

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-525345  
(P2004-525345A)

(43) 公表日 平成16年8月19日(2004.8.19)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/543 5 4 1 A	4 B 0 2 9
BO 1 J 19/00	GO 1 N 33/543 5 2 5 C	4 G 0 7 5
C 1 2 M 1/00	BO 1 J 19/00 3 2 1	
C 1 2 M 1/34	C 1 2 M 1/00 A	
GO 1 N 33/53	C 1 2 M 1/34 Z	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 74 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2002-545821 (P2002-545821)  
 (86) (22) 出願日 平成13年11月29日 (2001.11.29)  
 (85) 翻訳文提出日 平成15年5月29日 (2003.5.29)  
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2001/003780  
 (87) 国際公開番号 W02002/043855  
 (87) 国際公開日 平成14年6月6日 (2002.6.6)  
 (31) 優先権主張番号 0015398  
 (32) 優先日 平成12年11月29日 (2000.11.29)  
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

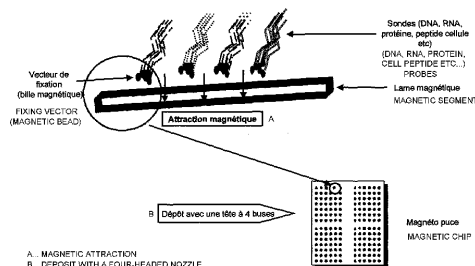
(71) 出願人 502124444  
 コミッサリア タ レネルジー アトミー  
 ク  
 フランス国 エフ-75015 パリ, リ  
 ュ ドゥ ラ フェデラシオン, 31-3  
 3  
 (74) 代理人 100109726  
 弁理士 園田 吉隆  
 (74) 代理人 100101199  
 弁理士 小林 義教  
 (72) 発明者 ユゴラン, ニコラ  
 フランス国 エフ-75011 パリ, リ  
 ュ オメータロン 4

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 磁力によって支持体に固定化されている生物学的又は化学的プローブの固定マイクロアレイ

(57) 【要約】

本発明は、固定化ベクターを利用した磁気結合によって、支持体と結合した生物学的又は化学的プローブの組織化されたアレイに関する。この支持体は、永久磁石を含んでもよく、電気的に誘導された磁化を示し得る。固定化ベクターは、1つの特定の型の生物学的プローブと特異的に結合することが可能なように機能化した磁石ビーズによって構成することができる。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

固定化ベクターを利用する磁気結合によって支持体へ結合した生物学的又は化学的プローブの組織化されたアレイ。

## 【請求項 2】

光学的に中性である支持体へ固定化した、請求項 1 に記載のアレイ。

## 【請求項 3】

永久磁石を含む支持体へ固定化した請求項 1 又は 2 に記載のアレイ。

## 【請求項 4】

電氣的に誘導した磁気を示す支持体へ固定化した、請求項 1 又は 2 に記載のアレイ。 10

## 【請求項 5】

構造化した磁気を示す支持体へ固定化した、請求項 1 から 4 のいずれか 1 つに記載のアレイ。

## 【請求項 6】

磁場が支持体の平面に対して垂直又は平行な、請求項 1 から 5 のいずれか 1 つに記載のアレイ。

## 【請求項 7】

固定化ベクターが常磁性体、超常磁性体、又は強磁性体である、請求項 1 から 6 のいずれか 1 つに記載のアレイ。

## 【請求項 8】

固定化ベクターが、酸化鉄の粒子を含むラテックス又は多糖類のビーズである、請求項 7 に記載のアレイ。 20

## 【請求項 9】

固定化ベクターが多極性ビーズである、請求項 7 又は 8 に記載のアレイ。

## 【請求項 10】

固定化ベクターが、磁場においてそれ自体を適用させることができる、請求項 7 又は 8 に記載のアレイ。

## 【請求項 11】

固定化ベクターそのものが磁気化している、請求項 10 に記載のアレイ。

## 【請求項 12】

固定化ベクターが、1 nm から 500  $\mu\text{m}$  の範囲、好ましくは、0.5  $\mu\text{m}$  から 5  $\mu\text{m}$  の範囲にある直径を有する、請求項 7 から 11 のいずれか 1 つに記載のアレイ。 30

## 【請求項 13】

固定化ベクターが、生物学的標的と特異的に結合することが可能なエレメントを有する、請求項 1 から 12 のいずれか 1 つに記載のアレイ。

## 【請求項 14】

固定化ベクターによって運ばれる生物学的標的と特異的に結合することが可能なエレメントが、免疫グロブリン、抗原、膜レセプター、膜レセプターリガンド、アビジン、ストレプトアビジン、ポリ-T又はポリ-Uオリゴヌクレオチドを含んでなる群から選択される、請求項 13 に記載のアレイ。 40

## 【請求項 15】

各プローブが、10  $\mu\text{m}$  から 1 mm の範囲、好ましくは、50  $\mu\text{m}$  から 200  $\mu\text{m}$  の範囲にある直径のスポットに配される、請求項 1 から 14 のいずれか 1 つに記載のアレイ。

## 【請求項 16】

各スポットが、 $10^5$  から  $10^{10}$  プローブ、好ましくは、 $10^8$  から  $10^{10}$  プローブを有する、請求項 1 から 15 のいずれか 1 つに記載のアレイ。

## 【請求項 17】

1  $\text{cm}^2$  当たり 1 から 100,000 スポットの密度、好ましくは、1  $\text{cm}^2$  当たり 10 から 10000 スポットの密度を有する、請求項 1 から 16 のいずれか 1 つに記載のアレイ。

## 【請求項 18】

A) 固定化ベクターへプローブを結合させ；及び  
 B) 組織化されたアレイの磁気支持体上の固定化ベクターに結合したプローブを配することの段階を含んでなる方法であって、固定化ベクターによる磁気結合によって支持体と結合した生物学的又は化学的プローブの組織化されたアレイを製造する方法。

## 【請求項 19】

A) 支持体上の既知の座標で固定化ベクターを磁気によって結合させ；及び B) 固定化ベクターへプローブを結合させる段階を含む方法であって、固定化ベクターによる磁気結合によって支持体と結合した生物学的又は化学的プローブの組織化されたアレイを製造する方法。

10

## 【請求項 20】

固定化ベクターと支持体を結合させる段階が、マスクを利用しておこなわれると特徴付けられる、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 21】

A) 固定化ベクターへプローブを結合させ；  
 B) 組織化されたアレイで、非磁気化スライド上へ固定化ベクターで結合させたプローブを配し；及び  
 C) 磁気支持体上へ段階 B) のアレイを移す段階を含む方法であって、固定化ベクターによる磁気結合によって支持体へ結合した生物学的又は化学的プローブの組織化されたアレイを製造する方法。

20

## 【請求項 22】

A) 少なくとも 1 つがビオチン化されている、ヌクレオチドプライマーからのプローブを増幅し、  
 B) そのプローブを加熱によって変性させ、その後で急冷し；  
 C) 常磁性体、超常磁性体、又は強磁性体であり、アビジン又はストレプトアビジンと結合したビーズ上にビオチン化プローブを結合させること；  
 D) そのビーズと結合したプローブを磁気によって沈殿させ；  
 E) 未結合プローブを洗浄によって除き；  
 F) 選択した濃度でそのプローブを再懸濁させること；及び  
 G) 支持体上へプローブを配する段階を含んでなる方法であって、一本鎖核酸分子によって構成されるプローブの組織化されたアレイを作製するための、請求項 18 又は請求項 21 に記載の方法。

30

## 【請求項 23】

プローブを固定化ベクターへ結合させる段階が、固定化ベクターに関して飽和しているプローブの濃度でおこなわれる、請求項 18 から 22 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【請求項 24】

請求項 18 から 23 のいずれか 1 つに記載の方法を用いて、生物学的又は化学的プローブのアレイを作製するための構造化された永久磁化を表示する支持体。

## 【請求項 25】

構造化された磁化が、任意の電場から分離された静磁化の結果であり、任意の荷電分子にとって不活性である、請求項 24 に記載の支持体。

40

## 【請求項 26】

支持体と固定化ベクターの間の磁気相互作用によって支持体へ結合している、固定化ベクターの組織化されたアレイ。

## 【請求項 27】

固定化ベクターが  $10^3$  から  $10^8$  の範囲、及び好ましくは  $10^5$  から  $10^7$  の範囲にある多くの核酸分子と結合する、核酸プローブと固定化ベクターを結合させることによって産生させる対。

## 【請求項 28】

請求項 1 から 17 のいずれか 1 つに記載の生物学的又は化学的プローブの組織化されたア

50

レイを作製するために、生物学的又は化学的プローブと固定化ベクターを結合させることによって産生される対の利用。

【請求項 29】

キットが磁気支持体及び固定化ベクターを含んでなる、生物学的又は化学的プローブの組織化されたアレイを作製するためのキット。

【請求項 30】

固定化ベクターが、生物学的プローブとの特異的な結合を可能にするエレメントを有する、請求項 29 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

(磁力によって支持体上に固定化されている生物学的又は化学的プローブの固定マイクロアレイ)

【0002】

本発明は、化学的に機能化されていない支持体上へ磁力によって固定化された生物学的又は化学的リガンド(プローブ)のアレイに関する。

【0003】

プローブは、生物学的又は化学的分子に関する生物学的又は化学的活性又は親和性を示す天然又は合成基質、例えば、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、RNA、一本鎖又は二本鎖DNA、多糖類、及びリン脂質、及び化学基質の組み合わせであってもよい。非常に低コストである、そのようなアレイは、例えば、診断手段、又は分子又は生物学的試料、又は治療又は診断目的のための分子のコレクションのスクリーニングのための手段として、多くの分野で応用可能である。本発明は、生物学的又は化学的プローブのアレイを組織化するための磁気面に安定的に固定されている前記リガンドにある。この方法は、種々の密度のマイクロアレイ、又はマクロアレイを産するために適応できる。

20

【0004】

ここ数年にわたって、しっかりと定まった位置に固定された生物学的プローブの小型アレイを作成するために、多くの方法が提案されてきた。

そのようなマトリックスを作成するための2つの技術がある。最初の技術は、グラフト化が可能となるように、前もって機能化及び活性化された表面で、直接に短いオリゴヌクレオチド又はペプチドを合成することにある。

30

二番目の技術は、前もって合成及び特徴付けられたリガンドを、機械的又は電気化学的方法によって置くことのできる前記プローブとともに機能化された表面上に固定化することにある。

【0005】

幾つかの特許及び刊行物には、特に、取り組んでいる光化学によってオリゴヌクレオチド又はペプチドのマトリックスを得るために、取り組んでいる光化学をおこなうことへの写真平板の応用が記載されている。その方法は、光活性化が可能な官能基によって保護された化学的に機能化された表面を用いることにある。次いで、マスクを通して選択的照明は、異なるカップリング部位からの保護を取り除き、オリゴヌクレオチド又はペプチドのインサイツ合成をおこなうことを可能にする。

40

【0006】

取り組んでいる光化学のその方法には、幾つかの欠点がある。最初に、保護を取り除くための反応の効率、100%ではない。その結果として、インサイツ合成は、例えば、切断されたりガンド、又は間違っ て対をなすオリゴヌクレオチド終止反応につながることでできるエラーを蓄積する。これは、プローブが高度に重複していて、多くのチェックをおこなうことを必要とし、また、標準シグナルを再構築するために、かなりのコンピューターの力を必要とする。さらには、固相に固定した短いリガンドとの相互作用又はハイブリダイゼーション反応の質は、予想することが難しい。最後に、マスクのセットを利用することは方法を複雑にし、それを高価で比較的柔軟性のないものにし、それによって主な

