



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 325 917**

51 Int. Cl.:
G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02796851 .0**

96 Fecha de presentación : **20.11.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1446666**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.08.2004**

54 Título: **Procedimiento de detección de analito(s) mediante partículas magnéticas coloidales.**

30 Prioridad: **20.11.2001 FR 01 15011**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.09.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.09.2009

73 Titular/es: **Diagnostica Stago**
9, rue des Frères Chausson
92600 Asnières, FR
Jérôme Bibette

72 Inventor/es: **Bibette, Jérôme;**
Baudry, Jean y
Rousseau, Alain

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 325 917 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de detección de analito(s) mediante partículas magnéticas coloidales.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento útil para detectar al menos una especie analítica en el seno de una muestra líquida, biológica o sintética, y que implica el acoplamiento de esta especie con un reactivo que se puede emparentar con un reactivo de aglutinación.

10 Hasta hoy, ya se han propuesto numerosos procedimientos llamados de aglutinación. Se utilizan principalmente para detectar antígenos y/o anticuerpos con vistas al diagnóstico. Estos procedimientos se aplican especialmente a las dosificaciones biológicas (pruebas de embarazo, pruebas de coagulación) o al diagnóstico de enfermedades infecciosas. Sin embargo, estos procedimientos tienen generalmente una sensibilidad limitada. Efectivamente, el principio general de estas pruebas consiste en detectar la formación de un gel de partículas coloidales que se forma en presencia del analito. El analito debe poder, en este tipo de test, enganchar dos partículas coloidales cuyas superficies están
15 cubiertas por una molécula que reconoce, en el sentido más amplio, el analito a dosificar. La presente invención se basa más especialmente en la utilización de partículas magnéticas a modo de reactivos coloidales de aglutinación. Ya se han empleado partículas magnéticas en técnicas de separación biológicas o de pruebas diagnósticas (WO 94/09368; EP 180 384; WO 98/51435). Las separaciones magnéticas resultan rápidas, fáciles de realización y precisan de un equipamiento simplificado. A partir de partículas magnéticas, cubiertas por una molécula que reconoce el analito a capturar, se puede separar, bajo el efecto de las fuerzas magnéticas, el analito en cuestión de una mezcla compleja. Este paso se emplea en el test llamado ELISA por ejemplo (*Enzyme Linked Immunoassay*). Las partículas magnéticas utilizadas incorporan a un material magnético, a saber por ejemplo magnetita, ferrita, óxido de cromo o níquel en una matriz, generalmente de naturaleza orgánica. Se funcionalizan en superficie mediante unos grupos reactivos de tipo antígeno, hapteno o anticuerpos destinados a reaccionar con la especie activa a separar.

25 Para evitar los problemas asociados a una remanencia magnética, se prefiere emplear un material superparamagnético en lugar de un material ferromagnético clásico. Los ferrofluidos, que tienen una magnetización muy elevada a saturación (superior a 100 mT) y no manifiestan remanencia magnética alguna en ausencia de un campo magnético externo son buenos candidatos para ser integrados en los protocolos de preparación de los coloides superparamagnéticos.

30 Por su parte, la presente invención se propone sacar provecho de la capacidad manifestada por estos coloides magnéticos para adoptar una organización estructural específica bajo el efecto de un campo magnético.

35 En este caso, la aglutinación inducida por el campo conduce, según la fracción en volumen de coloide, a unas "cadenas" aisladas o unos cúmulos de cadenas llamados "*clusters*". Cadenas o Clusters se designarán indiferentemente a continuación por cadenas. Se encontrará documentación detallada acerca de estas estructuras y su formación en numerosas publicaciones. En otros términos, en ausencia de un campo magnético, las partículas se presentan bajo una forma dispersa. En presencia de un campo magnético, se organizan para formar cadenas de partículas en solución acuosa. Estas cadenas son, obviamente, reversibles y se deshacen rápidamente cuando se deja de aplicar el campo magnético bajo el efecto de la agitación térmica. Ventajosamente, si estas partículas son suficientemente pequeñas, y por lo tanto brownianas y polarizables, estas cadenas se forman rápidamente en el eje del campo que se les aplica y no son sensibles a la gravedad. Este fenómeno se ilustra esquemáticamente en la figura 1A. La figura 1B muestra una microfotografía de las cadenas formadas por estas partículas en presencia de campo magnético.

45 De manera inesperada, los inventores han puesto de manifiesto que era posible sacar provecho de esta capacidad de las partículas coloidales magnéticas para organizarse rápidamente en cadenas de partículas bajo el efecto de un campo magnético, con una finalidad de detección y/o de cuantificación de especie(s) específica(s) en un medio líquido.

50 En este caso, cuando estas partículas coloidales magnéticas son cubiertas en superficie por unos ligantes específicos y la fase continua, en la cual están dispersadas, contiene una especie capaz de reaccionar frente a al menos dos ligantes específicos, el campo magnético catalizará el enganche de la especie considerada a dos partículas distintas y vecinas en la cadena inducida por el campo magnético. Tras la anulación del campo magnético, las partículas fijadas por la especie permanecen organizadas en cadenas permanentes e indican de este modo la presencia de la especie objetivo en el medio analizado.

55 Más concretamente, la presente invención tiene como objetivo principal un procedimiento de detección y/o de cuantificación de al menos un analito en un medio líquido, caracterizado por el hecho de que emplea partículas coloidales magnéticas funcionalizadas en superficie por al menos un ligante específico de un analito a detectar y/o dosificar y por el hecho de que comprende:

- 60
1. La puesta en contacto de dichas partículas con dicho medio,
 2. La aplicación de un campo magnético a dicho medio, a una intensidad suficiente para provocar la estructuración de dichas partículas magnéticas en forma de cadenas,
 - 65 3. El mantenimiento de este campo magnético una duración suficiente para permitir el acoplamiento o la asociación del analito considerado con al menos dos ligantes específicos presentes respectivamente en dos partículas vecinas de una cadena,

4. La anulación del campo magnético, y

- 5 5. La determinación de la presencia y/o la ausencia de dicho analito y, en este caso, de su concentración a través de la presencia o la ausencia de cadena(s) permanente(s) de partículas coloidales magnéticas en dicho medio líquido.

