



MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1006179A3

NUMERO DE DEPOT : 09200827

Classif. Internat. : C12Q G01N

Date de délivrance le : 31 Mai 1994

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l'arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

Vu le procès verbal dressé le 22 Septembre 1992 à 24H00 à l'Office de la Propriété Industrielle

ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : LAMBDATECH S.A.
Les Beyolettes, B-6953 FORRIERES(BELGIQUE)

représenté(e)(s) par : VAN MALDEREN Michel, OFFICE VAN MALDEREN, Place Reine Fabiola 6/1 - B 1080 BRUXELLES.

un brevet d'invention d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : CONJUGUE DESTINE A LA DETECTION ET/OU AU DOSAGE D'UN COMPOSE BIOLOGIQUE.

INVENTEUR(S) : Moris Philippe, chemin de la Caracole 2, B-5000 Namur (BE); Zammateo Nathalie, rue Pierre Fluche 1, B-4800 Verviers (BE); Remacle José, chemin des Pierres 14, B-5020-Malonne (BE); Rentier Bernard, rue de la Magrée 25, B-4163 Taviere (BE)

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeur(s).

Bruxelles, le 31 Mai 1994
PAR DELEGATION SPECIALE :

WUYTS L
Directeur

CONJUGUE DESTINE A LA DETECTION ET/OU AU DOSAGE D'UN COMPOSE
BIOLOGIQUE

5

Objet de l'invention

L'invention concerne un nouveau conjugué destiné à la détection et/ou au dosage d'un composé biologique, tel qu'un antigène, un anticorps ou d'une séquence d'acides
10 nucléiques. L'invention s'étend également à son procédé d'obtention, à son utilisation dans des procédés de détection et/ou de dosage et au kit de diagnostic le contenant.

Arrière-plan technologique et état de la technique à la base de l'invention

15 Beaucoup de procédés de dosages destinés aux tests diagnostiques dans les domaines de la biologie et de la médecine se basent principalement sur la reconnaissance spécifique des anticorps vis-à-vis de leurs antigènes et depuis quelques années sur l'appariement de bases nucléiques
20 (ADN ou ARN). Ces méthodes ont pris des formes diverses en fonction de la complexité des interactions mises en jeu et des moyens d'immobilisation qui sont utilisés pour fixer le ligand à doser (antigène-anticorps ou séquence nucléotidiques).

25 Les techniques de dosage de molécules marquées par un isotope radioactif sont précises et très sensibles. Le désavantage de ces méthodes repose évidemment sur les problèmes de stockage des déchets, de sécurité et de santé liés à l'utilisation des isotopes radioactifs et les
30 contraintes législatives qui en découlent.

La technique des sondes froides est basée sur l'utilisation de conjugués enzymatiques composés d'une sonde et d'un enzyme liés de manière covalente. Ces conjugués peuvent être détectés par la conversion d'un substrat de
35 l'enzyme en un produit coloré qui est alors mesuré en spectrophotométrie. C'est le cas de la peroxydase ou de la phosphatase alcaline. Bien que ce dosage permette la détection de ligands en quantités importantes, il s'est

révélé trop peu sensible dans le cas de dosages immunochimiques - lors de détection d'antigènes présents en faible quantité comme les hormones - et dans le cas d'hybridations génétiques utilisant des sondes à ADN - où les quantités à détecter sont extrêmement faibles.

La chémoluminescence se base sur l'émission de lumière à partir d'une molécule chimique qui est excitée. Cette excitation peut être réalisée à partir d'une réaction chimique ou par transfert d'énergie d'une autre molécule.

10 Dans le premier cas, la réaction est habituellement catalysée par une enzyme. Les systèmes les plus employés sont soit la peroxydase en présence de luminol et de peroxyde d'hydrogène, soit la phosphatase alcaline en présence de adamantyl 1,2-dioxétane phényl phosphate (L. Kricka, Chim. Chem. 37, 1472, 15 1481, 1991).

Ces systèmes de dosage sont sensibles mais la quantification du signal est très difficile car il est très bref. Une solution serait l'utilisation d'un lanthanide, l'euprium, qui une fois excité produit une fluorescence

20 ayant un temps d'excitation particulièrement long et donc détectable. Il a été utilisé pour la détection d'adénovirus avec un seuil de détection de 0,3 pg de DNA (Syvanen et al., Nuc. Acids Res. 14, 1017, 1986).

On peut aussi tirer profit du transfert d'énergie

25 de deux molécules : l'isiothiocyanate de fluorescéine (FITC) et l'isiothiocyanate de tetraméthyl rhodamine (TRITC). La première (FITC) est fixée sur la sonde et la seconde sur le DNA de l'échantillon. Lorsque la sonde se fixe sur l'échantillon, les deux molécules peuvent se transférer de

30 l'énergie : ainsi l'excitation de la TRITC à une longueur d'onde spécifique va être transférée à la FITC qui se trouve dans son voisinage - si l'appariement a eu lieu - et va alors émettre une fluorescence particulière. La méthode est sensible mais de nombreux paramètres doivent encore être

35 optimisés pour une utilisation courante (Davins et al., Analyt. letters 20, 1897, 1987).

Un nouveau système de dosage en chémoluminescence, commercialisé par la firme Boehringer

Mannheim, se base sur la détection de sondes à DNA marquées à la digoxigénine (Höltke H. and Kessler C. Nucleic Acids Research, 18 (19), 5843-51, 1990).

Cette molécule est reconnue par un anticorps
5 couplé à la phosphatase alcaline qui réagissant avec un substrat, provoque l'émission d'un photon détectable.

Cette méthode assez sensible, présente cependant l'inconvénient de faire intervenir une molécule toxique et d'être difficile à mettre en oeuvre.

10 La bioluminescence a pour principe l'émission naturelle de photons provoquée par l'activité enzymatique des luciférases en présence de leurs substrats. Il existe deux types de luciférase, la luciférase utilisant l'ATP comme
15 substrat et la luciférase qui utilise l'oxydation du NADH ou du NADPH comme source d'énergie. Dans ce cas, la luciférase est associée à une NAD(P)H-FMN oxydoréductase.

Ces enzymes permettent la mesure de substrats en quantité très faible (10^{-12} moles). La luciférase à ATP a un rendement quantique 10 fois plus élevé que la luciférase à
20 NAD(P)H, ce qui permet un seuil de détection des substrats 10 fois plus bas. Suivant les conditions de dosage, le signal peut être stable pendant des temps très longs.

Différents agents de couplage tels que des billes d'agarose (W087/06707), du N-succinimidyl-3 (2-
25 pyridylthiopropionate) (SDPD) (EP 0137515), ou de la glutaraldehyde (US 4.604.364) ont été proposés pour lier ces enzymes à des ligands tels que des anticorps, des antigènes et des sondes nucléiques.

Cependant, l'utilisation des luciférases comme
30 marqueurs a été limitée par l'inactivation de ces enzymes par les agents utilisés pour réaliser le couplage de ces enzymes sur les différents ligands.

Il est également connu par les demandes de brevets européens 0161-138 et 0362042 d'utiliser une glucose
35 6-phosphate deshydrogénase, fixée de manière covalente à un antigène ou anticorps, à une sonde nucléotidique ou bien à l'avidine pour la détection des sondes biotinylées. Ce complexe permet de révéler le NADH produit par la glucose 6-

phosphate déshydrogénase, la luciférase et la FMN-oxydo-réductase fixée de manière covalente sur le sépharose 4B. Cependant, la sensibilité obtenue par ce procédé est trop faible, sans doute en partie due aux phénomènes
5 d'inactivation lors des couplages des enzymes décrits précédemment.