50

欠点が構成される。極めて多くの研究室によって得られる新しい結果が連続して取り込まれるために、ゲノム及び機能的データベースが常に発展している。これは、最初に、前記のデータベースを豊富にすることにつながり、二番目に、データベースに存在する幾つかの間違った配列が直されることにつながる。研究及び臨床研究の分野では、よって、研究下で生物学的材料に用いたアレイを、知識を変換する関数として適応できることは有用である。マスクのセットを用いることに依存するアレイの製造に関する上述の方法は、あるプローブの配列の低コストでの迅速な修飾にとって必要な柔軟性も、単一の付加的プローブの容易な付加さえも有しない。

【0007】

プローブのアレイを製造するのに利用する二番目の型の技術は、支持体上へ固定化する間に個々のプローブを合成して特徴付けることにあるので、新しいデータを取り込むことに先天的により良く適用されているように思われる。

10

【0008】

プローブをグラフト化する最初の方法は、Lehrachら (Hybridization fingerprinting in genome mapping and sequencing, Genome Analysis, 1990, コールド・スプリング・ハーバー出版, 39-81頁) に記載されている。その方法は、9216ハイブリダイゼーションユニットのアレイを構築するための針を用いる。その方法の限界は、堆積物の大きな可変性、及び一度に製造できる少数のアレイにある。

【0009】

取り組んでいる機械的又は電気化学的なものを用いる他の技術が記載されている。これらの方法では、リガンドが調製され、精製され、次いで活性化した表面に蒸着される。例えば、種々の長さのオリゴヌクレオチド、及び前もって増幅した二本鎖プローブを、DNAMATRIXアレイを作製するために蒸着させることができる。この蒸着表面は、ガラス、又は場合によってはポラス・シリコン、ポリマー材料、又は任意の他の化学的に機能化された表面で作製されてもよい。

20

【0010】

従って、幾つかの資料は、ポリ-L-リジンによって、又はヒドラジド基で置換した所定のアミド基で活性化されたポリアクリルアミドゲルによって機能化されたガラス表面上に核酸プローブを蒸着させるために、マイクロピペティング又は針転移技術を利用することを記載している。これら方法には、幾つかの大きな欠点がある。最初に、表面を化学的に機能化することは、コントロールすることが困難であるが、そのような機能化が無くては、リガンドの強い共有結合固定化は不可能である。さらには、蒸着させて固定化されるリガンドの密度は、コントロールできるものではない。最後に、幾つかの場合には、プローブの化学的グラフト化は、例えば、認識部位に近接しているアミノ基によって機能化支持体へ固定化されているレセプターの場合には、それらの標的と比較してそれらの反応性を損なう可能性がある。

30

【0011】

電気化学的に取り組んでいる技術も記載されていた (特許出願 国際公開 A-94/22889)。その場合は、多くの電極を有する支持体で始まり、その電極は、電気化学的に生物学的なリガンドを固定化するために用いられ、電流の影響下でポリマー化する特性を有するピロール環のような電解質によって前もって機能化されたリガンドを利用する。その方法は、反応ゾーンに対するリガンドのコントロールされたアドレッシングの利点を示す。にもかかわらず、このアドレッシングは、導電性表面、機能性試薬、及び大量に製造されるマトリックスに関する品質管理を産業化し提供することが困難な工程を利用することを必須にする。

40

【0012】

上記のすべての方法は、生物学的プローブのマイクロアレイを製造することを可能にするが、多様性に関するそれらの安定性に関して、及びそれらが産業規模でおこなうためには大抵は複雑であるために、それらは限定されている。

【0013】

50

さらには、上で引用されている文献の殆どは、これらの方法を利用して、オリゴヌクレオチド又は二本鎖DNAに限定されている核酸プローブのアレイを得ることを記載している。にもかかわらず、感度のために、その合成オリゴヌクレオチドよりも長い一本鎖DNAプローブであって、約10オリゴヌクレオチド長よりも長いものを作製することは困難であるものを用いることは、より利点がある。例えば、100から500塩基を有する一本鎖DNAプローブは、優れたハイブリダイゼーション特異性を得ることを可能にする。さらには、機能的ゲノム学の出現は、ポリペプチド、タンパク質、そして細胞プローブのアレイに対する高いレベルの需要につながっている。

#### 【0014】

従って、安上がりで、多くの修飾によりよく適合し、すべての型のプローブ（核酸、タンパク質、細胞性、化学性、．．．）を用いることができ、そして特別な設備を必要とせず、実験室の需要によって構成することのできる方法に対する大きな需要が存在することを見出すことができる。

#### 【0015】

本発明の目的は、特に、核酸プローブ（オリゴヌクレオチド、二本鎖DNA又は一本鎖DNA、RNA、．．．）、タンパク質（膜レセプター、モノクローナル抗体、ペプチド、組み換えタンパク質、又はそのドメイン、．．．）、又はウイルスでも、細胞、又はコンビナトリアルライブラリに由来する有機化学的に合成した分子であり得る極めて様々なプローブのマイクロアレイを提供する。そのような生物学的又は化学的プローブのアレイは、磁力の相互作用によってプローブを固定化することに依存する方法を用いて、容易に作製できる。この方法で作ったマトリックスは、マイクロ又はマクロアレイを利用するすべての分野、とりわけ、診断、薬理ゲノム学、毒素ゲノム学、ゲノムの構造及び発現を研究すること、そして一般的には、分子間相互作用に関わるあらゆる型の応用において用いることができる。それらは、従って、特に、診断又は高速スクリーニングのために用いることができる。これらのアレイを製造することは、支持体の任意の事前の化学的機能化を必要とせず、単純で安価な手法でおこなうことができる。固定化がおこなわれる化学基質の質は、もはや限定する要素ではない。

#### 【0016】

本発明の1つの利点は、そのようなアレイの検出感度を高めることでもある。有意な例としては、一本鎖DNAの固定化の可能性にあり、それによって核酸標的のハイブリダイゼーションの間の二本鎖競争を回避する。比活性のための事前の試験後に容易に組み換えタンパク質の多くの断片又はドメインを固定する能力は、その他の有意な例を構成する。プローブをグラフト化するための化学処理の欠如は、スライド上での連続した光学的処理をおこなうことを可能にし、それらスライドを蛍光及び拡散干渉に対して不活性にする。

#### 【0017】

本発明の詳細な概説は、以下に定義されている種々の考えに依存する：

本文を通して、用語「生物学的プローブ」とは、

- 任意の生物学的分子、例えば、ペプチド、タンパク質、及び糖タンパク質（抗原、抗体、レセプター、リガンド、又はその断片）、核酸（一本鎖又は二本鎖DNA、オリゴヌクレオチド、RNA）、炭水化物、リポタンパク質、脂質；
- 任意の型の細胞（細菌、原生動物、酵母、糸状菌、真核生物細胞、．．．）；
- 任意の型のウイルス；又は
- 細胞又はウイルス等の断片

を示す。

「化学的プローブ」とは、例えば、コンビナトリアルライブラリに由来する任意の型の化学分子を指す。

#### 【0018】

この出願では、「固定化ベクター」とは、初めの共有的な結合、又は生物学的及び/又は化学的プローブとの強い相互作用によって可能な、そして二番目には、磁力によって支持体に固定化されることが可能なエレメントである。1つの特定の場合には、固定化ベクタ

ーとは、当該分野に熟練している者に知られている磁気ビーズの型であり、細胞を分離するため、又は分子を精製するために生物学で広く利用されており、例えば、Miltenyi又はDynabeads(例えば、Dynal M-280ストレプトアビジン)によって販売されている。この固定化ベクターは、必ずしも球形ではない。すべての場合において、「固定化ベクターの直径」とは、粒子が囲まれることが可能な球体の直径を指す。

【0019】

「組織化されたアレイ」とは、各スポットが、その組み合わせの機能として知られている、スポットの一組として定義することができる。拡大解釈すれば、「アレイ」という用語は、ここで、支持体上に固定したスポットの一組を指すために用いられ、その場合には、それは、「チップ」と同義語になる。

10

【0020】

「磁気チップ」とは、本発明のチップ、すなわち、固定化ベクターによる磁力によって支持体上に固定した生物学的又は化学的リガンド又はプローブのアレイである。

【0021】

本発明では、アレイの「スポット」は、与えられたプローブを有するハイブリダイゼーション又は反応単位を構成し、与えられた「密度」を示す。

「スポット密度」とは、ここで、スポット当たりのプローブの数として定義される(例えば、プローブが分子ならば、分子の数)。

「アレイ密度」とは、単位領域当たりのスポットの数を指す。

【0022】

「常磁性」材料は、一度はもはや磁場にはない、磁化の急速な損失を伴う低い磁化率によって特徴付けられる。

「強磁性」材料は、高い磁化率を有し、磁場(永久磁気)存在しない場合の磁気特性を保存することができる。

20

【0023】

「超常磁性」と呼ばれる材料は、高い磁化率(即ち、それらは、磁場に置かれると強い磁力となる)によって特徴付けられるが、常磁性材料のように、それらは、磁場がない場合に、彼らの磁化を急激に失う。超常磁性は、結晶の大きさが臨界値よりも小さい場合、強磁性材料で得ることができる。超常磁性ビーズは、磁石による強い引力に曝され、磁場の無い場合に凝集することができないという二重の利点を示す。

30

【0024】

支持体は、磁化スライドによって構成することができ、よって、表面をおおう均一の強度の磁場を作り出す。あるいは、支持体は、支持体の表面上で均一ではない磁場の強度によって定義される「構造化された磁化」を示すことができ、明確な位置で最高値を示す。これは、例えば、埋め込まれた極小磁石(三次元構造化)を有するシリカスライドを用い、磁場を通さず、規則的に間隔を離れた窓(二次元的に構造化)が貫通するマスクで覆われた単純な磁化スライドへ適用する。

【0025】

本発明は、磁気支持体上のアレイに組織化された明確な位置に生物学的又は化学的プローブを固定化することにあり、このプローブは、磁力によって引きつけられることができる粒子と共有結合によって、又は強い相互作用によって結合している。前記粒子は、「固定化ベクター」を構成する。このプローブは、固定化ベクターと磁気支持体の間の相互作用によって、支持体上の正確な座標に保持される。

40

【0026】

従って、支持体は、磁力を供給又はそれに曝すことができなければならない。それは、単純な磁気化スライドによって構成されることができるが、例えば、強磁性粒子で満たされた穴を有するシリカスライドのような、三次元磁気ゾーンを有する構造化支持体としても作用する。支持体の磁化は、電気的な起源でもあり得る。構造化した電磁気化を示す支持体の例は、通電伝導体ループの一組を有する集積回路である。

【0027】

50

支持体に対するカップリングプローブのための固定化ベクターは、磁力に曝され、また、それを提供する可能性があるエレメントである。これら固定化ベクターは常磁性、すなわち、磁場から取り出された場合に磁化を示すのではなくて磁石によって引きつけられる可能性がある。しかしながら、常磁性物質の固定化ベクターによるプローブと支持体の間のカップリングは、あまり強くなく、故に、超常磁性又は強磁性物質を用いて予見することが好ましい。一例として、これらは、生物学で広く用いられていて安価な、5マイクロメートル ( $\mu\text{m}$ ) よりも小さな直径を有する磁石ビーズ、又はナノフェリンスのようなナノ粒子であってもよい。