Hay que destacar que el orden en el cual se enumeran estas etapas corresponde a un modo de realización preferido de la invención, aunque también es posible en el marco de esta invención llevarlas a cabo en un orden diferente, por ejemplo activando el campo magnético antes de la introducción del medio a analizar.

Se puede también emplear, en el marco de la invención, una recolección de las partículas coloidales magnéticas ligadas por el analito que se está intentando detectar, dosificar o desplazar. Se pueden también emplear en el marco de la invención, geometrías de campo y de gradiente de campo, así como geometrías de “células de aglutinación” muy diversas. Estas variaciones están sujetas según los casos a optimizar a la vez la rapidez de la asociación ligante-receptor, y la detección de las cadenas permanentes que pueden ser de longitud y de espesor muy variable según las condiciones. En particular, la invención engloba los dispositivos microfluídicos, en los cuales la anchura o la altura de los canales es inferior a 100 Pm. Se pueden emplear campos orientados perpendicularmente o paralelamente al eje de los canales. Ventajosamente, el procedimiento se realiza en herramientas de diagnóstico, tales como dispositivos de análisis. Se prefieren especialmente los dispositivos de análisis automatizados. En lo que se refiere más especialmente a la caracterización de las cadenas permanentes, se puede realizar ventajosamente mediante un simple examen microscópico del medio analizado. Sin embargo, en especial en caso de realización en un dispositivo de análisis automatizado, es preferible detectar la presencia de las cadenas ópticamente. De este modo, se puede detectar la presencia de cadenas por medida de la difusión de la luz, por ejemplo por fotometría o turbidimetría. Otra variante la constituye el tratamiento de la imagen captada por ejemplo por una cámara CCD. Esta variante tiene la ventaja de permitir un análisis fino del tamaño de las cadenas. Para estas variantes de detección, se puede utilizar cualquier fuente de luz apropiada, preferentemente un láser. Obviamente, la formación de las cadenas, asimilables a los aglutinados convencionales, depende por un lado de la concentración del analito en el medio analizado y por otro lado de la concentración de partículas. Esquemáticamente, se puede considerar que más presente está el analito en dicho medio más largas serán las cadenas y cuanto más elevada sea la concentración de partículas, más espesas asimilables a cúmulos serán las cadenas. De este modo, en el marco de la presente invención resulta posible determinar la concentración de analito a partir de la cuantificación de la densidad de partículas magnéticas organizadas en forma de cadena(s) permanente(s). Esta medida de la densidad se puede llevar a cabo con técnicas convencionales. Para un analito determinado, se puede establecer previamente un calibrado de referencia.

El procedimiento reivindicado es especialmente interesante en términos de sensibilidad. De este modo resulta ventajoso para detectar analitos con reducidas concentraciones en medios líquidos.

Tal como se muestra en el ejemplo siguiente, las cadenas persisten para concentraciones en analitos, en este caso en antígenos, del orden de 10^{-9} moles/l frente a 10^{-5} moles/l para un test de aglutinación clásico, llevado con el mismo par ligante receptor (Biotina estreptavidina). Ventajosamente, este umbral de concentración es más reducido que el umbral de concentración necesario para la persistencia de agregados o la formación de un gel como el que se espera de un test de aglutinación clásico, llevado con el mismo par antígeno anticuerpos, y en ausencia de campo magnético. Por lo tanto, el procedimiento reivindicado puede sustituir ventajosamente a un test de aglutinación clásico, y aumentar ampliamente la sensibilidad del test.

En el contexto de la presente invención, el término coloidal significa que las partículas tienen un tamaño comprendido entre 5 y 10.000 nm y más preferentemente entre 100 y 500 nm. Sin embargo, es especialmente interesante favorecer la utilización de partículas lo más pequeñas posibles garantizando a la vez una susceptibilidad magnética suficiente para permitir una aglutinación inmediata bajo la acción conjugada de las fuerzas dipolares magnéticas y el movimiento browniano. Generalmente, este compromiso se alcanza con diámetros de partículas de, como mucho, algunas micras y preferentemente de aproximadamente 0,1 a 0,5 micras cuando la cantidad de material magnético, generalmente óxido de hierro encapsulado, es máxima. Por razones mencionadas más arriba, se prefiere la utilización de partículas coloidales superparamagnéticas. Existen varias tecnologías distintas para fabricar partículas coloidales superparamagnéticas con las propiedades requeridas relativas a la invención. Estas son, por ejemplo, técnicas de co-precipitación de un material polimérico natural o sintético con un ferrofluido acuoso, o de emulsión con un ferrofluido en fase orgánica.

La tecnología preferida para acceder a este tipo de material coloidal de manera controlada se basa en un principio de emulsión seguido de protocolos de polimerización y injerto. Estas emulsiones pueden, en especial, prepararse mediante cizallamiento de una mezcla constituida por un ferrofluido orgánico y una fase acuosa rica en tensioactivos. El ferrofluido se escoge de modo que su fase orgánica sea ligeramente soluble en fase acuosa. En este caso, cada gotita se transforma en un conglomerado esférico de partículas nanométricas del material magnético considerado, preferentemente óxido de hierro magnético (maghemita) con aproximadamente 60% en volumen de óxido de hierro en el seno de cada gotita. A continuación, se polimerizan las partículas así obtenidas introduciendo un monómero hidrófobo tal como el estireno, con la finalidad de que la reacción se produzca en el seno de las gotitas. La introducción de monómeros funcionales hidrosolubles al final de la polimerización garantiza una funcionalización de las superficies. El conjunto de estas dos operaciones, a saber la emulsificación y la polimerización, conduce a unas partículas esféricas, muy ricas en óxido de hierro, recubiertas por una capa polimerizada y funcionalizada. Para la preparación de esta

emulsión, se puede en especial recurrir al proceso publicado par J. Bibette en *J. Magn. and Magn. Mat.* v. 122, p. 37 (1993) y por T Mason y J Bibette en, *Phys. Rev. Lett.* 77, 3481 (1996) y en WO 9738787 y FR 2800836. Ventajosamente, el material magnético incorporado se selecciona de entre los óxidos de hierro, de cobalto o metales divididos y estabilizados y es preferentemente maghemita. Se incorpora a razón de 40% en volumen y preferentemente de 60% en partículas. Según una variante preferida de la invención, el material magnético de base es un ferrofluido. Las partículas coloidales magnéticas así obtenidas son especialmente ventajosas en la medida en que son compatibles con la inmovilización al nivel de su superficie de un elevado número de ligantes, y todo ello con procedimientos industriales convencionales.

