RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 487 983**
(A n'utiliser que pour les commandes de reproduction).

A1

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

(21) **N° 81 15030**

(54) **Procédé d'analyse immunométrique.**

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

(22) Date de dépôt ..... 3 août 1981.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : *EUA, 4 août 1980, n° 175 133 et 24 juin 1981, n° 323 498.*

(41) Date de la mise à la disposition du public de la demande ..... B.O.P.I. — « Listes » n° 5 du 5-2-1982.

(71) Déposant : Société dite : HYBRITECH INCORPORATED, résidant aux EUA.

(72) Invention de : Gary Samuel David et Howard Edward Greene.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Rinuy, Santarelli,
14, av. de la Grande-Armée, 75017 Paris.

La présente invention concerne des méthodes de détection et/ou de détermination de la concentration de substances antigéniques dans des liquides tels que le sérum. Selon un autre de ses aspects, elle concerne des techniques d'analyse immunométrique et des épreuves d'inhibition. Elle se rapporte en outre à des anticorps monoclonaux.

La détermination de la présence ou de la concentration de substances antigéniques, par exemple celles qui sont associées à une grande variété de troubles physiologiques, dans le sérum et dans d'autres liquides corporels s'appuie de plus en plus sur des techniques d'analyse immunologique. Ces techniques sont basées sur la formation d'un complexe entre la substance antigénique sur laquelle porte l'analyse et un anticorps ou des anticorps, où l'un ou l'autre des composants du complexe peut être marqué par exemple par un élément radioactif tel que ^{125}I, ce qui permet sa détection et/ou son analyse quantitative après séparation de l'antigène ou de l'anticorps marqué complexé de l'antigène ou de l'anticorps marqué non complexé.

Dans le cas d'une technique d'analyse immunologique par compétition, la substance antigénique contenue dans un échantillon de liquide dans lequel on détecte sa présence entre en compétition avec une quantité connue d'antigène marqué pour une quantité limitée de sites de fixation de l'anticorps. Ainsi, la quantité d'antigène marqué liée à l'anticorps est inversement proportionnelle à la quantité d'antigène dans l'échantillon. En contraste, les épreuves immunométriques utilisent un anticorps marqué. Dans une telle épreuve, la quantité d'anticorps marqué associée au complexe est proportionnelle à la quantité de substance antigénique dans l'échantillon liquide.

Des épreuves immunométriques se sont révélé être particulièrement bien adaptées à la détection d'antigènes polyvalents, c'est-à-dire de substances antigéniques qui sont capables de se complexer avec au moins deux anticorps en même temps. On utilise habituellement dans

de telles épreuves une quantité d'anticorps non marqué lié à un support solide qui est insoluble dans le liquide en cours d'analyse et une quantité d'anticorps soluble portant un indicateur tel qu'un isotope radioactif qui permet la détection et/ou une estimation quantitative du complexe ternaire formé entre l'anticorps en phase solide, l'antigène et l'anticorps marqué.

Dans des épreuves immunométriques connues dans l'art antérieur, on utilise normalement les épreuves "directes" dans lesquelles l'anticorps lié à la phase solide est tout d'abord mis en contact avec l'échantillon à analyser pour extraire l'antigène de l'échantillon par formation d'un complexe binaire entre l'anticorps en phase solide et l'antigène. Après une période convenable d'incubation, le support solide est lavé pour éliminer le résidu d'échantillon liquide, y compris l'antigène éventuel n'ayant pas réagi, puis mis en contact avec une solution contenant une quantité connue d'anticorps marqué.

Après une seconde période d'incubation pour permettre à l'anticorps marqué de se complexer avec l'antigène lié au support solide par l'intermédiaire de l'anticorps non marqué, le support solide est lavé une seconde fois pour enlever l'anticorps marqué n'ayant pas réagi. Dans une épreuve simple "oui/non" destinée à déterminer si l'antigène est présent dans l'échantillon en cours d'analyse, le support solide lavé est testé en vue de détecter la présence d'anticorps marqué, par exemple par mesure de la radiation émise si l'indicateur est un élément radioactif. La quantité d'anticorps marqué détectée est comparée à celle que l'on obtient pour un échantillon témoin négatif dont on sait qu'il est dépourvu d'antigène. La détection d'anticorps marqué en quantités sensiblement au-dessus des niveaux de fond indiqués par le témoin négatif est interprétée en vue de l'indication de la présence de l'antigène présumé. Des déterminations quantitatives peuvent être faites par comparaison de la mesure de l'anticorps marqué avec la valeur obtenue pour des échantillons étalonnés contenant des quantités connues

de l'antigène.

Ce type d'épreuve est souvent appelé méthode à "double site" ou "sandwich", attendu que l'antigène porte deux anticorps liés à sa surface en des endroits différents. Cette technique et des techniques apparentées sont décrites par Wide dans "Radioimmunoassay Methods" édité par Kirkham et Hunter, E.&.S. Livingstone, Edinburgh, 1970, pages 199-206. Une épreuve basée sur cette technique de détection de l'antigène associé à l'hépatite dans le sérum au moyen d'un anticorps marqué par ^{125}I est décrite dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 3 867 517.

Malgré leur grande utilité, les épreuves immunométriques de l'art antérieur se sont révélé être des processus lents, en partie parce que deux opérations de lavage sont nécessaires et du fait que de longues périodes d'incubation s'imposent pour approcher de l'équilibre, c'est-à-dire du point où la quantité de complexe formé ne varie pas lorsque le temps croît.

Pour éliminer au moins l'une des opérations de lavage impliquées dans ce processus, des épreuves dites "simultanées" et "inverses" ont été proposées. Une épreuve simultanée implique une seule étape d'incubation attendu que l'anticorps lié au support solide et l'anticorps marqué sont tous deux ajoutés en même temps à l'échantillon en cours d'analyse. Lorsque l'incubation est terminée, le support solide est lavé en vue d'éliminer le résidu d'échantillon liquide et l'anticorps marqué non complexé. La présence d'anticorps marqué associé au support solide est ensuite déterminée comme elle le serait dans une épreuve sandwich "directe" classique.

Une épreuve inverse implique l'addition par étapes, d'abord d'une solution d'anticorps marqué à l'échantillon liquide, puis de l'anticorps non marqué lié à un support solide après une période convenable d'incubation. Après une seconde incubation, la phase solide est lavée de façon classique pour la débarrasser du résidu de l'échantillon en cours d'analyse et de la solution

d'anticorps marqué n'ayant pas réagi. La détermination de l'anticorps marqué associé au support solide est ensuite effectuée comme dans les épreuves simultanée et directe.

Les techniques analytiques simultanée et inverse nécessitent toutes deux un excès suffisant d'anticorps en phase solide pour fixer la majeure partie ou la totalité de l'antigène présent pour éviter un effet d'accrochage à forte dose lorsqu'une évaluation faussement négative ou faible de l'antigène est observée à des concentrations extrêmement fortes en antigène. Pour cette raison, la méthode directe a constitué l'approche préférée dans l'art antérieur. Cela est dû au fait que de grandes quantités d'anticorps actif hautement purifié spécifique de l'antigène en question pour la préparation d'une phase solide ayant une capacité suffisante de fixation de l'antigène sont difficiles à obtenir à partir des anticorps "polyclonaux" utilisés dans les procédés de l'art antérieur. Lorsqu'une substance immunogénique est introduite dans un organisme vivant, le système immunitaire de l'organisme réagit en engendrant des anticorps vers chaque site sur l'immunogène qu'il reconnaît. Une grande molécule de protéine immunogénique peut présenter des douzaines de sites et une cellule étrangère peut en avoir des centaines. Par conséquent, bien que chaque cellule produisant un anticorps engendre un anticorps spécifique pour un seul site antigénique, le système immunitaire a engendré un type de cellules produisant des anticorps spécifiques pour chaque site immunogénique reconnu. En outre, l'organisme a produit des quantités relativement grandes d'anticorps relatifs à des antigènes autres que l'antigène en question, en sorte que la majeure partie de l'anticorps dans un mélange polyclonal n'est pas spécifique de l'antigène en question. En conséquence, les anticorps utilisés dans les épreuves immunométriques antérieures sont nécessairement de nature "polyclonale" attendu que les anticorps sont dérivés d'antisérums élaborés d'une manière classique chez les animaux et

que leur purification est difficile. Des méthodes de purification par affinité de ces anticorps ont généralement pris du temps et ont donné de faibles rendements et entraîné une perte d'anticorps de grande affinité.

Lorsqu'on utilise des mélanges d'anticorps polyclonaux classiques dans les épreuves inverse et simultanée, la formation d'un "sandwich" comprenant l'antigène complexé par au moins deux anticorps marqués qui se complexent avec l'antigène en des sites différents est possible. Ces complexes pourraient rester solubles dans l'échantillon en cours d'analyse, ils pourraient être éliminés par des opérations subséquentes de lavage et ils pourraient ne pas être "comptés" lorsque la phase solide est analysée en vue d'évaluer l'anticorps marqué lié à la phase solide. Si cela se produit dans une proportion importante, la sensibilité de l'épreuve est réduite et des résultats erronés peuvent apparaître. Toutefois, si l'anticorps lié non marqué est ajouté d'abord à l'échantillon comme dans l'épreuve directe du type sandwich, des considérations stériques empêchent la formation d'un sandwich comprenant l'antigène complexé à deux ou plus de deux anticorps non marqués, où l'anticorps marqué est mis dans l'impossibilité de se lier également à l'antigène. En conséquence, l'antigène est libre de réagir avec une molécule d'anticorps marqué. Néanmoins, il a été proposé d'utiliser une épreuve simultanée pour la thyrotrophine humaine (HTSH) en utilisant un grand excès de l'anticorps non marqué lié à une phase solide pour minimiser la formation d'un complexe soluble par des anticorps marqués solubles (voir Jeong et collaborateurs, "Comparison of Radioimmunoassay (RIA) with a Unique, Single-Incubation Two-Site Immunoradiometric Assay (IRMA) as Applied to the Determination of Human Thyroid Stimulating Hormone (HTSH)", Bio-Rad Laboratories, 1979).