**【0028】**

プローブは、共有結合、又はアフィニティー型の非共有結合、例えば、ストレプトアビジンとビオチンの間に關与している結合、抗原と抗体の間の結合、又はレセプター/リガンド相互作用等のいずれかによって固定化ベクターに固定化することができる。生物学的標的と特異的に結合することができる分子で覆われている多くの型の磁石ビーズは、すでに販売されている。例えば、ビオチンと相互作用することができるストレプトアビジンで覆われているか、又はアビジンの中のビーズ、或いはタンパク質、又は膜レセプターとの相互作用によって細胞と結合することが可能な特定の抗体を有するビーズがある。ポリ-T又はポリ-Uオリゴヌクレオチドで覆われているビーズは、ポリ-A残基(例えば、ポリ-A「テール」又はメッセンジャーRNAを有するcDNA)を含む核酸プローブのための固定化ベクターとしても利用が可能である。これらの例は、決して限定されておらず、当該分野に熟練している者は、ここに記載のアレイへの意図した応用に適用させる他の固定化ベクターをどのように選択するのかを知っている。

10

20

**【0029】**

各アレイスポット、又はハイブリダイゼーション単位は、固定化ベクターとの相互作用によって固定化されている同一のプローブがグラフト化されている、数十平方マイクロメートル ( $\mu\text{m}^2$ ) から1平方ミリメートル ( $\text{mm}^2$ ) の支持体上の同定された領域を示す。このアレイスポットの直径は、利用される固定化ベクターの型に依存し、意図する用途の機能として選択される。従って、診断のためのDNAチップ、又はハイスループットスクリーニングでは、このアレイスポットは、有利に小型であり、例えば、約50 $\mu\text{m}$ の直径を有する。対照的に、より大きな直径、例えば、200 $\mu\text{m}$ は、他の型の用途、例えばプローブが細胞である場合に好まれる。好ましい様式では、与えられたアレイのすべてのスポットは、同じ領域を有する。従って、本発明は、支持体上に規則的に配置される二次元又は三次元アレイのスポットに適用し、その各スポットは、磁力で支持体上に固定化されていて、その固定化ベクターとの共有結合又は強い相互作用によって結合している異なる型の生物学的又は化学的プローブで構成されている。

30

**【0030】**

そのようなアレイの独自性は、プローブ及びマイクロアレイを形成するために支持体上の正確な座標のその固定化ベクターによって構成されている各対を固定化するための方法にある。このプローブは、化学反応ではなく、物理力：磁力によってアレイに固定化されている。

**【0031】**

固定化ベクターを介する磁力相互作用によって支持体と結合しているプローブは、多くの利点を示す。最初に、この型のカップリングは、プローブを固定化する目的のための、どんな事前の支持体の化学的処理も必要とせず、特別な条件下での貯蔵をおこなうことを必要としない。この支持体の表面が化学的機能化に曝されるならば、表面処理のランダムな性質、及び貯蔵している間に生じる損傷は、化学基質は再生可能で安定であることを保証できる可能性が無いことを意味する。一例として、基質であるリジン又はポリアクリルアミドの脱水又は再水和について言及することが可能である。本発明に記載のようなアレイによって、磁力支持体を直ぐに用いることが可能であり、それらは、何ら特別なパッケージングを必要としない。

40

**【0032】**

50

さらに、プローブを固定するために、支持体を化学処理に曝す必要が無いということは、検出を最適化するために、光学的に中性で、磁場に対して透過性のある基質で支持体の表面を覆うことを可能にする。

#### 【0033】

分子プローブは、マイクロアレイを構築するために、支持体上の正確な位置に高度に安定な様式で固定化されるRNA又は一本又は二本鎖DNA、タンパク質、又はペプチド、及びより一般的には、任意の型の生物学的又は化学的分子によって構成することが可能である。核酸を研究するからみでは、用いられるDNA又はRNAの一本鎖断片の大きさ及び質は、それらが、最適条件下でチップから合成及び精製されるために、限定されるものではない。実施例4に例示したような、本発明のアレイの特定の実施態様では、そのプローブは、大きなサイズの一本鎖DNA分子であり、それ故に、オリゴヌクレオチドプローブ又は二本鎖DNAプローブと比較して検出感度が増大している。

10

#### 【0034】

磁力相互作用により支持体へ結合している固定化ベクターによって支持体へプローブを固定化することは、また、分子をスクリーニングするための多くの細胞を作製することを非常に容易にする（場合によっては、遺伝的に修飾）。例えば、遺伝的に修飾してストレス遺伝子を発現するようにした細胞は、大規模にストレス剤又はアンチストレス分子をスクリーニングするために固定化することが可能である。

#### 【0035】

マイクロアレイを作製する目的で、静止支持体への分子プローブに固定化ベクター対を加えたものの耐久性のある固定化は、固定化ベクターと支持体との間の磁力相互作用の結果である。この手法では、固定化支持体及び固定化ベクターによって構成される対のメンバーは、その双方が磁力（又は磁場）を同時に提供する必要が無いことを認めることは重要である。他方が、力へ応答することができる（又は、磁場によって引きつけられる）一方で、それらのうちの1つにとっては、前記の力（又は、磁場）を供給することで十分である。

20

#### 【0036】

従って、本発明は、最初に、固定化ベクターによる磁気結合によって支持体へ結合した生物学的又は化学的プローブの組織化されたアレイを提供する。この支持体は、好ましくは、光学的に中性である。

30

本発明の特定の実施態様では、この支持体は、業者Ugimag、3830 セイント ピエール グレヴァール、フランスによって販売されている永久磁石、例えば、サマリウム/コバルト又はネオジミウム/鉄/ホウ素磁石を含む。

あるいは、支持体は、電気的に誘導される磁化を示す。

#### 【0037】

本発明の特定の実施態様では、支持体は構造化された磁化を示す。支持体が永久磁石を含むならば、この特性は、支持体の特異的構造の結果であり得る。例えば、支持体は、規則的空間で分けられ、強磁性粒子で満たされている穴を有する磁気不活性な（例えば、シリカの）材料のスライド面によって構成することができる。この構造化された磁化は、マスクを有する平面永久磁石を利用して得ることもできる。電気磁化支持体によって、構造化された磁化を、例えば、導体ループの一組を同時に有する集積回路によって得ることができる。

40

#### 【0038】

磁力支持体は、磁場が支持体の主な表面に対して垂直か又は平行となるように選択することができる。

本発明のアレイは、磁力支持体へ生物学的及び化学的プローブを結合させるための固定化ベクターを含む。定義によると、これら固定化ベクターは、磁力へ応答するか、又は、適切ならば、それを供給することが可能でなければならない。従って、固定化ベクターは、常磁性体、超常磁性体、又は強磁性体である。固定化ベクターの例には、酸化鉄の粒子を含む、ラテックス又は多糖類のビーズがある。

50

## 【0039】

固定化ベクターは多極性であってもよく、又は、その反対で、それらは、磁場で特定の方向に向くことが可能であってもよい。本発明の特定の実施態様では、固定化ベクターは、そのものが磁気化されている。にもかかわらず、磁気固定化ベクターは、適用された磁場の非存在下でさえも、凝集することの欠点によって害を受ける。固定化ベクターは、従って、好ましくは超常磁性体である。

本発明のアレイの作製に利用するのに適切な固定化ベクターは、1ナノメートル（nm）から500 $\mu\text{m}$ の範囲、及び好ましくは0.5 $\mu\text{m}$ から5 $\mu\text{m}$ の範囲にある直径を有する。

## 【0040】

固定化ベクターは、プローブと支持体の間の結合を提供する役割を担う。それらの磁気特性に加えて、従って、共有結合によって、又は、例えば、アフィニティー型の強い相互作用によって、それらは、プローブとの結合が可能である。本発明の好ましい実施態様では、固定化ベクターは、生物学的標的との特異的な結合が可能でエレメントを有する。特定の型の標的に対して特異的な共有結合の例は、シッフ塩基とR-NH<sub>2</sub>型のある化合物との間の縮合によって確立される結合である。生物学的標的に対して特異的な非共有結合の例としては、レセプターと対応するリガンドの間、又は、抗原とそれを認識する抗体の間で確立しているアフィニティー相互作用がある。この結合は、また、2つの相補的核酸配列の間で確立している水素結合によって構成され得る。下のこの本文では、固定化ベクターは、ある型の生物学的分子のための高い親和性を有するエレメントを有する場合、生物学的標的と特異的に結合することが可能なエレメントを有すると言われている。問題となっているプローブの型によっては、そのようなエレメントは、例えば、免疫グロブリン、抗原又はその断片、膜レセプター、膜レセプターリガンド、アビジン、ストレプトアビジン、ポリ-T又はポリ-Uオリゴヌクレオチド、又は、特定の相互作用を可能にする任意の化学的又は生物学的分子によって構成される群から選択することができる。

## 【0041】

本発明は、また、生物学的又は化学的プローブと固定化ベクターの間の結合の産物を提供する。そのプローブの性質に依存し、各固定化ベクターと結合したそのプローブの例の数は、1（例えば、プローブが細胞の場合）から10<sup>8</sup>（核酸プローブに関して）の範囲にある。特に、本発明は、核酸プローブと固定化ベクターを結合させることによって産せられる対を提供する。その核酸プローブは、好ましくは、50オリゴヌクレオチドよりも長い一本鎖DNAプローブであるが、一本鎖オリゴヌクレオチド又は二重鎖DNAでもあってもよい。固定化ベクターと核酸プローブを結合することによって産せられる各対は、10<sup>3</sup>から10<sup>8</sup>の範囲、好ましくは、10<sup>5</sup>から10<sup>7</sup>の範囲にある核酸プローブの数を有する。

## 【0042】

生物学的又は化学的プローブの組織化されたアレイを作製するために、生物学的又は化学的プローブと固定化ベクターを結合させることによって産せられる対の利用によって、本発明の不可欠な部分が形成される。

本発明のアレイでは、固定化ベクターと結合した各プローブは、10 $\mu\text{m}$ から1mmの範囲、好ましくは、50 $\mu\text{m}$ から200 $\mu\text{m}$ の範囲にある直径のスポットに配置される。スポット直径は、意図する用途の機能として、特に、利用されるプローブの型の機能として、当該分野に熟練した者によって選択される。

## 【0043】

本発明のアレイの各スポットは、10<sup>5</sup>から10<sup>10</sup>プローブ、好ましくは、10<sup>8</sup>から10<sup>10</sup>プローブを有する。スポット当たりのプローブの数は、固定化ベクターと結合したプローブの平均数をスポット当たりの固定化ベクターに乗じた積である。これら2つのパラメーターは、実験によって確かめることができる。固定化ベクターと結合したプローブの平均数は、特に、ベクターの「許容量」、即ち、各ベクター上の結合部位の平均数に依存する。この「許容量」は、機能化された磁気ビーズの供給者によって特定化される。スポット当たり固定化ベクターの数は、単位領域当たりの固定化ベクターの密度が、固定

化ベクターが単層を形成するように、当該分野の熟練者によって計算される。従って、本発明のアレイは、均一な密度のスポットを有利に有していて、即ち、各スポットは、理想的には同じ数のプローブを有する。

【0044】

本発明のアレイの密度は、 $1\text{ cm}^2$  当たり1から100,000スポットの範囲、好ましくは、 $1\text{ cm}^2$  当たり10から1000スポットの範囲にある。

【0045】

本発明は、また、固定化ベクターによる磁気結合によって支持体と結合した生物学的又は化学的プローブの組織化されたアレイを製造する方法を提供する。実施例1に記載の本発明の最初の方法は、次の段階を含む：

- A) 固定化ベクターへプローブを結合させること；及び
- B) 固定化ベクターと結合させたプローブを、組織化されたアレイの磁気支持体上の固定化ベクターに配置すること。

【0046】

実施例2に例示した、固定化ベクターによる磁気結合によって支持体と結合した生物学的又は化学的プローブの組織化されたアレイの製造のその他の方法には、次の段階が含まれる：