Ventajosamente, se pueden asociar a una gran variedad de ligantes específicos para transformarlos en reactivos útiles en especial para inmunodosificación y pruebas de aglutinación tal como se describe en la presente invención. Las moléculas llamadas ligantes pueden ser inmovilizadas en la superficie de las partículas magnéticas coloidales mediante unas interacciones de adsorción, covalentes y/o de altas afinidades. El acoplamiento covalente puede, por ejemplo, ser realizado a partir de agrupamientos reactivos químicos presentes en la superficie de las partículas. A título ilustrativo de estos agrupamientos, se pueden además especialmente citar los agrupamientos carboxilo, amino, aldehído y epoxi. En el caso en que el analito que se quiere caracterizar es una especie química reactiva, estos agrupamientos pueden ellos mismos asegurar la función del ligante específico frente al analito objetivo. Por lo que se refiere a la inmovilización relevante de una interacción por alta afinidad, es generalmente mediada por dos parejas de un par de enlace de alta afinidad tales como (poli) carbohidrato/electina, biotina o compuestos biotinilados/avidina o estreptavidina, receptor de proteínas y su ligante específico, hapteno/anticuerpos etc... finalmente, la fijación del ligante a la superficie de las partículas puede ser realizada ya sea directamente o bien utilizando brazos distanciadores también designados por los términos "linker" o "spacer". Estas interacciones covalentes o por alta afinidad permiten la inmovilización de ligantes naturales o sintéticos, como por ejemplo péptidos, proteínas, incluyendo las glicoproteínas, las lipoproteínas y otras estructuras vecinas o derivadas, en forma libre o en un compuesto, inmunoglobinas, ácidos nucleicos tales como el ADN o el ARN y sus homólogos, sacáridos tales como los monosacáridos o disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, lípidos, hormonas, receptores, metabolitos u otras sustancias biológicas. Los analitos que pueden ser detectados y/o dosificados por el procedimiento reivindicado son preferentemente sustancias que pueden interactuar específicamente y con una afinidad elevada con las partículas funcionalizadas de la presente invención. Por lo tanto, se puede tratar de antígenos y de anticuerpos que pueden ser determinados mediante una reacción inmune, o ácidos nucleicos que pueden ser detectados por una reacción de hibridación, y más generalmente de cualquier tipo de proteína. Preferentemente, los analitos tienen un coeficiente de difusión en el seno del medio a analizar al menos igual al de dichas partículas.

El analito a identificar puede, en su forma natural, reaccionar con dos ligantes distintos, a imagen y semejanza por ejemplo de los antígenos y anticuerpos que ofrecen a menudo varios puntos de asociación. En caso contrario, se realiza previamente a la realización del procedimiento reivindicado, un pretratamiento del medio a analizar con el fin de volver reactivo el analito buscado respecto a al menos dos moléculas de uno de sus ligantes específicos. Este tipo de pretratamiento puede en especial consistir en una funcionalización del analito por al menos una molécula de una de las parejas de los pares llamados de alta afinidad discutidos más arriba. La realización de este tipo de pretratamiento entra en las competencias del experto en la materia.

Un primer modo de realización de la invención se refiere a la detección y/o la cuantificación de analito(s) de tipo anticuerpos en una muestra líquida, por ejemplo anticuerpos dirigidos contra patógenos tales como virus, bacterias o protozoos y otros agentes infecciosos, anticuerpos dirigidos contra tumores, anticuerpos dirigidos contra alérgenos, o autoanticuerpos.

Un segundo modo de realización de la invención se refiere a la detección y/o a la cuantificación de antígenos tales como antígenos libres tales como las proteínas y factores sanguíneos, los factores de coagulación, los metabolitos, hormonas, mediadores, etc., o los antígenos unidos a unos soportes, tales como los antígenos de superficie de microorganismos, los receptores de membrana, los antígenos de los grupos sanguíneos y del sistema mayor de histocompatibilidad, etc.

El procedimiento reivindicado también puede llevarse a cabo para la detección y/o la cuantificación de moléculas no biológicas tales como por ejemplo cualquier droga natural o artificial, sobreentendiéndose que la droga en cuestión puede tener directamente una doble afinidad para un ligante. Si este no es el caso, un pre-tratamiento deberá, por asociación, volver este tipo de analito bivalente con respecto al ligante designado. Esta invención puede en especial ser ventajosa en química analítica y micro analítica.

Según una variante particular de la invención, se pueden utilizar varios tipos de partículas coloidales magnéticas en un mismo test a modo de reactivos de aglutinación. Esto puede ser ventajoso en el caso en que el analito sería fácilmente reactivo con dos tipos de ligante. Por otro lado, las partículas coloidales empleadas según la invención pueden ser portadoras de un marcador anexo. Este marcado puede ser ventajoso en la medida en que puede permitir combinar un segundo modo de detección a modo de detección microscópica o simplemente mejorar la detección microscópica. Este marcador adjunto puede en especial ser caracterizable visualmente, ópticamente, mecánicamente y/o eléctricamente. Según esta variante de la invención, la caracterización de las cadenas puede ser realizada directamente por visualización con microscopio e indirectamente mediante un procedimiento óptico, mecánico y/o eléctrico según la naturaleza del marcador retenido. A título ilustrativo de los marcadores convenientes para la invención, se pueden en especial citar los pigmentos de color, agentes de fluorescencia o fosforescencia. Los medios líquidos analizados

pueden ser sintéticos o naturales como por ejemplo los fluidos biológicos. Puede tratarse en especial de fluidos corporales como, por ejemplo, la sangre (total o fraccionada), el suero, el plasma, la saliva y la orina y el líquido céfalo-raquídeo utilizados en forma diluida o no.