Une variante d'épreuve simultanée est décrite dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 4 174 384. Dans cette épreuve, des portions séparées d'anti-IgG (humaine) sont marquées, respectivement, avec un chromophore fluorescent (fluorescéine) et un chromophore

(rhodamine) qui absorbe de la lumière émise par la fluorescéine. Les deux anticorps, sous une forme soluble, sont mis en contact avec un échantillon contenant de l'IgG humaine. La réaction de l'anti-IgG avec l'IgG peut rapprocher suffisamment les deux chromophores l'un de l'autre, c'est-à-dire de l'ordre de 10,0 nanomètres ou moins, pour que l'émission de la lumière par le chromophore fluorescent soit absorbée (éteinte) par l'autre. Le pourcentage de fluorescence maximale pour l'échantillon est déterminé et utilisé comme mesure de la quantité d'IgG dans l'échantillon.

Il a été proposé d'utiliser une méthode inverse pour la thyrotrophine (HTSH), l'antigène associé à l'hépatite (AAH) et l'antigène carcinoembryonnaire (ACE) en utilisant une quantité d'anticorps marqué suffisante pour assurer la formation d'un complexe anticorps marqué: antigène, mais insuffisante pour former un "sandwich" de tout l'antigène présent dans un échantillon (voir brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 4 098 876).

Etant donné que les trois méthodes connues dans l'art antérieur utilisent un mélange polyclonal d'anticorps, le potentiel d'interférence de matières, dans le sérum ou autre liquide, autres que l'antigène auquel le test est destiné, est accru. L'existence d'une réactivité croisée avec d'autres antigènes réduit également la sensibilité du test vis-à-vis de l'antigène présumé et accroît la persepctive d'une épreuve "faussement positive". En outre, l'utilisation d'anticorps polyclonaux dans une épreuve simultanée ou inverse nécessite de prendre soigneusement en considération la quantité d'anticorps marqué utilisée par rapport à la quantité d'anticorps en phase solide et/ou d'antigène présent. Dans le cas de l'utilisation d'une extinction de la fluorescence, la sensibilité est réduite parce que la distance minimale entre le chromophore fluorescent et le chromophore extincteur n'est pas assurée lorsque des anticorps polyclonaux sont utilisés.

A cause de ces inconvénients, les limitations aux méthodes immunométriques connues dans l'art antérieur sont évidentes. Les épreuves directes classiques sont effectuées avec moins d'étapes mais nécessitent de grandes quantités d'anticorps spécifiques en phase solide et ne sont pas bien adaptées à la détermination de faibles concentrations en antigène, attendu que la formation d'un sandwich de l'antigène avec un nombre multiple de molécules d'anticorps marqué entre en compétition avec la formation du sandwich anticorps lié:antigène:anticorps lié ou, dans le cas de l'utilisation d'une extinction de fluorescence, la formation d'un sandwich sans appariement d'un chromophore fluorescent avec un chromophore extincteur est possible ; et toutes ces méthodes sont exposées à une mauvaise interprétation de résultats faussement positifs à cause de la nature polyclonale de l'anticorps.

En conséquence, l'un des buts de la présente invention est de proposer une méthode perfectionnée d'épreuves immunométriques pour des substances antigéniques.

Plus particulièrement, l'un des buts de la présente invention est de proposer des techniques plus rapides d'épreuve immunométrique.

Un autre but de la présente invention est de proposer des techniques d'épreuve immunométrique plus sensibles.

La présente invention a en outre pour objet de proposer des épreuves immunométriques "simultanées" et "inverses" perfectionnées.

Un autre but de l'invention est de trouver des épreuves d'inhibition perfectionnées.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention ressortiront de la description détaillée qui va suivre.

Conformément à la présente invention, les anticorps polyclonaux utilisés dans une épreuve immunométrique, par exemple, comme anticorps non marqué lié à un support solide, et l'anticorps utilisé comme anticorps marqué soluble ou, dans le cas d'épreuves basées

sur une extinction de fluorescence, les anticorps portant un chromophore fluorescent ou extincteur sont remplacés par au moins un et ordinairement deux ou plus de deux anticorps monoclonaux différents, c'est-à-dire chaque anticorps spécifique d'un site antigénique unique et produit séparément par des clones dérivés de lignées cellulaires uniques.

La présente invention propose, dans une méthode d'épreuve immunométrique pour l'analyse d'un échantillon liquide, comprenant la formation d'un complexe ternaire de la substance antigénique, d'un premier anticorps et d'un second anticorps lié à l'antigène en un site différent du premier anticorps par contact de l'échantillon avec le premier et le second anticorps, le perfectionnement consistant à utiliser un anticorps monoclonal pour chacun des premier et second anticorps.

Dans une forme de réalisation appréciée de l'invention, l'anticorps monoclonal utilisé comme anticorps lié à un support solide est le produit d'une lignée cellulaire différente de celle de l'anticorps monoclonal utilisé pour l'anticorps marqué, et les deux anticorps monoclonaux sont choisis pour lier la substance antigénique en des sites distants l'un de l'autre de manière à ne pas interférer avec la liaison de l'autre à l'antigène. Dans le cas d'une extinction de fluorescence, les deux anticorps sont d'ordinaire également les produits de lignées cellulaires différentes et sont choisis de manière à ne pas interférer avec la liaison de l'autre tout en rapprochant les deux chromophores suffisamment l'un de l'autre pour permettre l'extinction de la fluorescence, c'est-à-dire d'ordinaire de l'ordre d'environ 10,0 nanomètres. Les avantages de la présente invention, notamment dans des épreuves simultanées et inverses, par rapport aux méthodes de l'art antérieur deviennent clairs à l'examen des dessins annexés et à la lecture de la description détaillée qui suit.

Conformément à la présente invention, les anticorps monoclonaux sont également utilisés dans des

épreuves d'inhibition. Dans ces épreuves, une quantité connue d'un antigène et d'un anticorps monoclonal est mise en contact avec un échantillon devant contenir un antigène correspondant à l'antigène connu ajouté avec l'anticorps monoclonal. Le degré auquel l'inhibition du complexe entre l'anticorps et l'antigène a lieu parce qu'un complexe est formé entre l'anticorps monoclonal et l'antigène de l'échantillon, donne une mesure de la présence et/ou de la quantité d'antigène dans l'échantillon analysé.

Selon un autre aspect de l'invention, le procédé de détection de la présence ou de détermination de la concentration d'une substance antigénique dans un liquide comprend les étapes de :

(a) mise en contact d'un échantillon du liquide avec une quantité connue de substance antigénique ajoutée et d'un anticorps monoclonal relatif à la substance antigénique, et

(b) mesure de l'inhibition de la formation d'un complexe entre l'anticorps et la substance antigénique ajoutée par combinaison dudit anticorps monoclonal et de la substance antigénique dans le liquide pour former un second complexe.

Dans une forme de réalisation appréciée, l'anticorps et l'antigène sont liés, respectivement, à l'un de deux chromophores fluorescent et extincteur formant une paire. L'inhibition de la formation d'un complexe entre l'antigène marqué et l'anticorps par des antigènes de l'échantillon analysé conduit à une réduction de l'extinction et à une augmentation de la fluorescence. Le degré d'inhibition de l'extinction est une mesure de la concentration en antigène dans l'échantillon. Dans une autre forme appréciée d'épreuve d'inhibition, l'antigène connu et l'anticorps dans le complexe initial sont liés à des particules, par exemple des particules de latex, d'une dimension qui permet des agglutinations. Lorsqu'un échantillon devant contenir un antigène est mis en contact avec l'anticorps et l'antigène lié, une inhibition des agglutinations a lieu du fait de la complexation entre

l'anticorps lié et l'antigène de l'échantillon qui ne peuvent pas produire d'agglutinations. La réduction de l'agglutination peut être mesurée par des techniques turbidimétriques.

Sur les dessins annexés :

- la figure 1 est une représentation graphique illustrant les résultats obtenus en utilisant des anticorps polyclonaux dans quatre types d'épreuve immunométrique portant sur l'IgE humaine ; et

- la figure 2 est un graphique similaire illustrant la différence existant dans les résultats obtenus lorsqu'on utilise des anticorps monoclonaux dans les quatre mêmes types d'épreuve immunométrique portant sur l'IgE humaine.

Comme indiqué ci-dessus, conformément à la présente invention, l'anticorps polyclonal utilisé dans une méthode immunométrique d'analyse d'une substance antigénique est remplacé par un anticorps monoclonal. De même, des anticorps monoclonaux sont utilisés dans des épreuves d'inhibition. La présente invention est utile à la détection de la présence et à la détermination de la concentration d'une grande variété de substances antigéniques comprenant des substances antigéniques polyvalentes. En conséquence, le terme antigène et l'expression substance antigénique utilisés dans le présent mémoire désignent au sens large des substances vis-à-vis desquelles des anticorps peuvent être produits. Parmi ces substances, on peut mentionner des haptènes, des hormones telles que l'insuline et la thyrotrophine humaine (HTSH), des gamma-globulines, des allergènes, des virus, des sous-unités virales, des bactéries, des toxines telles que celles qui sont associées au tétanos et aux venins d'animaux, et même certains médicaments. Parmi les antigènes spécifiques qui peuvent être analysés par les procédés de la présente invention, on peut mentionner l'antigène carcinoembryonnaire (ACE), l'hépatite A et B, l'hépatite Non-A, Non-B, l'IgE et l'alphafoetoprotéine.

