

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 832 507

②① N° d'enregistrement national : **01 15011**

⑤① Int Cl⁷ : G 01 N 33/543

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 20.11.01.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la demande : 23.05.03 Bulletin 03/21.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *DIAGNOSTICA STAGO Société anonyme — FR et BIBETTE JEROME — FR.*

⑦② Inventeur(s) : BIBETTE JEROME MICHEL JACQUES.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET LAVOIX.

⑤④ METHODE DE DETECTION D'ANALYTE(S) A L'AIDE DE PARTICULES MAGNETIQUES COLLOIDALES.

⑤⑦ La présente invention a pour objet une méthode de détection et/ou de quantification d'au moins un analyte dans un milieu liquide, caractérisée en ce qu'elle met en oeuvre des particules colloïdales magnétiques fonctionnalisées en surface par au moins un ligand spécifique d'un analyte à détecter et/ou doser et en ce qu'elle comprend:

- la mise en contact desdites particules avec ledit milieu à analyser,

- l'application d'un champ magnétique audit milieu, à une intensité suffisante pour provoquer la structuration desdites particules magnétiques sous forme de chaînes,

- le maintien de ce champ magnétique une durée suffisante pour permettre le couplage ou l'association de l'analyte considéré avec au moins deux ligands spécifiques présents respectivement sur deux particules voisines d'une chaîne,

- l'annulation du champ magnétique, et

- la détermination de la présence et/ou l'absence dudit analyte et, le cas échéant, de sa concentration via la présence et/ou l'absence des dites chaînes permanente (s) de particules magnétiques.

FR 2 832 507 - A1



La présente invention concerne une méthode utile pour détecter au moins une espèce analytique au sein d'un échantillon liquide, biologique ou synthétique, et qui implique le couplage de cette espèce avec un réactif que l'on peut apparenter à un réactif d'agglutination.

5

A ce jour, de nombreuses méthodes dites d'agglutination sont déjà proposées. Elles sont majoritairement utilisées pour détecter des antigènes et/ou anticorps en vue du diagnostic. Ces méthodes sont notamment appliquées pour des dosages biologiques (tests de grossesse, tests de coagulation) ou le diagnostic de maladies infectieuses. Toutefois, ces méthodes ont généralement une sensibilité limitée. En effet, le principe général de ces tests consiste à déceler la formation d'un gel de particules colloïdales qui se forme en présence de l'analyte. L'analyte doit pouvoir, dans ce type de test, accrocher deux particules colloïdales dont les surfaces sont couvertes par une molécule reconnaissant, au sens le plus large, l'analyte à doser.

10
15

La présente invention repose plus particulièrement sur l'utilisation de particules magnétiques à titre de réactifs colloïdaux d'agglutination.

Des particules magnétiques sont déjà mises en œuvre dans des techniques de séparation biologiques ou de tests diagnostics (WO 94/09368 ; EP 20 180 384 ; WO 98/51435). Les séparations magnétiques s'avèrent rapides, faciles de mise en œuvre et nécessitent un appareillage simplifié. À partir de particules magnétiques, couvertes d'une molécule reconnaissant l'analyte à capturer, on peut séparer sous l'effet des forces magnétiques, l'analyte en question d'un mélange complexe. Cette démarche est mise à profit dans le test dit ELISA par exemple (Enzyme Linked Immunoassay). Les particules magnétiques utilisées incorporent un matériau magnétique, à savoir par exemple magnétite, ferrite, oxyde de chrome ou de nickel dans une matrice, généralement de nature organique. Elles sont fonctionnalisées en surface par des groupes réactifs de type antigène, haptène ou anticorps destinés à réagir avec l'espèce active à séparer.

25
30

De manière à éviter les problèmes associés à une rémanence magnétique, un matériau superparamagnétique est généralement privilégié au matériau ferromagnétique classique. Les ferrofluides, qui possèdent une

magnétisation très élevée à saturation (supérieure à 10^{-4} T(600 Gauss)) et ne manifestent aucune rémanence magnétique en l'absence d'un champ magnétique externe sont de bons candidats pour être intégrés dans les protocoles de préparation des colloïdes superparamagnétiques.

5

En ce qui la concerne, la présente invention vise à tirer profit de la faculté manifestée par ces colloïdes magnétiques à adopter une organisation structurelle spécifique sous l'effet d'un champ magnétique.