5 En lo concerniente al campo magnético, puede ser creado con ayuda de diferentes medios que son conocidos por el experto en la materia, por ejemplo los devanados de Helmholtz, los electroimanes o los imanes permanentes. El campo magnético continuo aplicado está generalmente comprendido entre 1 y 500 mT, preferentemente entre 1 y 100 mT.

10 Es generalmente ventajoso aplicar un campo magnético esencialmente uniforme. Un medio simple de crear un tal campo es colocar de parte y otra de la zona llamada de aglutinación dos polos, respectivamente norte y sur, de un imán permanente o de un electroimán. Otro medio consiste en construir un canal de eje esencialmente circular y concéntrico con una bobina de Helmholtz alimentada por un generador de corriente. Según un modo de realización preferido de la invención, se aplica un campo magnético oscilante (alternativo). La oscilación del campo magnético permite aumentar la probabilidad de que un analito a dosificar se encuentre a proximidad de dos ligantes específicos
15 presentes respectivamente en dos partículas. En cada ciclo de campo, las partículas pueden asociarse con el fin de formar o alargar las cadenas, sin afectar a las cadenas ya formadas. Por lo tanto, este medio permite optimizar la reacción entre los ligantes de las partículas coloidales magnéticas funcionalizadas y el analito a dosificar. De este modo se pueden dosificar además concentraciones reducidas de analito y obtener así una mejor sensibilidad del test. Hay que destacar, sin embargo, que determinadas aplicaciones de la invención pueden requerir un campo no uniforme.
20 Efectivamente se puede desear emplear a la vez un campo capaz de asegurar la aglutinación de las partículas y un gradiente de campo capaz de concentrar las cadenas en un lugar preciso. A la vez el campo y su gradiente podrán ser manipulados simultáneamente o separadamente. De este modo, es posible llevar a cabo primero la concentración de los analitos, y luego su revelación por formación de un cúmulo de tamaño suficiente. En otras aplicaciones que pertenecen al marco de la invención será preferible realizar la aglutinación en un canal microfluídico. Se sabe por
25 ejemplo (E. M. Lawrence y al., *Int. J. of Modern Phys. B*, 8, 2765-2777, 1994) que el diámetro y la separación de las columnas o cadenas ricas en partículas magnéticas dependen del campo magnético y del espesor de la célula. De este modo, es posible seleccionar las condiciones de aglutinación mejor adaptadas a la aplicación prevista. Los medios de introducción del medio a analizar pueden estar constituidos:

- 30 - por una o varias muescas o “pozos” en los cuales se deposita la muestra, como en la electroforesis en gel “*Electrophoresis: theory, techniques and biochemical and clinical applications*, A. T. Andrews, Oxford University Press, NY 1986”,
- o también un sistema de sobrepresión o depresión como en electroforesis capilar, ver por ejemplo “*Capillary Electrophoresis*”, P. D. Grossman, J. C. Colburn eds, Academic Press, San Diego, CA, USA, 1992),
35 - o también un canal por el cual un hilillo de muestra se vierte en continuo, como en electroforesis en vena líquida,
- 40 - o también uno de los modos de introducción de las muestras empleadas en cromatografía (“*Chromatographie en phase liquide et supercritique*”, R. Rosset, M. Caudé, A. Jardy, Masson ed., 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)
- 45 - o también cubetas u otros que continentes tales como los utilizados convencionalmente en los dispositivos de análisis automatizados.

En su realización más simple, la experiencia se desarrolla según el siguiente protocolo y sobre esta base será fácil concebir numerosas variantes. Unas partículas coloidales con las propiedades descritas anteriormente se fijan mediante anticuerpos específicos de un antígeno a dosificar. Con finalidades de claridad, se considera en esta descripción el
50 par ligante-receptor estreptavidina-biotina. La estreptavidina se fija a las partículas, el antígeno a detectar, a título de ejemplo, es un pequeño polímero polietileno glicol fijado en sus dos extremos por una molécula de biotina. Si se mezcla una cantidad suficiente de este antígeno con partículas con una fracción en volumen de 1% o más, la aglutinación en forma de gel, tal como se espera en el test clásico de aglutinación, es visible en algunos segundos, incluso algunos
55 minutos. Se considera C^* la concentración de antígeno tal que, por debajo de este valor, la aglutinación en el sentido clásico no sea detectable.

La experiencia, según la invención, consiste en mezclar partículas con una fracción en volumen del orden de 0,1%, con el antígeno a una concentración C muy inferior a C^* y designada por C^*/x , en aspirar la mezcla 3 en un capilar
60 de sección rectangular (espesor 20 a 50 Pm) y en aplicar un campo magnético paralelo al eje del capilar. El campo puede aplicarse mediante dos imanes dispuestos de parte y otra del capilar. El campo se mantiene dos minutos, a título de ejemplo, con una intensidad de al menos 500 Gauss. El capilar es a continuación observado con un microscopio para detectar la presencia de cadenas o de cúmulos. De este modo, el ejemplo del par biotina-estreptavidina permite establecer que la detección de los cúmulos según el protocolo de aglutinación sometida a campo puede intervenir hasta
65 unas concentraciones en antígeno del orden de $C^*/1000$.