Buts de l'invention

L'invention consiste à fournir un nouveau conjugué et un nouveau procédé de préparation de ce conjugué, destiné
10 à la détection et/ou au dosage d'un composé biologique, ledit conjugué étant constitué par un ligand susceptible de se lier de manière spécifique audit composé biologique et par un enzyme qui après son couplage avec le ligand conserve son activité enzymatique.

15 Un autre but de l'invention consiste à fournir un conjugué dont l'enzyme possède une activité spécifique, un "turn over rate" élevé et une stabilité élevée à température ambiante, dont l'enzyme soit de faible coût facilement purifiable et dont la réaction est essentiellement
20 irréversible.

Un but complémentaire de la présente invention consiste à fournir de nouvelles séquences d'acide nucléique qui ont la propriété de s'apparier à des séquences complémentaires présentes dans le génome des virus
25 responsables des papillomes génitaux humains (HPV) et qui puissent être utilisées en tant que ligand d'un conjugué selon l'invention ou être fixées à une molécule qui reconnaît un ligand d'un conjugué selon l'invention.

Éléments caractéristiques de l'invention

30 L'invention concerne un conjugué destiné à la détection et/ou au dosage d'un composé biologique, constitué par une enzyme capable de produire un composé intermédiaire utilisable par un système de bioluminescence, tel qu'une luciférase, et dont les groupements sulfures sont de
35 préférence préalablement réduits; ladite enzyme étant couplée à un ligand, préalablement activé par un agent couplant et susceptible de se lier de manière spécifique audit composé biologique.

Avantageusement, l'enzyme est une deshydrogénase ou une kinase, de préférence une pyrurate kinase.

De préférence, l'agent de couplage est le N-succinimidyl 3-2 pyridylditthio proprionate.

5 Selon une forme d'exécution préférée de l'invention, le ligand est un antigène, un récepteur d'hormone, un anticorps, une séquence nucléotidique ou un composé tel que l'avidine ou la streptavidine, capable de se fixer à une séquence nucléotidique biotinylée.

10 Un autre aspect de la présente invention, concerne des nouvelles séquences nucléotidiques d'ADN monocaténaire ou d'ARN, permettant la détection et l'identification de divers virus responsables de papillomes génitaux humains tels que le HPV-6B, le HPV-11, le HPV-16,
15 le HPV-18 et le HPV-33.

La présente invention concerne en particulier une séquence d'ADN de 25 nucléotides. La SEQ ID n°1 :

TGTGCAACAA TGTGCAGACA TTATA.

La séquence complémentaire : SEQ ID 1bis : ACACGTTGTT
20 ACACGTCTGT AATAT.

et les deux séquences d'ARN correspondantes :

SEQ ID n°2 : UGUGCAACAA UGUGCAGACA UUAUA

SEQ ID n°2bis : ACACGUUGUU ACACGUCUGU AAUAU qui permettent la détection simultanée des 5 types de HPV susmentionnés.

25 Ces quatre séquences s'hybrident à une région correspondant aux nucléotides 2047-2071 du gène E1 d'HPV6b avec deux mésappariements en position 9 et 15, à une région correspondant aux nucléotides 2047-2071 du gène E1 d'HPV11 avec deux mésappariements en position 8 et 9, à une région
30 correspondant aux nucléotides 2076-2100 du gène E1 d'HPV16 avec un mésappariement en position 15, à une région correspondant aux nucléotides 2157-2171 du gène E1 d'HPV18 avec un mésappariement en position 6 et à une région correspondant aux nucléotides 2070-2094 du gène E1 d'HPV33
35 avec trois mésappariements en position 5, 8 et 15.

Deux séquences d'ADN, de 25 nucléotides :

SEQ ID n°3 : CCAAGCTTT AGATGCGTGC CAGGA

SEQ ID n°4 : TACTACATAC ACCCCCGCAC AGACC

les séquences complémentaires :

SEQ ID n°3bis : GGTTTCGCAAA TCTACGCACG GTCCT

SEQ ID n°4bis : ATGATGTATG TGGGGGGCGTG TGTGG

et les séquences d'ARN correspondantes :

5 SEQ ID n°5 : CCAAGCGUUU AGAUGCGUGC CAGGA

SEQ ID n°6 : UACUACAUAC ACCCCCGCAC AGACC

SEQ ID n°5bis : GGUUCGCAAA UCUACGCACG GUCCU

SEQ ID n°6bis : AUGAUGUAUG UGGGGGCGUG UGUGG

permettent la détection simultanée des HPV de types 6b et 11.

10 Les séquences 3, 3bis, 5 et 5bis s'hybrident à une région correspondant aux nucléotides 2736-2760 du gène E2 des HPV6b et 11, identiques pour les deux virus.

Les séquences 4, 4bis, 6 et 6bis s'hybrident à une région correspondant aux nucléotides 3355-3379 du gène E2 des HPV6b et 11, identique pour les deux virus.

15 Une séquence d'ADN, de 21 nucléotides :

SEQ ID n°7 : ACCTTAACTG CAGATGTTAT G

la séquence complémentaire :

SEQ ID n°7bis : TGGAATTGAC GTCTACAATA C

20 et les deux séquences d'ARN correspondantes :

SEQ ID n°8 : ACCUUAACUG CAGAUGUUAU G

SEQ ID n°8bis : UGGAAUUGAC GUCUACAAUA C

permettent la détection simultanée des HPV de types 16, 18 et 33.

25 Ces séquences s'hybrident à une région correspondant aux nucléotides 6780-6800 du gène L1 d'HPV16 avec un mésappariement en position 15, à une région correspondant aux nucléotides 6759-6779 du gène L1 d'HPV18 avec un mésappariement en position 3 et à une région

30 correspondant aux nucléotides 6734-6754 du gène L1 d'HPV33 avec un mésappariement en position 15.

Une séquence d'ADN, de 25 nucléotides :

SEQ ID n°9 : ATATCAGATG ACGAGAACGA AAATG

et son complémentaire :

35 SEQ ID n°9bis : TATAGTCTAC TGCTCTTGCT TTTAC

et les deux séquences d'ARN correspondants :

séquence d'identification n°10 : AUAUCAGAUG ACGAGAACGA AAAUG

séquence d'identification n°10bis : UAUAGUCUAC UGCUCUUGCU

UUUAC

permettent la détection simultanée des HPV de types 16 et 18.

Ces séquences s'hybrident à une région correspondant aux nucléotides 931-985 du gène E1 d'HPV16 et
5 à une région correspondant aux nucléotides 1007-1031 du gène E1 d'HPV18 avec un mésappariement pour ce virus.

Ces séquences ont la propriété de s'apparier à des séquences complémentaires présentes dans le génome de divers types de papillomavirus humains (HPV) et absentes dans
10 le génome humain. Les hybrides ainsi éventuellement formés peuvent être détectés par diverses méthodes de l'état de la technique telles que hybridation in situ, hybridation sur filtre, hybridation en dot blot, Northern blot, Southern blot, par un marquage isotopique ou non isotopique associé
15 au fragment, par technique sondes froides, par amplification génétique, notamment par PCR ou LCR ou par bioluminescence.