10

En l'occurrence, l'agglutination induite par le champ conduit, selon la fraction volumique en colloïdes, à des « chaînes » isolées ou à des amas de chaînes dénommés « clusters ». Chaînes ou Clusters seront désignés indifféremment ci-après par chaînes. On trouvera une documentation détaillée sur ces structures et leur formation dans de nombreuses publications.

15

En d'autres termes, en l'absence d'un champ magnétique, les particules se présentent sous une forme dispersée. En présence d'un champ magnétique, elles s'organisent pour former des chaînes de particules en solution aqueuse. Ces chaînes sont, bien entendu, réversibles et se défont rapidement à l'arrêt du champ magnétique sous l'effet de l'agitation thermique. Avantageusement, si ces

20 particules sont suffisamment petites, et donc browniennes et polarisables, ces chaînes se forment rapidement dans l'axe du champ qui leur est appliqué et ne sont pas sensibles à la gravité.

25

De manière inattendue, les inventeurs ont mis en évidence qu'il était possible d'exploiter cette faculté des particules colloïdales magnétiques à s'organiser rapidement en chaînes de particules sous l'effet d'un champ magnétique, à des fins de détection et/ou de quantification d'espèce(s) spécifique(s) dans un milieu liquide.

30

En l'occurrence, lorsque ces particules colloïdales magnétiques sont couvertes en surface par des ligands spécifiques et que la phase continue, dans laquelle elles sont dispersées, contient une espèce capable de réagir vis à vis d'au moins deux ligands spécifiques, le champ magnétique va catalyser l'accrochage de l'espèce considérée à deux particules distinctes et voisines dans

la chaîne induite par le champ magnétique. Après annulation du champ magnétique, les particules fixées par l'espèce demeurent organisées en chaînes permanentes et indiquent ainsi la présence de l'espèce ciblée dans le milieu analysé.

5

Plus précisément, la présente invention vise à titre principal une méthode de détection et/ou de quantification d'au moins un analyte dans un milieu liquide, caractérisée en ce qu'elle met en œuvre des particules colloïdales magnétiques fonctionnalisées en surface par au moins un ligand spécifique d'un analyte à

10 détecter et/ou doser et en ce qu'elle comprend :

1. la mise en contact desdites particules avec ledit milieu,
2. l'application d'un champ magnétique audit milieu, à une intensité suffisante pour provoquer la structuration desdites particules magnétiques sous forme de chaînes,
- 15 3. le maintien de ce champ magnétique une durée suffisante pour permettre le couplage ou l'association de l'analyte considéré avec au moins deux ligands spécifiques présents respectivement sur deux particules voisines d'une chaîne,
4. l'annulation du champ magnétique, et
- 20 5. la détermination de la présence et/ou l'absence dudit analyte et, le cas échéant, de sa concentration via la présence ou l'absence de chaîne(s) permanente(s) de particules colloïdales magnétiques dans ledit milieu liquide.

Il est à noter que l'ordre dans lequel ces étapes sont énumérées

25 correspond à un mode de réalisation privilégié de l'invention, mais qu'il est également possible dans le cadre de cette invention de les mettre en œuvre dans un ordre différent, par exemple en activant le champ magnétique avant l'introduction du milieu à analyser.

On peut également mettre en œuvre, dans le cadre de l'invention, une

30 collecte des particules colloïdales magnétiques liées par l'analyte que l'on cherche à détecter, à doser ou à déplacer.

On peut également mettre en œuvre dans le cadre de l'invention, des géométries de champ et de gradient de champ, ainsi que des géométries de

« cellules d'agglutination » très diverses. Ces variations sont sujettes selon les cas à optimiser à la fois la rapidité de l'association ligand récepteur, et la détection des chaînes permanentes qui peuvent être de longueur et d'épaisseur très variable selon les conditions. En particulier, l'invention englobe les dispositifs microfluidiques, tels que la largeur ou la hauteur des canaux soit inférieures à 100 μm . Des champs orientés perpendiculairement ou parallèlement à l'axe des canaux peuvent être utilisés.

En ce qui concerne plus particulièrement la caractérisation des chaînes permanentes, elle peut avantageusement être réalisée par un simple examen microscopique du milieu analysé.

Bien entendu, la formation des chaînes, assimilables aux agglutinats conventionnels, dépend d'une part de la concentration de l'analyte dans le milieu analysé et d'autre part de la concentration en particules. Schématiquement, on peut considérer que plus l'analyte est présent dans ledit milieu plus les chaînes seront longues et plus la concentration en particules est élevée, plus les chaînes seront épaisses et assimilables à des amas. Dans le cadre de la présente invention, il s'avère ainsi possible de déterminer la concentration en analyte à partir de la quantification de la densité de particules magnétiques organisées sous forme de chaîne(s) permanente(s). Cette mesure de densité peut être réalisée par des techniques conventionnelles. Pour un analyte donné, il peut être ainsi au préalable établi un étalonnage de référence.