El procedimiento reivindicado es especialmente interesante para la detección y en este caso la cuantificación de al menos un analito en un sistema microfluídico. En este modo de realización específico, se puede en especial concebir

realizar la aglutinación magnética en una primera zona del sistema microfluídico y la detección en una zona distinta. Este modo de realización se presta en especial ventajosamente al aislamiento de las cadenas permanentes de partículas, no habiendo las partículas padecido la aglutinación. Una aplicación especialmente interesante del procedimiento según la invención la constituye el análisis multicriterio, que permite la dosificación simultánea de varios analitos en un mismo test. Según este modo de realización, se utilizan varias poblaciones de partículas coloidales magnéticas funcionalizadas. Cada población de partículas se funcionaliza mediante al menos un ligante específico de uno de los analitos a detectar. La aplicación de un campo magnético oscilante conduce entonces a la formación progresiva de cadenas formadas de partículas de la misma población, específicas para cada analito. Con el fin de permitir su distinción y por lo tanto la lectura de la dosificación, las diferentes poblaciones de partículas coloidales magnéticas llevan un marcador adjunto específico para cada analito a detectar.

La presente invención se ilustrará mejor con los ejemplos siguientes, y con referencia a las figuras que muestran:

La figura 1: Esquema y microfotografía del principio de formación de líneas de partículas coloidales magnéticas bajo campo magnético.

La figura 2: una microfotografía de una solución que contiene partículas coloidales magnéticas fijadas y BSA biotinilado tras interrupción del campo.

La figura 3: gráfico que muestra la longitud media de las líneas en función de la concentración en BSA biotinilado en la solución sometida campo y tras interrupción del campo.

La figura 4A muestra una microfotografía de una solución según el ejemplo 2 para una dilución 0% (testigo);

La figura 4B muestra una microfotografía de una solución según el ejemplo 2 para una dilución de 0,1%;

La figura 4C muestra una microfotografía de una solución según el ejemplo 2 para una dilución de 1%;

La figura 4D muestra una microfotografía de una solución según el ejemplo 2 para una dilución de 100%.

Ejemplo 1

Detección de un analito con ayuda de partículas magnéticas coloidales

El ejemplo ilustra la detección de un analito modelo proveniente del par de fuerte afinidad biotina/estreptavidina y se propone caracterizar el umbral de sensibilidad del procedimiento reivindicado para un determinado analito. El analito está constituido por biotina, estando fijada la estreptavidina a las partículas coloidales. Más concretamente, el analito biotinilado está compuesto por un polímero Polietileno glicol de masa 5000, fijado a estos dos extremos por una molécula de biotina. Estos productos están disponibles comercialmente (Shearwater USA). Las partículas superparamagnéticas coloidales fijadas con estreptavidina se obtienen previamente. Las partículas coloidales se obtienen según el proceso publicado por J. Bibette en *J. Magn. y Magn. Mat.* v. 122, p. 37 (1993) y F. Leal Calderon, T. Stora, O. Mondain-Monval, P. Poulin, y J. Bibette, *Phys. Rev. Lett.*, 72, 2959 (1994) o según el procedimiento publicado por T. Mason y J. Bibette en *Phys. Rev. Lett.* 77, 3481 (1996) y en WO 9738787. La polimerización de estas partículas se obtiene según el protocolo descrito en la solicitud FR 2800836. La fijación de la estreptavidina a los grupos carboxílicos es bien conocida por el experto en la materia. Se podrá inspirar en: Molday RS, Dreyer WJ, Rembaum A, Yen SP, *J Cell Biol* 1975 Jan; 64(1):75-88 y Staros JV, Wright RW, Swingle DM, *Anal Biochem.* 1986 Jul; 156 (1):220-2. El test de aglutinación en presencia de campo consiste en mezclar las partículas coloidales magnéticas fijadas mediante la estreptavidina a los analitos llamados PEG biotina. El modo de detección empleado es la observación directa con microscopio. Para una determinada fracción en volumen Φ en partículas, del orden de 10^{-4} a 10^{-2} , se hace variar la concentración en analitos C para detectar el límite de sensibilidad del test. Para cada ensayo, se aspira la mezcla considerada en un capilar plano de 50 micras de espesor, que se dispone entre dos imanes planos, de modo que el campo producido sea superior a aproximadamente 50 mT y paralelo al eje del capilar. Este campo se crea con ayuda de imanes planos comerciales. Se aplica 2 minutos aproximadamente y el capilar se observa al microscopio en ausencia de campo. El test es positivo cuando se puede ver con el microscopio la presencia de cadenas o de cúmulos (ver figura 2) y negativo cuando las partículas se vuelven a dispersar espontáneamente bajo la acción de la agitación térmica. Resulta que según este modo de realización, el test permanece positivo hasta una concentración en analitos del orden de 10^{-9} mol/l. A título de comparación, por debajo de 10^{-5} mol/l, se vuelve imposible llevar a cabo un test de aglutinación clásico.

En un estudio complementario, se ha determinado la longitud media de las cadenas ha en función de la concentración del analito a dosificar (BSA biotinilado, 8 a 12 biotinas/BSA). La figura 3 muestra la longitud media de las cadenas tras 30 minutos en presencia de campo magnético de 10 mT (línea continua) y tras 24 horas en ausencia de campo (línea a trazos) en función de la concentración en BSA biotinilado. Se constata que la aplicación del campo magnético permite la detección rápida del analito para concentraciones de analitos que pueden descender hasta 10^{-9} mol/L, o incluso menos, lo cual representa una sensibilidad superior a la de las pruebas que se comercializan actualmente. Además, se destaca que la longitud media de las cadenas formadas aumenta en función de la concentración de analito. Así, el procedimiento de la invención permite también la detección cuantitativa del analito a dosificar mediante la determinación de la longitud media de las cadenas.

Ejemplo 2

Preparación de partículas coloidales magnéticas fijadas mediante inmunoglobulinas G anti-vWF (IgG) y dosificación del factor von Willebrand

Se prepara 200 Pl de una solución coloidal de partículas al 1% en volumen de partículas coloidales magnéticas (diámetro 206 nm, disponibles en Ademtech, France) en un tampón de fosfato (20 mM, pH 7,2).