Ces séquences mentionnées permettent l'identification spécifique des HPV les plus fréquemment rencontrés dans le tractus génital (types 6b, 11, 16, 18,
20 33). Il est connu que certains types de HPV (types 16, 18 et 33) sont plus fréquemment associés à l'apparition d'une tumeur maligne, en l'occurrence le cancer du col utérin chez la femme, alors que les autres types (6b et 11) sont caractéristiques de lésions bénignes. La détermination de la
25 présence d'un ou de plusieurs HPV ainsi que du type HPV rencontré est donc très importante pour l'établissement d'un pronostic et, par conséquent, d'une intervention thérapeutique éventuelle.

De préférence, tout ou partie des séquences
30 nucléotidiques susmentionnées sont des ligands du conjugué selon l'invention ou sont susceptibles de se fixer à un conjugué selon l'invention, pour la détection et/ou le dosage des virus responsables de papillomes génitaux humains.

Un autre aspect de l'invention, concerne le
35 procédé de préparation du conjugué selon l'invention dans lequel on fait réagir en solution l'agent de couplage au ligand et dans lequel ce ligand activé est couplé à une fonction thiol de l'enzyme dont un ou plusieurs ponts

disulfure ont été éventuellement réduits.

Avantageusement, l'enzyme du conjugué selon l'invention est immobilisé au niveau de son site actif sur une colonne d'affinité par exemple du Blue Sépharose, et est
5 couplé au ligand préalablement activé par l'agent couplant, la colonne est lavée et le conjugué est élué de la colonne en modifiant la composition de la solution de lavage, par exemple en augmentant la force ionique.

L'invention concerne également l'utilisation du
10 conjugué selon l'invention pour la détection et/ou le dosage d'un composé biologique; ainsi que la trousse de détection et/ou de dosage d'un composé biologique, comprenant le conjugué selon l'invention.

Description d'une forme d'exécution préférée de l'invention

15 Dans la présente invention, on utilise comme agent révélateur, la luciférase à ATP plutôt que la luciférase à NADH du fait de sa plus grande sensibilité de dosage des substrats. Afin d'augmenter encore la sensibilité et d'obtenir un signal important sur une longue période de
20 temps, on marque la séquence nucléotidique, l'anticorps ou l'antigène avec une kinase qui peut produire une quantité constante d'ATP suivant les conditions expérimentales. Cet ATP est ensuite dégradé par la luciférase et l'activité de cette dernière est quantifiée par la détection des photons
25 émis.

Choix d'une kinase

L'enzyme marqueur doit être choisi en fonction de différents critères qui sont semblables à ceux utilisés pour les ELISA (Avrameas, Scand. J. Immunol., 8, 7-22, 1978)
30 à savoir :

- une activité spécifique et un "turn over rate" élevés;
- une stabilité relativement bonne à température ambiante;
- une perte d'activité, suite au couplage, qui doit être la plus faible possible, et enfin,
- 35 - l'enzyme doit être disponible sous forme hautement purifiée, soit commercialement, soit sa préparation doit être relativement simple,
- de plus, l'enzyme doit être choisi en fonction de la

stabilité de ses substrats.

D'après Kayne (Kayne F.S., The Enzyme, ed. Boyer part. A, 8, 1973, Academic Press, pp. 353-382), la pyruvate kinase est commercialement disponible sous forme très pure
5 mais il est aussi très simple d'en purifier de grandes quantités à partir de muscles de lapin.

D'autre part, la réaction catalysée par la kinase est essentiellement irréversible en faveur de la formation de pyruvate et d'ATP car la variation d'énergie libre
10 standard de la réaction est de - 75 kcal/mole (Muirhead, M., Biochemical Society Transactions, 15 (5), 996-999, 1987).

Phosphoenolpyruvate + ADP -----> Pyruvate + ATP

Une solution d'enzyme à 5 µg/ml garde son activité au moins 48h à température ambiante. La solution
15 commerciale (avec 50% de glycérol) est stable au moins 6 mois à 4°C.

En outre, la pyruvate kinase présente d'autres avantages, tels que sa disponibilité commerciale, sa bonne stabilité thermique et le déplacement de la réaction dans le
20 sens de la formation de l'ATP. Cependant, d'autres kinases comme l'acétate kinase peuvent également être utilisées.

Couplage de la pyruvate kinase

L'utilisation des agents de couplage habituels (glutaraldehyde, SPDP (N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate), periodate, ...) conduit effectivement à la
25 formation de conjugués mais pour lesquels la perte d'activité est très élevée et dépasse les 95%. Ceci confirme la sensibilité des kinases et déhydrogénases aux agents de couplage et le fait que l'utilisation des méthodes de
30 couplage habituelles ne permet pas d'obtenir des conjugués suffisamment actifs pour une utilisation dans les tests diagnostiques.

Lors d'expériences contrôles, les inventeurs ont constaté avec surprise que la kinase native non activée
35 pouvait se fixer de manière covalente sur les ligands activés au SPDP (N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate). L'explication de cette observation inattendue est probablement que la kinase porte un groupement -SH libre qui

peut réaliser un pont disulfure avec le groupement 2 pyridyl-disulfure fixé sur la sonde activée. Le conjugué obtenu est tout à fait actif.

Les inventeurs ont aussi constaté que l'on peut
5 avantageusement augmenter le rendement du couplage par réduction préalable d'un ou plusieurs ponts disulfures naturels de la kinase par de faibles concentrations en dithiothréitol et cela, sans perte d'activité.

Les conditions de couplage optimisées en
10 solution sont décrites ci-après pour les anticorps. Les inventeurs ont observé qu'une activation des anticorps avec un excès molaire de 5 SPDP produisait la fixation de 1 à 2 bras SPDP par molécule d'anticorps. Cette concentration en SPDP donne un maximum de conjugués actifs lorsqu'on met en
15 présence une quantité équivalente (en mole) d'anticorps activés et de kinase.

Une autre méthode de couplage sur colonne (phase solide) qui permet d'améliorer le rendement, de faciliter la séparation entre les anticorps conjugués à la kinase et les
20 anticorps non conjugués et de pouvoir préparer une grosse quantité de conjugués, consiste à fixer par des liaisons faibles non covalentes la kinase au niveau de son site actif sur une colonne contenant du Blue Sépharose (Pharmacie, Upsala, Suède) puis de faire circuler sur la colonne en
25 circuit fermé et pendant un temps suffisant (habituellement 16h) les anticorps préalablement activés au SPDP.

Les anticorps activés auront ainsi tout le loisir de réaliser des conjugués avec la kinase immobilisée sur le Blue Sepharose.

30 Après la réaction, la colonne est lavée et les anticorps qui n'ont pas réagi sont éliminés, puis le conjugué est élué en augmentant la force ionique de la solution de lavage. Cette méthode est décrite en détail ci-après pour les anticorps et pour l'avidine.

35 La disponibilité de conjugués actifs permet leur utilisation pour des tests diagnostiques basés soit sur des réactions immunologiques telles que les procédés Enzyme linked ImmonoSorbent Assays ou ELISA ou sur l'hybridation de

séquences nucléotidiques.

Dosages immunochimiques (ELISA)

La kinase peut être couplée à un anticorps pour former un conjugué anticorps-kinase qui peut servir dans les
5 divers tests ELISA.

Dans le cas d'un dosage direct des conjugués, on utilise une boîte multipuits ou des tubes ou un support quelconque sur lesquels sont immobilisés les antigènes.