La méthode revendiquée est particulièrement intéressante en terme de sensibilité. Elle s'avère ainsi avantageuse pour détecter des analytes à faibles concentrations dans des milieux liquides.

Comme il est montré dans l'exemple ci après, les chaînes persistent pour des concentrations en analytes, en l'occurrence en antigènes, de l'ordre de 10^{-9} mole/l contre 10^{-5} mole/l pour un test d'agglutination classique, mené avec le même couple ligand récepteur (Biotine streptavidine). Avantagusement, ce seuil de concentration est plus faible que le seuil de concentration nécessaire à la persistance d'agrégats ou la formation d'un gel tel qu'attendu dans un test

d'agglutination classique, mené avec le même couple antigène anticorps, et en l'absence de champ magnétique.

La méthode revendiquée peut donc se substituer avantageusement à un test d'agglutination classique, et largement augmenter la sensibilité du test.

5

Au sens de la présente invention, le terme colloïdal signifie que les particules possèdent une taille comprise entre 5 et 10.000 nm et plus préférentiellement entre 100 et 500 nm. Toutefois, il est particulièrement intéressant de privilégier l'utilisation de particules les plus petites possibles tout
10 en leur garantissant une susceptibilité magnétique suffisante pour autoriser une agglutination immédiate sous l'action conjuguée des forces dipolaires magnétiques et du mouvement brownien. Généralement, ce compromis est atteint pour des diamètres de particules d'au plus quelques microns et de préférence d'environ 0,1 à 0,5 microns lorsque la quantité de matériau
15 magnétique, généralement de l'oxyde de fer encapsulé, est maximal.

Pour les raisons évoquées précédemment, on privilégie l'usage de particules colloïdales superparamagnétiques.

Il existe plusieurs technologies distinctes pour fabriquer des particules colloïdales superparamagnétiques possédant les qualités requises relatives à
20 l'invention. Ce sont, par exemple, des techniques de co-précipitation d'un matériau polymérique naturel ou synthétique avec un ferrofluide aqueux, ou d'émulsification avec un ferrofluide en phase organique.

La technologie privilégiée pour accéder à ce type de matériau colloïdal de manière contrôlée est basée sur un principe d'émulsification suivie de protocoles
25 de polymérisation et de greffage. Ces émulsions peuvent notamment être fabriquées par cisaillement d'un mélange constitué d'un ferrofluide organique et d'une phase aqueuse riche en tensioactif. Le ferrofluide est choisi de manière à ce que sa phase organique soit légèrement soluble dans la phase aqueuse. En l'occurrence, chaque gouttelette se transforme en un conglomerat sphérique de
30 particules nanométriques du matériau magnétique considéré, de préférence l'oxyde de fer magnétique (maghémite) avec environ 60% en volume d'oxyde de fer au sein de chaque gouttelette. Les particules ainsi obtenues sont ensuite polymérisées en introduisant un monomère hydrophobe tel que le styrène, afin

que la réaction se produise au sein des gouttelettes. L'introduction de monomères fonctionnels hydrosolubles en fin de polymérisation assure une fonctionnalisation des surfaces. L'ensemble de ces deux opérations, à savoir émulsification et polymérisation, conduit à des particules sphériques, très riches en oxyde de fer, revêtues d'une couche polymérisée et fonctionnalisée. Pour la
5 préparation de cette émulsion, on peut notamment se reporter à la procédure publiée par J. Bibette dans J. Magn. and Magn. Mat. v. 122, p. 37 (1993) et par T Mason et J Bibette dans, Phys. Rev. Lett. 77, 3481 (1996) et les brevets PCT/FR97/00690 et la demande Française n° 9914195.

10 Avantageusement, le matériau magnétique incorporé est choisi parmi les oxydes de fer, de cobalt ou des métaux divisés et stabilisés et est de préférence de la maghémite. Il est incorporé à raison de 40% en volume et de préférence de 60% dans les particules. Selon une variante préférée de l'invention, le matériau magnétique de base est un ferrofluide.

15 Les particules colloïdales magnétiques ainsi obtenues sont particulièrement avantageuses dans la mesure où elles sont compatibles avec l'immobilisation au niveau de leur surface d'un grand nombre de ligands, et ceci selon des méthodes industrielles conventionnelles.

