

(19)



(11)

EP 2 501 475 B1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des Hinweises auf die Patenterteilung:
30.03.2016 Patentblatt 2016/13

(51) Int Cl.:
B01L 3/00 ^(2006.01) **B03C 1/00** ^(2006.01)
G01N 33/48 ^(2006.01)

(21) Anmeldenummer: **10816365.0**

(86) Internationale Anmeldenummer:
PCT/DE2010/001366

(22) Anmeldetag: **15.11.2010**

(87) Internationale Veröffentlichungsnummer:
WO 2011/060771 (26.05.2011 Gazette 2011/21)

(54) **SYSTEM UND EIN VERFAHREN ZUR DETEKTION VON IN FLÜSSIGEN PROBEN ENTHALTENEN ANALYTMOLEKÜLEN**

SYSTEM AND A METHOD FOR DETECTING ANALYTE MOLECULES CONTAINED IN LIQUID SAMPLES

SYSTÈME ET PROCÉDÉ POUR LA DÉTECTION DE MOLÉCULES D'ANALYTE CONTENUES DANS DES ÉCHANTILLONS LIQUIDES

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR

- **SCHILLING, Niels**
09648 Mittweida (DE)
- **GRUCHOW, Mathias**
01259 Dresden (DE)
- **HENKE, Markus**
01099 Dresden (DE)

(30) Priorität: **18.11.2009 DE 102009055800**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
26.09.2012 Patentblatt 2012/39

(74) Vertreter: **Pfenning, Meinig & Partner mbB**
Patent- und Rechtsanwälte
An der Frauenkirche 20
01067 Dresden (DE)

(73) Patentinhaber: **Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V.**
80686 München (DE)

(56) Entgegenhaltungen:
WO-A1-2008/096302 **WO-A1-2008/116941**
WO-A1-2008/155519 **WO-A2-2009/006409**
DE-A1-102004 040 785 **FR-A1- 2 863 117**
US-A1- 2004 018 611 **US-A1- 2005 287 577**

(72) Erfinder:
• **SONNTAG, Frank**
01277 Dresden (DE)
• **KLOTZBACH, Udo**
01326 Dresden (DE)

EP 2 501 475 B1

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents im Europäischen Patentblatt kann jedermann nach Maßgabe der Ausführungsordnung beim Europäischen Patentamt gegen dieses Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein System und ein Verfahren zur Detektion von in flüssigen Proben enthaltenen Analytmolekülen. Dies können insbesondere Proteine oder DNA sein. Besonders vorteilhaft ist ein Einsatz bei sehr kleinen Molekülen möglich

[0002] Üblicherweise wird so vorgegangen, dass eine flüssige Probe durch einen Messkanal strömt, in dem für die jeweiligen Analytmoleküle spezifische Liganden auf Messflächen immobilisiert sind, an die die Analytmoleküle anbinden können. Nach dem Anbinden erfolgt eine Detektion, bei der festgestellt werden kann, ob die jeweiligen Analytmoleküle in der Probe enthalten sind oder nicht. Es kann auch eine quantitative Bestimmung durchgeführt werden.

[0003] Die Analytmoleküle sind in der flüssigen Probe mehr oder weniger gleichmäßig verteilt und der Messkanal hat ein bestimmtes erforderliches Volumen. Dadurch bedingt strömt die flüssige Probe mit einer Mindestschichtdicke durch den Messkanal. Bevorzugt ist aber ein vollständiges Ausfüllen von Messkanälen. Der Analytmolekültransport zu den immobilisierten Liganden erfolgt dabei im Wesentlichen durch Konvektion und Diffusion. In der Nähe der Oberfläche von Messflächen, an denen Liganden immobilisiert sind, bildet sich eine Schicht aus, in der im Wesentlichen Diffusion auftritt. Diese wird als Nernstsche-Diffusionsgrenzschicht bezeichnet. Der Transport von Analytmolekülen zu Liganden ist dadurch behindert, wobei sich dieser Effekt mit steigender Dicke der Diffusionsschicht verstärkt.

[0004] Um diesen Nachteilen entgegenzutreten und die Bindungsrate von Analytmolekülen zu erhöhen und die Anbindung zu beschleunigen wurde in DE 10 2007 012 866 A1 vorgeschlagen, durch einen Flusskanal einen mit einer inerten Flüssigkeit gebildeten Hauptstrom zu führen. In diesen von Analytmolekülen freien Hauptstrom soll dann vor den eigentlichen Messflächen eine Zuführung für flüssige Probe angeordnet sein. Mit dem Hauptstrom kann eine Verdrängung der flüssigen Probe in Richtung auf die Messflächen mit den dort immobilisierten Liganden erreicht werden. Die flüssige Probe kann so als dünner Film über die Messflächen strömen.

[0005] Es liegt auf der Hand, dass durch den erforderlichen größeren freien Querschnitt des Flusskanals eine Vergrößerung des gesamten Systems hervorgerufen wird. Mit dem Hauptstrom kann ein Verdünnungseffekt für die Probe nicht vermieden werden. Außerdem kann nicht spezifisch bzw. selektiv auf das Anbindungsverhalten bestimmter Analytmoleküle Einfluss genommen werden.

[0006] Des Weiteren ist es bekannt, dass mittels Dielektrophorese eine Trennung oder Sortierung von Nanopartikeln oder auch Biomolekülen möglich ist. Eine geeignete Vorrichtung ist in der nicht vorveröffentlichten DE 10 2008 062 620 beschrieben.

[0007] Dabei sollen ober- und ggf. auch unterhalb eines Messkanals streifenförmige Elektroden in Abständen zueinander angeordnet und jeweils mit einer elektrischen Wechselspannung beaufschlagt sein. Die Polarität wechselt dabei von Elektrode zu Elektrode. Dabei soll mit bestimmter Frequenz unter Berücksichtigung des jeweiligen Clausius-Mossotti-Faktors eine Kraftwirkung auf Moleküle ausgeübt werden, um diese beim Durchströmen zu einer Messfläche hin oder unspezifisch gebundene Fremdmoleküle von dieser weg zu bewegen.

[0008] Dabei wirken sich Unterschiede der Flüssigkeit, in der die jeweiligen Analytmoleküle enthalten sind, aus und es ist sehr aufwändig die jeweilige den Clausius-Mossotti-Faktor berücksichtigende Frequenz zu bestimmen. Auch bei zumindest nahezu optimal eingehaltener Frequenz der elektrischen Wechselspannung müssen die Analytmoleküle eine bestimmte Größe aufweisen, um eine ausreichende Kraftwirkung zu erreichen.

[0009] Aus DE 697 29 101 T2 sind ein Gerät sowie ein Verfahren zum Trennen, Immobilisieren und Quantifizieren biologischer Substanzen bekannt. Dies soll mit Hilfe von externen und internen Magnetfeldern erreicht werden, die mit Permanentmagneten, die in Bezug zu einer ferromagnetischen Fängerkonstruktion an einem Trenngefäß angeordnet sind, ausgebildet werden sollen. Die Fängerkonstruktion soll dabei bevorzugt mit einem aus einem ferromagnetischen Werkstoff gebildeten Gitter ausgebildet sein, das an der oberen Innenwand des Trenngefäßes angebracht werden soll. Die Kraftwirkung des Magnetfeldes soll dabei Moleküle oder Zellen, die mit magnetisch reagierenden Teilchen gekoppelt sind, in Richtung auf die Fangkonstruktion ziehen und dort zu immobilisieren. Anschließend kann dann eine bevorzugt optische Detektion der Moleküle durchgeführt werden.

[0010] Insbesondere durch die Anordnung der Fängerkonstruktion wird aber eine Detektion behindert außerdem können unspezifisch gebundene Moleküle die Genauigkeit beeinträchtigen und auch eine Reinigung kann nicht ohne weiteres bzw. in einfacher Form durchgeführt werden.

