à une particule transporteuse et les anticorps de classe deux étant reliés à une enzyme, de telle sorte qu'en présence de l'antigène faisant l'objet de l'essai, les anticorps de classe un et les anticorps de classe deux forment, avec cet antigène et à l'intérieur de la zone d'emprisonnement, des complexes comprenant des anticorps de classe un liés à une particule transporteuse, l'antigène et des anticorps de classe deux reliés à une enzyme, (ii) une matière capable de capturer les anticorps de classe deux, mais non les anticorps de classe un ou l'une ou l'autre substance liée à ces particules transporteuses, et (iii) une zone de substrat contenant une matière capable de réagir avec les anticorps de classe deux reliés à une enzyme pour provoquer une réaction indiquant la présence de ces anticorps;

b. laisser s'infiltrer ce mélange dans la zone d'emprisonnement à travers laquelle s'écoulent librement tous les anticorps liés aux particules transporteuses, y compris les complexes, pour parvenir dans la zone de substrat, tandis que tous les anticorps non liés à ces particules transporteuses, y compris les anticorps de classe deux reliés à une enzyme et s'écoulant librement, sont capturés par cette zone d'emprisonnement; et

c. observer la présence ou l'absence de tout changement survenant dans la zone de substrat pour déterminer ainsi la présence ou l'absence de l'antigène faisant l'objet de l'essai, contenu dans cette prise d'essai.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que la zone d'emprisonnement et

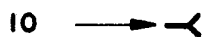
la zone de substrat sont placées dans une relation de juxtaposition.

5 18. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que le changement survenant dans la zone de substrat pour déterminer ainsi la présence ou l'absence de l'antigène faisant l'objet de l'essai et contenu dans cette prise d'essai, est provoqué par un changement de coloration.

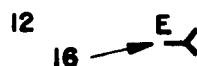
10 19. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que la zone d'emprisonnement est réalisée à partir de nitrocellulose.

20. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que l'antigène à déterminer est la gonadotrophine chorionique humaine.