20 Avantageusement, elles peuvent être associées à une grande variété de ligands spécifiques de manière à les transformer en réactifs utiles notamment pour des immunodosages et des tests d'agglutination tel que décrit dans la présente invention.

25 Les molécules dites ligands peuvent être immobilisées à la surface des particules magnétiques colloïdales par des interactions d'adsorption, covalentes et/ou de hautes affinités.

30 Le couplage covalent peut, par exemple, être réalisé à partir de groupements réactifs chimiques présents à la surface des particules. A titre illustratif de ces groupements, on peut plus particulièrement citer les groupements carboxyle, amino, aldéhyde et époxy. Dans le cas où l'analyte que l'on cherche à caractériser est une espèce chimique réactive, ces groupements sont eux-mêmes susceptibles d'assurer le rôle du ligand spécifique vis-à-vis de l'analyte ciblé.

Pour ce qui est de l'immobilisation relevant d'une interaction par haute affinité, elle est généralement médiée par deux partenaires d'un couple de liaison à haute affinité tels que (poly)carbohydrate/électine, biotine ou composés biotinilés/avidine ou streptavidine, récepteur de protéines et son ligand
5 spécifique, haptène/anticorps etc...

Enfin, la fixation du ligand à la surface des particules peut être réalisée soit directement soit en utilisant des bras espaceurs encore désignés sous les termes « linker » ou « spacer »

Ces interactions covalentes ou par haute affinité permettent
10 l'immobilisation de ligands naturels ou synthétiques, comme par exemple des peptides, des protéines, y compris les glycoprotéines, les lipoprotéines et autres structures voisines ou dérivées, sous forme libre ou complexée, des immunoglobines, des acides nucléiques comme l'ADN ou l'ARN et leurs homologues, des saccharides comme les monosaccharides ou bisaccharides,
15 oligosaccharides et polysaccharides, des lipides, des hormones, des récepteurs, des métabolites ou autres substances biologiques.

Les analytes qui peuvent être détectés et/ou dosés par la méthode revendiquée sont de préférence des substances qui peuvent interagir spécifiquement et avec une affinité élevée avec les particules fonctionnalisées de
20 la présente invention. Il peut ainsi s'agir d'antigènes et d'anticorps qui peuvent être déterminés par une réaction immune, ou d'acides nucléiques qui peuvent être détectés par une réaction d'hybridation, et plus généralement de toutes sortes de protéines.

De préférence, les analytes possèdent un coefficient de diffusion au sein
25 du milieu à analyser au moins égal à celui des dites particules.

L'analyte à identifier peut sous sa forme naturelle réagir avec deux ligands distincts, à l'image par exemple des antigènes et anticorps qui offrent souvent plusieurs sites d'association.

30 Dans le cas contraire, il est effectué préalablement à la mise en œuvre de la méthode revendiquée, un prétraitement du milieu à analyser afin de rendre réactif l'analyte recherché vis à vis d'au moins deux molécules d'un de ses ligands spécifiques. Ce type de prétraitement peut notamment consister en une

fonctionnalisation de l'analyte par au moins une molécule d'un des partenaires des couples dits à haute affinité discutés ci-dessus. La réalisation de ce type de prétraitement relève des compétences de l'homme de l'art .

5 Un premier mode de réalisation de l'invention concerne la détection et/ou la quantification d'analyte(s) de type anticorps dans un échantillon liquide, par exemple des anticorps dirigés contre des pathogènes tels que virus, bactéries ou protozoaires et autres agents infectieux, anticorps dirigés contre des tumeurs, anticorps dirigés contre des allergènes, ou autoanticorps.

10 Un second mode de réalisation de l'invention concerne la détection et/ou la quantification d'antigènes tels que des antigènes libres comme les protéines et facteurs sanguins, tels les facteurs de la coagulation, les métabolites, hormones, médiateurs, etc., ou les antigènes liés à des supports, comme les
15 antigènes de surface de microorganismes, les récepteurs membranaires, les antigènes des groupes sanguins et du système majeur d'histocompatibilité, etc.

La méthode revendiquée peut également être mis en œuvre pour la détection et/ou la quantification de molécules non biologiques comme par
20 exemple toute drogue naturelle ou artificielle, étant entendu que la drogue en question est susceptible de posséder directement une double affinité pour un ligand. Si ce n'est pas le cas un pré-traitement devra par association rendre ce type d'analyte bivalent vis à vis du ligand désigné. Cette invention peut notamment être avantageuse en chimie analytique et micro analytique.