- A) 支持体上の既知の座標に固定化ベクターを磁気によって結合させること；及び
- B) 固定化ベクターへプローブを結合させること。

上記の方法では、支持体への固定化ベクターを結合させる段階は、マスクを用いておこなうことができる。

【0047】

このマスクは、規則的に間隔を離れた窓によって貫通されていて、好ましくは、固定化ベクターが単独で前記窓に固定化されるように、磁場を通さない。あるいは、このマスクは、磁場に対して透過性がある。このような環境下では、マスクで覆われるか否かに関わらず、この固定化ベクターは、最初に、支持体の全表面にわたって固定化される。その結果、支持体と直接に接触しない固定化ベクターが取り除かれるように、このマスクは、慎重に取り除かれる。

【0048】

固定化ベクターによる磁気結合によって支持体と結合した生物学的又は化学的プローブの組織化されたアレイの製造の代替法は、実施例3に記載されていて、次の段階が含まれる：

- A) 固定化ベクターへのプローブの結合；
- B) 組織化されたアレイの非磁気化スライド上の固定化ベクターと結合したプローブを配置すること；及び
- C) 磁気支持体上へ段階B)のアレイを転移させること。

【0049】

上記のような本発明のすべての方法、固定化ベクターは、それらがプローブと結合するか否かにも関わらず、当該分野の熟練者によって考案されることが可能な任意の手法を用いて、随意的に磁気支持体上に配置される。例えば、これは、それぞれが、その先端が $200\text{ }\mu\text{m}$ よりも小さな直径の針によって構成されているピペット、マイクロピペット、圧電ピペット、ノズル、針、又は柔らかい鉄の芯を有する小さな電磁石を利用しておこなうことができる。

【0050】

実施例4に記載の本発明の特定の方法は、20から5000ヌクレオチドの範囲、好ましくは、100から500ヌクレオチドの範囲にある大きさの一本鎖核酸分子によって構成されるプローブの組織化されたアレイを製造するために役立つ。この方法は、以下の段階を含む：

- A) 少なくとも1つがビオチン化されているヌクレオチドプライマーからのプローブを増幅すること；

10

20

30

40

50

- B) 急冷の後の加熱によってプローブを変性させること；
- C) 常磁性体、超常磁性体、又は強磁性体であって、アビジン又はストレプトアビジンと結合しているビーズ上のビオチン化プローブを結合させること；
- D) ビーズと結合しているプローブを磁氣的に沈殿させること；
- E) 洗浄によって、未結合プローブを取り除くこと；
- F) 選択した濃度でプローブを再懸濁すること；及び
- G) 支持体上にプローブを配置すること。

**【0051】**

上記の方法の好ましい実施では、固定化ベクターへプローブを結合する段階は、固定化ベクターのためのプローブの飽和濃度でおこなわれる。これは、特に、各固定化ベクターと結合しているプローブの平均数を知ること、容易に再生可能なようにそれをおこなうことを可能にする。

10

**【0052】**

本発明は、また、上記のような生物学的又は化学的プローブのアレイの製造を目的とする、永久又は電氣的に誘導される構造化した磁化を表示することが可能な支持体を提供する。本発明の好ましい支持体は、永久である構造化した磁化を示す。さらにより好ましい様式では、本発明の支持体は、任意の電界から分離され、任意の荷電分子にとって不活性な静磁化を表示する。最も生物学的なポリマー、特にDNAは、それ故に、Mellerら (A.Meller, L.Nivon, ら(2000), 「Rapid nanopore discrimination between single polynucleotide molecules」Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97(3): 1079-84; 及びA.Meller, L.Nivon, ら(2001), 「Voltage-driven DNA translocations through a nanopore」, Phys. Rev. Lett., 86(15): 3435-8) による論文に記載されているように、荷電して、それによって非常に低い電圧でも、電界に対して感度がある。コイルによって誘導される磁場は、一般的に、残存する電界に付随して起こる(コイルの形に依存する)。残存する磁場が完全に消滅することを可能にしないコイルの形によって誘導される電磁場の利用は、支持体の表面上の荷電分子の非特異的吸収を引き起こす。さらには、そのような電界は、分子の物理化学的特徴を修飾する可能性がある。例えば、ある条件下では、電界によって誘導されるイオン勾配は、DNAらせんを劣化する可能性がある。

20

**【0053】**

支持体と固定化ベクターの間の磁化相互作用によって支持体と結合している固定化ベクターの組織化されたアレイは、また、本発明の一部を形成する。

30

**【0054】**

最終的には、本発明は、磁化支持体及び固定化ベクターを含むキットであって、生物学的又は化学的プローブの組織化されたアレイを作製するためのキットを提供する。そのようなキットは、独自の要求に特に適応しているプローブの独自のアレイを作製し、それを低コストで研究又は分析研究室がおこなえるために特に利点がある。例えば、このキットによって、研究室が、おそらくは、上記の最後の方法を利用して「特注」DNAチップを作製することを可能にする。

**【0055】**

限定されていないが好ましい様式で、本発明のキットに存在する磁化支持体は、光学的に中性であり、永久磁石を含む。適切ならば、この支持体は、構造化磁化を示す。

40

本発明のキットのある特定の種類では、固定化ベクターは、すでに、組織化されたアレイの支持体に固定化されている。

本発明のキットに存在する固定化ベクターは、例えば、常磁性体、超常磁性体、又は強磁性体ビーズによって構成される。

本発明のキットの有利な実施態様では、固定化ベクターは機能化されている、即ち、それは、生物学的標的と特異的に結合することが可能なエレメントを有する。

**【0056】**

本発明のキットは、幾つかの型の用途のために設計されることが可能であり、それらは、ある型のプローブによる用途のために設計することが可能である。例えば、片方の末端に

50

ポリ-T又はポリ-Uがあるオリゴヌクレオチドを有する固定化ベクターを有するキットは、ポリ-AテールがグラフトされているメッセンジャーRNA又はcDNAチップを作製する用途のためにさらに特化されている。対照的に、固定化ベクターがストレプトアビジンと又はアビジンと結合しているキットは、ビオチン化が可能な任意の型のプローブによる用途について適している。

#### 【0057】

本発明のキットは、また、場合によっては固定化ベクターと結合している1つ又は複数のコントロールプローブを有する。例えば、このキットが真核生物細胞の遺伝子発現を解析するためのチップを作製することを意図しているならば、それを、 $\alpha$ -アクチンの断片をコードする一本鎖DNAプローブによって構成することができる。キットは、また、遊離状態のコントロールプローブと既に固定化ベクターに固定化してあるコントロールプローブの双方を含み、それ故に、使用者が固定化ベクターへプローブを結合させる段階をモニターすることを可能にする。キットは、また、支持体上の固定化ベクターの配置を校正するために、印を付けたプローブと結合させた固定化ベクターを含む。これらの例は限定されておらず、当該分野の熟練者は、結果をより正確に判断することを可能にするため、又は、特定の型の応用を標的とするために、容易に利用できるための付加的なエレメントを有する任意の型のキットを考案することができる。

10

#### 【0058】

以下の実施例及び図面は、本発明がどのように実行され、どのような利点があるのかを、その範囲を限定することなく示している。

20

#### 【実施例1】

#### 【0059】

単段階配置による磁気チップを作製する方法

プローブは、例えば、多極磁化ビーズなどの磁化粒子へ固定化させた。ビーズへの固定化は、共有結合によって、又は任意の他の化学結合、例えば、シッフ塩基を確立することによって、又は、例えば、ストレプトアビジン/ビオチン又は抗体/抗原結合等の非共有結合のいずれかによっておこなわれた(図1)。

固定化ベクター及びプローブを含む対は、次いで、磁化支持体の数 $\mu\text{m}^2$ の小さな領域上に、所望される密度で配置された。支持体上の決まった座標で、これは、同一のプローブのスポットを所望される密度で提供する。この操作は、必ず異なるプローブのスポットのマイクロアレイを得るためごとにおこなわれた。多くのスポットが同時に作製できることが観察されるべきである(図2)。

30

#### 【実施例2】

#### 【0060】

二段階の配置による磁気チップを作製する方法

実施例1に記載のプロトコールに関する代替案は、固定化ベクターとプローブの間に非共有結合を利用することである。そのような環境下では、磁化表面上に機能化ビーズ及びプローブを配することを分離することが可能である。従って、実施例によって、ストレプトアビジンで機能化したビーズは、各スポットが明確な密度でビーズによって構成される磁化ビーズの正規のアレイを作製するために、最初に磁化支持体上に配される。このアレイは、上のような連続配置(図3A)、又は、他にマスクを用いる単一操作のいずれかによる(図3B)、2つの異なる方法で作製された。

40

#### 【0061】

磁化ビーズのアレイは、磁場を隔離するマスクを用いて作製され、ビーズを受け取るべき帯磁スライドの領域のみを非マスク化し、帯磁スライドの残りの表面をマスク化として残した(図3Bを比較せよ)。結果として、磁石の非マスク化部分のみが磁気ビーズを固定化することができる。ビーズを配するためのマスクは、化学処理で構成されたシリカスライドによって、又はレーザーによって機械加工されたプラスチックフィルムによって構成することができる。

構造化された磁化を示す支持体、例えば、それに埋め込まれた小型磁石については、固定

50

化ベクターのアレイは、マスクを利用することを必要とせずに、単一の操作で作製することが可能である。

【0062】

従って、単一の配置操作によって、組織化された磁気ビーズのアレイを得ることが可能である（図4）。

従って、二番目のステップでは、ストレプトアビジンの飽和濃度でビオチンと結合させた特定のプローブを、磁気ビーズの各スポット上に配した（図5）。同じような方策は、固定化ベクターとプローブの間のすべての非共有結合に対して利用することができる。

配置の後、遊離型のストレプトアビジンを添加して洗浄することによって、非固定化プローブを取り除いた。

これによって、決められた座標の支持体へ所望する濃度で耐久的に固定化した、特定のプローブによって構成されるマイクロアレイのスポットを産した。

【実施例3】

【0063】

再生によって、磁気チップを作製する方法

最終的な変形型は、固定化ベクターと結合したプローブをガラススライド上に配し、次いで、磁気ビーズによって構成される対、及びさらに帯磁スライドへ固定化したプローブを移すことから成る。

転移は、単に、帯磁ビーズ及びガラススライドから帯磁スライドの等価座標へ同時に跳ぶプローブによって構成される対を伴って、帯磁スライドをガラススライドへ動かすことによって行うことができる。

【実施例4】

【0064】

一本鎖DNAプローブの磁気チップを調製して利用すること

・スライドの調製

最初の製造段階では、磁力は、35mm×25mmの容積、及び1mmの厚さを有する帯磁スライドによって提供される。

スライドの2つの型の組成物、最初に、1.3テスラ(T)の最大磁化を提供することが可能なネオジウムホウ化鉄で作製されたスライド、及び二番目には、1Tの最大磁化を供給することが可能なサマリウムコバルト帯磁スライドが試験された。

各型のスライドについて、磁場に関する2つの方向が試験された：最初は、スライドの主な表面に対して垂直な場、そして二番目には、スライドの主な表面と平行な磁化である。各場については、4つの異なる力が利用された：0.2T、0.5T、そして1T又は1.3Tのいずれかである。

【0065】

・固定化ベクター

最初の実験では、利用される固定化ベクターは、2.8µmの直径を有し、単位当たり $8 \times 10^{-3}$  cgsの感受率を持つ酸化鉄(10%-14%の $Fe_3O_4$ )を含むポリマーで作られている。酸化物の粒子は、磁場と反応する能力を提供した。ビーズは、ビオチンを固定化することが可能なストレプトアビジン分子で、共有的な様式で覆われていた。ストレプトアビジンレセプターの平均密度は、ビーズ当たり $7 \times 10^5$  から  $10^6$  である。