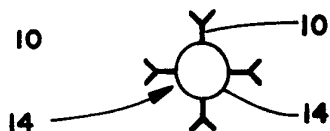
Anticorps 10 de
classe un



Anticorps 12 de
classe deux con-
jugués avec des
enzymes 16



Anticorps 10 de
classe un fixés
à la surface
d'une particule
transporteuse 14



Antigène 28



Zone d'emprison-
nement 18

18

Zone de substrat
20 contenant
un réactif
chromogène 22

20

22

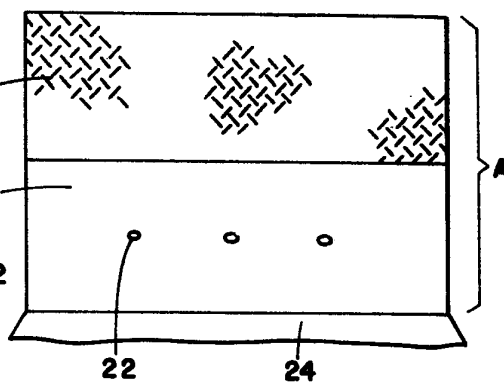
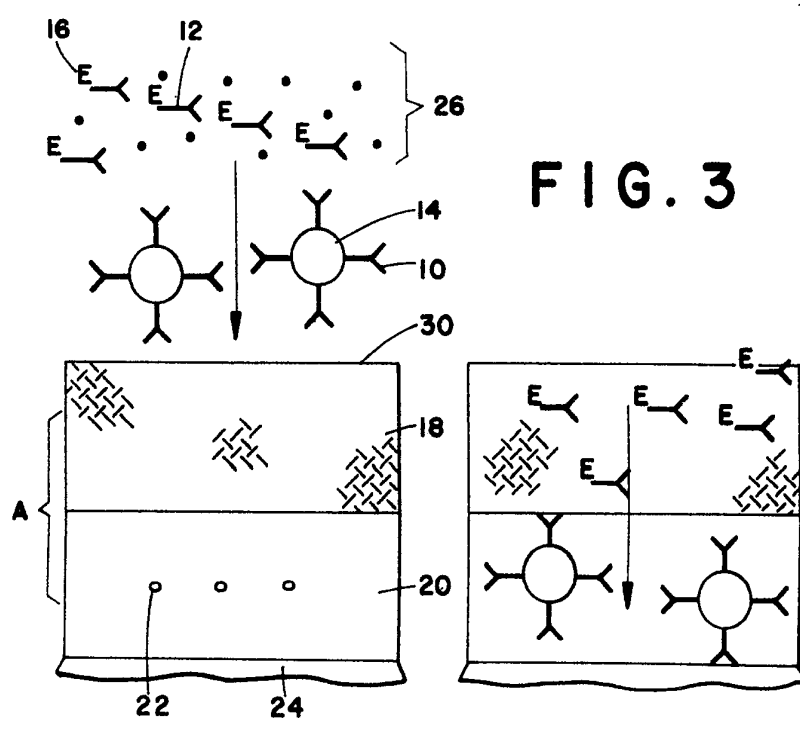
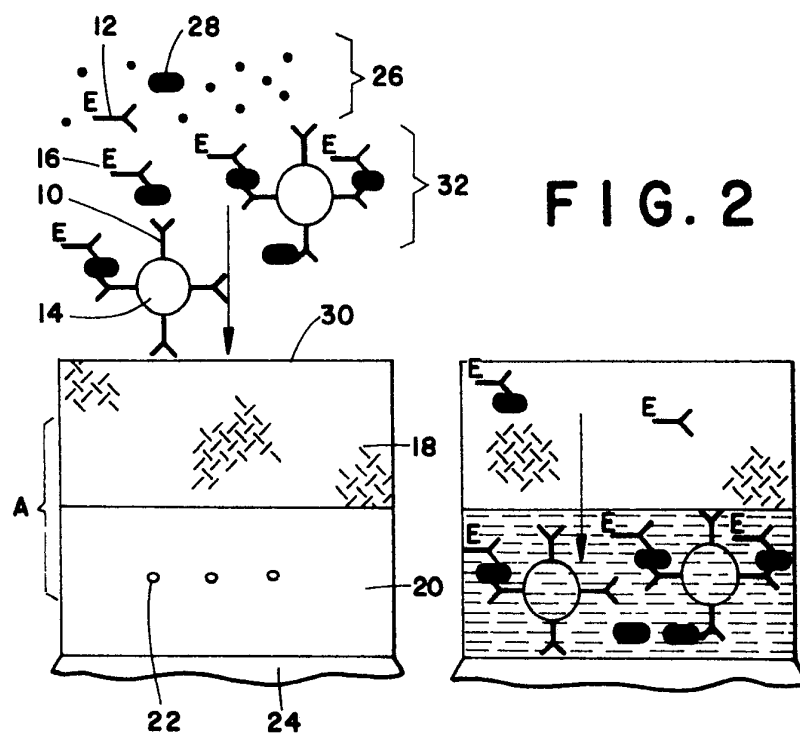