25 Selon une variante particulière de l'invention, plusieurs types de particules colloïdales magnétiques peuvent être utilisés dans un même test à titre de réactifs d'agglutination. Ceci peut être avantageux dans le cas où l'analyte serait aisément réactif sur deux types de ligand.

30 Par ailleurs, les particules colloïdales mises en œuvre selon l'invention peuvent être porteuses d'un marqueur annexe.

Ce marquage peut être avantageux dans la mesure où il peut permettre de combiner un second mode de détection au mode de détection microscopique ou simplement d'améliorer la détection microscopique. Ce marqueur annexe peut notamment être caractérisable visuellement, optiquement, mécaniquement et/ou électriquement. Selon cette variante de l'invention, la caractérisation des chaînes peut être effectuée directement par visualisation au microscope et indirectement par une méthode optique, mécanique et/ou électrique selon la nature du marqueur retenu. A titre illustratif des marqueurs convenant à l'invention, on peut notamment citer les pigments de couleur, agents de fluorescence ou phosphorescence.

Les milieux liquides analysés peuvent être synthétiques ou naturels comme par exemple les fluides biologiques. Il peut s'agir notamment de fluides corporels comme, par exemple, le sang (total ou fractionné), le sérum, le plasma, la salive et l'urine et le liquide céphalo-rachidien utilisés sous forme diluée ou non.

En ce qui concerne le champ magnétique, il peut être créé à l'aide de différents moyens qui sont connus de l'homme de l'art, par exemple les bobines d'Helmutz, les électroaimants ou les aimants permanents.

Il est généralement avantageux d'appliquer un champ magnétique essentiellement uniforme. Un moyen simple de réaliser un tel champ est de placer de part et d'autre de la zone dite d'agglutination deux pôles, respectivement Nord et Sud, d'un aimant permanent ou d'un électroaimant. Un autre moyen consiste à construire un canal d'axe essentiellement circulaire et concentrique à une bobine d'Helmutz alimentée par un générateur de courant.

Il est à noter, cependant, que certaines mises en œuvre de l'invention peuvent requérir un champ non uniforme. En effet on pourra chercher à mettre en œuvre à la fois un champ capable d'assurer l'agglutination des particules et un gradient de champ capable de concentrer les chaînes en un endroit précis. À la fois le champ et son gradient pourront être manipulés simultanément ou séparément. Ainsi il est possible de réaliser en premier la concentration des analytes, puis leur révélation par formation d'un amas de taille suffisante. Dans

d'autres applications appartenant au cadre de l'invention il sera préférable de réaliser l'agglutination dans un canal microfluidique. On sait par exemple (E. M. Lawrence et al., *Int. J. of Modern Phys. B*, 8, 2765-2777, 1994) que le diamètre et l'espacement des colonnes ou chaînes riches en particules magnétiques dépendent du champ magnétique et de l'épaisseur de la cellule. Il est ainsi possible de sélectionner des conditions d'agglutinations les mieux adaptées à l'application envisagée.

Les moyens d'introduction du milieu à analyser peuvent être constitués :

- d'une ou plusieurs encoches ou « puits » dans lesquels on dépose l'échantillon, comme en électrophorèse sur gel « *Electrophoresis : theory, techniques and biochemical and clinical applications*, A. T. Andrews, Oxford University Press, NY 1986 »,

- ou encore d'un système de surpression ou de dépression comme en électrophorèse capillaire, voir par exemple « *Capillary Electrophoresis* », P. D. Grossman, J. C. Colburn eds, Academic Press, San Diego, CA, USA, 1992),

- ou encore d'un canal par lequel un filet d'échantillon est déversé en continu, comme en électrophorèse en veine liquide,

- ou encore d'un des modes d'introduction des échantillons employés en chromatographie (« *Chromatographie en phase liquide et supercritique* », R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, Masson éd., Paris 1991 ; « *Practical High Performance Liquid Chromatography*, V. R. Meyer, John Wiley ed., Chichester, NY, USA ; « *Chromatography of polymers* », T. Prodver ed, ACS publ., Washington DC, 1993).

Dans sa réalisation la plus simple, l'expérience se déroule selon le protocole suivant et sur cette base il sera aisé d'imaginer de nombreuses variantes.