[0011] FR 2 863 117 - A1 beschreibt ein Mikrosystem zur Verdrängung von Fluiden, wobei das Mikrosystem eine Mikroleitung mit mindestens einer Flüssigkeit und Mittel aufweist, die zum Einrichten einer primären Verdrängung des Fluids zwischen einem Einlass und einen Auslass der Mikroleitung verwendet werden. Weiterhin weist das Mikrosystem magnetohydrodynamischen Mittel auf, die mindestens eine sekundäre Verdrängung des Fluids bewirken. Die Erfindung kann auf dem Gebiet der Mikrofluidik, unter anderem zum Mischen von Fluiden und zum Abtasten von Teilchen an der Oberfläche von Reaktoren eingesetzt werden.

[0012] Es ist daher Aufgabe der Erfindung Möglichkeiten zu schaffen, um eine verbesserte Sensitivität von Analytmolekülen, mit einem einfach aufgebauten und wieder verwendbaren System, zu erreichen.

[0013] Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe mit einem System, das die Merkmale des Anspruchs 1 aufweist, gelöst.

Dabei kann mit einem Verfahren nach Anspruch 5 vorgegangen werden. Vorteilhafte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Erfindung sind mit in untergeordneten Ansprüchen bezeichneten Merkmalen realisierbar.

[0014] Beim erfindungsgemäßen System sind innerhalb eines Gehäuses in Strömungsrichtung eines Analytmoleküle enthaltenden Fluids an einem Messkanal an dessen Anfang und Ende jeweils mindestens eine Öffnung zu deren Zu- Und Abfuhr vorhanden. Eine Probe die Analytmoleküle und eine Flüssigkeit aufweist, kann so durch den Messkanal hindurchgeführt werden. Außerdem ist am Boden des Messkanals ein sensibler Flächenbereich vorhanden, auf dem im Messkanal Liganden für die jeweiligen Analytmoleküle immobilisiert werden können.

[0015] Das Gehäuse soll aus einem nichtmagnetischen und nicht magnetisierbaren Werkstoff gebildet sein. Hierfür können geeignete Polymere und/oder Aluminium eingesetzt werden.

[0016] Oberhalb des Messkanals ist im Gehäusewerkstoff oder an der oberen Wand des Messkanals mindestens ein Element aus einem ferromagnetischen Werkstoff angeordnet. Für die externe Ausbildung eines magnetischen Feldes sind an beiden Seiten des Messkanals parallel zur Strömungsrichtung zwei Permanentmagnete angeordnet bzw. sie können dort temporär angeordnet werden. Ein magnetisches Feld sollte innerhalb des Messkanals zumindest im Bereich, in dem das/die Element(e) aus ferromagnetischem Werkstoff angeordnet ist/sind, ausgebildet werden. In diesem Fall weisen die Analytmoleküle eine Suszeptibilität > 0 auf oder es sind an Analytmoleküle Teilchen gebunden deren Suszeptibilität > 0 ist. Dabei sollte bei an Analytmolekülen gebundenen Teilchen die Gesamtsuszeptibilität > 0 sein. Die Analytmoleküle und/oder Teilchen weisen daher paramagnetische, supermagnetische oder ferromagnetische Eigenschaften auf.

[0017] Bei einem nicht zur Erfindung gehörenden System können mehrere Permanentmagnete in einer Reihenordnung oberhalb des Messkanals angeordnet sein. Dabei sind die Permanentmagnete alternierend wechselnd magnetisiert. Die Polausrichtung von nebeneinander angeordneten Permanentmagneten ist demzufolge entgegengesetzt.

[0018] Diese Reihenordnung sollte zumindest im Bereich des sensiblen Flächenbereichs angeordnet sein.

[0019] Für eine Detektion wird bei diesem nicht zur Erfindung gehörenden System eine Probe eingesetzt, in der Analytmoleküle enthalten sind, die eine Suszeptibilität aufweisen, die ≤ 0 ist oder es sind an Analytmoleküle Teilchen gebunden deren Suszeptibilität ≤ 0 ist. Dabei sollte bei an Analytmoleküle gebundenen Teilchen die Gesamtsuszeptibilität ≤ 0 sein. Die Analytmoleküle und/oder Teilchen weisen dabei diamagnetische Eigenschaften auf.

[0020] Beim Durchströmen gelangt die Probe bei beiden alternativen Ausbildungen in den Einflussbereich des magnetischen Feldes, das mit den Permanentmagneten ausgebildet wird, so dass die Analytmoleküle mit einer in Richtung auf den Boden des Messkanals und den mit Liganden für Analytmoleküle immobilisierten sensiblen Flächenbereich wirkenden Kraft beaufschlagt werden.

[0021] Dabei kann ausgenutzt werden, dass eine auf magnetische bzw. magnetisierte Teilchen wirkende Kraft vom Gradienten der magnetischen Feldstärke innerhalb eines magnetischen Feldes beeinflusst werden kann. Die jeweilige Kraft ist dabei vom Verhältnis der Suszeptibilität der Teilchen und dem diese umgebenden Medium abhängig.

[0022] Bei der Erfindung kann ausgenutzt werden, dass ein mit Magneten ausgebildetes homogenes magnetisches Feld mit ferromagnetischen Elementen, die im magnetischen Feld angeordnet sind, beeinflusst werden kann. Diese Elemente werden magnetisiert und können zu Gradienten der magnetischen Feldstärke in bestimmten Richtungen führen, die von der jeweiligen Anordnung der Magnete und der ferromagnetischen Elemente abhängen. In der Ebene, die parallel zum externen magnetischen Feld ausgerichtet ist, weist der Gradient zu einem ferromagnetischen Element. Senkrecht dazu weist der Gradient der magnetischen Feldstärke vom ferromagnetischen Element weg.

[0023] Die Richtungsabhängige Kraft F ergibt sich zu

$$F = \frac{1}{2} V_p * (\chi_p - \chi_{fl}) * \mu_0 * \delta (H * H) / \delta .$$

[0024] Dabei ist χ_p - die Suszeptibilität (magnetisierbarkeit) der Analytmoleküle bzw. der an ihnen gebundenen magnetisierbaren Teilchen/Partikel, χ_{fl} - die Suszeptibilität der Probenflüssigkeit jeweils als dimensionslose Volumenmagnetisierbarkeit in SI-Einheit, V_p - Volumen der Analytmoleküle ggf. mit gebundenem magnetisierbaren Partikel und H - die magnetische Feldstärke.

[0025] Durch geeignete Wahl kann dementsprechend der Term $(\chi_p - \chi_{fl})$ positiv oder negativ sein, wodurch die Richtung der wirkenden Kraft F je nach dem Vorzeichen entsprechend um 180° verändert werden kann. Ein hierfür geeigneter Parameter ist eine entsprechende Auswahl einer Flüssigkeit für die jeweilige Probe mit einer kleineren oder größeren Suszeptibilität χ_{fl} , als der Suszeptibilität χ_p der Analytmoleküle.

[0026] Ein oder mehrere Elemente aus ferromagnetischem Werkstoff sollten bevorzugt in Strömungsrichtung vor dem sensiblen Flächenbereich angeordnet sein. Dadurch kann eine Kraftwirkung auf die Analytmoleküle, die dabei eine höhere Suszeptibilität χ_p aufweisen als die Suszeptibilität χ_{fl} der Probenflüssigkeit, vom einen oder den mehreren ferromagnetischen Element(en) weg in Richtung auf den Boden des Messkanals und wegen der Strömung auch in Richtung auf dem sensiblen Flächenbereich immobilisierte Liganden ausgeübt werden. Die jeweiligen Analytmoleküle können

dadurch besser und sicherer an die Liganden gebunden werden. Das erforderliche Probenvolumen kann klein gehalten und die erforderliche Zeit reduziert werden.

[0027] Die bei der Erfindung einsetzbaren ferromagnetischen Elemente können sehr flach ausgebildet und dabei parallel zum Boden des Messkanals ausgerichtet sein. Sie können beispielsweise streifenförmig und parallel zur Strömungsrichtung der Probe ausgerichtet sein. Sie sollten dabei eine Dicke von 0,1 mm bis 0,4 mm aufweisen und dabei ihre Breite mindestens Zehnfach größer sein.