Les conjugués anticorps-kinase sont alors ajoutés
10 en quantité décroissante. Après lavage, l'activité de la kinase fixée est mesurée en présence de ses substrats, permettant de produire de l'ATP, qui en présence de luciférine est dégradé par la luciférase avec une émission de lumière. Celle-ci peut être mesurée par un bioluminomètre
15 ou par un film sensible comme un "Polaroid" (R) ou encore par un papier négatif sensible aux rayons X. Ce test permet de déterminer le titre des anticorps.

Dans les conditions de dosage de la pyruvate kinase, l'excès de substrats par rapport à la quantité
20 d'enzyme et à la quantité de luciférase est tel que ces enzymes travaillent pendant plusieurs jours et permet de suivre l'émission de lumière pendant trois jours dans un test ELISA normal.

Le test direct permet la mesure de l'antigène
25 grâce à l'utilisation de la méthode dite compétitive. Dans ce cas, l'anticorps est immobilisé sur la boîte ou le support de dosage. Ensuite, l'antigène à doser est incubé en présence d'une quantité fixe d'antigène conjugué à la kinase. Ces deux antigènes vont entrer en compétition pour l'anticorps fixé
30 sur la boîte : plus l'antigène à doser sera en quantité importante, moins l'antigène-kinase pourra se fixer sur l'anticorps. C'est celui-ci qui est détecté par l'activité de la kinase. L'estimation de l'antigène à doser se fait alors en référence à une courbe d'étalonnage.

35 Le dosage de l'antigène se fait plus facilement grâce à la méthode dite en Sandwich. La boîte ou le support solide contient des anticorps immobilisés. L'antigène à doser est alors ajouté en dilutions croissantes puis après lavage,

une quantité fixe d'un second anticorps marqué à la kinase est ajouté et l'activité de la kinase est mesurée. Une variante à cette méthode consiste à utiliser un second anticorps non marqué et d'ajouter par la suite un anticorps
5 marqué à la kinase (Double Sandwich).

Le dosage en Sandwich permet également la mesure d'anticorps puisque dans ce cas on utilise un support sur lequel l'antigène est immobilisé. L'anticorps est ajouté en concentrations croissantes puis après lavage, des anti-
10 anticorps marqués à la kinase sont incubés et l'activité de la kinase est mesurée. Ici aussi, on peut réaliser des doubles Sandwich en utilisant un anti-anticorps non marqué puis un deuxième anti-anticorps conjugué à la kinase.

Dosage par hybridation de séquences oligonucléotidiques

15 La possibilité d'utiliser l'avidine (ou la streptavidine) comme sonde protéique qui peut être couplée à la kinase permet la mise au point de tests de reconnaissance de séquences nucléotidiques. Cette technique peut s'appliquer à un très grand nombre de domaines comme les
20 tests diagnostics de détection de bactéries, de champignons, de levures, de virus, de cellules cancéreuses ou de tout organisme biologique possédant une séquence d'acides nucléiques particulière.

Le principe de l'hybridation d'oligonucléotides
25 est basé sur la reconnaissance d'une séquence de nucléotides (ADN ou ARN) par un brin de nucléotides complémentaire et de leur appariement en une double chaîne dans des conditions de température, pH et sels adéquats. Cette reconnaissance est permise par la formation de ponts hydrogènes entre l'adénine
30 (A) et la thymine (T) (ou uracil (U)) et entre la guanine (G) et la cytosine (C). Si l'on connaît la séquence de l'ADN (ou de RNA) à détecter, il est possible de construire par des procédés chimiques, enzymatiques ou biologiques la séquence complémentaire qui ira s'hybrider de manière spécifique avec
35 le DNA (ou le RNA) à détecter.

L'utilisation des conjugués kinase selon l'invention pour réaliser des tests en bioluminescence a comme avantage une sensibilité très grande et une mesure de

détection pouvant s'étendre sur plusieurs jours. Dans le procédé le plus simple, la séquence de nucléotide utilisée pour le test est marquée à la biotine. Ce marquage peut se faire de diverses manières :

- 5 - soit chimiquement en utilisant un oligonucléotide biotinylé lors de la synthèse, ou en faisant réagir la séquence avec un NHS-biotine, biotényl aminocapric acid-N-hydroxysuccinimide ester,
- soit de façon enzymatique en utilisant la terminal
10 transferase qui incorpore des nucléotides biotinylés à l'extrémité d'une séquence nucléotidique spécifique.

La séquence biotinylée peut alors être reconnue par l'avidine ou la streptavidine elle-même couplée à l'enzyme.

- 15 Après hybridation avec la séquence à doser, un conjugué avidine-kinase est utilisé, qui se fixe sur la biotine. La kinase est alors mesurée par sa production d'ATP qui en présence de luciférase émet des photons.

- 20 La détection de séquence de l'ADN ou RNA présent en solution est plus complexe car elle nécessite une étape d'immobilisation afin de réaliser un lavage ou une réaction de compétition. Elles peuvent être immobilisées directement sur des filtres de nitrocellulose ou de nylon dans des tests dits de "Dot Blot" ou après séparation par électrophorèse sur
25 gels (Southern blot et Northern blot).

- 30 Dans le cas où le DNA (ou RNA) à mesurer se trouve en quantité très faible, on peut aussi immobiliser ce DNA grâce à une séquence complémentaire qui est elle-même immobilisée sur un support filtre, gel, plastique, verre,
35 billes... L'ADN (ou ARN) hybridé sur la sonde immobilisée, pourra être mesuré à l'aide d'une autre séquence biotinylée et d'un conjugué avidine-kinase. Cette méthode utilisant deux séquences nucléotidiques - l'une immobilisée dite capteur et l'autre biotinylée dite détecteur - est aussi appelée méthode Sandwich. Du point de vue de la méthodologie, les deux séquences capteur et détecteur peuvent être ajoutées simultanément au DNA (ou RNA) à détecter ou de manière séquentielle suivant les conditions du test et du résultat

à obtenir : sensibilité plus grande, rapidité de travail ou facilité des manipulations.

Ces méthodes peuvent être complexifiées en utilisant non seulement la reconnaissance entre l'avidine et
5 la biotine mais aussi entre les antigènes (ou haptènes) et les anticorps.

Par exemple, on peut utiliser une séquence d'acides nucléiques biotinylée puis une réaction avec de
l'avidine, couplée ou non à la kinase, qui sera elle-même
10 reconnue par des anticorps anti-avidine couplés à la kinase.

Il existe plusieurs variantes à cette technique comme l'utilisation d'un deuxième anticorps conjugué à la
kinase ou l'utilisation d'anticorps conjugués à la biotine sur
lesquels on peut faire réagir des conjugués avidine-
15 kinase. Quelle que soit la combinaison utilisée, on utilisera au moins un conjugué avidine-kinase ou anticorps-kinase selon l'invention dans l'une des étapes de la réaction.

Ces reconnaissances spécifiques avidine-biotine ou anticorps-antigène peuvent aussi être mises à profit pour
20 l'immobilisation sur le support solide. Ceci permet de faire la réaction d'hybridation en solution avant de réaliser l'immobilisation. L'avantage de l'hybridation en solution réside en sa plus grande rapidité par rapport à l'hybridation sur support solide pour laquelle les facteurs stériques et
25 de diffusion ralentissent la réaction.