FIG. 1



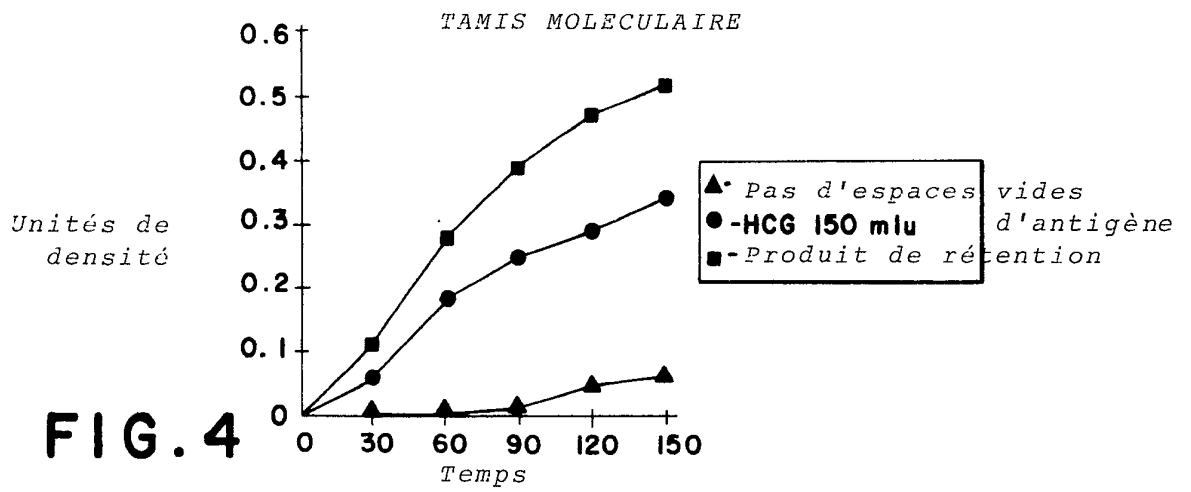


FIG. 4

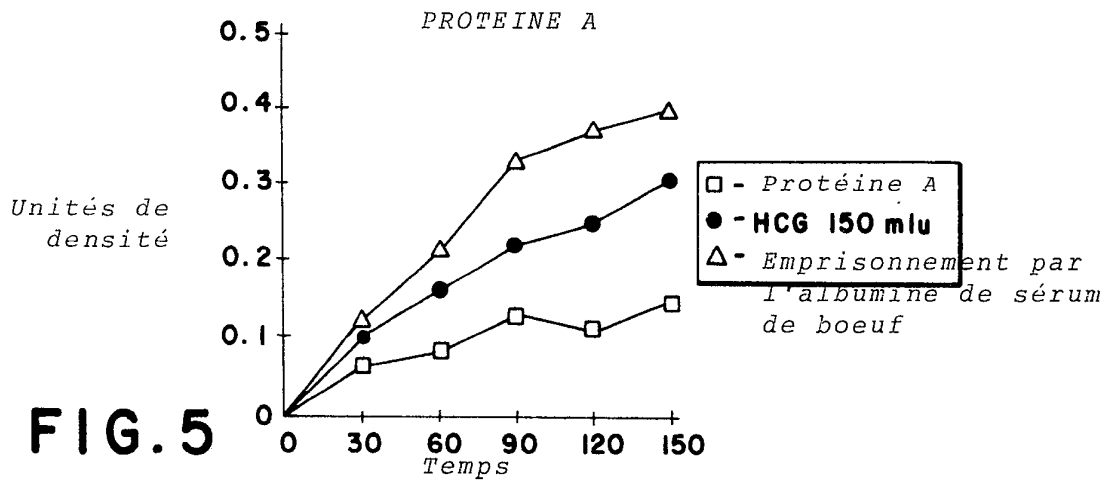


FIG. 5

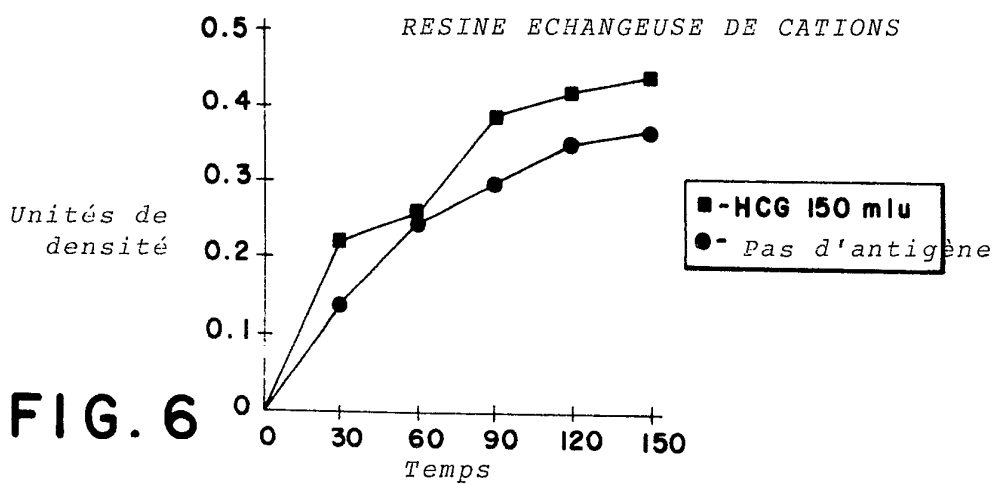


FIG. 6