[0028] Bevorzugt kann es auch sein, lediglich ein solches flächiges ferromagnetisches Element einzusetzen. Dessen Breite sollte dabei mindestens 80 % der Breite des Messkanals in Strömungsrichtung entsprechen.

[0029] Ein oder auch mehrere Elemente aus ferromagnetischem Werkstoff können günstigerweise in den Werkstoff des Gehäuses eingebettet werden. Ein unmittelbarer Kontakt zu Proben kann so vermieden werden. Es können eine dauerhafte exakte Positionierung beibehalten und Haftungsprobleme vermieden werden. Diese Elemente können aber auch in Form von Drähten mit kreisförmigem oder auch elliptischem Querschnitt ausgebildet sein.

[0030] Mit den beiden oder den Permanentmagneten sollte ein magnetisches Feld mit einer magnetischen Feldstärke H von mindestens 0,5 T ausgebildet werden können. Die Magnetisierung der Permanentmagnete sollte mindestens 0,5 T aufweisen.

[0031] Wie bereits vorab angedeutet, kann durch Auswahl einer geeigneten Flüssigkeit mit entsprechender größerer Suszeptibilität χ_{fl} die Kraftwirkungsrichtung die mit dem Gradienten der magnetischen Feldstärke hervorgerufen wird, bei unveränderter Anordnung der Permanentmagnete auch verändert werden. Dies kann für ein Spülen bzw. auch ein Entfernen/Ablösen von unspezifisch gebundenen anderen Molekülen vom sensitiven Flächenbereich, genutzt werden. Anstelle einer Probe kann vor oder auch nach einer Detektion eine Flüssigkeit mit größerer Suszeptibilität χ_{fl} , in der keine weiteren Moleküle, zumindest keine Analytmoleküle enthalten sind, durch den Messkanal strömen. Unspezifisch gebundene Moleküle, deren Bindungskräfte zu Liganden kleiner sind können so einfach abgelöst und aus dem Messkanal vor der eigentlichen Detektion der Analytmoleküle entfernt werden.

[0032] Bei einer deutlich größeren Suszeptibilität χ_{fl} einer solchen Flüssigkeit kann auch ein vollständiges Spülen des Messkanals erreicht und dabei zumindest auch die an Liganden gebundenen Analytmoleküle entfernt werden, so dass ein so gespültes und gereinigtes System erneut für eine Detektion einer anderen Probe nutzbar wird.

[0033] Für eine Detektion können beispielsweise Vollblutproben, Blutplasma oder andere Körperflüssigkeiten eingesetzt werden. Solche Proben können auch mehr oder weniger verdünnt sein. Dies kann mit entionisiertem Wasser erreicht werden.

[0034] Zum Spülen können als Flüssigkeit mit größerer Suszeptibilität χ_{fl} beispielsweise Mangan(II)-chlorid oder Gadolinium(III)-Komplexe eingesetzt werden.

[0035] Zur Verbesserung der Magnetisierbarkeit können an die jeweiligen Analytmoleküle sehr kleine ferromagnetische, paramagnetische oder superparamagnetische Teilchen angebunden werden, deren Größe einige wenige Nanometer beträgt. Diese Teilchen können aus Eisen, Nickel, Kobalt oder einer Legierung der genannten Metalle gebildet sein bzw. können diese auch als Mischung mit Polymer eingesetzt werden.

[0036] Die gleichen Effekte zum Spülen und Lösen von unspezifisch gebundenen Molekülen können aber auch dadurch erreicht werden, indem die Ausrichtung des externen magnetischen Feldes verändert wird. Dabei können die bis dahin an den beiden Seiten des Messkanals angeordneten zwei Permanentmagnete entfernt werden. Mindestens ein Permanentmagnet wird dann oberhalb des einen oder mehrerer aus einem ferromagnetischen Werkstoff gebildeter Elemente angeordnet. Das oder die Element(e) befinden sich dann zwischen diesem Magnet und dem Messkanal. Die durch den Gradienten der magnetischen Feldstärke hervorgerufene wirkende Kraft verändert dadurch ihre Richtung und ist entgegen gesetzt zur Krafrichtung, die zum Anbinden der Analytmoleküle an Liganden ausgenutzt worden ist. Die Größe der wirkenden Kraft ist dabei abhängig von der mit dem/den Permanentmagneten erreichbaren magnetischen Feldstärke und/oder dessen/deren Abstand zu dem/den ferromagnetischen Element(en).

[0037] Eine dritte Möglichkeit zum Spülen und/oder Entfernen unspezifisch gebundener Moleküle besteht mit der Durchströmung des Messkanals mit einer Spülflüssigkeit in entgegen gesetzter Richtung durch den Messkanal.

[0038] Die genannten Möglichkeiten zum Spülen und/oder Entfernen unspezifisch gebundener Moleküle können auch miteinander kombiniert eingesetzt werden.

[0039] Nachfolgend soll die Erfindung beispielhaft näher erläutert werden.

[0040] Dabei zeigen:

Figur 1 auf magnetisierbare Teilchen in einem magnetischen Feld wirkende Kraftvektoren, die bei der Erfindung ausgenutzt werden können;

Figur 2 eine schematische Darstellung eines erfindungsgemäßen Systems für ein Ablenken von Analytmolekülen in Richtung auf einen sensitiven Flächenbereich am Boden eines Messkanals;

Figur 3 eine schematische Darstellung eines Systems für ein Ablenken von Analytmolekülen in die entgegen gesetzte

Richtung vom Boden eines Messkanals weg, das nicht zur Erfindung gehört;

Figur 4 eine Explosionsdarstellung eines Beispiels eines erfindungsgemäßen Systems, bei dem zwei Permanentmagnete an den Seiten eines Messkanals angeordnet werden können und

5

Figur 5 eine Explosionsdarstellung eines weiteren Beispiels eines erfindungsgemäßen Systems.

[0041] Mit Figur 1 soll verdeutlicht werden, wie die Richtung von auf magnetische oder magnetisierbare Teilchen wirkende Kräfte in einem Magnetfeld je nach Ausrichtung des magnetischen Feldes ist. Diese kann durch eine Veränderung der Ausrichtung des magnetischen Feldes verändert werden kann.

10

[0042] In der schematischen Darstellung nach Figur 2 ist in einer Seiten- und Vorderansicht ein in einem Gehäuse 1 aus optisch transparentem Polymer ausgebildeter Messkanal 3 gezeigt, durch den eine Probe 2 geführt wird. Die Strömungsrichtung ist mit dem Pfeil angegeben. An die jeweiligen Analytmoleküle der Probe 2 sind Teilchen aus Eisen, Nickel, einer Legierung davon, die auch als Mischung mit Polymer eingesetzt werden können, mit einem Durchmesser von 5 nm bis 500 nm gebunden. Die so präparierten Analytmoleküle wiesen eine Suszeptibilität $\chi_p > 0$ bis 100 auf. Die Flüssigkeit der Probe hatte eine Suszeptibilität $\chi_{fl} < 0$. Bei Einsatz von Flüssigkeiten mit unterschiedlicher Suszeptibilität χ_{fl} , zur verbesserten Anbindung von Analytmolekülen, können die Teilchen auch magnetisierbare Polymere oder ein diamagnetisches Metall, wie Gold sein. Die Verbesserung der Anbindung durch Flüssigkeiten mit erhöhter Suszeptibilität führt eine negative Differenz im Term $(\chi_p - \chi_{fl})$ zu einer Ablenkung von Partikeln oder Analytmolekülen die diamagnetisch oder an die diamagnetische Partikel gebunden sind. Dies gilt jedoch nur für die zweite Alternative der Erfindung.

15

20

[0043] Im Deckel 1.1 des Gehäuses 1 ist in den polymeren Werkstoff ein aus Eisen gebildetes ferromagnetisches Element 6 eingebettet. Das Element 6 hat eine Dicke von 0,2 mm. Seine Breite soll 2,5 mm betragen. Der Messkanal 3 hat eine Länge von 8 mm bis 10 mm in Bezug zur Strömungsrichtung und eine Höhe von 50 μm .