Con la finalidad de activar las partículas, se añaden a la solución 200 Pl de solución acuosa de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) a 0,01 g/l y se mantiene bajo agitación durante 20 minutos a 44°C. A continuación se elimina el exceso de eDAC por lavado con una solución acuosa de Tween 20 a 0,001%. A continuación, se procede a la fijación de las IgG a las partículas coloidales añadiendo 400 Pl de solución coloidal de partículas activadas a 400 Pl de solución de igG (1,7 Pl de solución IgG a 20 mg/ml en 398 Pl de agua). Se mantiene la solución bajo agitación durante 20 minutos a 44°C, y luego durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se elimina el exceso de solución de igG por aclarado con un tampón de saturación (tampón de glicina, BSA, 0,001% de Tween 20). Las partículas fijadas así obtenidas son a continuación separadas por filtración a través de un filtro 1,2 Pm. Las partículas fijadas así preparadas presentan una fijación de anticuerpos de densidad y de orientación controlada. Además, la fijación es estable, incluso en presencia de surfactantes u otras proteínas en la solución. Para la dosificación del factor von Willebrand, se utiliza el plasma de calibración del Liatest® vWF (STA® vWF Calibrator, disponible en Diagnostica Stago) que contiene 200% (2 unidades internacionales) de factor von Willebrand y se procede sensiblemente tal como se indica en el folleto de utilización de este test, con la excepción de que se utiliza la solución coloidal de partículas magnéticas fijadas.

Se preparan diluciones de plasma al 100%, 1%, 0,1% de factor von Willebrand con tampón Owren-Koller. A título de testigo (0%), se utiliza el tampón Owren-Koller. A continuación, se añaden a 1 volumen de cada una de estas diluciones 2 volúmenes de tampón glicina y 3 volúmenes de la solución coloidal de partículas magnéticas fijadas. Entonces, la solución obtenida se coloca en un capilar cuadrado de 50 Pm de sección. El conjunto se somete a campo durante 5 minutos a una intensidad de 70 mT. Tras interrupción del campo, la muestra se coloca en la platina de un microscopio óptico. La figura 4 A, B, C y D muestra la apariencia de las muestras bajo el microscopio para las diferentes diluciones estudiadas. Se constata en especial que el procedimiento descrito también permite la distinción visual de una muestra a 0,1% del testigo (0%). Este resultado es mejor que el umbral de detección de 2% indicado para el Liatest®.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la CEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 9409368 A [0002]
- WO 9738787 A [0014] [0027]
- EP 180384 A [0002]
- WO 9851435 A [0002]
- FR 2800836 [0014] [0027]

Documentos que no son patentes citados en la descripción

- J. BIBETTE. *J. Magn. and Magn. Mat.*, 1993, vol. 122, 37 [0014] [0027]
- T MASON; J BIBETTE. *Phys. Rev. Lett.*, 1996, vol. 77, 3481 [0014] [0027]
- E. M. LAWRENCE *et al.* *Int. J. of Modern Phys. B*, 1994, vol. 8, 2765-2777 [0022]
- A. T. ANDREWS. *Electrophoresis: theory, techniques and biochemical and clinical applications. Oxford University Press*, 1986 [0022]
- Capillary Electrophoresis. *Academic Press*, 1992 [0022]
- Chromatographie en phase liquide et supercritique. 1991 [0022]
- Practical High Performance Liquid Chromatography. V. R. MEYER. *Chromatography of polymers. ACS publ*, 1993 [0022]
- F. LEAL CALDERON; T. STORA; O. MONDAIN-MONVAL; P. POULIN; J. BIBETTE. *Phys. Rev. Lett.*, 1994, vol. 72, 2959 [0027]

ES 2 325 917 T3

- **MOLDAY RS; DREYER WJ; REMBAUM A; YEN SP.** *J Cell Biol*, Janvier 1975, vol. 64 (1), 75-88 [0027]
- **STAROS JV; WRIGHT RW; SWINGLE DM.** *Anal Biochem.*, Juillet 1986, vol. 156 (1), 220-2 [0027]

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección y/o de cuantificación de al menos un analito en un medio líquido, **caracterizado** por el hecho de que emplea partículas coloidales magnéticas funcionalizadas en superficie por al menos un ligante específico de un analito a detectar y/o dosificar y por el hecho de que comprende:

- 1) la puesta en contacto de dichas partículas con dicho medio a analizar,
- 2) la aplicación de un campo magnético a dicho medio, a una intensidad suficiente para provocar la estructuración de dichas partículas magnéticas en forma de cadenas,
- 3) el mantenimiento de este campo magnético una duración suficiente para permitir el acoplamiento o la asociación del analito considerado con al menos dos ligantes específicos presentes respectivamente en dos partículas vecinas consecutivas de una cadena,
- 4) la anulación del campo magnético, y
- 5) la determinación de la presencia y/o la ausencia de dicho analito y, en este caso, su concentración a través de la presencia y/o la ausencia de cadena(s) permanente(s) de partículas coloidales magnéticas.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que dichas partículas son partículas coloidales superparamagnéticas.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** por el hecho de que las partículas coloidales superparamagnéticas se obtienen por co-precipitación de un polímero con un ferrofluido acuoso o por emulsión con un ferrofluido en fase orgánica.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** por el hecho de que las partículas magnéticas coloidales tienen un tamaño comprendido entre 5 y 10 000 nm y más preferentemente entre 100 y 500 nm.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** por el hecho de que los ligantes específicos se inmovilizan en la superficie de las partículas, mediante unas interacciones de absorción, covalentes y/o de altas afinidades.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** por el hecho de que el ligante inmovilizado es una de las dos parejas de un par de enlace de alta afinidad.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** por el hecho de que el ligante se selecciona de entre una de las parejas de los pares (poli)carbohidrato/electina, biotina o compuestos biotinilados/avidina o estreptavidina, receptor de proteínas y su ligante específico, y hapteno/anticuerpos.