Des particules colloïdales ayant les propriétés décrites précédemment sont greffées par un anticorps spécifique d'un antigène à doser. Par mesure de clarté, on considère dans ce descriptif le couple ligand-récepteur streptavidine-biotine. La streptavidine étant greffée sur les particules, l'antigène à détecter, à titre d'exemple, est un petit polymère polyéthylène glycol greffé à ces deux extrémités par une molécule de biotine. Si on mélange une quantité suffisante de

cet antigène avec des particules à une fraction volumique de 1% ou plus, l'agglutination sous forme de gel, comme attendu dans le test classique d'agglutination, est visible en quelques secondes, voire quelques minutes. On considère C^* la concentration d'antigène telle que, en dessous de cette valeur, l'agglutination au sens classique ne soit plus décelable.

L'expérience, conforme à l'invention, consiste à mélanger des particules à une fraction volumique de l'ordre de 0.1%, avec l'antigène à une concentration C très inférieure à C^* et notée C^*/x , à aspirer le mélange dans un capillaire à section rectangulaire (épaisseur 20 à 50 μm) et à appliquer un champ magnétique parallèle à l'axe du capillaire. Le champ peut être appliqué grâce à deux aimants disposés de part et d'autre du capillaire. Le champ est maintenu deux minutes à titre d'exemple, avec une intensité d'au moins 500 Gauss. Le capillaire est ensuite observé avec un microscope pour déceler la présence de chaînes ou d'amas.

L'exemple du couple biotine-streptavidine permet ainsi d'établir que la détection des amas selon le protocole d'agglutination sous champ peut intervenir jusqu'à des concentrations en antigène de l'ordre de $C^*/1000$.

La méthode revendiquée est particulièrement intéressante pour la détection et le cas échéant la quantification d'au moins un analyte dans un système microfluidique. Dans ce mode de réalisation spécifique, on peut notamment envisager de réaliser l'agglutination magnétique dans une première zone du système microfluidique et la détection dans une zone distincte. Ce mode de réalisation se prête notamment avantageusement à l'isolement des chaînes permanentes de particules, des particules n'ayant pas subi l'agglutination.

La présente invention a également pour objet un kit de réactifs pour la détection d'un analyte dans un milieu liquide de préférence un liquide biologique caractérisé en ce qu'il comprend au moins des particules colloïdales magnétiques fonctionnalisées en surface par au moins un ligand spécifique dudit analyte.

La présente invention sera mieux illustrée par l'exemple qui suit

Exemple

Détection d'un analyte à l'aide de particules magnétiques colloïdales

5

L'exemple illustre la détection d'un analyte modèle issu du couple de forte affinité biotine/streptavidine et vise à caractériser le seuil de sensibilité de la méthode revendiqué pour un analyte donné. L'analyte est constituée par la biotine, la streptavidine étant greffée sur les particules colloïdales.

- 10 Plus précisément, l'analyte biotinylé est composé d'un polymère Poly éthylène glycol de masse 5000, greffé à ces deux extrémités par une molécule de biotine. Ces produits sont disponibles commercialement (Shearwater USA).

Les particules superparamagnétiques colloïdales greffés par de la strepavidine sont au préalable obtenues. Les particules colloïdales sont obtenues selon la
15 procédure publiée par J. Bibette dans *J. Magn. and Magn. Mat.* v. 122, p. 37 (1993) et F. Leal Calderon, T. Stora, O. Mondain-Monval, P. Poulin, and J. Bibette, *Phys. Rev. Lett.*, 72, 2959 (1994) ou selon la procedure publié par T Mason et J Bibette dans, *Phys. Rev. Lett.* 77, 3481 (1996) et breveté dans PCT/FR97/00690. La polymérisation de ces particules est obtenue selon le
20 protocole décrit dans la demande Francaise n° 9914195. Le greffage de la streptavidine sur les sites carboxyliques est bien connu de l'homme de l'art. On pourra s'inspirer de : Molday RS, Dreyer WJ, Rembaum A, Yen SP, *J Cell Biol* 1975 Jan;64(1):75-88 et Staros JV, Wright RW, Swingle DM, *Anal Biochem.* 1986 Jul;156(1):220-2.

- 25 Le test d'agglutination sous champ consiste à mélanger les particules colloïdales magnétiques greffées par la streptavidine avec les analytes dits PEG biotine. Le mode de détection retenu est l'observation directe au microscope .

Pour une fraction volumique Φ en particules donnée, de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-2} , on fait varier la concentration en analytes C de manière à détecter la limite de
30 sensibilité du test.