[0044] An den beiden Seiten des Messkanals 3 sind hier nicht dargestellte Permanentmagnete 5 angebracht, mit deren Hilfe ein externes magnetisches Feld ausgebildet werden kann. Dabei weist der Nordpol des einen Permanentmagneten 5 in Richtung Messkanal 3 wohingegen der Südpol des auf der gegenüberliegenden Seite des Messkanals 3 angeordneten Permanentmagneten 5 zum Messkanal 3 weist. Die Magnetisierung der Permanentmagnete 5 soll mindestens 0,5 T betragen.

25

[0045] Mit Figur 2 wird durch den dunkler dargestellten Bereich der durch den Messkanal 3 strömenden Probe 2 verdeutlicht, wie sich Analytmoleküle durch die mit den Gradienten der magnetischen Feldstärke hervorgerufenen Kräfte in Richtung Boden des Messkanals 3 bewegen. Dort ist ein sensibler Flächenbereich 7 ausgebildet, auf dem Liganden für Analytmoleküle immobilisiert sind. Der sensitive Flächenbereich 7 kann mit einer dünnen Metallschicht, bevorzugt Gold oder Silber gebildet sein. In diesem Fall besteht die Möglichkeit die Detektion mittels einer SPR-Analyse durchzuführen, wie dies beispielsweise auch in DE 10 2008 062 620 beschrieben ist. Hierfür kann ein nicht dargestellter Lichtwellenleiter unterhalb des sensitiven Flächenbereichs 7 angeordnet sein, über den elektromagnetische Strahlung zumindest nahezu unter Totalreflexionsbedingungen auf die Unterseite des sensitiven Flächenbereichs 7 gerichtet werden kann. Die Auswertung der SPR-Analyse kann in an sich bekannter Form vorgenommen werden.

30

35

[0046] Mit Figur 3 ist ein nicht zur Erfindung gehörendes System in schematischer Form gezeigt. Dabei sind oberhalb des Messkanals 3 Permanentmagnete 5.1 und 5.2 in Strömungsrichtung der Probe 2 in Reihe angeordnet. Die nebeneinander angeordneten Permanentmagnete 5.1 und 5.2 sind jeweils entgegen gesetzt zueinander magnetisiert. Die Suszeptibilität χ_p der Analytmoleküle oder ggf. auch der Teilchen, die an Analytmoleküle gebunden sind, ist dabei kleiner als die Suszeptibilität χ_{fl} der Flüssigkeit bzw. des Fluids der Probe 2. Es wird deutlich, dass wie auch beim Beispiel nach Figur 2 eine Kraftwirkung auf die Analytmoleküle in der Probe 2 ausgeübt und für eine Bewegung in Richtung auf den am Boden des Messkanals 3 angeordneten sensitiven Flächenbereich 7 ausgenutzt werden kann, um das Anbindungsverhalten der Analytmoleküle an dort immobilisierte Liganden zu verbessern.

40

45

[0047] Zum Spülen bzw. Entfernen von unspezifisch gebundenen Molekülen kann, bei dem in Figur 2 gezeigten Beispiel, anstelle der Probe lediglich eine Spülflüssigkeit mit höherer Suszeptibilität χ_{fl} als der Suszeptibilität der der Probenflüssigkeit eingesetzt werden. Das Vorzeichen des Terms $(\chi_p - \chi_{fl})$ ändert sich und demzufolge ändert sich auch die Richtung der wirkenden Kräfte in die entgegen gesetzte Richtung, was zum Ablösen unspezifisch gebundener Moleküle führen kann. Bei größerer Differenz von χ_p und χ_{fl} können auch alle Moleküle abgelöst und der Messkanal 3 gereinigt werden.

50

[0048] Ein zum Anbinden von Analytmolekülen an Liganden genutztes Beispiel eines erfindungsgemäßen Systems ist in Figur 4 in einer Explosionsdarstellung gezeigt. Dabei können zwei Permanentmagnete 5 seitlich rechts und links vom Messkanal 3 in dort angeordnete Aufnahmen 9 eingesetzt sein oder für eine Detektion temporär eingesetzt werden. Oberhalb des Messkanals 3 ist im Deckel 1.1 des Gehäuses 1 ein plattenförmiges Element 6 aus Eisen in das Polymer des Deckels 1.1 eingebettet. Das Element 6 hat folgende Abmessungen L/B/H 10/2,5/0,2 mm.

55

[0049] Am Boden des Messkanals 3 ist wieder, wie bereits beschrieben, ein sensibler Flächenbereich 7 ausgebildet.

[0050] Beim Durchströmen einer Probe 2, wie bereits bei der Beschreibung von Figur 2 erläutert, wirken auf die magnetisierten Analytmoleküle Kräfte, die diese in Richtung Boden des Messkanals 3 und auch den sensitiven Flächen-

bereich 7 beschleunigen und dort kann so im Bereich oberhalb des sensitiven Flächenbereichs 7 eine Anreicherung von Analytmolekülen erreicht werden, wodurch das Anbindungsverhalten verbessert und die Bindungsrate erhöht werden können.

[0051] Zwischen Deckel 1.1 und Boden 1.3 des Gehäuses 1 ist ein Dichtungselement 1.2 aus einem Elastomer angeordnet, an dessen Unterseite in Richtung Boden 1.3 weisend eine Aussparung vorhanden ist, die den Messkanal 3 bildet. Auf der Oberfläche des Bodens 1.3 ist ein sensitiver Flächenbereich 7, als dünne Goldschicht ausgebildet. Dort können Liganden immobilisiert werden.

[0052] Im Deckel 1.1 ist eine weitere Aufnahme 10 ausgebildet, in die ein weiterer Permanentmagnet 8 eingesetzt werden kann, wenn gebundene Analytmoleküle oder unspezifisch gebundene Moleküle entfernt werden sollen. Dabei sind die vorab in die Aufnahmen 9 eingesetzten Permanentmagnete 5 aus diesen entfernt worden.

[0053] Die Richtung der wirkenden Kräfte hat sich durch den Einsatz und die Anordnung des Permanentmagneten 8 umgekehrt. Sie weist nun vom Boden 1.3 des Messkanals 3 weg in Richtung auf das aus ferromagnetischem Werkstoff gebildete Element 6. Es kann so ein Ablösen und Entfernen von Molekülen, auch solchen die an Liganden gebunden waren, aus dem Messkanal 3 erreicht werden.

[0054] Die Öffnungen für die Zu- und Abfuhr von Proben 2 können im Deckel 1.1 ausgebildet sein.

[0055] Die Figur 5 zeigt ein erfindungsgemäßes System ohne die beiden an den Seiten des Messkanals 3 angeordneten Permanentmagnete 5.

Ansonsten entspricht das in Figur 5 gezeigte System dem Beispiel nach Figur 4, wobei jedoch auf die Ausbildung von Aufnahmen 9 bzw. 10 im Deckel 1.1 zusätzlich verzichtet werden kann.