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** por el hecho de que el ligante inmovilizado es un compuesto seleccionado de entre los péptidos, proteínas, incluyendo las glicoproteínas, las lipoproteínas, y otras estructuras vecinas o derivadas, en forma libre o en un compuesto, inmunoglobinas, ácidos nucleicos tales como el ADN o el ARN y sus homólogos, sacáridos tales como los monosacáridos o disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, lípidos, hormonas, receptores, des metabolitos u otras sustancias biológicas.

9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** por el hecho de que los analitos objetivo son unos antígenos, anticuerpos y ácidos nucleicos y/o proteínas.

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** por el hecho de que el medio a analizar se somete previamente a un pretratamiento con la finalidad de convertir en reactivo el analito buscado respecto a al menos dos moléculas de uno de sus ligantes específicos.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, **caracterizado** por el hecho de que el pretratamiento comprende una funcionalización del analito por una de las parejas de un par de enlace de alta afinidad.

12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la detección y/o la cuantificación de analito(s) de tipo anticuerpos o patógenos tales como virus, bacterias o protozoos y otros agentes infecciosos, anticuerpos contra tumores, anticuerpos dirigidos contra alérgenos, o autoanticuerpos.

13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la detección y/o la cuantificación de antígenos tales como antígenos libres como las proteínas y factores sanguíneos, tales como los factores de coagulación, los metabolitos, hormonas, mediadores, o los antígenos ligados a unos soportes, tales como los antígenos de superficie de microorganismos, los receptores de membrana, los antígenos de los grupos sanguíneos y del sistema mayor de histocompatibilidad.

ES 2 325 917 T3

14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado** por el hecho de que las partículas magnéticas coloidales llevan además un portador adjunto.

5 15. Procedimiento según la reivindicación 14, **caracterizado** por el hecho de que este marcador se puede caracterizar visualmente, ópticamente, mecánicamente y/o eléctricamente.

16. Procedimiento según la reivindicación 14 ó la 15, **caracterizado** por el hecho de que este marcador se selecciona de entre los pigmentos de color y agentes de fluorescencia o fosforescencia.

10 17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, **caracterizado** por el hecho de que se emplean varias poblaciones de partículas coloidales magnéticas funcionalizadas respectivamente por al menos un ligante específico de los diferentes analitos a detectar.

15 18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, **caracterizado** por el hecho de que el campo magnético es continuo.

19. Procedimiento según la reivindicación 18, **caracterizado** por el hecho de que el campo magnético continuo es de 5 a 500 mT, preferentemente 10 a 100 mT.

20 20. procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, **caracterizado** por el hecho de que el campo magnético es alternativo.

25 21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, **caracterizado** por el hecho de que la caracterización de las cadenas se hace directamente por visualización mediante microscopio y/o en este caso indirectamente mediante cualquier procedimiento óptico, mecánico, eléctrico.

22. Procedimiento según la reivindicación 21, **caracterizado** por el hecho de que la caracterización de las cadenas se realiza por fotometría o turbidimetría.

30 23. Procedimiento según la reivindicación 21, **caracterizado** por el hecho de que la caracterización de las cadenas se realiza por tratamiento de imágenes.

24. Procedimiento según la reivindicación 23, **caracterizado** por el hecho de que se utiliza como sensor de imagen una cámara CCD.

35 25. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, **caracterizado** por el hecho de que se utiliza como fuente de luz un láser.

40 26. Utilización del procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 para la detección y/o la cuantificación de al menos un analito en un sistema microfluídico.

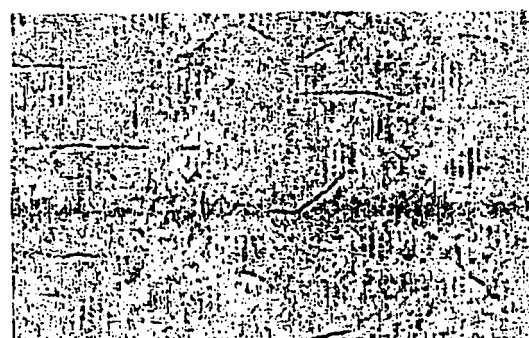
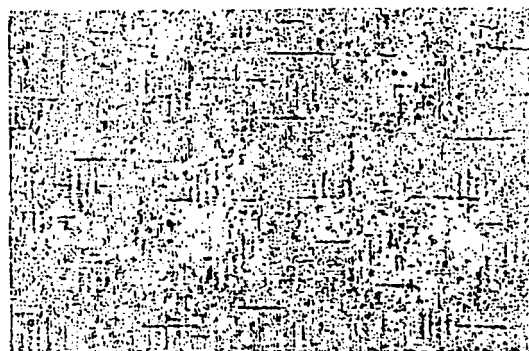
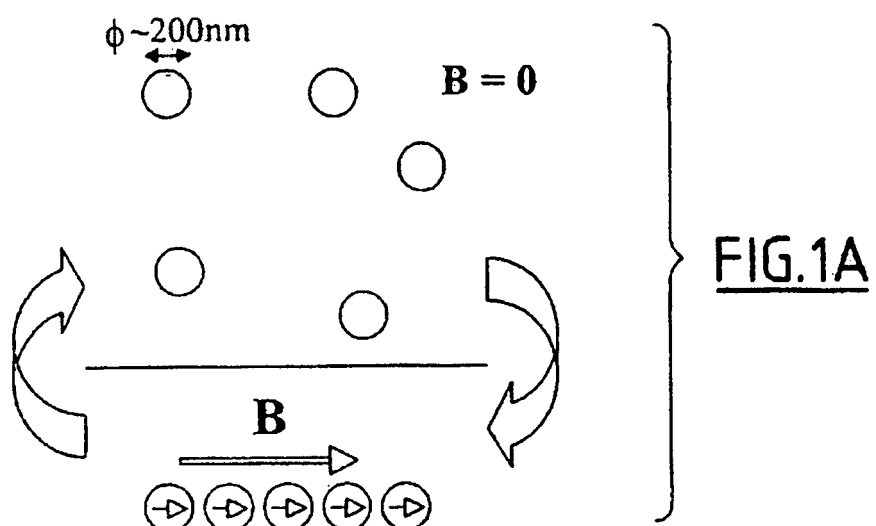
45