Les anticorps monoclonaux utiles dans la présente invention sont obtenus par le procédé décrit par Milstein et Kohler dans Nature 256 495-497, 1975. Les détails de ce procédé sont bien connus et ne seront pas répétés dans le présent mémoire. Toutefois, il implique pour l'essentiel l'injection d'un immunogène à une souris ou à un autre animal convenable. La souris est ensuite sacrifiée et des cellules prélevées sur sa rate sont unies à des cellules de myélome. Il en résulte une cellule hybride appelée "hybridome" qui se reproduit in vitro. La population d'hybridomes est sélectionnée et manipulée de manière à isoler des clones individuels dont chacun élabore une espèce unique d'anticorps relative à l'antigène. Chaque anticorps spécifique individuel obtenu de cette façon est le produit d'une unique cellule B de l'animal immun, engendrée en réponse à un site antigénique spécifique reconnu sur la substance immunogénique.

Lorsqu'une substance immunogénique est introduite dans un hôte vivant, le système immunitaire de l'hôte réagit en produisant des anticorps relatifs à tous les sites reconnaissables sur la substance. Cette approche sous "contrainte" de la production d'anticorps pour combattre l'envahisseur entraîne la production d'anticorps d'affinités et de spécificités différentes envers la substance immunogénique. En conséquence, après que les différentes lignées cellulaires d'hybridomes ont été triées pour identifier celles qui produisent un anticorps relatif à l'antigène désiré, les anticorps produits par les lignées cellulaires individuelles d'hybridomes sont de préférence examinés en vue d'identifier celles qui ont la plus grande affinité pour la substance immunogénique stimulant leur production originelle avant la sélection en vue de leur utilisation dans la présente invention. On considère que la sélection basée sur ce critère contribue à offrir la sensibilité élevée dans les épreuves immunométriques et d'inhibition de la présente invention utilisant un anticorps monoclonal, comparativement à l'anticorps polyclonal utilisé dans l'art antérieur qui, dans

le meilleur cas, a une affinité pour l'antigène qui est, grossièrement, la moyenne des affinités de tous les anticorps produits par le système immunitaire. De préférence, l'anticorps monoclonal choisi a une affinité compatible avec la sensibilité et la plage désirées pour le système analytique en question. De préférence, l'anticorps a une affinité d'au moins 10^8 litres/mole et, notamment, une affinité d'au moins environ 10^9 litres/mole.

En outre, les anticorps monoclonaux ayant les affinités maximales peuvent encore être sélectionnés par la conduite d'une épreuve simulée sur des échantillons dont on sait qu'ils donnent des résultats faussement positifs par des procédés utilisant des anticorps polyclonaux classiques pour identifier les anticorps monoclonaux qui ne sont pas susceptibles de réaction croisée et qui donnent des résultats faussement positifs.

Du fait que l'épreuve immunométrique à deux sites est basée sur la formation d'un sandwich anticorps: antigène:anticorps, habituellement deux anticorps monoclonaux différents qui n'interfèrent pas avec leur liaison mutuelle à l'antigène sont choisis pour constituer l'anticorps lié et l'anticorps marqué soluble ou la paire d'anticorps lorsqu'on utilise une extinction de fluorescence. Attendu que tous deux sont nécessaires pour réaliser le sandwich, des épreuves inverses et simultanées peuvent être conduites sans se soucier, par exemple, de la formation d'un complexe anticorps marqué:antigène:anticorps marqué qui interdit la formation d'un complexe entre l'antigène et l'anticorps lié à la phase solide et c'est là que réside un avantage particulier de la présente invention. En outre, une épreuve directe peut être conduite sans opération intermédiaire de lavage, attendu que les deux anticorps se lient à deux sites différents. Une telle méthode sera appelée épreuve "directe rapide".

Toutefois, en particulier dans le cas d'une épreuve directe, le même anticorps monoclonal peut être utilisé pour l'anticorps marqué et pour l'anticorps lié au support solide lorsque la substance antigénique possède

des sites identiques de liaison des anticorps suffisamment éloignés les uns des autres pour permettre la liaison de plus d'une molécule d'anticorps à la fois. Dans un tel système, l'addition préalable de l'anticorps lié à l'échantillon interdit la formation d'un sandwich pour des considérations d'ordre stérique. Lorsque l'anticorps monoclonal marqué est ajouté par la suite, il est également capable de se complexer avec l'antigène lié à l'anticorps non marqué sur la phase solide.

L'anticorps monoclonal non marqué utilisé dans le procédé de la présente invention pour extraire la substance antigénique de l'échantillon en cours d'analyse peut être immobilisé sur l'un quelconque des supports usuels utilisés dans des épreuves immunométriques. Parmi ces supports, on peut mentionner du papier-filtre, des perles de matière plastique ou des tubes à essai en polyéthylène, polystyrène, polypropylène ou autre matière convenable. On peut aussi utiliser des matières en particules telles que de l'agarose, du dextrane réticulé, et d'autres polysaccharides. Les techniques de liaison des anticorps à de telles matières sont bien connues de l'homme de l'art. Par exemple, des anticorps peuvent être liés à des polymères de polysaccharides par le procédé décrit dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 3 645 852.

L'anticorps monoclonal marqué utilisé dans la présente invention peut être pourvu des mêmes marques que celles qui sont utilisées dans les épreuves immunométriques de l'art antérieur. Parmi ces marques, on peut mentionner les marques produisant une fluorescence pour la détection par fluorimétrie comme décrit dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 3 940 475 et des marques enzymatiques comme décrit dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 3 654 090. Conformément à l'invention, on préconise le marquage de l'anticorps avec un radio-isotope tel que ^{125}I en utilisant, par exemple, le mode opératoire décrit par Hunter et Greenwood dans Nature, 144 (1962), page 945 ou la méthode de David et

collaborateurs décrite dans Biochemistry, volume 13, pages 1014-1021, 1974.

Dans une épreuve représentative, la quantité d'anticorps marqué associé au complexe insoluble en sandwich est déterminée par l'examen du support insoluble par des moyens convenables. Toutefois, il est également possible d'établir la relation entre la présence ou l'absence d'un antigène dans l'échantillon liquide analysé et la quantité d'anticorps marqué qui ne réagit pas au cours de l'épreuve et qui reste sous la forme soluble.

Les avantages de la présente invention, dans laquelle des anticorps monoclonaux sont utilisés dans des épreuves immunométriques comparativement à des anticorps polyclonaux, ressortent de l'exemple suivant. Dans cet exemple, quatre épreuves comparatives, une épreuve simultanée, une épreuve inverse, une épreuve directe et une épreuve directe "rapide", ont été conduites avec un anticorps monoclonal et un anticorps polyclonal en utilisant un sérum normal contenant 100 UI/ml d'IgE humaine comme échantillon positif. Du sérum normal de cheval ne contenant pas d'IgE a été utilisé comme témoin négatif.

L'anticorps polyclonal relatif à IgE utilisé comme anticorps marqué dans l'exemple est un produit de la firme Pharmacia Diagnostics de Piscataway, New Jersey. L'anticorps polyclonal lié au support solide provient de la firme Tago, Inc. de Burlingame, Californie.

L'anticorps monoclonal relatif à IgE a été obtenu en utilisant la méthode de Milstein et Kohler commentée ci-dessus. Les deux anticorps choisis présentaient chacun une affinité pour IgE de plus de 10^9 litres/mole et n'interféraient pas avec leur liaison mutuelle à l'IgE.

Les épreuves ont été conduites en utilisant un anticorps non marqué lié à de l'agarose par le procédé décrit dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 3 645 852. Le marquage de l'anticorps a été effectué à l'isotope ^{125}I conformément au procédé de David et collaborateurs (voir ci-dessus). Une solution physiologique

de sel tamponnée au phosphate, de pH 7,4, a été utilisée pour laver tous les échantillons.

EXEMPLE

1) Méthode d'épreuve simultanée -

On a utilisé des échantillons en double préparés en mélangeant 100 µl d'une suspension d'anticorps immobilisé sur des particules d'agarose avec 100 µl d'échantillon (sérum) et 100 µl d'anticorps soluble marqué par ^{125}I. On a fait incuber ce mélange pendant les durées indiquées sur le tableau I (pour l'anticorps polyclonal) et sur le tableau II (pour l'anticorps monoclonal) reproduits ci-dessous, plus 30 minutes. La période additionnelle d'incubation de 30 minutes a été ajoutée pour assimiler cette méthode d'analyse aux autres méthodes d'analyse qui nécessitent une durée additionnelle d'incubation de 30 minutes pour un second réactif que l'on ajoute. Après les périodes d'incubation, les particules d'agarose ont été lavées par l'addition d'un tampon et centrifugées. Après l'élimination par succion du liquide de lavage, le culot résultant de particules d'agarose a été soumis à un comptage de l'anticorps lié marqué par ^{125}I. Les numérations obtenues pour chacun des complexes après la durée spécifiée d'incubation sont indiquées sur les tableaux I et II.