Patentansprüche

1. System zur Detektion von in flüssigen Proben enthaltenen Analytmolekülen, bei dem innerhalb eines Gehäuses (1) in Strömungsrichtung einer Analytmoleküle enthaltenden Probe (2) an einem Messkanal (3) an dessen Anfang und Ende jeweils mindestens eine Öffnung zu deren Zu- Und Abfuhr vorhanden sind; außerdem am Boden (1.3) des Messkanals (3) ein sensitiver Flächenbereich (7) angeordnet ist, und das Gehäuse (1) aus einem nichtmagnetischen und nicht magnetisierbaren Werkstoff gebildet ist, **dadurch gekennzeichnet, dass** oberhalb des Messkanals (3) im Gehäusewerkstoff oder an der oberen Wand des Messkanals (3) mindestens ein Element (6) aus einem ferromagnetischen Werkstoff angeordnet ist; und außerdem an beiden Seiten des Messkanals (3) parallel zur Strömungsrichtung zwei Permanentmagnete (5) angeordnet sind, mit denen ein magnetisches Feld innerhalb des Messkanals (3) zumindest im Bereich, in dem das/die Element(e) (6) aus ferromagnetischem Werkstoff angeordnet ist/sind, ausgebildet wird, dabei in der Probe (2) Analytmoleküle mit einer Suszeptibilität > 0 oder an Analytmoleküle Teilchen, deren Suszeptibilität > 0 ist, gebunden sind, enthalten sind, so dass die Analytmoleküle mit einer in Richtung auf der mit Liganden für Analytmoleküle immobilisierten sensitiven Flächenbereich (7) wirkenden Kraft beaufschlagbar sind.
2. System nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** das/die Element(e) (6) aus ferromagnetischem Werkstoff in Strömungsrichtung vor dem sensitiven Flächenbereich angeordnet ist/sind.
3. System nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** das/die ferromagnetische(n) Element(e) (6) eine Dicke im Bereich von 0,1 mm bis 0,4 mm aufweist/aufweisen und seine/ihre Breite mindestens Zehnfach größer ist.
4. System nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** innerhalb des Gehäuses (1) oberhalb des Messkanals (3) ein Element (6) aus einem ferromagnetischen Werkstoff angeordnet ist, dessen Breite mindestens 80 % der Breite des Messkanals (3) in Strömungsrichtung beträgt.
5. Verfahren zur Detektion von in flüssigen Proben enthaltenen Analytmolekülen, bei dem eine Analytmoleküle enthaltende Probe durch einen Messkanal (3), der innerhalb eines aus nichtmagnetischem oder nichtmagnetisierbarem Werkstoff gebildeten Gehäuses (1) ausgebildet ist, über einen am Boden des Messkanals (3) angeordneten sensitiven Flächenbereich (7) auf dem Liganden für die jeweiligen Analytmoleküle immobilisiert sind, geführt wird, beim Durchströmen des Messkanals (3) gelangt die Probe (2) in den Einflussbereich eines extern ausgebildeten Magnetfeldes, das mit zwei an beiden Seiten des Messkanals (3) angeordneten Permanentmagneten (5) und mittels mindestens einem oberhalb des Messkanals (3) angeordneten Elements (6) aus ferromagnetischem Werkstoff ausgebildet wird; so dass ein Gradient der magnetischen Feldstärke innerhalb des Messkanals (3) auftritt, der zu einer Kraftwirkung in Richtung Boden des Messkanals (3) und den sensitiven Flächenbereich (7) auf die Analytmoleküle führt, so dass

EP 2 501 475 B1

diese in Richtung auf Liganden beschleunigt und an diesen gebunden werden, wobei bei dem mit zwei Permanentmagneten (5) ausgebildeten magnetischen Feld die Analytmoleküle eine Suszeptibilität > 0 aufweisen oder an Analytmoleküle Teilchen, deren Suszeptibilität > 0 ist, gebunden sind.

- 5 **6.** Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** Permanentmagnete (5) mit einer Magnetisierung von mindestens 0,5 T eingesetzt werden.
- 10 **7.** Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** für ein Spülen und/oder ein Entfernen unspezifisch gebundener Moleküle eine Spülflüssigkeit mit entgegen gesetzter Strömungsrichtung durch den Messkanal (3) oder eine Flüssigkeit mit einer höheren Suszeptibilität χ_{fi} als der Suszeptibilität χ_p der Analytmoleküle, bei gleichzeitig an den beiden Seiten des Messkanals (3) angeordneten Permanentmagneten (5) und unverändertem magnetischen Feld geführt wird.
- 15 **8.** Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** zum Entfernen unspezifisch gebundener Moleküle eine Spülflüssigkeit durch den Messkanal (3) geführt wird und dabei die beiden Permanentmagnete (5) an den Seiten entfernt werden und mindestens ein Permanentmagnet (8) oberhalb des Messkanals (3) und dem/den Element(en) (6) aus ferromagnetischem Werkstoff angeordnet wird.
- 20 **9.** Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** zur Erhöhung des Suszeptibilität χ_p der Analytmoleküle, diese an ferromagnetische, paramagnetische oder superparamagnetische Teilchen/Partikel vor dem Einführen der Probe in den Messkanal (3) gebunden werden.

Claims

- 25 **1.** A system for the detection of analyte molecules contained in liquid samples in which at least one respective opening for the supply and removal of a sample (2) containing analyte molecules is provided at a start and at an end of a measurement channel (3) within a housing (1) in the direction of flow of said sample containing analyte molecules; in which in addition a sensitive surface region (7) is arranged at the base (1.3) of the measurement channel (3); and in which the housing (1) is formed from a nonmagnetic and non-magnetisable material,
- 30 **characterised in that**
at least one element (6) composed of a ferromagnetic material is arranged above the measurement channel (3) in the housing material or at the upper wall of the measurement channel (3); and **in that** in addition two permanent magnets (5) are arranged at both sides of the measurement channel (3) in parallel with the direction of flow, with which permanent magnets a magnetic field is formed within the measurement channel (3) at least **in that** region in which the element(s) (6) of ferromagnetic material is/are arranged and in this respect analyte molecules having a susceptibility > 0 or particles whose susceptibility > 0 and are bound to analyte molecules are contained in the sample (2) so that the analyte molecules can be acted on by a force acting in the direction toward the sensitive surface region (7) immobilised by ligands for analyte molecules.
- 35 **2.** A system in accordance with claim 1, **characterised in that** the element(s) (6) of ferromagnetic material is/are arranged before the sensitive surface region in the direction of flow.
- 40 **3.** A system in accordance with claim 1 or claim 2, **characterised in that** the ferromagnetic element(s) has/have a thickness in the range from 0.1 mm to 0.4 mm and its/their width(s) is/are at least ten times larger.
- 45 **4.** A system in accordance with one of the preceding claims, **characterised in that** an element (6) of a ferromagnetic material whose width amounts to at least 80% of the width of the measurement channel (3) in the direction of flow is arranged within the housing (1) above the measurement channel (3).
- 50 **5.** A method for the detection of analyte molecules contained in liquid samples, in which a sample containing analyte molecules is conducted through a measurement channel (3), which is configured within a housing (1) formed from nonmagnetic or non-magnetisable material, via a sensitive surface region (7) which is arranged at the base of the measurement channel (3) and on which ligands for the respective analyte molecules are immobilized;
- 55 on flowing through the measurement channel (3), the sample (2) enters into the region of influence of an externally formed magnetic field which is formed by two permanent magnets (5) arranged at both sides of the measurement channel (3) and which is formed by means of at least one element (6) of ferromagnetic material arranged above the measurement channel;

such that a gradient of the magnetic field strength occurs within the measurement channel (3) which results in a force effect in the direction of the measurement channel (3) and of the sensitive surface region (7) toward the analyte molecules such that they are accelerated in the direction of ligands and are bound thereto, wherein in the magnetic field formed by two permanent magnets (5), the analyte molecules have a susceptibility > 0 or particles whose susceptibility is > 0 are bound to analyte molecules.

6. A method in accordance with claim 5, **characterised in that** permanent magnets (5) are used having a magnetisation of at least 0.5 T.

7. A method in accordance with claim 5 or claim 6, **characterised in that** a flushing liquid having an opposite direction of flow or a liquid having a higher susceptibility χ_{fl} than the susceptibility χ_p of the analyte molecules is conducted through the measurement channel (3) for a flushing and/or for a removal of non-specifically bound molecules, with simultaneously permanent magnets (5) arranged at both sides of the measurement channel (3) and with an unchanged magnetic field.

8. A method in accordance with claim 5 or claim 6, **characterised in that** a flushing liquid is conducted through the measurement channel (3) for the removal of non-specifically bound molecules and in this connection the two permanent magnets (5) at the sides are removed and at least one permanent magnet (8) is arranged above the measurement channel (3) and above the element(s) (6) of ferromagnetic material.