Un procédé particulièrement avantageux consiste à réaliser l'hybridation de l'ADN à mesurer avec deux séquences nucléotidiques complémentaires d'une partie de l'ADN à mesurer. Ces deux séquences sont marquées par des
30 molécules différentes, par exemple l'une par la biotine et l'autre par la kinase. Après hybridation, l'ensemble est mis en présence d'un support portant de l'avidine qui va fixer les séquences biotinylées dont certaines feront partie de l'hybride, qui portera une deuxième séquence-kinase qu'il
35 suffira de mesurer en présence de luciférase et des substrats appropriés.

Les deux séquences peuvent aussi porter une biotine ou un antigène (ou haptène) comme du dinitrophénol

(haptène). Après l'hybridation, on peut soit immobiliser l'hybride sur un support portant l'avidine et révéler l'hybride par un anticorps dirigé contre l'antigène ou l'haptène (ici, anti-dinitrophénol ou anti-digoxigénine) 5 marqué à la kinase. Si l'anticorps n'est pas marqué à la kinase, un deuxième anti-anticorps marqué à la kinase peut être utilisé.

L'immobilisation peut aussi se faire à partir d'anticorps fixés sur le support qui va reconnaître et fixer 10 l'antigène ou l'haptène (ici le dinitrophénol). La révélation de l'hybride se fera alors en faisant réagir de l'avidine-kinase sur la séquence biotinylée de l'hybride. Les autres méthodes de mise en évidence de la biotine-avidine expliquées ci-dessus peuvent aussi servir mais dans tous les cas, un 15 conjugué-kinase au moins sera utilisé.

Dans ces situations de détection des hybrides décrites ci-dessus, on faisait appel, dans une des étapes au moins, à la reconnaissance entre la biotine et l'avidine. On peut éviter le passage par cette réaction dans le cas 20 notamment de la pyruvate kinase car on a observé que cette enzyme était stable à 45°C pendant 2h au moins, ce qui représente des conditions d'hybridation que l'on peut obtenir notamment avec des oligonucléotides. Sur base de ces observations, on réalise un conjugué composé de kinase 25 directement couplée sur la séquence d'oligonucléotides qui servira à l'hybridation; l'activité de la kinase étant mesurée en présence de ses substrats et de luciférase.

La technique d'hybridation du DNA ou RNA est particulièrement bien adaptée au dosage de virus que l'on 30 ne peut cultiver in vitro comme les papillomavirus ou le virus de l'hépatite B. De plus la spécificité de cette technique permet de distinguer les divers types de virus d'une même famille. Une application particulièrement intéressante est la détection des divers types de virus du 35 papillome humain décrits précédemment.

Exemples

Tests immunologiques

I. Mise en évidence de conjugués anti-IgG-kinase

Des IgG de souris sont immobilisés sur des plaques multipuits en incubant 0,2 ml d'une solution d'IgG à 10 μ g/ml par puits dans du tampon borate 0,1 M pH 7,5 avec NaCl 0,5 g/l pendant 24h à 20°C. Les puits sont alors saturés
5 par l'albumine bovine en incubant une solution de 5 mg/ml pendant 4h. Ensuite les puits sont lavés 3 fois avec une solution de Tween à 5 ml/l d'eau puis avec la même solution, mais contenant 5 mg/l de saccharose. Les puits peuvent éventuellement être séchés par incubation à 45° pendant 15
10 min. Les anticorps conjugués sont alors incubés à raison de 0,1 ml par puits dans un tampon Tris HCl 0,1 M pH 7,5 en présence d'albumine à 5 mg/ml pendant 2h à 20°C. Après lavage, l'activité de la kinase est dosée en ajoutant 0,16 ml d'une solution mélange préparée à partir d'un tampon Tris-
15 HCl 0,025 M, DTT 75 μ M, EDTA 125 μ M, MgCl₂ 6,25mM pH 7,75 auquel on ajoute extemporanément 1 mM de phosphénolpyruvate, 75 μ M de luciférine, 0,008 mg de luciférase/ml. On ajoute alors 0,04 ml de tampon phosphate 50 mM pH 7,5 contenant 2 μ g ADP/ml. La mesure des photons se fait dans un
20 bioluminomètre au cours des 5 minutes qui suivent, et le résultat est exprimé en fonction de plateau ou de l'intégration pendant 1 minute. On peut aussi exposer à l'aide d'un film polaroid 3.000 ou 20.000 ASA pendant 5 minutes suivi d'un développement de 45 sec. Dans un test
25 réalisé de cette manière, les anti-IgG-kinase ont été dilués successivement et ont pu être détectés jusqu'à une dilution de 2560 fois, ce qui représentait 2,6 10⁻¹³ moles d'anticorps par test.

30 II. Mesure d'IgG considérés comme antigènes (méthode Sandwich)

La même expérience fut réalisée selon l'exemple I, mais en immobilisant sur des plaques multipuits des anticorps de lapins anti-IgG humains. Ces plaques ont été incubées avec des IgG humaines à des dilutions de plus en
35 plus grandes, ensuite ont été lavées, puis des anticorps de souris anti-IgG-humaines conjugués à la kinase ont été ajoutés à tous les puits. La mesure de kinase par la plaque photographique a permis de détecter une concentration de 8,3

10^{-14} mole/test d'IgG humaine.

III. Détermination du titre des anticorps anti-B-HCG (human corionic gonadotropin)

On réalise deux dilutions de 20X et de 100X d'un
5 sérum positif Béta-BHCG contenant 98.000 μ UI/ml avec du sérum
négatif (provenant d'un sujet humain de sexe féminin). Ces
deux dilutions ont été incubées pendant 60 minutes à 37°C et
sous atmosphère humide dans 2 X 3 séries de micropuits
préalablement fixés avec l'anticorps monoclonal trappeur
10 (anti-Béta HCG). Après trois rinçages avec du tampon
phosphate 100 mM, pH 7 et 1 mg/ml d'ovalbumine, nous avons
incubé une préparation commerciale d'IgG polyclonaux de lapin
anti-HCG, dialysée et diluée 100 X, 1.000 x et 10.000 X. On
rince trois fois dans le tampon phosphate. Enfin, pour chaque
15 série de micropuits, nous avons réalisé une courbe de
concentration en conjugués qui sont composés d'un anticorps
de mouton anti-IgG de lapin conjugués à la pyruvate kinase.
Après trois rinçages, on dose l'activité au moyen du lecteur
de plaques en bioluminescence. Si on dilue l'anticorps de
20 lapin anti-HCG 100X et si on utilise une dilution de 50 fois
pour le conjugué on observe une activité de 30 RLU pour la
dilution 20X du serum HCG à 98.000 μ UI/ml et de 7 RLU (valeur
du test moins la valeur du blanc) pour la dilution 100X. Nous
pouvons donc doser des concentrations de 4.900 μ UI/ml de BHCG
25 dans le sérum avec un rapport signal/bruit de 7 et une
concentration de 980 μ UI/l avec un rapport signal/bruit de
2. Cette valeur constituerait dans l'état actuel des choses,
la limite de détection du dosage. Un sérum est considéré
comme positif lorsqu'il contient plus de 2.000 μ UI/l ce qui
30 cadre bien avec les exigences requises en laboratoire de
biologie clinique. Une optimalisation des conditions
permettrait d'améliorer encore les performances de ce dosage.