2) Méthode d'analyse inverse -

On a utilisé des échantillons en double préparés en mélangeant 100 µl d'échantillon (sérum) avec 100 µl d'anticorps soluble marqué par ^{125}I et on les a fait incuber pendant les durées précisées sur les tableaux I et II. On a ensuite ajouté 100 µl d'une solution d'anticorps immobilisé sur des particules d'agarose et on a fait incuber le mélange pendant encore 30 minutes. Les particules d'agarose ont ensuite été lavées et comptées comme dans la méthode d'analyse simultanée. Les numérations sont reproduites sur les tableaux I et II.

3) Méthode d'analyse directe -

On a préparé des échantillons en double en mélangeant 100 µl d'échantillon (sérum) avec 100 µl d'une suspension d'anticorps immobilisé sur des particules d'agarose et on les a fait incuber pendant les durées précisées sur les tableaux I et II. Les particules d'agarose ont ensuite été lavées une fois par addition de 2,5-3,0 ml de tampon qui, après agitation, a été centrifugé, et le liquide a été retiré par succion. On a ensuite ajouté 100 µl d'anticorps soluble marqué par ^{125}I et on a fait incuber le mélange pendant encore 30 minutes. Les particules d'agarose ont ensuite été lavées et comptées comme dans la méthode d'analyse simultanée. Les résultats des comptages sont reproduits sur les tableaux I et II.

4) Méthode d'analyse directe rapide -

L'épreuve est conduite, en double, de la même manière que la méthode d'analyse directe, à la différence que l'étape de lavage entre l'incubation initiale de l'échantillon avec l'anticorps immobilisé sur des particules d'agarose et l'addition d'anticorps soluble marqué par ^{125}I a été omise.

Le nombre de chocs par minute pour les témoins en double et les essais en double des échantillons contenant l'IgE, avec utilisation d'anticorps polyclonal et d'anticorps monoclonal, sont reproduits sur les tableaux respectifs I et II. Ces résultats ont été utilisés pour la construction des courbes des figures I et II de la manière suivante. La moyenne des nombres de chocs par minute pour un témoin et pour une durée donnée d'incubation est soustraite de la moyenne des nombres de chocs pour l'épreuve correspondante avec l'IgE. La différence a été exprimée par un pourcentage des nombres de chocs totaux par minute de l'anticorps marqué ajouté à l'échantillon et elle est portée sur l'axe des ordonnées où elle est exprimée par le pourcentage des nombres totaux de chocs par minute de l'anticorps lié à la phase solide. La durée d'incubation est portée sur l'axe des abscisses.

Une comparaison des courbes représentées sur la figure 2, montrant les résultats d'épreuves conduites en utilisant l'anticorps monoclonal, avec celles de la figure 1 correspondant à des essais utilisant l'anticorps polyclonal, montre que dans chaque type d'épreuve, simultanée (S), inverse (I), directe (D) et directe rapide (DR) l'épreuve utilisant l'anticorps monoclonal a été plus sensible comme l'indique le plus fort pourcentage de chocs totaux en liaison avec la phase solide dans le cas de l'échantillon à 100 UI d'IgE/ml. Dans les épreuves simultanées et inverses, on a découvert le fait inattendu que celles qui utilisent un anticorps monoclonal atteignent l'équilibre plus rapidement que ne le fait l'épreuve correspondante utilisant un anticorps polyclonal. Par conséquent, lorsqu'on utilise un anticorps monoclonal dans ces processus, on peut réduire notablement la durée de l'épreuve au-delà de l'économie de temps réalisée par la simple élimination d'une étape de lavage. Sous ce rapport, l'épreuve inverse avec l'anticorps monoclonal a atteint l'équilibre en moins d'une heure. La même épreuve conduite avec l'anticorps polyclonal n'a pas atteint l'équilibre avant 4 heures. De même, dans le cas d'épreuves simultanées, l'épreuve utilisant un anticorps monoclonal a atteint l'équilibre en 8 heures tandis que l'épreuve utilisant un anticorps polyclonal n'a pas atteint l'équilibre en 24 heures. Par conséquent, la présente invention offre des épreuves simultanées et inverses sensiblement plus rapide et plus sensibles que les procédés de l'art antérieur et elle élimine le problème de compétition de la formation d'un complexe soluble "sandwich" avec la formation du complexe insoluble désiré.

TABLEAU I

Résultats des épreuves utilisant un anticorps polyclonal

Durée d'incubation (h)	Epreuve simultanée		Epreuve inverse		Epreuve directe		Epreuve directe rapide	
	Echantillons témoins	Echantillons d'IgE	Echantillons témoins	Echantillons d'IgE	Echantillons témoins	Echantillons d'IgE	Echantillons témoins	Echantillons d'IgE
0,25	372,314	2705,2667	302,243	2568,2581	357,326	2092,2077	396,293	2271,2238
0,50	348,265	2391,2366	284,262	2958,2999	288,233	1905,1817	---,---	----,----
1,00	315,277	2793,2708	305,277	3154,3218	355,424	2157,2255	304,284	1789,1706
2,00	342,356	2897,2887	290,274	3377,3212	302,314	1946,2019	288,312	1728,1867
4,00	421,385	3696,3746	28,280	3413,3651	274,255	2019,2392	283,292	1720,1683
6,00	447,436	4028,4101	296,281	3762,3643	241,267	1750,1452	301,257	1283,1424
24,00	526,577	4564,4628	233,263	3651,3546	320,277	1553,1604	273,256	1450,1470

2487983

TABLEAU II

Résultats des épreuves utilisant un anticorps monoclonal

Durée d'incubation (h)	Epreuve simultanée		Epreuve inverse		Epreuve directe		Epreuve directe rapide	
	Echantillons témoins	Echantillons d'IgE	Echantillons témoins	Echantillons d'IgE	Echantillons témoins	Echantillons d'IgE	Echantillons témoins	Echantillons d'IgE
0,25	135,132	5610,5803	388,594	8407,8358	210,205	4618,4894	194,183	4859,4906
0,50	558,459	7472,7115	240,231	8238,8271	223,228	4897,5273	198,197	5024,5152
1,00	268,265	6289,6529	325,265	8010,8377	230,187	3453,4308	215,192	4887,4901
2,00	282,275	6787,6784	255,305	7856,7644	226,197	4834,4268	192,210	4937,4944
4,00	308,272	8150,8155	343,305	8017,7788	231,216	5269,4420	218,187	4929,5071
6,00	549,667	8884,9494	698,850	7870,7358	226,361	2006,3631	405,243	3033,3713
25,55	426,420	8669,9044	497,323	7037,7359	194,201	2465,2586	246,233	3945,2943

2487983

Les commentaires ci-dessus ont été axés sur des épreuves à double site ou sandwich dans lesquelles l'un des anticorps est insolubilisé tandis que l'autre est soluble dans le milieu analysé. D'autres variantes sont possibles. Une variante appréciée utilise des anticorps liés à des particules telles que des particules de latex, d'une manière ayant pour résultat que chaque particule porte plusieurs anticorps. Lorsqu'une quantité de particules auxquelles un premier anticorps monoclonal est lié est mélangée par exemple avec une quantité de particules auxquelles un second anticorps monoclonal est lié, il se forme une suspension laiteuse. Toutefois, si un échantillon contenant un antigène polyvalent duquel les anticorps sont spécifiques est introduit dans la suspension, il se produit une agglomération ou une agglutination des particules avec formation d'amas particulaires aisément détectables.

La détection visuelle d'une agglutination peut être utilisée dans un test de recherche de l'antigène. Cette détection peut être favorisée par la coloration des particules portant un anticorps monoclonal différemment des particules portant l'autre. Toutefois, le degré d'agglutination peut aussi être déterminé comme mesure de la quantité d'antigène présente dans l'échantillon. Par exemple, on peut mesurer la variation de turbidité en utilisant des techniques normales telles que la néphélométrie.

On apprécie conformément à l'invention l'utilisation de particules de latex auxquelles l'anticorps est lié par covalence selon des techniques bien connues de l'homme de l'art. Toutefois, on peut utiliser d'autres supports en particules. Parmi ces supports, on peut mentionner la silice, le verre, des cellules, des polyacrylamides, le polyméthacrylate de méthyle et l'agarose. Le diamètre des particules varie de préférence entre environ 0,2 et environ 10 µm. Toutefois, une détection visuelle nécessite des particules d'au moins environ 1,0 µm.

Dans une autre variante, l'un des anticorps est insolubilisé sur une perle, la paroi d'un tube à essai ou un support solide macroscopique et l'autre est lié à

de petites particules de latex ou d'une autre matière convenable. En présence d'antigène, une fixation en sandwich de l'antigène a lieu entre l'anticorps en liaison macroscopique et l'anticorps lié à la particule. En colorant par exemple les particules, on peut détecter visuellement la formation de la fixation en sandwich. Une marque fluorescente, enzymatique, radioactive ou d'une autre nature sur l'anticorps lié aux particules peut être utilisée pour des dosages quantitatifs comme dans le cas de l'utilisation d'un anticorps soluble décrit ci-dessus.

Dans une autre variante appréciée de l'épreuve à double site, au moins l'un de deux anticorps monoclonaux différents est lié à un enzyme qui catalyse une réaction impliquant une substance liée à l'autre anticorps monoclonal pour produire ou bien une substance détectable ou pour agir d'une certaine autre façon conjointement avec la substance portée sur le second anticorps de manière à permettre la détection du complexe anticorps:antigène:anticorps. La détection peut être effectuée par exemple par colorimétrie, fluorimétrie, luminescence, spectrophotométrie, etc. Il y a lieu de remarquer que lorsqu'on utilise ces techniques, aucun des anticorps ne nécessite d'être insolubilisé, ce qui simplifie grandement l'épreuve.