Pour chaque essai, on aspire le mélange considéré dans un capillaire plat de 50 microns d'épaisseur, que l'on dispose entre deux aimants plats, tel que le champ

produit soit supérieur à environ 500 G et parallèle à l'axe du capillaire. Ce champ est réalisé à l'aide d'aimants plats commerciaux. Il est appliqué 2 minutes environ et le capillaire est observé au microscope en absence de champ. Le test est positif quand on peut voir sous microscope la présence de chaînes ou d'amas et négatif lorsque les particules se redispersent spontanément sous l'action de l'agitation thermique.

Il s'avère que selon ce mode de réalisation le test demeure positif jusqu'à une concentration en analytes de l'ordre de 10^{-9} mol/l. A titre de comparaison, en dessous de 10^{-5} mol/l, il devient impossible de conduire un test d'agglutination classique.

REVENDEICATIONS

1. Méthode de détection et/ou de quantification d'au moins un analyte dans un milieu liquide, caractérisée en ce qu'elle met en œuvre des particules colloïdales magnétiques fonctionnalisées en surface par au moins un ligand spécifique d'un analyte à détecter et/ou doser et en ce qu'elle comprend :

- 5 1) la mise en contact desdites particules avec ledit milieu à analyser,
- 2) l'application d'un champ magnétique audit milieu, à une intensité suffisante pour provoquer la structuration desdites particules magnétiques sous
10 forme de chaînes,
- 3) le maintien de ce champ magnétique une durée suffisante pour permettre le couplage ou l'association de l'analyte considérée avec au moins deux ligands spécifiques présents respectivement sur deux particules voisines consécutives d'une chaîne,
- 15 4) l'annulation du champ magnétique, et
- 5) la détermination de la présence et/ou l'absence dudit analyte et, le cas échéant, de sa concentration via la présence et/ou l'absence de chaîne(s) permanente(s) de particules colloïdales magnétiques.

20 2. Méthode selon la revendication 1 caractérisée en ce que lesdites particules sont des particules colloïdales superparamagnétiques.

3. Méthode selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elles sont obtenues par co-précipitation d'un polymère avec un ferrofluide aqueux ou par
25 émulsification avec un ferrofluide en phase organique.

4. Méthode selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que les particules magnétiques colloïdales possèdent une taille comprise entre 5 et 10 000 nm et plus préférentiellement entre 100 et 500nm.

30

5. Méthode selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que les ligands spécifiques sont immobilisés à la surface des particules, par des interactions d'absorption, covalentes et/ou de hautes affinités.

6. Méthode selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le ligand immobilisé est un des deux partenaires d'un couple de liaison à haute affinité.

5

7. Méthode selon la revendication 6 caractérisée en ce que le ligand est choisi parmi un des partenaires des couples (poly)carbohydate/électine, biotine ou composés biotinilés/avidine ou streptavidine, récepteur de protéines et son ligand spécifique, et haptène/anticorps.

10

8. Méthode selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que le ligand immobilisé est un composé choisi parmi les peptides, protéines, y compris les glycoprotéines, les lipoprotéines, et autres structures voisines ou dérivées, sous forme libre ou complexée, des immunoglobines, des acides nucléiques comme l'ADN ou l'ARN et leurs homologues, des saccharides comme les monosaccharides ou bisaccharides, oligosaccharides et polysaccharides, des lipides, des hormones, des récepteurs, des métabolites ou autres substances biologiques.

15

9. Méthode selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que les analytes ciblés sont des antigènes, anticorps et des acides nucléiques et/ou protéines.

20

10. Méthode selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le milieu à analyser subi au préalable un prétraitement afin de rendre réactif l'analyte recherché vis à vis d'au moins deux molécules d'un de ses ligands spécifiques.

25

11. Méthode selon la revendication 10 caractérisée en ce que le prétraitement comprend une fonctionnalisation de l'analyte par l'un des partenaires d'un couple de liaison à haute affinité.

30

12. Méthode selon l'une des revendications précédentes pour la détection et/ou la quantification d'analyte(s) de type anticorps à des pathogènes tels que virus, bactéries ou protozoaires et autres agents infectieux, anticorps contre des tumeurs, anticorps dirigés contre des allergènes, ou autoanticorps.

5

13. Méthode selon l'une des revendications 1 à 11 pour la détection et/ou la quantification d'antigènes tels que des antigènes libres comme les protéines et facteurs sanguins, tels les facteurs de la coagulation, les métabolites, hormones, médiateurs, ou les antigènes liés à des supports, comme les antigènes de surface de microorganismes, les récepteurs membranaires, les antigènes des groupes sanguins et du système majeur d'histocompatibilité.