IV. Dosage des anticorps anti-histone

Un dosage d'anticorps anti-histone dans le sérum
35 d'un patient positif a été réalisé en diluant le sérum de 2
en 2 fois par un sérum contrôle pour les dilutions allant de
800 à 102.400 fois. Les boîtes multipuits ont été fixées avec
des protéines histones. Le sérum humain anti-histone a été

incubé dans ces puits, puis après lavage un anticorps de lapin anti-IgG humain marqué à la kinase. Ce sérum anti-histone donnait un signal linéaire en fonction de la dilution jusqu'à une dilution de 25.600 fois alors que le même test
5 réalisé avec un conjugué marqué à la peroxydase et révélé en spectrophotométrie suivant les conditions habituelles du fabricant (Biolab, Belgique) en utilisant l'ABTS (azino-benzthiazoline sulfonate) comme substrat ne détectait que jusqu'à la dilution de 1.600 fois.

10 V. Mesure directe du DNA du virus HPV-18

A. Fixation covalente du DNA sur les boîtes plastiques

Le DNA du virus d'HPV-18 a été immobilisé de manière covalente sur des boîtes de plastique multipuits modifiées de manière à ce qu'elles présentent des groupements
15 aminés en surface (Boîte Covalink NUNC.,^(R) GIBCO BRL)^(R). La fixation se fait de la manière suivante : le DNA est d'abord dénaturé par chauffage de 10 min. à 95°C. Il est alors refroidi rapidement et placé dans de la glace. Le DNA est alors dilué au moyen d'une solution froide de 1-
20 méthylimidozole 0,1 pH 7 afin d'obtenir des solutions de diverses concentrations (100 ng-0,1 ng) en DNA dans du 1-méthylimidozole 0,01 M. 75 µl de ce mélange est ajouté dans chacun des puits de la plaque Covalink. On ajoute ensuite 25
25 µl par puits d'une solution fraîche de 1-méthylimidozole 0,01 M pH 7 contenant 0,2 M de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide. Ces agents sont des agents couplants qui permettent la fixation covalente du phosphate des extrémités du DNA sur l'amine présente sur le plastique.

Les plaques sont incubées 5 h à 50°C, puis les
30 puits sont lavés par une solution 5 x SSC contenant 0,25% de SDS et à 50°C. Ces conditions de fixation sont recommandées par la firme qui commercialise ces boîtes Covalink.^(R)

B. Révélation du DNA par des oligo-biotinylés

Un oligonucléotide de 21 paires de base a été
35 sélectionné pour sa spécificité à reconnaître une séquence spécifique des DNA viraux de HPV 18 - 33 et 16. Il s'agit de la séquence :

5'-ACCTTAACTGCAGATGTTATG-3'

Cette séquence s'hybride à une région correspondant aux nucléotides 6780-6800 du gène L1 HPV 16 avec un mésappariement en position 15 et un en position 3, à une région correspondant aux nucléotides 6759-6779 du gène L1 d'HPV 18 et à une région correspondant aux nucléotides 6734-6754 du gène L1 d'HPV 33 avec un mésappariement en position 15 et un mésappariement en position 3.

Le marquage à la biotine de cet oligonucléotide se fait au moyen de la terminal transferase. Celle-ci fixe à l'extrémité 3' quelques d.UTP biotinylée et quelques d-CTP (non biotinylés).

L'hybridation se déroule de la manière suivante : les puits contenant du DNA fixé de manière covalente sont d'abord lavés par NaOH 0,2 N pendant 10 min., puis rincés par 200 µl d'une solution de SSPE 5X, Denhart 5X et de DNA de sperme de Hareng à 100 µg/ml. On ajoute alors 100 µl/puits de cette solution contenant la séquence biotinylée à 25 ng/puits et l'on incube 16h à 50°C. Les puits sont alors lavés deux fois par du SSPE 2X à 50°C.

Le conjugué avidine-kinase est alors ajouté à raison de 0,01 µg/ml et après lavage, l'activité de la kinase est révélée en présence de ses substrats et de la luciférase comme explicitée dans les exemples ci-dessus. La quantité de DNA viral de HPV-18 mise en évidence dans ces conditions correspond à la solution de 100 ng/puits, ce qui est très élevé.

VI. Mesure indirecte du DNA du virus HPV-18 (Méthode Sandwich)

A. Genome de 586 BP

Pour éviter les problèmes de viscosités, d'interactions, d'encombrements qu'implique la manipulation du génome complet d'HPV (+/- 8 000 bp), on amplifie par PCR une partie de ce génome, à savoir un brin de 586 bp à partir de la 6.193e base jusqu'à la 6.779e.

B. Fixation covalente de l'oligo-trappeur

L'oligonucléotide trappeur de 21 paires de bases a une spécificité unique pour le génome d'HPV 18 et constitue le complémentaire des 21 premières bases à partir de

l'extrémité 3' de la séquence sélectionnée ci-dessus. La séquence est :

5'-TTTGGAAGATGGTGATATGG-3'

L'oligo-trappeur est immobilisé de manière covalente dans les boîtes NUNC de la même manière que précédemment pour le DNA du virus HPV 18. On incube durant 5h à 50°C, 5 ng d'oligonucléotides par puits et on fixe environ 1,2 ng par un lien covalent.

C. Hybridation du fragment d'HPV 18

Pour l'hybridation, les puits contenant l'oligonucléotide trappeur sont rincés par 200 µl de la solution d'hybridation composée de SSPE 5 X, Denhart 5 X et de 100 µg/ml de DNA de sperme de Hareng.

On ajoute alors à 200 µl/puits de cette solution 10 µl contenant des concentrations décroissantes du fragment du génome d'HPV 18 diluée dans l'eau. Celui-ci ayant été préalablement dénaturé 10 min. à 95°C et maintenu ensuite dans la glace durant 5 minutes. L'hybridation se déroule à 50°C pendant 2h.

D. Hybridation de l'oligonucléotide biotinylé

L'oligonucléotide détecteur de 21 paires de bases est spécifique pour les génomes d'HPV 16, 18 et 33 (cfr mesure indirecte du virus HPV 18 - point B) et constitue le complémentaire des 21 dernières bases à partir de l'extrémité 3' de la séquence de 586 paires de bases sélectionné au point A. Sa séquence :

5'-ACCTTAACTGCAGATGTTATG-3'

Après avoir lavé les puits avec 200 µl/puits d'une solution de SSPE 2X, on procède à une nouvelle hybridation de la même manière que précédemment sinon que l'on ajoute aux 200 µl/puits de la solution de préhybridation 25 ng des oligonucléotides biotinylés. Cette hybridation dure 1 h à 45°C. L'hybridation peut se réaliser en une seule étape plutôt qu'en deux incubations avec chacune des deux séquences sondes.

E. Révélation par bioluminescence

Après hybridation, les plaques sont lavées avec une solution SSPE 2X à 20°C, puis le conjugué avidine-kinase

est ajouté à raison de 0,01 $\mu\text{g/ml}$ et après lavage, l'activité de la kinase est révélée en présence de ses substrats et de la luciférase, comme explicitée dans les exemples ci-dessus.

1. ELISA en bioluminescence, lecture sur place
5 Polaroid.

De nouveaux conjugués sont synthétisés, des plaques 96 puits sont coatées avec des IgG de lapin anti-IgG humains, des IgG humains et des IgG de souris.

a) la première opération consiste à réaliser une courbe de
10 saturation afin de déterminer le titre des conjugués;

b) le dosage Elisa proprement dit a été réalisé suivant deux méthodes qui varient légèrement au niveau du dosage de l'enzyme marqueur. Dans un premier cas, mesure directe, on mesure continuellement l'ATP produit par la réaction de la
15 pyruvate kinase en bioluminescence. Cette méthode permet de détecter $2.6 \cdot 10^{-13}$ mol/test d'IgG humains (fig. 1a). Dans un deuxième cas, mesure indirecte, l'ATP produit est accumulé pendant 60 min. puis mesuré en bioluminescence. Dans ce cas, on détecte $8.32 \cdot 10^{-14}$ mol/test (fig. 1b). On constate que la
20 sensibilité n'a pas été améliorée comme on aurait pu l'espérer .