Dans une forme de réalisation préconisée, la substance portée par le second anticorps est également un enzyme et l'épreuve utilise la paire d'anticorps marqués par l'enzyme pour catalyser des réactions séquentielles dont l'une donne un produit que nécessite l'autre. Dans ces réactions, les deux anticorps sont choisis de manière que lorsqu'ils se fixent à l'antigène, ils soient disposés stériquement de manière que le produit de la première réaction enzymatique soit engendré assez près du second anticorps marqué par l'enzyme pour que la seconde réaction ait lieu avant qu'une diffusion importante du produit de la première réaction dans le milieu environnant se soit manifestée.

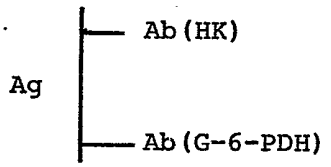
Ce processus peut être illustré par l'utilisation d'une paire d'anticorps monoclonaux dont l'un est marqué

par l'hexokinase (HK), l'autre par la glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G-6-PDH) dans la série de réactions suivante :

(1) triphosphate d'adénosine (ATP) + glucose $\xrightarrow{HK}$ diphosphate d'adénosine (ADP) + glucose-6-phosphate

(2) glucose-6-phosphate + nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD^+) $\xrightarrow{G\text{-}6\text{-}PDH}$ gluconolactone-6-phosphate + dihydronicotinamide-adénine-dinucléotide (NADH)

On conduit l'épreuve en ajoutant à l'échantillon contenant l'antigène présumé les anticorps marqués relatifs à l'antigène, de l'ATP, du glucose et le co-enzyme NAD^+. En présence de l'antigène, un complexe illustré ci-dessous est formé :



L'anticorps marqué par HK catalyse la formation de glucose-6-phosphate à proximité de l'anticorps marqué à la G-6-PDH, où il est transformé en gluconolactone-6-phosphate. Le NADH formé dans cette réaction par réduction de NAD^+ peut être détecté par spectrophotométrie à cause de la forte absorption à 340 nm caractéristique d'un dihydronicotinamide.

La même transformation du glucose en gluconolactone-6-phosphate avec formation de NADH peut aussi avoir lieu dans le milieu lui-même, catalysé par les anticorps marqués non complexés, mais bien plus lentement que lorsque les deux anticorps sont disposés à proximité l'un de l'autre dans le complexe anticorps:antigène:anticorps. En conséquence, un accroissement de l'absorption à 340 nm comparativement à un échantillon témoin confirme la présence d'antigène

dans l'échantillon. L'accroissement de l'absorption peut aussi être mise en corrélation avec la quantité d'antigène dans le complexe.

Toute autre paire de réactions successives convenables catalysées par un enzyme peut être utilisée dans une épreuve à double site avec des anticorps convenablement marqués, relatifs à un antigène présumé. Parmi ces réactions, on peut mentionner la réaction du glucose catalysé par la glucose-oxydase avec formation de gluconolactone et de peroxyde d'hydrogène, suivie de la réaction du peroxyde d'hydrogène avec la o-phényldiamine catalysée par une peroxydase pour produire un groupement coloré. Dans cette épreuve, l'un des anticorps monoclonaux est marqué à la glucose-oxydase et l'autre est marqué à la peroxydase. L'intensité de la couleur produite comparée à un témoin peut être mise en corrélation avec la présence et/ou la quantité d'antigène dans l'échantillon analysé. Il y a lieu de remarquer que d'autres substances oxydables en un groupement coloré en présence d'un enzyme peuvent être substituées à la o-phénylènediamine.

Une autre paire convenable de réactions séquentielles utilisant une paire d'anticorps relatifs à un antigène désiré, marqués respectivement par la NAD-oxydoréductase et la luciférase, est indiquée ci-après :

$$\text{(1)}\quad \text{NADH} + \underset{\text{(FMN)}}{\text{riboflavine-5'-phosphate}} \xrightarrow{\text{NAD-oxydo-réductase}} \text{FMNH}_2 + \text{NAD}^+$$

$$\text{(2)}\quad \text{FMNH}_2 + \text{RCHO} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{luciférase}} \text{FMN}^* + \text{RCOOH} + \text{H}_2\text{O}$$

RCHO est normalement un aldéhyde à chaîne droite ayant 10 ou plus de 10 atomes de carbone.

La production de FMN^*, état excité de FMN, est suivie de l'émission d'un photon qui peut être détecté par photométrie en vue de la corrélation avec un échantillon témoin pour indiquer la présence et /ou la quantité d'antigène dans un échantillon en cours d'analyse.

Dans une autre forme de réalisation utilisant une paire d'anticorps marqués avec des enzymes, le produit de la première réaction à catalyse enzymatique peut être un activateur ou un inhibiteur allostérique de la réaction subséquente catalysée par l'enzyme. Un activateur allostérique, au lieu d'être consommé dans la seconde réaction, agit conjointement avec l'enzyme pour accroître son affinité pour un substrat ou pour élever la vitesse de transformation du substrat en produit après la formation du complexe enzyme-substrat. Des inhibiteurs allostériques ont en revanche l'effet opposé et réduisent l'affinité de l'enzyme pour un substrat ou réduisent la vitesse de transformation du substrat en produit. L'inhibition allostérique peut aussi être du type compétitif ou non compétitif.

Un exemple d'épreuve impliquant une activation allostérique utilisant une paire d'anticorps marqués respectivement par la phosphofructokinase et le phospho-énolpyruvate, utilise les schémas réactionnels suivants :

(1) fructose-6-phosphate + ATP $\xrightarrow{\text{phosphofructokinase}}$ fructose-1,6-diphosphate + ADP

(2) HCO_3^- + phospho-énolpyruvate (PEP) $\xrightarrow{\text{phospho-énolpyruvate-carboxylase}}$ oxaloacétate (OAA)

(3) OAA + NADH $\xrightarrow{\text{malate-déshydrogénase}}$ malate + NAD^+

Le fructose-1,6-diphosphate formé dans la réaction (1) effectue une interaction allostérique avec la phospho-énolpyruvate-carboxylase et active sa catalyse de la réaction (2), à savoir la formation d'oxaloacétate à partir de PEP. La réaction (3) s'effectue dans le milieu environnant, c'est-à-dire qu'il n'est pas nécessaire de lier la malate-déshydrogénase à un troisième anticorps monoclonal. La présence et/ou la quantité d'antigène

présumé sont déterminées par la mise en corrélation de la réduction d'absorption à 340 nm par NADH qui est oxydé dans la réaction (3) en NAD^+.

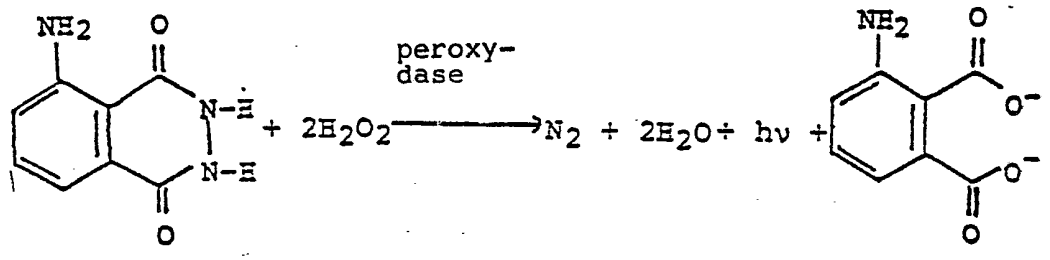
Un exemple d'épreuve impliquant une inhibition allostérique utilisant une paire d'anticorps marqués respectivement par l'aspartate-amino-transférase (AST) et la phospho-énolpyruvate-carboxylase, est donné par le schéma réactionnel ci-après :

$$(1)\quad \text{oxaloacétate} + \text{glutamate} \xrightarrow{\text{AST}} \text{aspartate} + \alpha\text{-cétoglutarate}$$

$$(2)\quad \text{PEP} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{phospho-énolpyruvate-carboxylase}} \text{OAA} + NAD^+$$

La formation d'aspartate dans la réaction (1) inhibe la seconde réaction par interaction allostérique avec la phospho-énolpyruvate-carboxylase. Cela réduit la vitesse à laquelle NADH est oxydé en NAD^+. Par conséquent, la réduction de l'absorption à 340 nm présentée par NADH peut être mise en corrélation avec la présence et/ou la quantité d'antigène dans l'échantillon analysé, une réduction plus faible que celle qui se manifeste avec un échantillon témoin indiquant la présence d'un antigène.

L'homme de l'art comprendra que de nombreuses autres paires réactionnelles impliquant une activation ou une inhibition de la seconde réaction catalysée par un enzyme peuvent être substituées aux exemples donnés ci-dessus en vue de leur utilisation dans une épreuve à double site. Dans une autre forme de réalisation, une seule des paires d'anticorps est marquée avec un enzyme, la seconde étant marquée avec une substance, par exemple, qui subit une réaction catalysée par l'enzyme pour donner un second produit qui peut être analysé qualitativement et/ou quantitativement par colorimétrie, fluorimétrie, luminescence, spectrophotométrie ou par une autre technique. Un exemple de ce genre utilise une paire d'anticorps monoclonaux dont l'un est marqué par une peroxydase et l'autre par le luminol, et tire profit de la réaction suivante :



luminol

Le photon ($h\nu$) émis par la réaction peut être détecté par des techniques photométriques et mis en rapport avec la présence et/ou la quantité d'un antigène dans un échantillon analysé.