9. A method in accordance with any one of the claims 5 to 7, **characterised in that** to increase the susceptibility of χ_p of the analyte molecules the latter are bound to ferromagnetic, paramagnetic or superparamagnetic particles before the introduction of the sample into the measurement channel (3).

Revendications

1. Système pour la détection de molécules d'analyte contenues dans des échantillons liquides, dans lequel un échantillon (2), contenu à l'intérieur d'une enveloppe (1) dans la direction d'écoulement d'une molécule d'analyte, est disposé contre un canal de mesure (3), tant au début qu'à l'extrémité duquel se trouve au moins une ouverture pour son amenée et son évacuation,

par ailleurs une zone plane sensible (7) étant disposée sur le fond (1, 3) du canal de mesure (3), et l'enveloppe (1) étant constituée d'un matériau amagnétique et non-aimantable,

caractérisé en ce qu'au-dessus du canal de mesure (3), dans le matériau de l'enveloppe ou sur la paroi supérieure du canal de mesure (3), au moins un élément (6) en un matériau ferromagnétique est disposé ; et par ailleurs, sur les deux côtés du canal de mesure (3), parallèlement à la direction de l'écoulement, deux aimants permanents (5) sont disposés, à l'aide desquels un champ magnétique est réalisé à l'intérieur du canal de mesure (3) au moins dans la zone dans laquelle le/les éléments (6) en un matériau ferromagnétique sont disposés, l'échantillon (2) contenant des molécules d'analyte ayant une susceptibilité > 0 ou des particules, dont la susceptibilité est > 0 , liées aux molécules d'analyte, de telle sorte que les molécules d'analyte peuvent être sollicitées par une force agissant dans la direction allant sur la zone plane sensible (7) immobilisée avec des ligands pour les molécules d'analyte.

2. Système selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** le/les éléments (6) en un matériau ferromagnétique sont disposés dans la direction de l'écoulement en amont de la zone plane sensible.

3. Système selon la revendication 1 ou 2, **caractérisé en ce que** le/les éléments ferromagnétiques (6) présentent une épaisseur comprise dans la plage de 0,1 mm à 0,4 mm, et sa/leur largeur est au moins dix fois plus grande.

4. Système selon l'une des revendications précédentes, **caractérisé en ce qu'**à l'intérieur de l'enveloppe (1), au-dessus du canal de mesure (3), est disposé un élément (6) en un matériau ferromagnétique dont la largeur est d'au moins 80 % de la largeur du canal de mesure (3) dans la direction de l'écoulement.

5. Procédé pour la détection de molécules d'analyte contenues dans des échantillons liquides, dans lequel un échantillon contenant des molécules d'analyte est guidé à travers un canal de mesure (3), qui est configuré à l'intérieur d'une enveloppe (1) formée d'un matériau amagnétique ou non-aimantable, en passant sur une zone plane sensible (7), disposée au fond du canal de mesure (3), zone sur laquelle sont immobilisés des ligands pour les molécules d'analyte correspondantes, lors du passage par le canal de mesure (3), l'échantillon (2) arrive dans la zone d'influence d'un champ magnétique

EP 2 501 475 B1

5 externe, qui est réalisé avec deux aimants permanents (5) disposés sur les deux côtés du canal de mesure (3), et à l'aide d'au moins un élément (6), en un matériau ferromagnétique, disposé par-dessus le canal de mesure (3) ; de façon qu'il se forme à l'intérieur du canal de mesure (3) un gradient de l'intensité du champ magnétique, qui conduit à un effet de force dans la direction du fond du canal de mesure (3) et de la zone plane sensible (7) sur les molécules d'analyte, de sorte que ces dernières sont accélérées dans la direction allant vers les ligands et se lient à ces derniers,

10 dans le champ magnétique réalisé avec les deux aimants permanents (5), les molécules d'analyte présentent une susceptibilité > 0 , ou des particules dont la susceptibilité est > 0 sont liées aux molécules d'analyte.

15 **6.** Procédé selon la revendication 5, **caractérisé en ce que** les aimants permanents (5) sont utilisés avec une aimantation d'au moins 0,5 T.

20 **7.** Procédé selon la revendication 5 ou 6, **caractérisé en ce que**, pour un rinçage et/ou une élimination des molécules à liaison non-spécifique, un liquide de rinçage est, dans une direction d'écoulement opposée, envoyé par le canal de mesure (3), ou un liquide ayant une sensibilité X_{r1} supérieure à la susceptibilité X_p des molécules d'analyte, dans le cas d'aimants permanents (5) disposés simultanément sur les deux côtés du canal de mesure (3), et d'un champ magnétique non modifié.

25 **8.** Procédé selon la revendication 5 ou 6, **caractérisé en ce que**, pour éliminer les molécules à liaison non-spécifique, un liquide de rinçage est envoyé par le canal de mesure (3), ce à l'occasion de quoi les deux aimants permanents (5) sont enlevés sur les côtés, et au moins un aimant permanent (8) est disposé au-dessus du canal de mesure (3) et du/des éléments (6) en un matériau ferromagnétique.

30 **9.** Procédé selon l'une des revendications 5 à 7, **caractérisé en ce que**, pour augmenter la susceptibilité X_p des molécules d'analyte, on lie ces dernières à des particules ferromagnétiques, paramagnétiques ou super-paramagnétiques avant d'introduire l'échantillon dans le canal de mesure (3).