2. Effet de la concentration en SPDP sur le nombre de bras fixés et sur l'activité de la pyruvate kinase - protection par les substrats.

25 Des aliquots de 100 μl de PK à 10 mg/ml dans du KH_2PO_4 100mM pH 7 sont activés avec 200 μl de SPDP en concentration croissante dans de l'éthanol. Après 30 min. de réaction, le SPDP en excès est éliminé sur Séphadex G25 et la PK est analysée par rapport à son activité résiduelle et
30 au nombre de bras fixés par molécule d'enzyme. L'expérience est aussi réalisée en présence des substrats en concentration 1mM (ADP phosphoénol pyruvate et MgCl_2). Le graphique montre que pour un faible nombre de bras fixés sur l'enzyme (inférieur à 5), l'activité résiduelle est semblable si
35 l'expérience est effectuée en présence des substrats ou non. Au-delà d'un excès de 10 SPDP, ce qui correspond à +/- 4 bras fixés par enzyme, l'activité résiduelle est légèrement supérieure si l'expérience est réalisée en présence des

substrats (fig. 2).

Dans une boîte micropuits, des immunoglobines (IgG) de souris (blanc) et humaines (test) sont coatées selon une méthode classique. Après une incubation avec des
5 conjugués IgG anti-IgG humaines couplés à la pyruvate kinase, les micropuits sont lavés et on révèle en luminescence l'activité de la kinase couplée à l'IgG anti-IgG humaine. Ces dernières se fixent dans les puits contenant leur antigène, à savoir les IgG humaines (fig.3).

REVENDICATIONS

1. Conjugé destiné à la détection et/ou au dosage d'un composé biologique, caractérisé en ce qu'il est constitué par une enzyme capable de produire un composé
5 intermédiaire utilisable par un système de bioluminescence tel qu'une luciférase et dont les groupements sulfures sont de préférence préalablement réduits, ladite enzyme étant couplée à un ligand, préalablement activé par un agent couplant, et susceptible de se lier de manière spécifique
10 audit composé biologique.

2. Conjugé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'enzyme est une déshydrogénase ou une kinase.

3. Conjugé selon la revendication 2 caractérisé en ce que l'enzyme est une pyruvate kinase.

15 4. Conjugé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que l'agent de couplage est le N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate.

20 5. Conjugé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que le ligand est un antigène.

6. Conjugé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que le ligand est un récepteur d'hormone.

25 7. Conjugé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que le ligand est un anticorps.

30 8. Conjugé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que le ligand est une séquence nucléotidique.

9. Conjugé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que le ligand est un composé capable de se fixer à une séquence nucléotidique biotinylée.

35 10. Conjugé selon la revendication 9 caractérisé en ce que le ligand est de l'avidine ou de la streptavidine.

11. Conjugé selon l'une quelconque des revendications précédentes 8 à 10 caractérisé en ce que la

séquence nucléotidique est constituée par tout ou partie d'une séquence nucléotidique choisie parmi le groupe constitué par les séquences nucléotidiques suivantes:

- SEQ ID n°1 : TGTGCAACAA TGTGCAGACA TTATA
 5 SEQ ID 1bis : ACACGTTGTT ACACGTCTGT AATAT
 SEQ ID n°2 : UGUGCAACAA UGUGCAGACA UUAUA
 SEQ ID n°2Bis : ACACGUUGUU ACACGUCUGU AAUAU
 SEQ ID n°3 : CCAAGCTTT AGATGCGTGC CAGGA
 SEQ ID n°3bis : GGTTCGCAA TCTACGCACG GTCCT
 10 SEQ ID n°4 : TACTACATAC ACCCCCGCAC AGACC
 SEQ ID n°4bis : ATGATGTATG TGGGGGGCGTG TGTGG
 SEQ ID n°5 : CCAAGCGUUU AGAUGCGUGC CAGGA
 SEQ ID n°5bis : GGUUCGCAA UCUACGCACG GUCCU
 SEQ ID n°6 : UACUACAUAC ACCCCCGCAC AGACC
 15 SEQ ID n°6bis : AUGAUGUAUG UGGGGGCGUG UGUGG
 SEQ ID n°7 : ACCTTAACTG CAGATGTTAT G
 SEQ ID n°7bis : TGG AATTGAC GTCTACAATA C
 SEQ ID n°8 : ACCUUAACUG CAGAUGUUAU G
 SEQ ID n°8bis : UGGAAUUGAC GUCUACAAUA C
 20 SEQ ID n°9 : ATATCAGATG ACGAGAACGA AAATG
 SEQ ID n°9bis : TATAGTCTAC TGCTCTTGCT TTTAC
 SEQ ID n°10 : AUAUCAGAUG ACGAGAACGA AAAUG
 SEQ ID n°10bis : UAUAGUCUAC UGCUCUUGCU UUUAC

12. Procédé de préparation du conjugué selon l'une
 25 quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que on fait réagir en solution l'agent de couplage sur le ligand et en ce que ce ligand activé est couplé à une enzyme dont un ou plusieurs ponts sulfures ont été éventuellement réduits .

30 13. Procédé de préparation du conjugué selon la revendication 12 caractérisé en ce que l'enzyme du conjugué selon l'invention est immobilisé au niveau de son site actif sur une colonne contenant un gel ayant une affinité pour l'enzyme tel que le Blue Sépharose et est couplé au ligand
 35 préalablement activé par l'agent couplant et en ce que la colonne est lavée et le conjugué est élué de la colonne en changeant la composition de la solution de lavage, notamment en augmentant sa force ionique.

14. Utilisation du conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 pour la détection et/ou le dosage d'un composé biologique.

5 15. Trousse de détection et/ou de dosage d'un composé biologique caractérisé en ce qu'il comprend le conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 11.

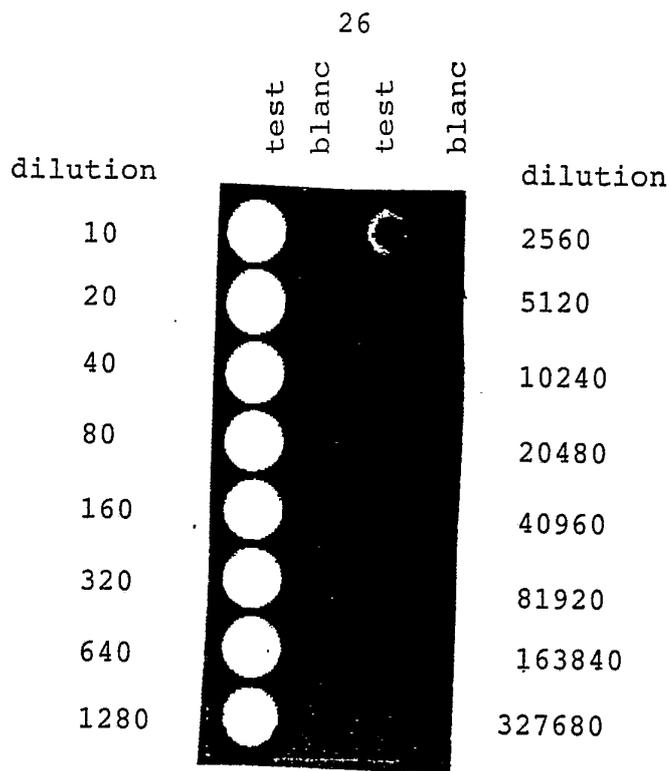


FIG 1a.