【0066】

・スポット又はハイブリダイゼーション単位を配すること

ベクター(ビーズ)及びプローブ(一本鎖cDNA分子)を含む対を、0.2mmチップを有するペンを利用して、最初に配した。各ディポジットのために選択したビーズの濃度は、ハイブリダイゼーション単位当たり $6 \times 10^9$  プローブに一致する約6000ビーズを含有するディポジットであり、すべてのストレプトアビジン部位は飽和していたと仮定した。そのような条件下では、ビーズの単層ディポジットが得られた(各ビーズは、スライド上に直接に静止している)。

【0067】

10

20

30

40

50

### ・ プローブの調製

5' でビオチン化されたプライマーの対に始まり、前方向プライマー又は逆方向プライマーのいずれか、又は両方のプライマーで、研究中の遺伝子の特定領域のポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) によって、増幅をおこなった。従って、各PCRのために、二重鎖配列を得た。その配列を、選択した構築物によって、コード鎖の5'、そして逆標準の5'のそれぞれでビオチン化するか、又は、両ストランドの5'でビオチン化した。双方の場合では、二重鎖を浸漬によって変性させ、次いで、ストレプトアビジンで機能化した磁石ビーズへ結合させた。添加した磁石ビーズの数を、ストレプトアビジン部位がDNAのビオチンによって飽和されるような様式で測定した。結果として、すべてのビーズは、 $n$ の一本鎖DNA分子を固定化し、その $n$ とは、ビーズ当たりのストレプトアビジン部位の数を示す。ビーズ及び一本鎖DNA対を磁場で沈殿し、次いで洗浄して、ビオチンへ固定化していないすべてのDNAを除いた (プライマーの1つのみがビオチン化された場合、二重鎖DNAの2つのストランドの1つのみが保持される)。DNAの最終的な所望される濃度を得るために、磁石ビーズ (ベクター) 及び一本鎖DNA (プローブ) を含む対を、所望する濃度で懸濁した；そのような環境下では、DNAのモル濃度は、ビーズの濃度に依存するので、それを直接得る。

10

【0068】

### ・ アレイの調製

固定化ベクター (磁石ビーズ) 及びプローブ (一本鎖DNA) を含む対を、ペン又は圧電ピペットによって、所望される密度で、100  $\mu\text{m}$  から 300  $\mu\text{m}$  の辺を有する小さな領域上に配した。これは、所望される密度での同一プローブのハイブリダイゼーション単位が、支持体の定まった座標で得られたことを確かなものにする。操作は、異なるプローブのスポットのマイクロアレイを得るために必要な度におこなった。多くのスポットが同時に作製されることが観察されるべきである。

20

【0069】

### ・ ハイブリダイズ

この方法で作製したスライドを、次いで、蛍光標識cDNAの混合物で直接にハイブリダイズした。cDNAは、RT-PCR (例えば、蛍光マーカースとしてCy3 (商品名) の存在下で) によって、研究中の細胞から抽出したmRNAから得た。また、それぞれCy3 (商品名) 及びCy5 (商品名) で標識したcDNAを供給するRNAの2つの抽出物を利用して、同時ハイブリダイゼーションをおこなうことが可能である。

30

【0070】

スライドを洗浄し、非ハイブリダイズcDNA分子を除いた後、各スポットの蛍光の量は、ハイブリダイゼーションの量を示し、従って、各型の分子の比率を示す。

この標識化は、限定されない；同じような実験は、放射性cDNAを用いておこなうことができる。

【実施例5】

【0071】

GAPDH及びHPRT遺伝子をスクリーニングするための一本鎖DNAプローブの磁石チップ  
磁石チップを、プローブによって、特異的増幅 (PCR) によって得られるように、以下の配列を利用して作製した。各配列に関して、上記の3つの構造を作製した：

40

- 5' ビオチン化コード鎖の配列
- 5' ビオチン化アンチセンスストランドの配列
- 5' ビオチン化の両鎖の配列。

下線が引かれた配列は、プローブを増幅するために用いる特異的プライマーに該当する。

【0072】

GAPDH遺伝子のために選択したプローブ

CTGGTGTCTTACCACCATGGAGAAGGCCGGGGCCCACTTGAAGGGTG  
GAGCCAAACGGGTCATCATCTCCGCCCTTCTGCCGATGCCCCATGT  
 TTGTGATGGGTGTGAACCACGAGAAATATGACAACTCACTCAAGATTGT  
 CAGCAATGCATCCTGCACCACCAACTGCTTAGCCCCCTGGCCAAGGT  
 CATCCATGACAACTTTGGCATTGTGGAAGGGCTCATGACCACAGTCCAT  
 GCCATCACTGCCACCCAGAAGACTGTGGATGGCCCCTCTGGAAAGCTG  
 TGGCGTGATGGCCGTGGGGCTGCCAGAACATCATCCCTGCATCCACT  
 GGTGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCAGAGCTGAACGGGAA  
 GCTCACTGGCATGGCCTTCCGTGTTCCCTACCCCCAATGTGTCCGTCTGTG  
 GATCTGACGTGCCGCTGGAGAAACCTGCCAAGTATGATGACATCAAG  
AAGGTGGTGA

10

TTCACCACCATGGAGAAGGCCGGGGCCCACTTGAAGGGTGGAGCCAAA  
CGGGTCATCATCTCCGCCCTTCTGCCGATGCCCCATGTTTGTGATGG  
 GTGTGAACCACGAGAAATATGACAACTCACTCAAGATTGTCAGCAATGC  
 ATCCTGCACCACCAACTGCTTAGCCCCCTGGCCAAGGTCATCCATGAC  
AACTTTGGCATTGTGGAAGGGCTCATGACCACAGTCCATGCC

20

【 0 0 7 3 】

HPRT遺伝子のために選択したプローブ

GCTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAGTGTGGATACAGGCCAGACTTTGTT  
GGATTTGAAATCCAGACAAGTTTGTGTTGGATATGCCCTTGACTATAA  
 TGAGTACTTCAGGAATTTGAATCACGTTTGTGTCATTAGTGAAACTGGAA  
 AAGCCAAATACAAAGCCTAAGATGAGCGCAAGTTGAATCTGCAAATACG  
 AGGAGTCCTGTTGATGTTGCCAGTAAAATTAGCAGGTGTTCTAGTCCTG  
TG

30

AGGAGATGGGAGGCCATCACATTGTGGCCCTCTGTGTGCTCAAGGGGG  
GCTATAAGTTCTTTGCTGACCTGCTGGATTACATTAAGCACTGAATAGA  
 AATAGTGATAGATCCATTCCTATGACTGTAGATTTTATCAGACTGAAGAG  
 CTACTGTAATGATCAGTCAACGGGGACATAAAAGTTATTGGTGGAGAT  
 GATCTCTCAACTTTAACTGGAAAGAATGTCTTGATTGTTGAAGATATAAT  
 TGCACTGGTAAAACAATGCAAACCTTTGCTTTCCCTGGTTAAGCAGTACA  
 GCCCCAAAATGGTTAAGGTTGCAAGCTTGCTGGTAAAAGGACCTCTCG  
 AAGTGTGGATACAGGCCAGACTTTGTTGGATTTGAAATCCAGACAAG  
 TTTGTTGTTGGATATGCCCTTGACTATAATGAAGTACTTCAGGAATTTGAA  
TCACGTTTGTGTCATTAAGTAAAAGTGGAAAAGCCAAATACAAAGCC

40

50

## 【実施例 6】

## 【0074】

核酸プローブとスライド上の固定化ベクター間での複合体の形成の検証

ここで用いる固定化ベクターは、ストレプトアビジンで機能化した、 $1\ \mu\text{m}$ の直径を有する常磁性 $\text{Fe}_2\text{O}_3$  ポリスチレン粒子であった。プローブは、前出の実施例で示したGAPDH遺伝子の断片と一致する。それは、その2つの鎖のうちの1つのみ(センス鎖)の5'のピオチンによって機能化されたか、又は機能化されなかった。

配列を明らかにしたプライマー:

5' CTGGTGTCTTCACCACCATG 3'

5' TCACCACCTTCTTGATGTCATC 3'

このプローブは、PCRによる増幅の間、全配列にわたってCy3(商品名)又はCy5(商品名)のいずれかによって標識された。

## 【0075】

PCRの産物を沈殿させ、再懸濁し、 $100^\circ\text{C}$ で変性し、 $0^\circ\text{C}$ で浸漬させ、次いで、 $4^\circ\text{C}$ で60分にわたって粒子と浸漬させた。その結果として生じたプローブ及びベクター複合体は、磁石活性化によって沈殿させ、それらは、 $10\times\text{SSC}$ 緩衝液で3回、そして $3\times\text{SSC}$ 緩衝液で1回洗浄した。その残存物は、 $3\times\text{SSC}$ 緩衝液に再懸濁させた。

結果として生じた溶液のアリコートをし、針を用いて取り出し、 $20\text{mm}\times 30\text{mm}\times 1\text{mm}$ の容積を有する1Tの磁石スライドへ配した。この堆積物は、 $10\times\text{SSC}$ 緩衝液で3回洗浄した。

## 【0076】

図6は、次の堆積の結果を示す:

- A) ピオチンによって機能化されていないCy3-標識プローブ;
- B) 5'でピオチンによって機能化されたCy3-標識プローブ;
- C) 機能化されていない、Cy3-標識プローブ;
- D) 5'でピオチンによって機能化されたCy3-標識プローブ;
- E) 単一粒子。

この図は、粒子へのプローブの固定化は、実際に特異的であり(プローブがピオチンで機能化されていない場合は、蛍光標識はない)、そして、ビーズ及びプローブ複合体は、実際には、磁石スライド上に保持されている(図B及びD)。

## 【実施例 7】

## 【0077】

ビーズ及びプローブ複合体上での核酸標的のハイブリダイゼーションの検証

プローブは、センス鎖上の5'のピオチンによって機能化された又は機能化されていないGAPDH遺伝子に関する配列の断片によって構築された。

標的は、Cy3(商品名)又はCy5(商品名)によって配列すべてに沿って標識されたGAPDHのPCR産物によって構築された。

固定化ベクターは、 $1\ \mu\text{m}$ の直径を有し、ストレプトアビジンによって機能化された常磁性 $\text{Fe}_2\text{O}_3$  ポリスチレン粒子である。

## 【0078】

プローブを $100^\circ\text{C}$ で変性させ、 $0^\circ\text{C}$ で浸漬させ、次いで、 $4^\circ\text{C}$ で60分にわたって粒子と複合させた。その結果として生じたプローブ及びベクター複合体を、磁石活性化によって沈殿させ、 $10\times\text{SSC}$ 緩衝液で4回洗浄した。その残存物は、25%ホルムアミド緩衝液に再懸濁させ、次いで、その変性標的をプローブと混合させ、それらを $50^\circ\text{C}$ でハイブリダイズした。

結果として生じた溶液のアリコートをし、針を用いて取り出し、 $20\text{mm}\times 30\text{mm}\times 1\text{mm}$ の容積を有する1Tの磁石スライド上へ配した。この堆積物を、 $10\times\text{SSC}$ 緩衝液で3回、そして $3\times\text{SSC}$ 緩衝液で1回洗浄した。

## 【0079】

その結果は、図7に示してあり、その種々のスポットは、以下の条件と一致する:

A) 5' でビオチンによって機能化した未標識プローブであって、Cy 3 で標識された標的；

B) ビオチンで機能化されていないプローブであって、Cy 3 で標識された標的；

C) 5' でビオチンによって機能化した未標識プローブであって、Cy 5 で標識された標的；

D) ビオチンで機能化されていないプローブであって、Cy 5 で標識された標的。

従って、粒子と固定化した場合に、標的は、プローブ上へハイブリダイズすることが可能であり、極めて僅かな非特異的吸収があった。

実際に、標的は、ベクターによってスライド上に保持された。

#### 【実施例 8】

10

##### 【0080】

標的及びタンパク質プローブが固定化ベクターと固定化されていることの検証

ベクターは、非特異的に、それらの表面上のタンパク質を吸収することが可能な、 $1\ \mu\text{m}$  の直径を有する常磁性 $\text{Fe}_2\text{O}_3$  ポリスチレン粒子である。

この場合のプローブは、タンパク質 x に対して特異的な抗体である。

標的は、Cy 3 で標識された細胞抽出物に含まれるタンパク質 x であった。

標的を含有する細胞抽出物の任意のエLEMENTを認識しない、タンパク質 x の非特異的抗体は、参考として用いられた。

##### 【0081】

種々の異なるハイブリダイゼーションをおこない、その結果を図 8 に示す。

20

図 8 A : 粒子を血清アルブミン (BSA) で、次いで、Cy 3 -標識全タンパク質抽出物でプレインキュベートした。

非特異的固定化を認めることができる。

図 8 B : 粒子を非特異的抗体でプレインキュベートし、次いで、非標識 BSA で飽和し、その後で、Cy 3 -標識全抽出物でインキュベートした。

同じ非特異的固定化は、BSA によるプレハイブリダイゼーションの間の現象として考えることができる。

##### 【0082】

図 8 C : 粒子を、x に対して特異的な抗体でプレインキュベートし、非標識 BSA で飽和し、次いで、Cy 3 標識全抽出物でインキュベートした。

30

蛍光シグナルの強度は、非特異的ハイブリダイゼーションのそれよりも大きい。実際に、特異的ハイブリダイゼーションは、抗 x 抗体によっておこった。

##### 【0083】

この実験で観察された非特異的固定化は、大きい。この非特異的固定化は、SH 基がグラフト化されている「シリカ粒子」又は「ビーズシリカ」等のケイ酸又はシリコン型の常磁性粒子を利用して取り除くことができる。

これらの粒子は、タンパク質を吸収せず、よって、それらは、非特異的吸収を取り除く。抗体は、例えば、還元後に、重鎖のチオールによって固定化することができる。よって、特異的固定化部位は、S-S 架橋によって粒子と共有結合した重鎖と軽鎖によって構成することができる。

40

#### 【実施例 9】

##### 【0084】

1 T での固定化アレイを有する支持体上の常磁性粒子アレイの可能性

Cy 3 標識プローブで機能化したビーズを、1 T で静止磁化を示す支持体上へ、 $1\text{cm}^2$  当たり 625 の密度で配した。次いで、結果として生じたアレイを、 $10\times$  SSC 溶液で 3 回、 $3\times$  SSC 溶液で 1 回洗浄した。その結果は図 9 に示してあり、安定なアレイが得られたことを示している。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0085】

【図 1】磁化粒子へのプローブの固定化。

50

【図2】磁気チップを作製すること。

【図3】A)連続の堆積によって； B)磁場を通さないマスクを利用する単段での配置による機能化されたビーズのアレイの作製。

【図4】磁化ビーズの組織化されたアレイ。

【図5】前もって磁気によって組織化したアレイへプローブを配すること。

【図6】スライド上の核酸プローブと固定化ベクターの間の複合体の形成を示す、5  $\mu\text{m}$ の解像度でスキャンした蛍光画像： A)ビオチンで機能化されていない、Cy3-標識プローブ； B)5'でビオチンによって機能化されたCy3-標識プローブ； C)機能化されていない、Cy3-標識プローブ； D)5'でビオチンによって機能化されたCy3-標識プローブ； E)単一粒子。 観察は、5  $\mu\text{m}$ の解像度でGMS 428スキャナーを用いておこなった。

10

【図7】ビーズ及びプローブ複合体上での核酸標的のハイブリダイゼーションを示す、5  $\mu\text{m}$ の解像度でスキャンした蛍光画像： A)5'でビオチンによって機能化された非標識プローブ、Cy3で標識した標的； B)ビオチンで機能化されていないプローブ、Cy3で標識した標的； C)5'でビオチンによって機能化された非標識プローブ、Cy5で標識した標的； D)ビオチンで機能化されていないプローブ、Cy5で標識した標的。 観察は、5  $\mu\text{m}$ の解像度でGMS 428スキャナーを用いておこなった。

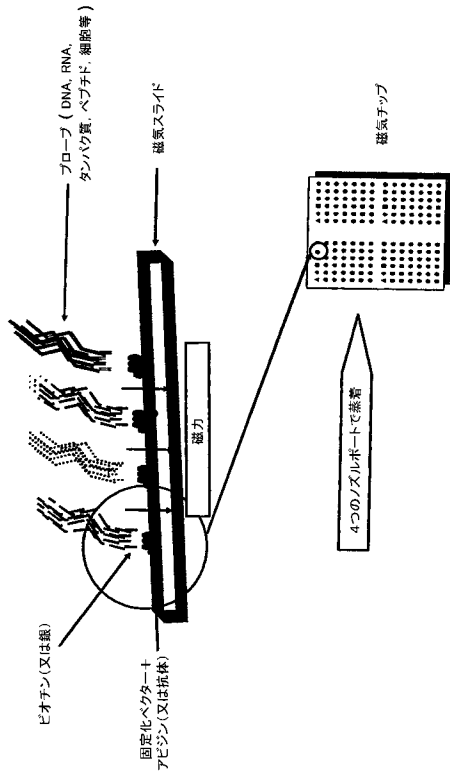
【図8】タンパク質プローブの固定化及び固定化ベクター上の標的を示す、5  $\mu\text{m}$ の解像度でスキャンした蛍光画像： A)ウシ血清アルブミン(BSA)でプレインキュベートし、次いで、Cy3で標識した全タンパク質抽出物； B)非特異的抗体、次いで非標識BSA、次いでCy3-標識全抽出物でプレインキュベートした粒子； C)特異的抗体X、次いで非標識BSAで、次いでCy3-標識全抽出物でプレインキュベートした粒子； D)洗浄後に配したCy3標識タンパク質。 観察は、5  $\mu\text{m}$ の解像度でGMS 428スキャナーを用いておこなった。

20

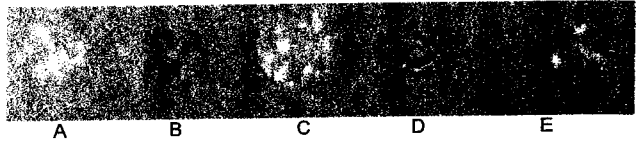
【図9】5  $\mu\text{m}$ の解像度でGMS 428スキャナーを用いて観察された、1  $\text{cm}^2$ あたり625の密度で、Cy3-標識プローブで機能化したビーズのアレイ。スキャンした表面は、0.75  $\text{cm}$ の側面を有する正方形であった。



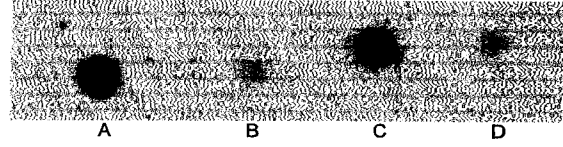
【 図 5 】



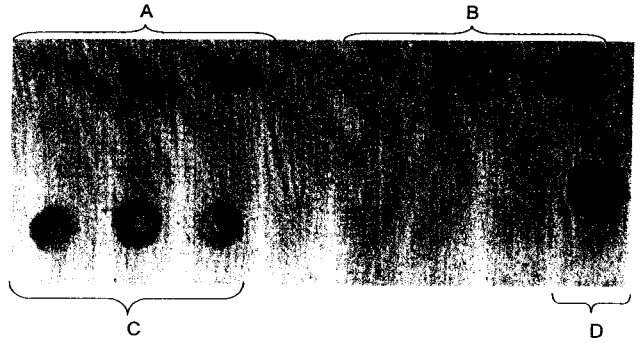
【 図 6 】



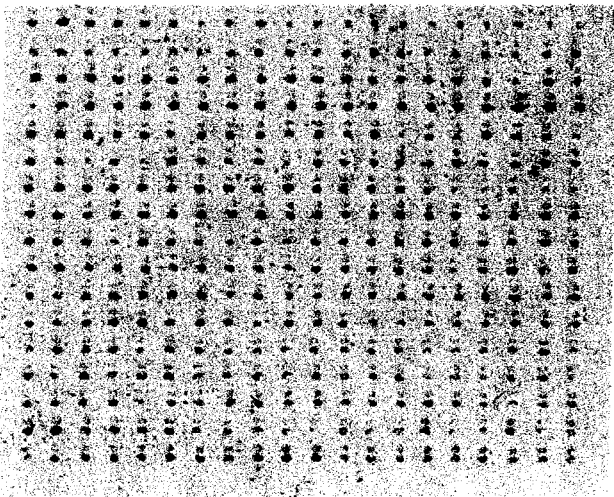
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【国際公開パンフレット】

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle Bureau international



(43) Date de la publication internationale 6 juin 2002 (06.06.2002)

PCT

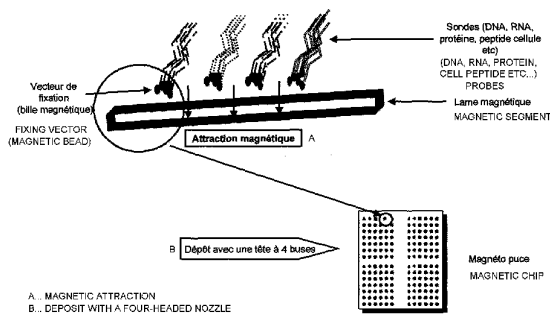
(10) Numéro de publication internationale WO 02/43855 A1

- (51) Classification internationale des brevets: B01J 19/00, G01N 33/545
- (71) Dépositant (pour tous les États désignés sauf US): COMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33, rue de la Fédération, F-75015 Paris (FR).
- (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR01/03780
- (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): UGOLIN, Nicolas [FR/FR]; 4 rue Omer-Talon, F-75011 Paris (FR). MARGUERIE DE ROTROU, Gérard [FR/FR]; 68, rue du Génie, F-91410 Vitry (FR). KORTULEWSKI, Thierry [FR/FR]; 29 rue Pasteur, F-91380 Chilly Mazarin (FR). ALIBERT, Olivier [FR/FR]; 4 avenue Saint-Exupéry, F-91255 Saint-Germain le Corbeil (FR). LE ROUX, Diana [FR/FR]; 5 avenue de Trivaux, F-92190 Meudon (FR).
- (22) Date de dépôt international: 29 novembre 2001 (29.11.2001)
- (25) Langue de dépôt: français
- (26) Langue de publication: français
- (30) Données relatives à la priorité: 0015398 29 novembre 2000 (29.11.2000) FR

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: STATIC MICRO-ARRAY OF BIOLOGICAL OR CHEMICAL PROBES IMMOBILISED ON A SUPPORT BY MAGNETIC ATTRACTION

(54) Titre: MICRO RESEAU STATIQUE DE SONDÉS BIOLOGIQUES OU CHIMIQUES, IMMOBILISÉES SUR UN SUPPORT PAR ATTRACTION MAGNÉTIQUE



A. MAGNETIC ATTRACTION B. DEPOSIT WITH A FOUR-HEADED NOZZLE

(57) Abstract: The invention concerns an organised array of biological or chemical probes, bound to a support by magnetic coupling by means of a fixing vector. The support can comprise a permanent magnet or exhibit electrically induced magnetism. The fixing vectors can consist of magnetic beads functionalised to be specifically bound to one type of biological probes.