Dans une autre variante appréciée de l'épreuve à double site, les deux anticorps monoclonaux sont conjugués respectivement avec un chromophore fluorescent et un chromophore extincteur qui absorbe de la lumière à la longueur d'onde émise par la substance fluorescente. Les deux anticorps sont choisis de manière que lorsqu'ils se combinent avec l'antigène duquel il sont spécifiques, les deux chromophores soient disposés suffisamment près pour permettre à la lumière émise par le chromophore fluorescent d'être absorbée par l'autre chromophore. D'ordinaire, cela les situe à environ 10,0 nanomètres l'un de l'autre et de préférence à environ 5,0 nanomètres l'un de l'autre. Le choix d'anticorps convenables peut être effectué par une méthode de sélection dans laquelle un mélange d'anticorps monoclonaux marqués par un chromophore fluorescent et un chromophore extincteur sont mis en contact avec un échantillon contenant une quantité connue d'antigène. Une réduction de fluorescence prouve que les deux chromophores sont disposés suffisamment près l'un de l'autre.

Lorsqu'on utilise une extinction de fluorescence, il est inutile d'insolubiliser l'un ou l'autre des deux anticorps. Des mesures quantitatives peuvent être effectuées par simple détermination de la réduction de fluorescence

maximale, c'est-à-dire la quantité de fluorescence présentée par un échantillon témoin dépourvu de tout antigène; ou par comparaison de la fluorescence de l'échantillon avec celle d'échantillons témoins contenant une quantité connue d'antigène. Toutefois, des paires de chromophores d'extinction de fluorescence peuvent aussi être utilisées conjointement avec la technique d'agglutination de particules et dans la technique selon laquelle l'un des anticorps est insolubilisé par liaison à un support solide tel que la paroi d'un tube à essai ou une perle, attendu que l'appariement des chromophores extincteurs de fluorescence a lieu. Une réduction de fluorescence est là encore en rapport avec la présence ou la quantité d'antigène dans l'échantillon.

Des chromophores fluorescents et extincteurs convenables et des techniques permettant de les mettre en conjugaison avec des anticorps sont décrits dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 4 174 384. Conformément à l'invention, on préconise d'utiliser la fluorescéine et la rhodamine comme chromophores fluorescent et extincteur respectifs.

Dans les commentaires présentés ci-dessus conformément à l'invention, on a décrit des techniques d'exctinction de fluorescence dans lesquelles des paires d'anticorps portant les chromophores nécessaires sont liées à un antigène éventuellement présent dans l'échantillon en cours d'analyse, selon une disposition stérique qui permet au chromophore extincteur d'absorber de la lumière émise par le chromophore fluorescent. Des dosages quantitatifs de l'antigène présent sont effectués par mesure de la réduction de la fluorescence maximale.

Ces techniques conviennent bien à la détection de la présence d'un antigène dans un échantillon dans une large plage de concentrations. Toutefois, les faibles réductions de fluorescence qui sont liées à une faible concentration de l'antigène sont difficiles à détecter et à mesurer avec précision. En revanche, de faibles élévations de la fluorescence sont relativement faciles à détecter et à mesurer précisément. Par conséquent, selon

un autre aspect de la présente invention, il est préférable d'exploiter l'inhibition de l'extinction et de mesurer l'élévation de fluorescence.

Pour opérer de la sorte dans une épreuve portant sur un antigène particulier, les quantités de l'antigène et de l'anticorps monoclonal relatifs à l'antigène sont marquées individuellement avec l'un ou l'autre de deux chromophores fluorescent et extincteur formant une paire. L'antigène et l'anticorps marqués par le chlorofore sont ensuite combinés pour former un complexe dans lequel le chromophore fluorescent est disposé de manière que la lumière qu'il émet soit absorbée par le chromophore extincteur. Pour ce faire, l'antigène peut être marqué avec le chromophore fluorescent et l'anticorps avec le chromophore extincteur, ou vice versa.

Un échantillon que l'on suspecte de contenir l'antigène recherché est ensuite mis en contact avec l'antigène et l'anticorps marqué par le chromophore. Après une période convenable d'incubation, on mesure la fluorescence. Si l'antigène est présent dans l'échantillon analysé, il inhibè, au moins en partie, la formation d'un complexe entre l'antigène marqué par le chromophore et l'anticorps en formant lui-même un complexe avec l'anticorps monoclonal. Dans la mesure où cela se produit, le chromophore fluorescent n'est plus disposé de telle manière que la lumière qu'il émet soit absorbée par le chromophore extincteur. Il en résulte une élévation de la fluorescence. L'élévation de fluorescence peut être mesurée et rapportée à la concentration de l'antigène dans l'échantillon subissant l'analyse par comparaison avec la fluorescence présentée par des échantillons témoins dépourvus d'antigène ou contenant des quantités connues d'antigène.

Il ressort de ce qui précède que le complexe antigène:anticorps marqué par un chromophore peut être un complexe soluble. Toutefois, il est préférable conformément à l'invention d'utiliser un antigène marqué par un chromophore et un anticorps monoclonal qui sont liés à des particules de latex ou d'autres particules convenables,

par exemple celles qui sont mentionnées ci-dessus, d'un diamètre apte à produire des agglutinations lorsque le complexe est formé. Des particules dont le diamètre varie d'environ 0,2 à environ 10 µm conviennent ordinairement à cette fin. Lorsqu'un échantillon inconnu contenant l'antigène recherché est mis en contact avec des particules d'anticorps et d'antigène qui s'agglutinent, une inhibition de l'agglutination a lieu parce que l'antigène de l'échantillon se combine avec l'anticorps lié aux particules. Attendu qu'une extinction ne peut plus avoir lieu, il en résulte une augmentation de fluorescence qui peut être détectée et mesurée afin d'être mise en corrélation avec la quantité d'antigène dans l'échantillon par comparaison avec la fluorescence observée pour un échantillon contenant une quantité connue d'antigène.

Il est également possible, conformément à l'invention, d'utiliser un antigène lié et un anticorps monoclonal lié à des particules dans une épreuve qui mesure directement l'inhibition de l'agglutination. Dans cette technique, l'antigène et l'anticorps ne sont marqués ni l'un ni l'autre. Lorsqu'un échantillon contenant l'antigène est mis en contact avec les particules, une inhibition de l'agglutination pendant la période d'incubation a lieu. Il en résulte une réduction au moins partielle de l'agglutination. On détecte l'inhibition par néphélométrie ou par d'autres techniques de mesure de la turbidité. La réduction de turbidité peut être mise en corrélation avec la quantité d'antigène dans l'échantillon.

La description de l'invention donnée ci-dessus et les exemples illustrant l'application de l'invention à des épreuves portant sur l'IgE ne sont que des illustrations des diverses modalités d'utilisation de l'invention. Il va de soi que de nombreuses autres variantes de l'invention sont possibles sans sortir de son cadre.

REVENDICATIONS

1. Procédé perfectionné d'analyse immunométrique pour détecter la présence ou déterminer la concentration d'une substance antigénique dans un échantillon liquide, comprenant la formation de complexes ternaires de la substance antigénique, d'un premier anticorps et d'un second anticorps lié à l'antigène en un site différent de celui du premier anticorps par contact de l'échantillon avec lesdits premier et second anticorps, caractérisé en ce que le perfectionnement consiste à utiliser un anticorps monoclonal pour chacun des premier et second anticorps.

2. Procédé suivant la revendication 1 caractérisé en ce qu'un chromophore fluorescent est lié audit premier anticorps et un chromophore capable d'absorber la lumière à la longueur d'onde émise par le chromophore fluorescent est lié audit second anticorps, et en ce que l'échantillon est mis en contact avec une solution contenant le premier et le second anticorps pour former le complexe ternaire et l'intensité de fluorescence est déterminée et comparée à la fluorescence d'un échantillon de référence dépourvu dudit antigène ou contenant ledit antigène en une quantité connue.

3. Procédé suivant la revendication 2, caractérisé en ce que l'un des premier et second anticorps est lié à un support solide qui est insoluble dans l'échantillon liquide et l'autre anticorps est soluble dans l'échantillon liquide.

4. Procédé suivant la revendication 3, caractérisé en ce que l'échantillon liquide est simultanément mis en contact avec les premier et second anticorps pour former un complexe ternaire insoluble, et l'intensité de fluorescence du complexe ternaire est déterminée et comparée à la fluorescence d'un échantillon de référence dépourvu dudit antigène ou contenant ledit antigène en une quantité connue.

5. Procédé suivant la revendication 3, caractérisé en ce que l'échantillon est d'abord mis en contact avec l'un des premier et second anticorps pour former un

complexe binaire anticorps:antigène, puis mis en contact avec l'autre anticorps pour former le complexe ternaire, et l'intensité de la fluorescence du complexe ou du liquide est déterminée et comparée à un échantillon de référence dépourvu dudit antigène ou contenant l'antigène en une quantité connue.

6. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le premier anticorps est lié à des particules insolubles dans l'échantillon liquide et l'échantillon est mis en contact avec une suspension des particules pendant une période suffisante pour provoquer la formation dudit complexe ternaire de manière que l'agglutination des particules liées aux premier et second anticorps ait lieu.

7. Procédé suivant la revendication 6, caractérisé en ce que le diamètre des particules se situe dans la plage d'environ 0,2 à environ 10 µm.

8. Procédé suivant la revendication 7, caractérisé en ce que les particules sont choisies dans le groupe comprenant des particules de latex, de silice, de verre, des cellules, un polyacrylamide, un polyméthacrylate de méthyle et l'agarose.

9. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 6, 7 et 8, caractérisé en ce que les particules liant le premier anticorps sont d'une couleur différente de celle des particules liant le second anticorps.

10. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 6 à 9, caractérisé en ce que le diamètre des particules se situe dans la plage d'environ 1,0 à 10 µm.

11. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 6, 7, 8 et 10, caractérisé en ce que la turbidité de l'échantillon après la formation du complexe ternaire est déterminée et mise en relation avec la turbidité d'un échantillon témoin dont on sait qu'il est dépourvu de l'antigène ou qu'il contient une quantité connue de l'antigène.

12. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 6, 7, 8 et 10, caractérisé en ce qu'un chromophore fluorescent est lié au premier anticorps et un chromophore

capable d'absorber de la lumière à la longueur d'onde émise par le chromophore fluorescent est lié au second anticorps et, après ledit contact, l'intensité de la fluorescence est déterminée et comparée à la fluorescence d'un échantillon de référence dépourvu dudit antigène ou contenant celui-ci en une quantité connue.

13. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 2 à 5 et 12, caractérisé en ce que le chromophore fluorescent est la fluorescéine et le chromophore capable d'absorber de la lumière émise est la rhodamine.

14. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'un enzyme est lié au premier anticorps et une substance est liée au second anticorps de manière que l'enzyme agisse conjointement avec la substance pour permettre la détection du complexe anticorps:antigène:anticorps.

15. Procédé suivant la revendication 14, caractérisé en ce que la substance liée au second anticorps est un enzyme.

16. Procédé suivant la revendication 15, caractérisé en ce que l'enzyme lié au premier anticorps catalyse une réaction qui donne un produit désiré par une réaction catalysée par l'enzyme lié au second anticorps .

17. Procédé suivant la revendication 16, caractérisé en ce que le produit de la réaction catalysée par le premier enzyme lié est consommé dans la réaction catalysée par le second enzyme lié.

18. Procédé suivant la revendication 16, caractérisé en ce que le produit de la réaction catalysée par le premier enzyme lié est capable d'une interaction allostérique avec le second enzyme lié.

19. Procédé suivant la revendication 18, caractérisé en ce que le produit de la réaction catalysée par le premier enzyme lié active de façon allostérique ou inhibe de façon allostérique le second enzyme lié.

20. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 16 à 19, caractérisé en ce que la réaction catalysée par l'enzyme lié au second anticorps donne un produit pouvant être détecté.

21. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 16 à 19, caractérisé en ce que la réaction catalysée par l'enzyme lié au second anticorps consomme une substance pouvant être détectée.

22. Procédé suivant l'une des revendications 20 et 21, caractérisé en ce que la formation ou la consommation de la substance dont la détection est possible est détectée par colorimétrie, fluorimétrie, luminescence ou spectrophotométrie.

23. Procédé suivant la revendication 14, caractérisé en ce que la substance portée par le second anticorps subit une réaction catalysée par l'enzyme lié au premier anticorps.

24. Procédé suivant la revendication 23, caractérisé en ce que la réaction produit une substance pouvant être détectée par colorimétrie, fluorimétrie, luminescence ou spectrophotométrie.

25. Procédé de détection de la présence ou de détermination de la concentration d'une substance antigénique dans un liquide, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

(a) mise en contact d'un échantillon du liquide avec une quantité connue d'une substance antigénique ajoutée et d'un anticorps monoclonal relatif à la substance antigénique, et

(b) mesure de l'inhibition de la formation d'un complexe entre l'anticorps et la substance antigénique ajoutée par combinaison dudit anticorps monoclonal et de la substance antigénique dans le liquide pour former un second complexe.

26. Procédé suivant la revendication 25, caractérisé en ce qu'un chromophore fluorescent est lié à la substance antigénique ajoutée et un chromophore capable d'absorber de la lumière à la longueur d'onde émise par le chromophore fluorescent est lié à l'anticorps monoclonal et, après la mise en contact, l'intensité de la fluorescence est déterminée et comparée à la fluorescence d'un échantillon normal dépourvu de ladite substance

antigénique ou contenant cette substance en une quantité connue.

27. Procédé suivant la revendication 25, caractérisé en ce qu'un chromophore fluorescent est lié à l'anticorps monoclonal et un chromophore capable d'absorber de la lumière à la longueur d'onde émise par le chromophore fluorescent est lié à la substance antigénique ajoutée et, après la mise en contact, l'intensité de la fluorescence est déterminée et comparée à la fluorescence d'un échantillon normal dépourvu de ladite substance antigénique ou contenant cette substance en une quantité connue.

28. Procédé suivant l'une des revendications 26 et 27, caractérisé en ce que le chromophore fluorescent est la fluorescéine et le chromophore capable d'absorber de la lumière émise est la rhodamine.

29. Procédé suivant l'une des revendications 26 et 27, caractérisé en ce que l'anticorps monoclonal et la substance antigénique ajoutée sont liés à des particules et le premier complexe comprend une agglutination des particules liant l'anticorps monoclonal et les particules liant la substance antigénique.

30. Procédé suivant la revendication 29, caractérisé en ce que les particules sont choisies entre des particules formées de latex, de silice, de verre, de cellules, d'un polyacrylamide, d'un polyméthacrylate de méthyle et d'agarose.

31. Procédé suivant la revendication 25, caractérisé en ce que l'anticorps monoclonal et la substance antigénique ajoutée sont liés à des particules et le premier complexe comprend une agglutination des particules liant la substance antigénique ajoutée et, après ledit contact, la turbidité de l'échantillon est déterminée et comparée à la turbidité d'un échantillon de référence dépourvu de ladite substance antigénique ou contenant ladite substance antigénique en une quantité connue.

32. Procédé suivant la revendication 31, caractérisé en ce que les particules sont choisies entre des

particules formées de latex, de silice, de verre, de cellules, d'un polyacrylamide, d'un polyméthacrylate de méthyle et d'agarose.

33. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 29 à 32, caractérisé en ce que la plage des diamètres de particules va d'environ 0,2 à environ 10 µm.

34. Procédé suivant la revendication 1 pour la détection de la présence ou la détermination de la concentration d'une substance antigénique dans un liquide, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

(a) mise en contact d'un échantillon du liquide avec un premier anticorps monoclonal soluble relatif à la substance antigénique en vue de former un complexe soluble de l'anticorps et de la substance antigénique présente dans ledit échantillon, ledit anticorps monoclonal étant marqué ;

(b) mise en contact du complexe soluble avec un second anticorps monoclonal lié à un support solide, ledit support solide étant insoluble dans ledit liquide, en vue de former un complexe insoluble dudit premier anticorps monoclonal, ladite substance antigénique et ledit second anticorps monoclonal étant liés audit support solide ;

(c) séparation du support solide de l'échantillon liquide et de l'anticorps marqué n'ayant pas réagi ;

(d) mesure de la quantité de l'anticorps marqué associé au support solide ou de la quantité de l'anticorps marqué n'ayant pas réagi ; et

(e) mise en relation de la quantité d'anticorps marqué mesurée avec la quantité d'anticorps marqué mesurée pour un échantillon témoin préparé conformément aux étapes (a) à (d), ledit échantillon témoin étant dépourvu de ladite substance antigénique, pour déterminer la présence de substance antigénique dans ledit échantillon liquide, ou mise en relation de la quantité d'anticorps marqué mesuré avec la quantité d'anticorps marqué mesuré pour des échantillons contenant des quantités connues de substance antigénique préparés conformément aux étapes (a) à (d) pour déterminer la concentration en substance

antigénique dans ledit échantillon liquide.

35. Procédé suivant la revendication 1 pour la détection de la présence d'une substance antigénique dans un liquide, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

(a) mise en contact simultanément d'un échantillon du liquide avec un premier et un second anticorps monoclonals relatifs à la substance antigénique, ledit premier anticorps monoclonal étant marqué et ledit second anticorps monoclonal étant lié à un support solide insoluble dans ledit liquide, en vue de former un complexe insoluble du premier anticorps monoclonal, de la substance antigénique et du second anticorps monoclonal ;

(b) séparation du support solide de l'échantillon liquide et de l'anticorps marqué n'ayant pas réagi ;

(c) mesure de la quantité d'anticorps marqué associé au support solide ou de la quantité d'anticorps marqué n'ayant pas réagi ; et

(d) mise en relation de la quantité d'anticorps marqué mesurée avec la quantité d'anticorps marqué mesurée pour un échantillon témoin préparé conformément aux étapes (a) à (c), ledit échantillon témoin étant dépourvu de ladite substance antigénique, pour déterminer la présence de substance antigénique dans ledit échantillon liquide, ou mise en relation de la quantité d'anticorps marqué mesurée avec la quantité d'anticorps marqué mesurée pour des échantillons contenant des quantités connues de substance antigénique préparés conformément aux étapes (a) à (c) en vue de déterminer la concentration en substance antigénique dans l'échantillon liquide.

36. Epreuve immunométrique perfectionnée suivant la revendication 1 pour détecter la présence ou déterminer la concentration d'une substance antigénique dans un échantillon d'un liquide, comprenant la formation d'un complexe ternaire d'un premier anticorps marqué, de ladite substance antigénique et d'un second anticorps, ledit second anticorps étant lié à un support solide insoluble dans ledit liquide, caractérisée en ce que le perfectionnement

consiste à utiliser un anticorps monoclonal pour l'anticorps marqué et pour l'anticorps lié à un support solide.