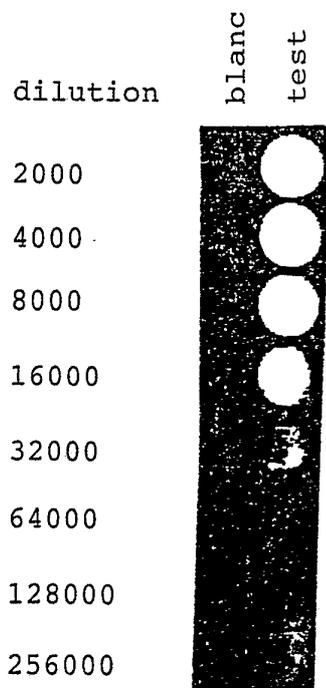


FIG 1 b.

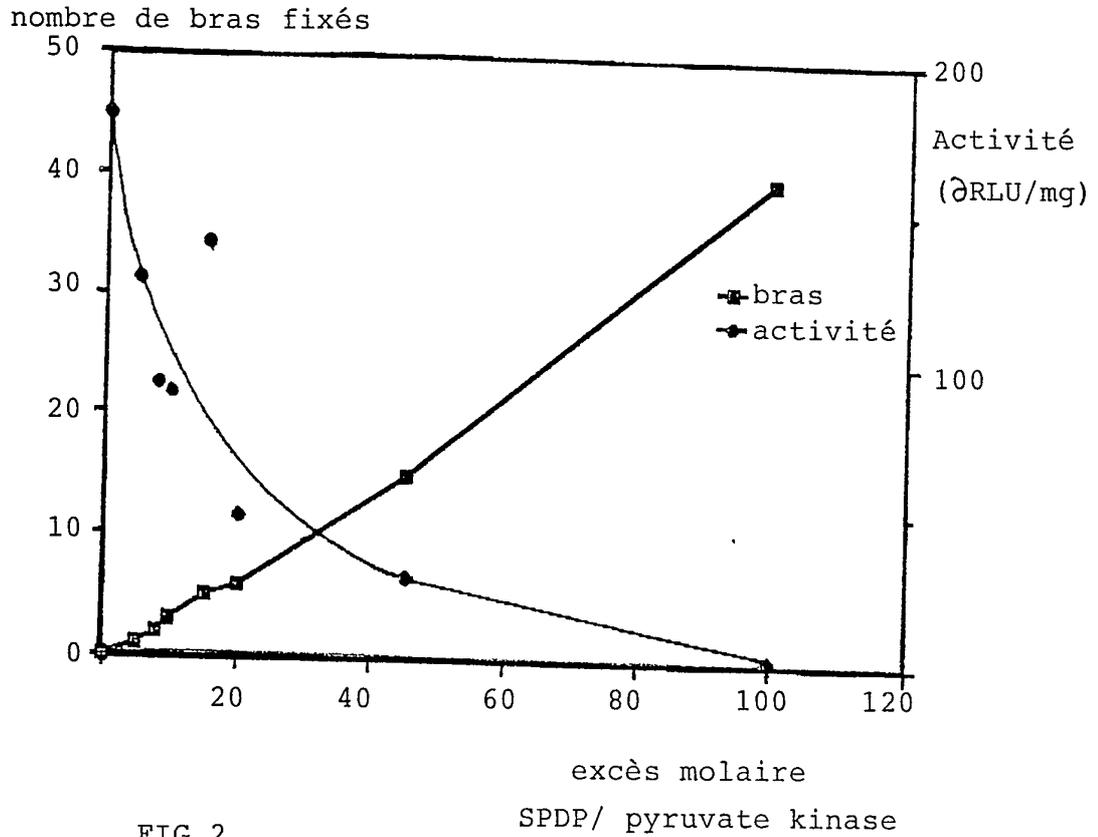


FIG 2.

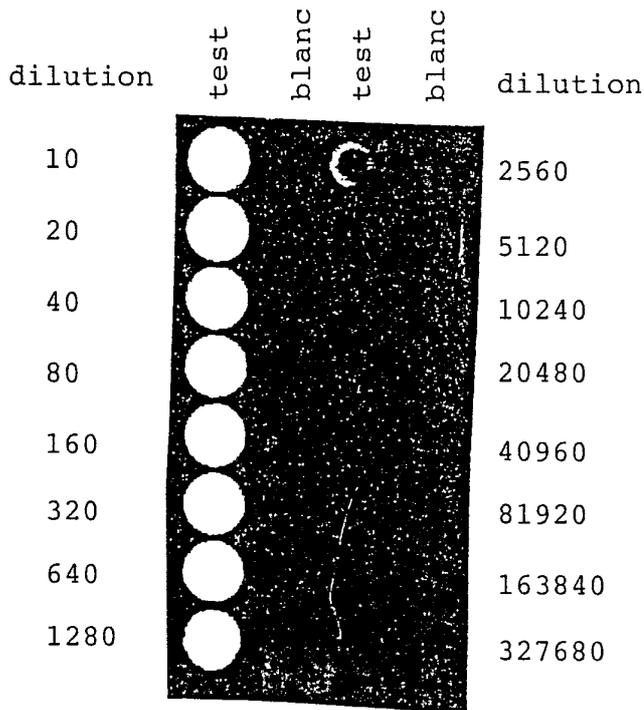


FIG 3.



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numero de la demande
nationale

BE 9200827
BO 3841

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
D,Y	EP-A-0 362 042 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) * revendications *	1-10, 12-15	C12Q1/68 G01N33/535 C12Q1/70
Y	EP-A-0 304 934 (AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR) * colonne 18 - colonne 19; revendications *	1-10	
D,Y	EP-A-0 137 515 (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION) * revendications; exemple 4 *	1,4-8, 14,15	
Y	EP-A-0 123 300 (ENZO BIOCHEM., INC.) * abrégé *	13	
A	EP-A-0 431 882 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES) * le document en entier *	1,4-8,14	
Y	EP-A-0 254 172 (MILES LABORATORIES) * page 6, ligne 35 - ligne 55 *	1,12	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
			C12Q G01N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
07 JUIN 1993		MOLINA GALAN E.	
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

1

EPO FORM 1503 03.82 (P/0448)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BE 9200827
BO 3841

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets. 07/06/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0362042	04-04-90	FR-A- 2636970	30-03-90
EP-A-0304934	01-03-89	Aucun	
EP-A-0137515	17-04-85	AU-B- 590511 AU-A- 3420384 CA-A- 1234756 JP-A- 61022254	09-11-89 18-04-85 05-04-88 30-01-86
EP-A-0123300	31-10-84	AU-A- 2716184 JP-A- 59224564	25-10-84 17-12-84
EP-A-0431882	12-06-91	JP-A- 5084100	06-04-93
EP-A-0254172	27-01-88	US-A- 4810638 CA-A- 1293441 DE-A- 3774348 JP-A- 63045561	07-03-89 24-12-91 12-12-91 26-02-88