(57) Abrégé: L'invention porte sur un réseau organisé de sondes biologiques ou chimiques, liées à un support par couplage magnétique à l'aide d'un vecteur de fixation. Le support peut comporter un aimant permanent ou présenter un magnétisme électro-induit. Les vecteurs de fixation peuvent être constitués de billes magnétiques fonctionnalisées pour être capables de se lier spécifiquement à un type de sondes biologiques.

WO 02/43855 A1

WO 02/43855 A1



(74) Mandataires : ERNEST GUTMANN-YVES  
PLASSERAUD S.A. etc., 3, rue Chauveau-Lagarde,  
F-75008 Paris (FR).

européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,  
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ,  
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,  
ZA, ZM, ZW.

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale  
avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont  
reçues

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MR, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TI, TM), brevet

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

**MICRO RESEAU STATIQUE DE SONDAS BIOLOGIQUES OU  
CHIMIQUES, IMMOBILISEES SUR UN SUPPORT PAR ATTRACTION  
MAGNETIQUE**

5 La présente invention a pour objet un réseau de ligands biologiques ou chimiques (sondes) immobilisés sur un support non fonctionnalisé chimiquement, par attraction magnétique.

10 Les sondes peuvent être des produits naturels ou synthétiques ayant une activité biologique ou chimique ou une affinité pour des molécules biologiques ou chimiques, par exemple, des peptides, des protéines, des oligonucléotides, des ARN, des ADN double brin ou simple brin, des polysaccharides et des phospholipides et des combinatoires de produits chimiques. Ces réseaux, d'un coût très réduit, peuvent trouver des applications dans de nombreux domaines, par exemple comme outils de diagnostic, ou comme outils de criblage de collections de molécules ou d'échantillons biologiques, ou de molécules à visée thérapeutique ou diagnostique. L'invention réside dans l'immobilisation stable de ces ligands sur une surface magnétique, pour organiser un réseau de sondes biologiques ou chimiques. Cette méthode peut être adaptée à la production de micro réseaux de densité variable ou de macro réseaux.

20 De nombreuses méthodes ont été proposées au cours des dernières années, pour fabriquer des réseaux miniaturisés comportant des sondes biologiques immobilisées à des positions bien définies.

25 Il existe deux technologies pour fabriquer de telles matrices. La première technologie consiste à faire une synthèse directe d'oligonucléotides courts ou de peptides, sur une surface préalablement fonctionnalisée et activée pour permettre le greffage.

La seconde technologie consiste à immobiliser les ligands préalablement synthétisés et caractérisés avant leur immobilisation, sur une surface fonctionnalisée, le dépôt de ces sondes pouvant être réalisé par des méthodes mécaniques ou électrochimiques.

Plusieurs brevets et publications décrivent l'application de la photolithographie, pour réaliser un adressage photochimique, notamment pour l'obtention d'une matrice d'oligonucléotides ou de peptides par adressage photochimique. Ce procédé consiste à utiliser des surfaces fonctionnalisées chimiquement et protégées par des groupements photo-activables. Une illumination sélective à l'aide de masques permet ensuite de déprotéger les différents sites de couplage et de réaliser une synthèse *in situ* de l'oligonucléotide ou du peptide.

Cette méthode d'adressage photochimique présente plusieurs inconvénients. Tout d'abord, les réactions de déprotection n'ont pas un rendement de 100%. Par conséquent, les synthèses *in situ* accumulent des erreurs pouvant conduire par exemple à des ligands tronqués et à des misappariements terminaux dans le cas d'oligonucléotides. Ceci impose une forte redondance des sondes et de nombreux contrôles, ainsi qu'une informatique lourde pour reconstituer un signal standard. D'autre part, la qualité des réactions d'interaction ou d'hybridation avec des ligands de courte taille immobilisés en phase solide est difficile à prédire. Enfin, l'utilisation de jeux de masques complique le procédé et le rend coûteux et peu flexible, ce qui constitue un inconvénient majeur. En effet, les bases de données génomiques et fonctionnelles sont en perpétuelle évolution, puisqu'elles intègrent en permanence les nouveaux résultats obtenus par de très nombreux laboratoires. Ceci conduit d'une part à un enrichissement de ces bases de données, et d'autre part, à la correction de certaines séquences erronées présentes dans ces bases. Dans les domaines de la recherche et des études

cliniques, il est donc utile de pouvoir adapter le réseau utilisé à l'objet biologique étudié, en fonction de l'évolution des connaissances. Les procédés de fabrication de réseaux décrits ci-dessus, reposant sur l'utilisation de jeux de masques, n'ont pas la souplesse nécessaire pour modifier rapidement et à peu de frais la séquence de certaines sondes, ni pour ajouter facilement ne fût-ce qu'une sonde supplémentaire.

Le deuxième type de technologie employé pour produire des réseaux de sondes paraît *a priori* plus adapté à l'intégration de nouvelles données, puisqu'il consiste à synthétiser et caractériser individuellement des sondes avant de les immobiliser sur un support.

Une première méthode de greffage de sondes a été décrite dans Lehrach *et al.* (in Hybridization fingerprinting in genome mapping and sequencing, genome analysis, 1990, Cold Spring Harbor press, pages 39-81). Cette méthode utilise des aiguilles pour constituer des réseaux de 9216 unités d'hybridation. La limite de cette méthode réside dans la grande variabilité des dépôts et le nombre réduit de réseaux qui peuvent être produits à la fois.

D'autres technologies d'adressage par voie mécanique ou électrochimique ont été décrites. Dans ces méthodes, les ligands sont préparés, purifiés puis déposés sur une surface activée. Par exemple, des oligonucléotides de longueurs variables et des sondes double brin pré-amplifiées peuvent être déposés pour réaliser des réseaux de matrices d'ADN. La surface de dépôt peut être en verre ou en silicium poreux ou non, en matériau polymère ou toute autre surface fonctionnalisée chimiquement.

Ainsi, plusieurs documents décrivent l'utilisation de la technique de micro pipetage ou de repiquage à l'aide d'aiguilles pour déposer des sondes nucléiques sur des surfaces de verre fonctionnalisées par de la Poly-L-lysine ou par un gel de polyacrylamide activé en substituant certains groupes amides en groupes hydrazides. Ces méthodes présentent plusieurs inconvénients majeurs. En premier lieu, la fonctionnalisation chimique de la

5 surface sans laquelle une fixation covalente et robuste du ligand n'est pas possible est difficile à contrôler. De plus, la densité des ligands déposés et immobilisés n'est pas contrôlable. Enfin, le greffage chimique des sondes peut, dans certains cas, altérer leur réactivité vis-à-vis de leur cible, par exemple dans le cas d'un récepteur fixé à un support fonctionnalisé par l'intermédiaire d'un groupement amine proche du site de reconnaissance.

10 Des techniques d'adressage électrochimique ont également été décrites (demande de brevet WO A-94/22889). Dans ce cas, on part d'un support qui comporte plusieurs électrodes et on utilise ces électrodes pour fixer des ligands biologiques par voie électrochimique en utilisant des ligands préalablement fonctionnalisés à l'aide d'un électrolyte comme le noyau pyrrole ayant la propriété de polymériser sous l'effet d'un courant. Cette méthode présente l'avantage d'un adressage contrôlé de ligands sur une zone de réaction. L'adressage nécessite cependant l'utilisation d'une surface conductrice, de réactifs fonctionnalisés et un lourd procédé pour l'industrialisation et le contrôle qualité des matrices produites en grandes séries.

20 Tous les procédés décrits ci-dessus ont permis de fabriquer des micro réseaux de sondes biologiques, mais sont limités dans leur possibilité de diversification et par leur mise en oeuvre, souvent complexe, à l'échelle industrielle.

25 De plus, la plupart des documents cités ci-dessus décrivent l'utilisation de ces méthodes pour obtenir des réseaux de sondes nucléiques limitées à des oligonucléotides ou à des ADN double brin. Il est pourtant plus avantageux, pour des raisons de sensibilité, d'utiliser des sondes d'ADN simple brin d'une taille supérieure à celle des oligonucléotides synthétiques, qui dépassent difficilement quelques dizaines de nucléotides. Par exemple, des sondes d'ADN simple brin de 100 à 500 bases permettraient d'obtenir une excellente spécificité d'hybridation. De plus, l'avènement de la génomique fonctionnelle

crée une demande importante de réseaux de sondes polypeptidiques, protéiques et même cellulaires.

On voit donc qu'il existe un besoin important de méthodes moins coûteuses, plus adaptées à de nombreuses modifications, permettant d'utiliser tous les types de sondes (nucléiques, protéiques, cellulaires, chimiques...), et qui puissent être réalisées sur demande dans des laboratoires sans équipement particulier.

La présente invention a précisément pour objet des micro réseaux de sondes extrêmement diversifiées et qui peuvent être des sondes nucléiques (oligonucléotides, ADN double brin ou ADN simple brin, ARN,...), des protéines (récepteurs membranaires, anticorps monoclonaux, peptides, protéines recombinantes ou des domaines de celles-ci,...), ou encore des virus, des cellules, ou des molécules de synthèse organique issues de chimiothèques. Ces réseaux de sondes biologiques ou chimiques sont de réalisation aisée, par un procédé qui repose sur l'immobilisation des sondes sur un support par interaction magnétique. Les matrices ainsi créées sont utilisables dans tous les domaines d'utilisation des micro ou macro réseaux, et plus particulièrement en diagnostic, pharmacogénomique, toxicogénomique, étude de la structure et de l'expression de génomes, et de manière générale dans tout type d'application mettant en jeu des interactions moléculaires. Elles peuvent donc notamment servir d'outils de diagnostic ou de criblage à haut débit. La fabrication de ces réseaux ne nécessite aucune fonctionnalisation chimique préalable du support et peut être faite de façon simple et peu coûteuse. La qualité du substrat chimique sur lequel s'effectue l'immobilisation n'est plus un élément limitant.

Un des avantages de l'invention est également d'augmenter la sensibilité de détection de ces réseaux. La possibilité de fixer des ADN simple brin, qui évite la compétition du double brin lors de l'hybridation de cibles nucléiques est un exemple significatif. La possibilité de fixer aisément plusieurs

5 fragments ou domaines de protéines recombinantes préalablement testés pour leurs activités spécifiques est un autre exemple significatif. L'absence d'un traitement chimique pour le greffage des sondes permet de réaliser un traitement optique de série sur les lames, pour les rendre inertes à la fluorescence et à la diffusion parasites.

L'exposé détaillé de l'invention fait appel à plusieurs notions qui sont définies ci-après :

Dans l'ensemble du texte, le terme « sondes biologiques » désignera :

- 10 - n'importe quelle molécule biologique telle que peptides, protéines et glycoprotéines (antigènes, anticorps, récepteurs, ligands ou fragments de ceux-ci...), acides nucléiques (ADN simple ou double brin, oligonucléotides, ARN), carbohydrates, lipoprotéines, lipides,
- n'importe quel type de cellules (bactéries, protozoaires, levures, champignons, cellules eucaryotes, ...),
- 15 - n'importe quel type de virus,
- fragments de cellules ou de virus, etc.

Les « sondes chimiques » désignent n'importe quel type de molécule chimique, issue par exemple de chimiothèques.

20 Dans cette demande, un « vecteur de fixation » est un élément capable, d'une part, de se lier covalamment ou par des interactions fortes, à une sonde biologique et/ou chimique et, d'autre part, capable de se fixer à un support, par attraction magnétique. Dans un cas particulier, un vecteur de fixation est une bille magnétique du type des billes connues de l'homme du métier, utilisées couramment en biologie pour faire de la séparation cellulaire  
25 ou de la purification moléculaire, et commercialisées par exemple par Miltenyi ou Dynabeads (par exemple Dynal M-280 streptavidine). Le vecteur

de fixation n'est pas nécessairement sphérique. Dans tous les cas, le « diamètre du vecteur de fixation » désignera le diamètre de la sphère à laquelle la particule est circonscrite.