10

14. Méthode selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que les particules magnétiques colloïdales sont en outre porteuses d'un marqueur annexe.

15

15. Méthode selon la revendication 14 caractérisée en ce que ce marqueur est caractérisable visuellement, optiquement, mécaniquement et/ou électriquement.

20

16. Méthode selon la revendication 14 ou 15 caractérisée en ce que ce marqueur est choisi parmi les pigments de couleur et agents de fluorescence ou phosphorescence.

25

17. Méthode selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que la caractérisation des chaînes se fait directement par visualisation au microscope et/ou le cas échéant indirectement par toute méthode optique, mécanique, électrique.

30

18. Kit de réactifs pour la détection d'un analyte dans un milieu liquide caractérisé en ce qu'il comprend au moins des particules colloïdales magnétiques fonctionnalisées en surface par au moins un ligand spécifique de l'analyte ciblé.

19. Utilisation de la méthode selon l'une des revendications 1 à 17 pour la détection et/ou la quantification d'au moins un analyte dans un système microfluidique.



2832507

N° d'enregistrement national

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

FA 610852
FR 0115011

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	WO 98 16101 A (KING CHESTER F ;BIO TECH IMAGING INC (US); HALLOWITZ ROBERT A (US)) 23 avril 1998 (1998-04-23) * abrégé *	1,18	G01N33/543
A	WO 97 20214 A (PINDER ANDREW CHARLES ;CUNLIFFE DAVID (GB); CLARKE ROSEMARY GEORGI) 5 juin 1997 (1997-06-05) * abrégé *	1,18	
A	US 5 512 332 A (LIBERTI PAUL A ET AL) 30 avril 1996 (1996-04-30) * abrégé *	1,18	
D,A	WO 94 09368 A (COULTER CORP) 28 avril 1994 (1994-04-28) * abrégé *	1,18	
D,A	WO 98 51435 A (TANG WEIXIN ;WANG YUZHOU (US)) 19 novembre 1998 (1998-11-19) * abrégé *	1,18	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
			G01N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
2 octobre 2002		Moreno, C	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
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 T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

1

EPO FORM 1503 12.98 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0115011 FA 610852**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 02-10-2002
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 9816101	A	23-04-1998	US	5817458 A	06-10-1998
			US	5714390 A	03-02-1998
			AU	743937 B2	07-02-2002
			AU	4822497 A	11-05-1998
			EP	0933989 A1	11-08-1999
			JP	2001503859 T	21-03-2001
			WO	9816101 A1	23-04-1998
			US	2001039007 A1	08-11-2001
			US	2002037498 A1	28-03-2002
			WO 9720214	A	05-06-1997
WO	9720214 A1	05-06-1997			
US 5512332	A	30-04-1996	US	5597531 A	28-01-1997
			US	4795698 A	03-01-1989
			US	5698271 A	16-12-1997
			AT	137804 T	15-05-1996
			AU	6340390 A	03-04-1991
			CA	2060182 A1	23-02-1991
			DE	69026949 D1	13-06-1996
			DE	69026949 T2	28-11-1996
			EP	0489119 A1	10-06-1992
			JP	5503188 T	27-05-1993
			WO	9102811 A1	07-03-1991
			US	5108933 A	28-04-1992
			US	5866099 A	02-02-1999
			AT	156366 T	15-08-1997
			CA	1275533 A1	23-10-1990
			DE	3650644 D1	11-09-1997
			DE	3650644 T2	12-03-1998
			DE	3689618 D1	17-03-1994
			DE	3689618 T2	11-05-1994
			EP	0244444 A1	11-11-1987
			EP	0516198 A2	02-12-1992
			WO	8702063 A1	09-04-1987
			JP	2588181 B2	05-03-1997
JP	63501978 T	04-08-1988			
WO 9409368	A	28-04-1994	US	5466609 A	14-11-1995
			AU	5360394 A	09-05-1994
			CA	2146964 A1	28-04-1994
			DE	69331970 D1	04-07-2002
			EP	1213587 A1	12-06-2002
			EP	0665955 A1	09-08-1995
			JP	8502443 T	19-03-1996
			WO	9409368 A1	28-04-1994

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0115011 FA 610852**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 02-10-2002
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9409368 A		US 5639620 A	17-06-1997
		US 5776706 A	07-07-1998
		US 5707877 A	13-01-1998
WO 9851435 A	19-11-1998	AU 7685498 A	08-12-1998
		WO 9851435 A1	19-11-1998