35

40

45

50

55

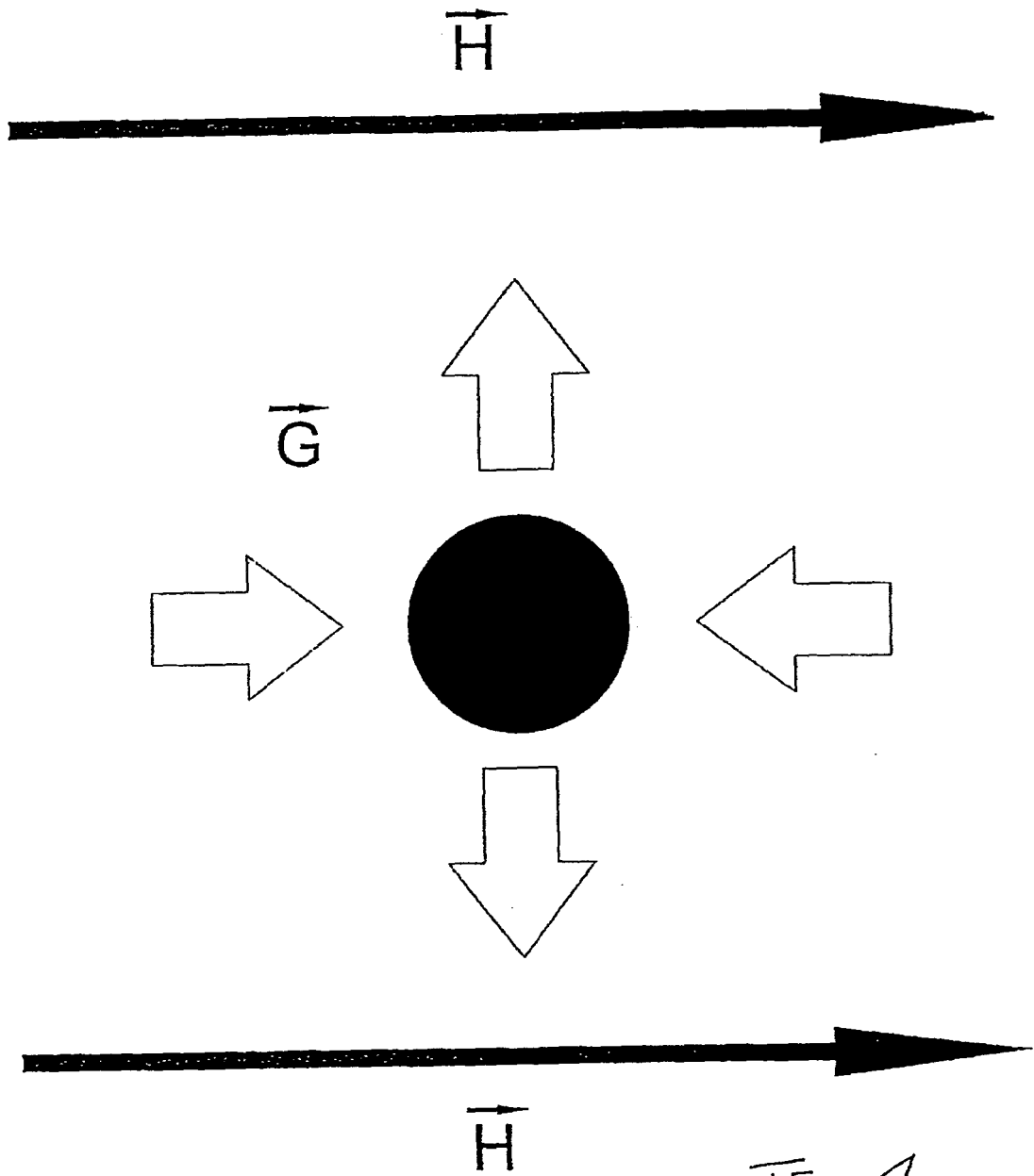


Fig. 1

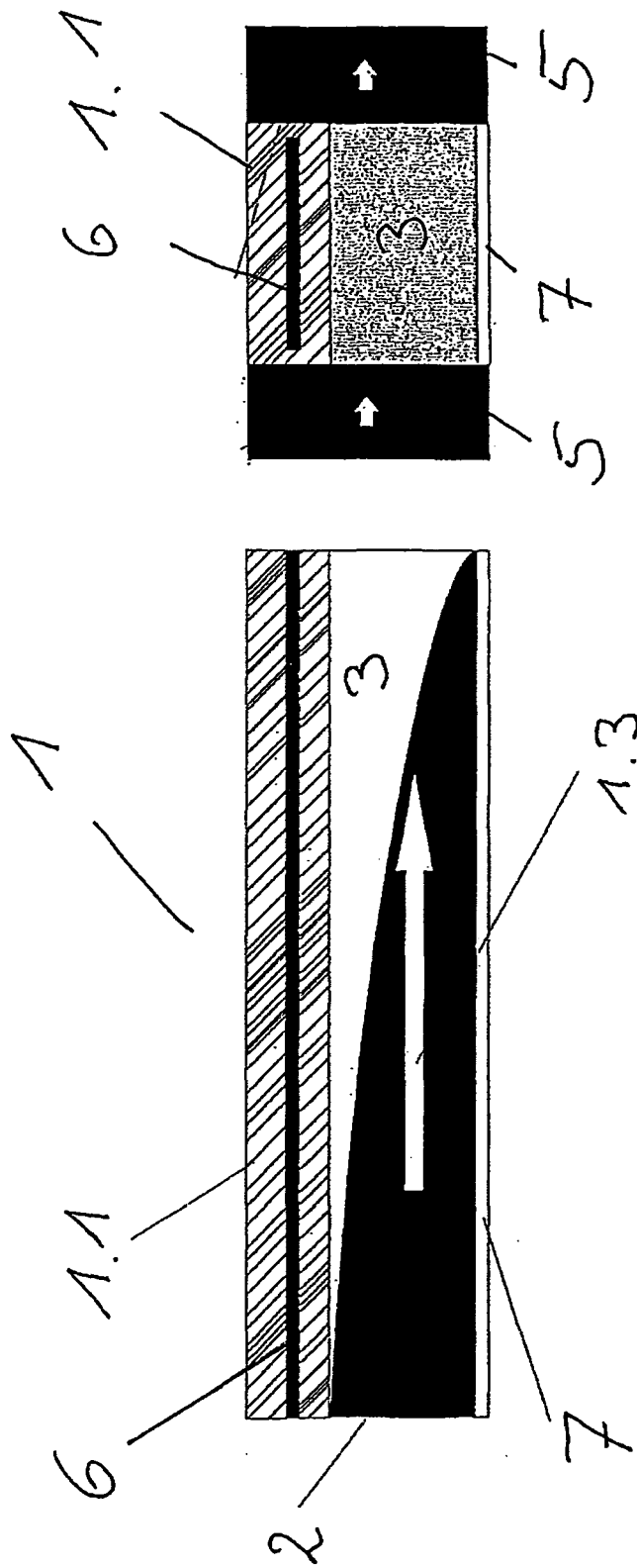


Fig. 2

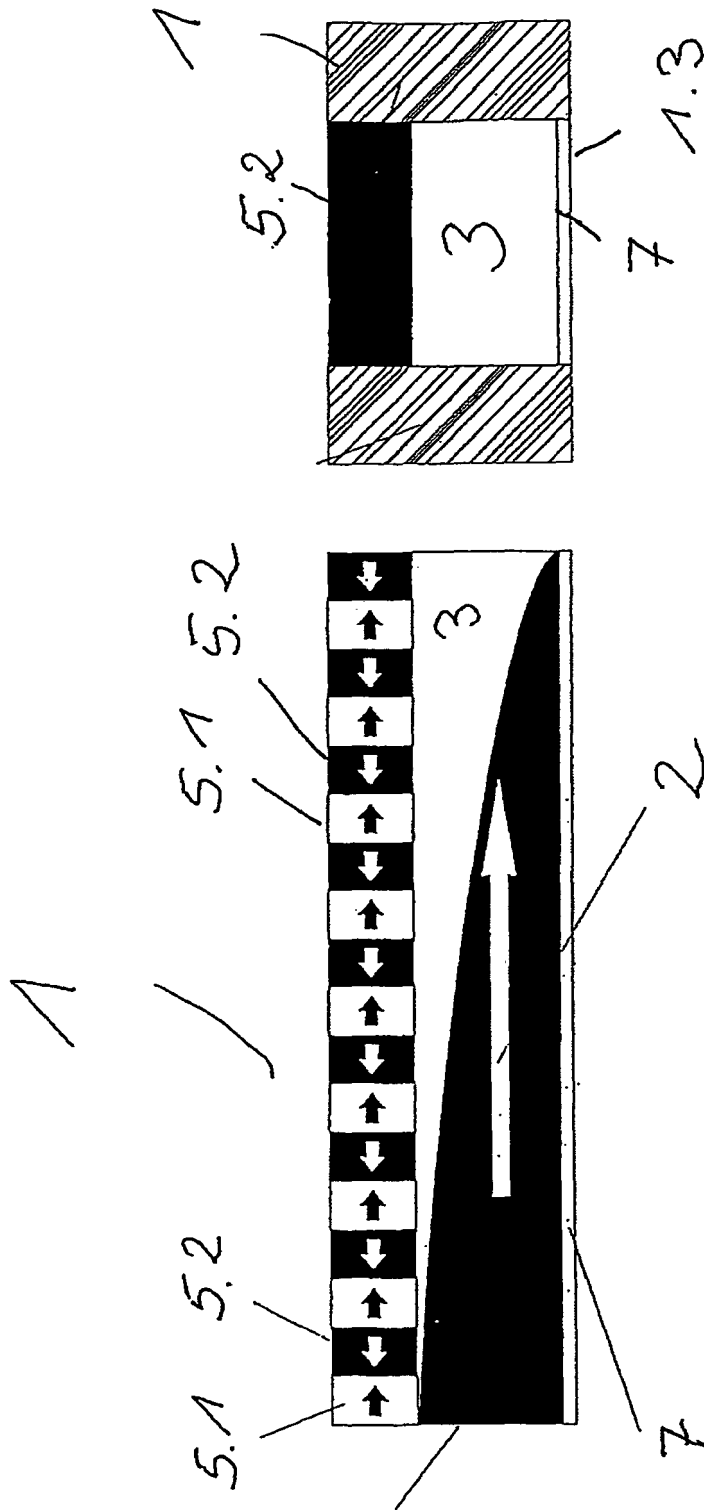


Fig. 3

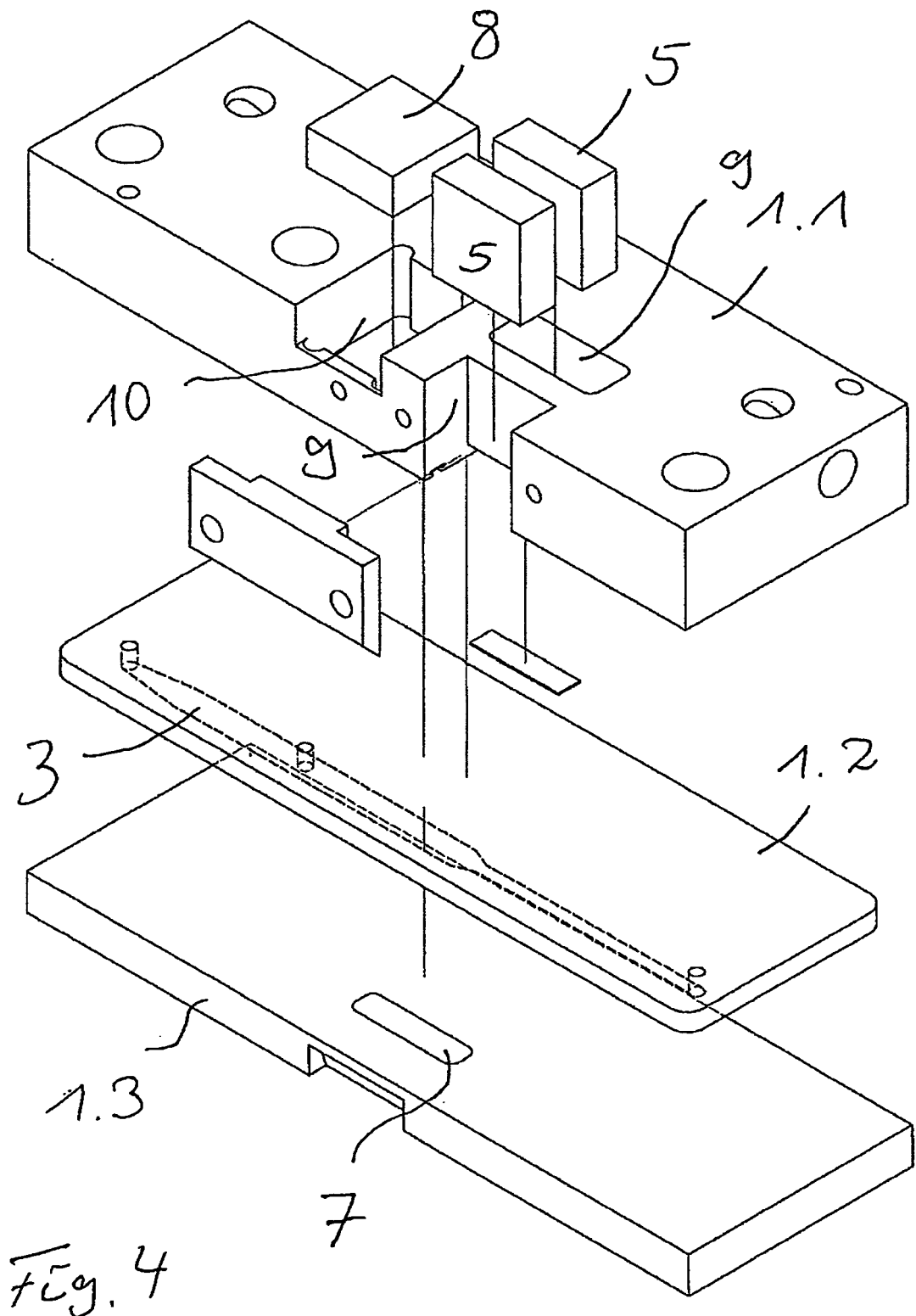
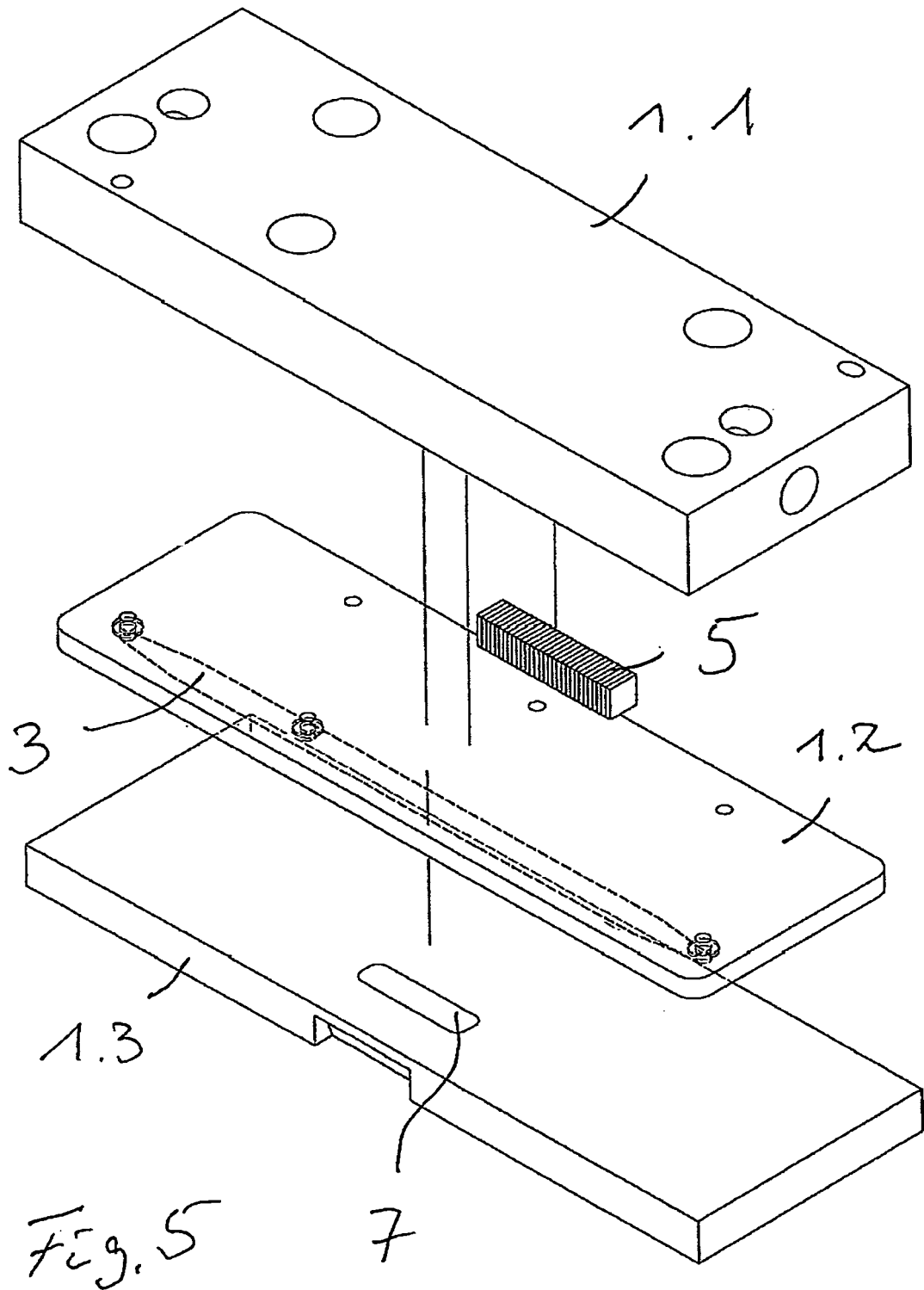


Fig. 4



IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde ausschließlich zur Information des Lesers aufgenommen und ist nicht Bestandteil des europäischen Patentdokumentes. Sie wurde mit größter Sorgfalt zusammengestellt; das EPA übernimmt jedoch keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

In der Beschreibung aufgeführte Patentdokumente

- DE 102007012866 A1 [0004]
- DE 102008062620 [0006] [0045]
- DE 69729101 T2 [0009]
- FR 2863117 A1 [0011]