50

55

60

65



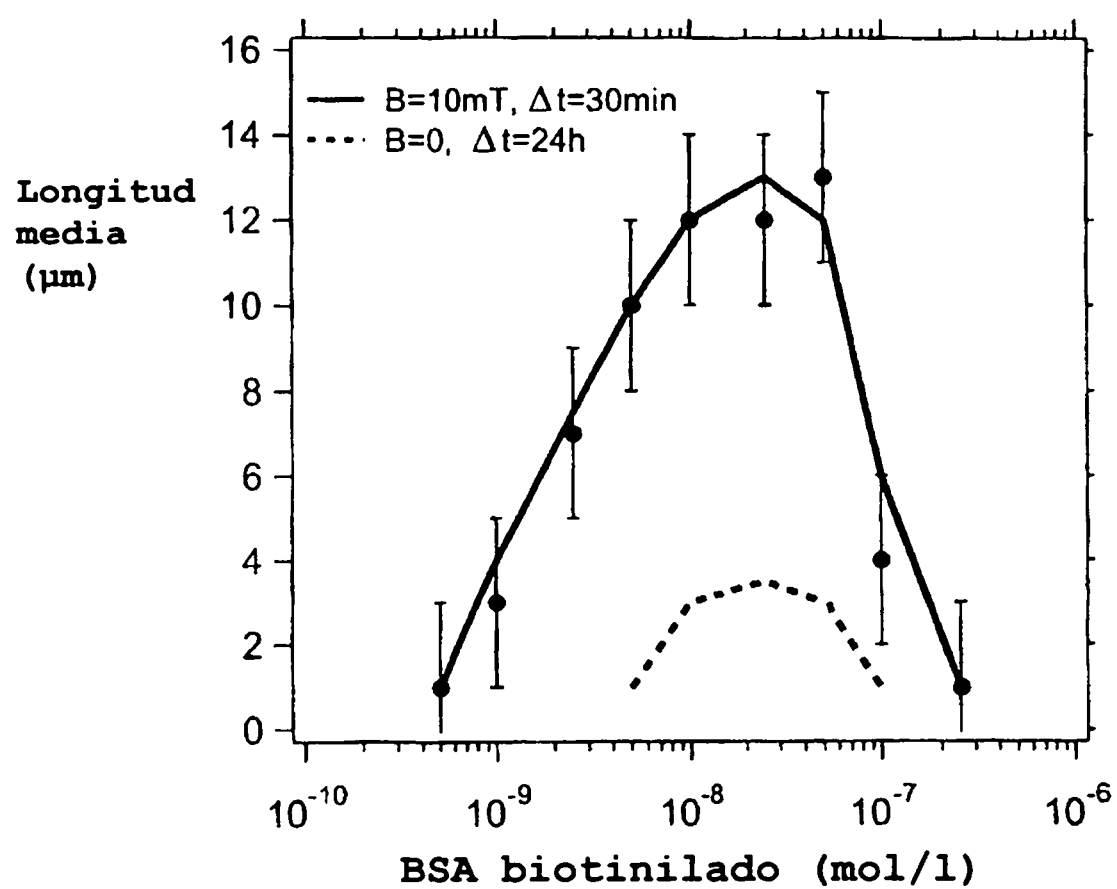


FIG.3

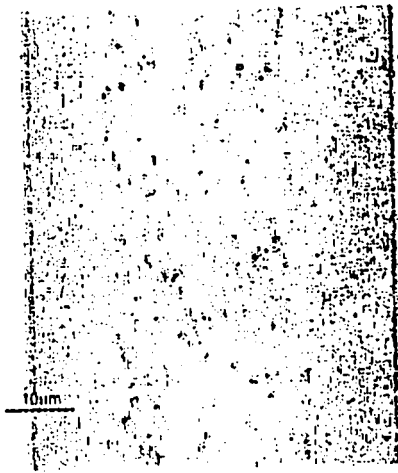


FIG. 4A

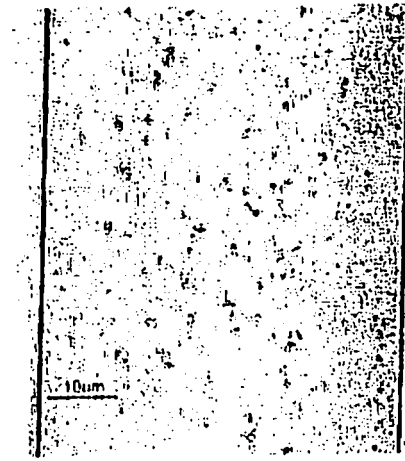


FIG. 4B

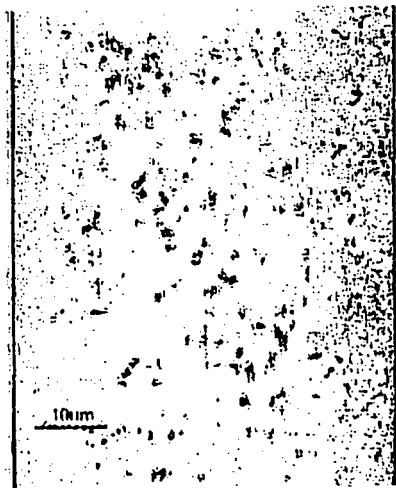


FIG. 4C

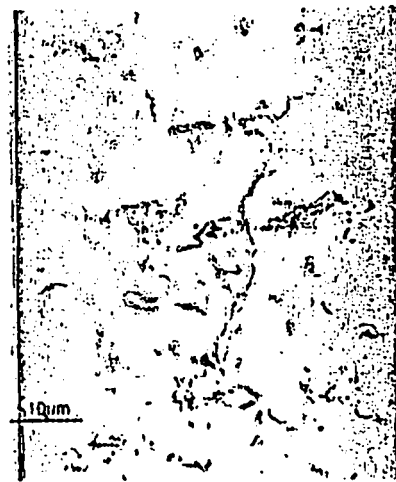


FIG. 4D