37. Procédé suivant la revendication 36, caractérisé en ce que l'échantillon liquide est mis en contact tout d'abord avec le second anticorps pour former un complexe binaire de la substance antigénique et du second anticorps insoluble dans le liquide, puis mis en contact avec le premier anticorps marqué pour former le complexe ternaire.

38. Procédé suivant la revendication 36, caractérisé en ce que l'échantillon liquide est tout d'abord mis en contact avec le second anticorps pour former un complexe binaire de la substance antigénique et du second anticorps insoluble dans le liquide ; l'échantillon est séparé du support solide et le support solide est mis en contact avec une solution dudit premier anticorps marqué pour former ledit complexe ternaire.

39. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 34 à 38, caractérisé en ce que le premier anticorps monoclonal est le produit d'une lignée cellulaire différente de celle dont provient le second anticorps monoclonal.

40. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 34 à 38, caractérisé en ce que ledit antigène présente au moins deux sites identiques de liaison et les premier et second anticorps monoclonaux sont le produit de la même lignée cellulaire.

41. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 34 à 40, caractérisé en ce que les premier et second anticorps sont choisis de manière qu'ils aient une affinité pour ledit antigène d'au moins environ 10^8 litres/mole.

42. Procédé suivant la revendication 41, caractérisé en ce que l'affinité est d'au moins environ 10^9 litres/mole.

43. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 34 à 40, caractérisé en ce que le support solide est lavé pour séparer l'échantillon liquide du support.

44. Procédé suivant la revendication 43, caractérisé en ce que le support solide est lavé avec une solution physiologique de sel tamponné au phosphate.

45. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 34 à 40, caractérisé en ce que l'antigène est choisi dans le groupe comprenant l'IgE, l'hépatite A, l'hépatite B, l'hépatite non-A, l'hépatite Non-B, l'alphafoetoprotéine, l'antigène carcinoembryonnaire, l'insuline et la thyrotrophine humaine.

46. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 34 à 40, caractérisé en ce que la marque de l'anticorps marqué est choisie dans le groupe comprenant un isotope radioactif, un enzyme et une matière fluorogénique, et l'examen est effectué au moyen d'une méthode radiométrique, fluorimétrique ou enzymatique.

47. Procédé suivant la revendication 46, caractérisé en ce que la marque est l'isotope radioactif ^{125}I.

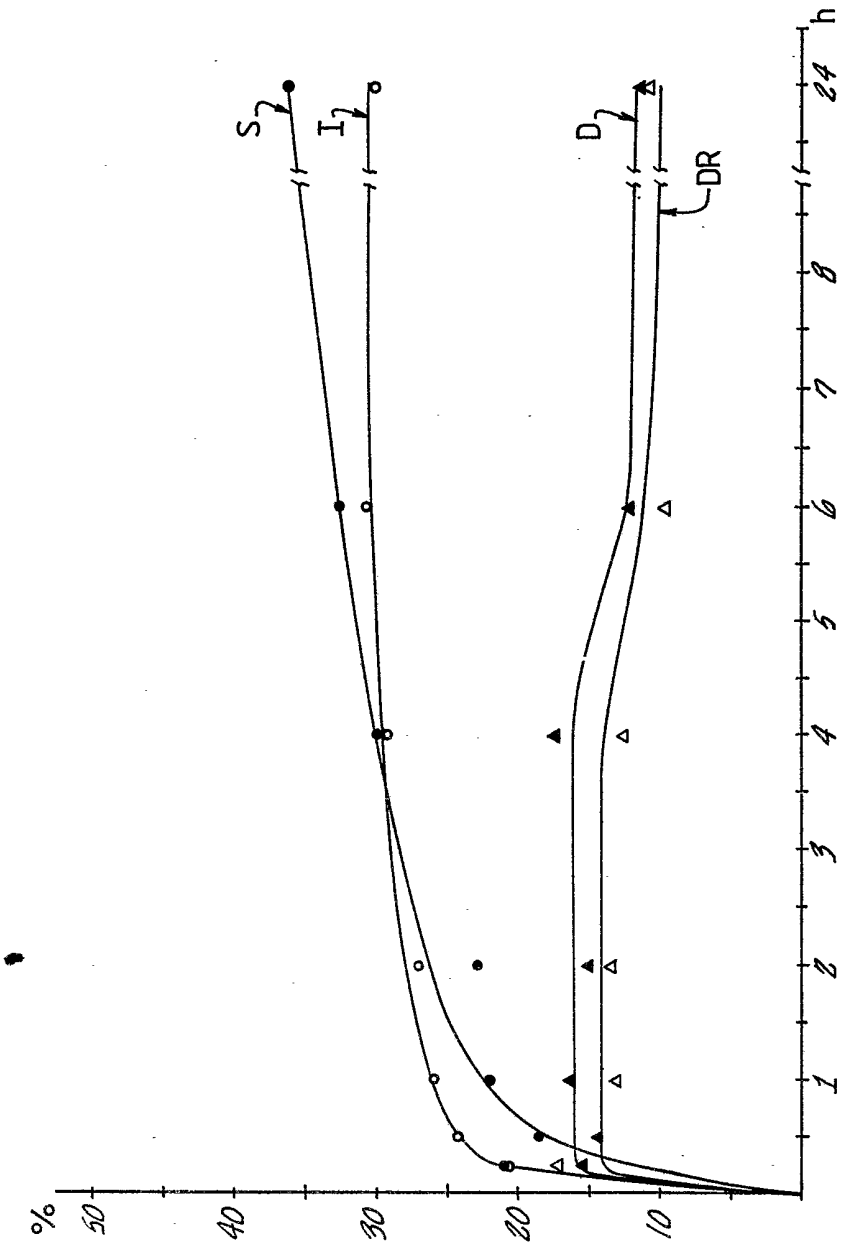


FIG 1

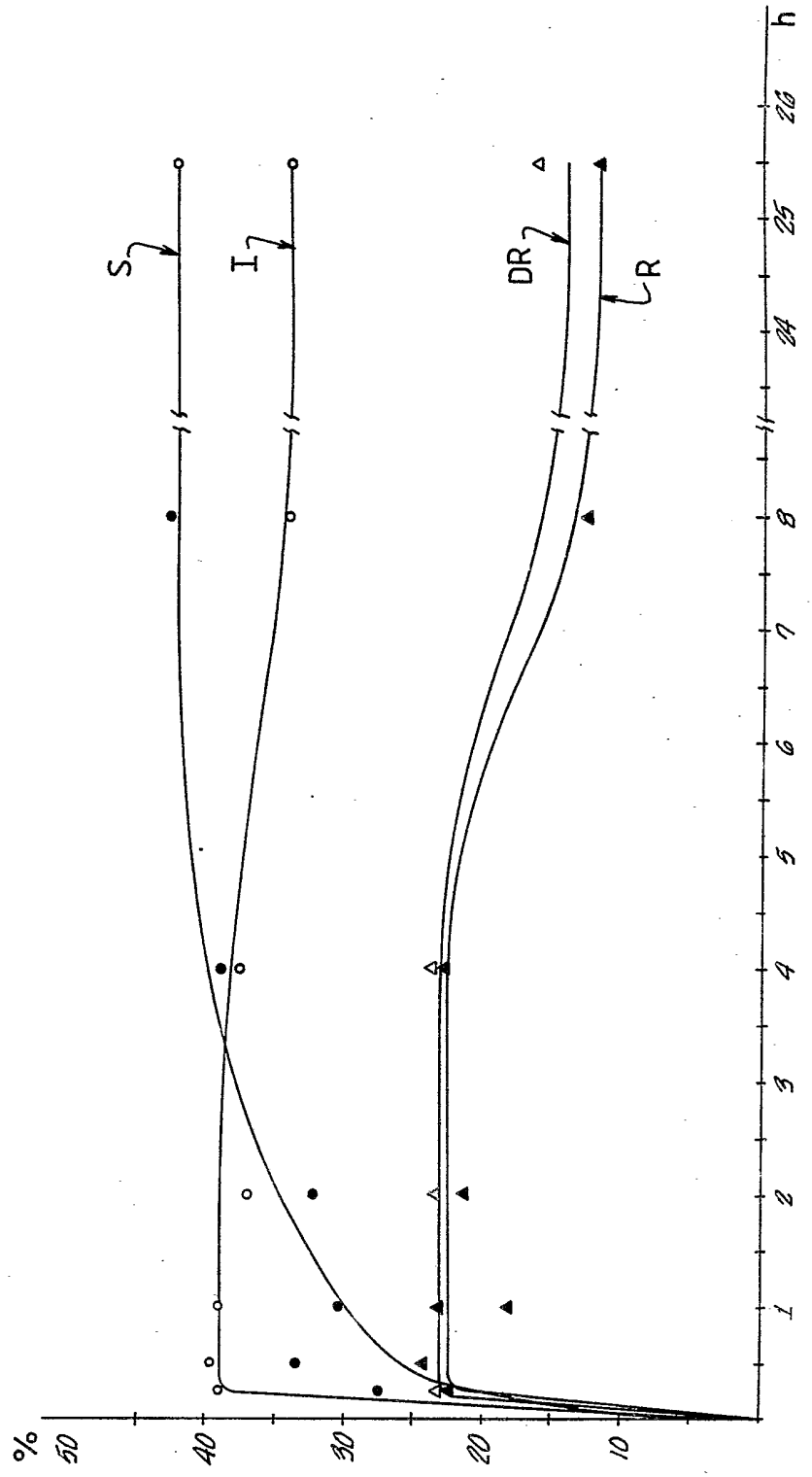


FIG. 2