5 Un « réseau organisé » peut être défini comme un ensemble de points tels que le contenu de chaque point est connu en fonction de ses coordonnées. Par extension, le terme « réseau » désignera ici un ensemble de points fixés sur un support, et sera alors synonyme de « puce ».

10 Une « magnéto-puce » est une puce selon l'invention, c'est-à-dire un réseau de ligands ou sondes biologiques ou chimiques immobilisés sur un support, par attraction magnétique, via un vecteur de fixation.

Un « point » du réseau (*spot* en anglais) est, dans le cas de la présente invention, une unité d'hybridation ou de réaction portant une sonde donnée, et présentant une « densité » donnée.

15 La « densité d'un point » se définit ici comme le nombre de sondes par point (par exemple nombre de molécules, si la sonde est moléculaire).

La « densité d'un réseau » désigne le nombre de points par unité de surface.

Un matériau « paramagnétique » se caractérise par une susceptibilité magnétique faible et une perte rapide de son magnétisme dès lors qu'il n'est plus dans un champ magnétique.

20 Les matériaux « ferromagnétiques » ont une susceptibilité magnétique élevée et sont capables de conserver des propriétés magnétiques en l'absence de champ magnétique (magnétisme permanent).

Les matériaux dits « superparamagnétiques » sont caractérisés par une susceptibilité magnétique élevée (c'est à dire qu'ils deviennent fortement

magnétiques lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique), mais, à l'instar des matériaux paramagnétiques, ils perdent rapidement leur magnétisme en l'absence de champ magnétique. On peut obtenir du superparamagnétisme dans des matériaux ferromagnétiques quand la taille du cristal est inférieure à une valeur critique. Des billes  
5 superparamagnétiques présentent le double avantage de pouvoir subir une attraction forte par un aimant, et de ne pas s'agréger en l'absence de champ magnétique.

Le support peut être constitué d'une simple lame aimantée, et crée alors un  
10 champ magnétique d'intensité homogène à sa surface. Alternativement, le support peut présenter un « magnétisme structuré », défini par une intensité du champ magnétique qui n'est pas homogène à la surface du support et présente des maxima à des positions bien définies. Ceci est le cas par exemple d'une lame de silice dans laquelle seraient incrustés des micro-  
15 aimants (structuration tridimensionnelle), ou d'une lame aimantée simple recouverte par un masque opaque au champ magnétique et percé de fenêtres régulièrement espacées (structuration bidimensionnelle).

La présente invention consiste à fixer à des positions bien définies, organisées en réseau sur un support magnétique, des sondes biologiques ou  
20 chimiques reliées par une liaison covalente ou par des interactions fortes à une particule capable d'être attirée par une force magnétique. Ces particules constituent les « vecteurs de fixation ». Les sondes sont retenues à des coordonnées précises du support par l'interaction entre les vecteurs de fixation et le support magnétique.

25 Le support doit donc être capable de fournir ou de subir une attraction magnétique. Il peut être constitué d'une lame aimantée simple, mais il peut s'agir aussi d'un support structuré comportant des zones tridimensionnelles magnétiques, par exemple d'une lame de silice comportant des cavités remplies de particules ferromagnétiques. Le magnétisme du support peut

aussi être d'origine électrique. Un exemple de support présentant un électromagnétisme structuré est un micro-circuit comportant un ensemble de boucles conductrices parcourues par un courant.

5 Les vecteurs de fixation, permettant le couplage des sondes au support, sont des éléments capables de subir et éventuellement de fournir une attraction magnétique. Ces vecteurs de fixation peuvent être paramagnétiques, c'est-à-dire qu'ils sont attirés par un aimant mais ne présentent pas de magnétisme lorsqu'ils sont placés en dehors du champ magnétique. Cependant, le couplage des sondes au support par des vecteurs de fixation en matériau paramagnétique ne sera pas très fort, et il est donc préférable d'envisager  
10 l'utilisation de matériaux superparamagnétiques ou ferromagnétiques. Il peut s'agir par exemple de billes magnétiques d'un diamètre inférieur à 5  $\mu\text{m}$ , communément utilisées en biologie et peu coûteuses, ou de nanoparticules telles que les nanoferrines.

15 La fixation de la ou des sondes au vecteur de fixation peut se faire, soit par des liaisons covalentes, soit par des liaisons non covalentes de type affine par exemple, telles que les liaisons mises en jeu entre la streptavidine et la biotine, les liaisons antigènes anticorps ou les interactions récepteurs ligands. De nombreux types de billes magnétiques recouvertes de molécules  
20 capables de se lier spécifiquement à une cible biologique sont déjà commercialisés. Il s'agit par exemple de billes recouvertes de streptavidine ou d'avidine, capables d'interagir avec la biotine, ou de billes portant des anticorps particuliers capables de se lier à des protéines, ou à des cellules par interaction avec un récepteur membranaire. Des billes recouvertes  
25 d'oligonucléotides poly-dT ou poly-U peuvent aussi être utilisées comme vecteur de fixation pour des sondes d'acides nucléiques comportant un résidu poly A (par exemple, des ADNc ayant une "queue" poly-A ou des ARN messagers). Ces exemples ne sont aucunement limitatifs, et l'homme du métier est en mesure de choisir d'autres vecteurs de fixation adaptés à  
30 l'application qu'il souhaite faire des réseaux décrits ici.

Chaque point du réseau, ou unité d'hybridation, représente quelques dizaines de  $\mu\text{m}^2$  à  $1\text{ mm}^2$  répertoriés du support, sur lesquels sont greffées des sondes identiques immobilisées par l'interaction de leur vecteur de fixation. Le diamètre des points du réseau dépend du type de vecteur de fixation utilisé et sera choisi en fonction de l'application envisagée. Ainsi, dans une puce à ADN destinée au diagnostic ou au criblage à haut débit, les points du réseau seront avantageusement de taille réduite, par exemple d'un diamètre de l'ordre de  $50\ \mu\text{m}$ . En revanche, un diamètre plus important, par exemple de  $200\ \mu\text{m}$ , sera préféré dans d'autres types d'applications, par exemple dans le cas où les sondes sont des cellules. De manière préférée, tous les points d'un même réseau auront la même surface. L'invention porte donc sur un réseau bidimensionnel ou tridimensionnel de points régulièrement disposés sur le support, chaque point étant constitué d'un type de sonde biologique ou chimique différent, relié par des liaisons covalentes de des interactions fortes avec son vecteur de fixation, lui-même immobilisé sur le support par interaction magnétique.

L'originalité d'un tel réseau réside dans la méthode utilisée pour immobiliser le couple sonde / vecteur de fixation à des coordonnées précises sur le support afin de former un micro réseau. L'immobilisation des sondes dans le réseau n'est pas due à une réaction chimique mais fait appel à une force physique : la force magnétique.

Le couplage des sondes au support par interaction magnétique par l'intermédiaire d'un vecteur de fixation présente de nombreux avantages. En premier lieu, ce type de couplage évite tout traitement chimique préalable du support en vue de la fixation des sondes, et ne nécessite pas de stockage dans des conditions particulières. En effet, dans le cadre d'une fonctionnalisation chimique de la surface du support, les aléas du traitement de surface et les dégradations survenant durant le stockage, ne permettent pas de garantir la reproductibilité et la stabilité d'un substrat chimique. A titre

d'exemple, on peut citer la déshydratation ou la réhydratation de substrat Lysine ou Polyacrylamide. Dans le cas des réseaux décrits dans la présente invention, les supports magnétiques sont utilisables instantanément et n'ont pas besoin de conditionnement particulier.

5 De plus, l'absence de nécessité d'un traitement chimique du support pour la fixation des sondes permet de recouvrir la surface du support par une substance optiquement neutre et perméable aux champs magnétiques, en vue d'une détection optimale.

10 Les sondes moléculaires peuvent être constituées de molécule d'ARN ou d'ADN, double ou simple brin, de protéines ou de peptides, d'une manière plus générale de tout type de molécules biologique ou chimique que l'on veut immobiliser de façon stable à des positions précises sur un support, dans le but de constituer un micro réseau. Dans le cadre des études des acides nucléiques, la taille et la qualité des fragments d'ADN ou d'ARN simple brin  
15 utilisés n'est pas limitant, car ils sont synthétisés et purifiés en dehors de la puce, dans des conditions optimales. Dans une réalisation particulière des réseaux de l'invention, illustrée à l'exemple 4, les sondes sont des molécules d'ADN simple brin de taille importante, ce qui augmente la sensibilité de détection par rapport à des sondes oligonucléotidiques ou d'ADN double  
20 brin.

La fixation des sondes au support par l'intermédiaire d'un vecteur de fixation couplé au support par interaction magnétique permet également de réaliser très facilement des réseaux de cellules génétiquement modifiées ou non pour cribler des molécules. A titre d'exemple, des cellules génétiquement  
25 modifiées pour exprimer des gènes de stress pourront être immobilisées pour des criblages d'agents de stress ou de molécules anti-stress en grandes séries.

L'immobilisation durable du couple sonde moléculaire / vecteur de fixation au support fixe dans le but de réaliser un micro réseau, résulte de l'interaction magnétique du vecteur de fixation et du support. Il est important de noter que dans cette approche, les membres du couple support de fixation / vecteur de fixation, ne doivent pas nécessairement fournir tous les deux une force magnétique (ou champ magnétique) simultanément. Il suffit que l'un des deux acteurs fournisse la force (ou le champ magnétique) et que l'autre acteur soit capable de subir cette force (soit attiré par le champ magnétique).

L'invention porte donc en premier lieu sur un réseau organisé de sondes biologiques ou chimiques, liées à un support par couplage magnétique, à l'aide d'un vecteur de fixation. De manière préférée, le support est optiquement neutre.

Dans une réalisation particulière de l'invention, le support comporte un aimant permanent, par exemple un aimant samarium-cobalt ou néodyme-fer-bore, tels que ceux commercialisés par la société UGIMAG, 38830 Saint Pierre d'Allevard, France.

Alternativement, le support présente un magnétisme électro-induit.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le support présente un magnétisme structuré. Si le support comporte un aimant permanent, cette propriété peut résulter de la structure même du support. Celui-ci peut être par exemple constitué d'une lame d'un matériau inerte sur le plan magnétique (par exemple, de silice), qui comporte des trous régulièrement espacés que l'on remplit de particules ferromagnétiques. Le magnétisme structuré peut aussi être obtenu à partir d'un aimant permanent plan, et l'utilisation d'un masque. Dans le cas d'un support électromagnétique, un magnétisme structuré peut être obtenu par exemple avec un micro-circuit comportant un ensemble de boucles conductrices en parallèle.

Le support magnétique peut être choisi de telle façon que le champ magnétique soit perpendiculaire ou parallèle à la plus grande surface du support.

5 Les réseaux de la présente invention comportent des vecteurs de fixation, qui assurent le couplage des sondes biologiques ou chimiques au support magnétique. Ces vecteurs de fixation doivent par définition être capables de subir et le cas échéant de fournir une attraction magnétique. Un vecteur de fixation est donc paramagnétique, superparamagnétique ou ferromagnétique. Un exemple de vecteur de fixation est une bille de latex ou de polysaccharides, comportant des particules d'oxyde de fer.

10 Les vecteurs de fixation peuvent être multipolaires ou au contraire capables de s'orienter dans un champ magnétique. Dans une réalisation particulière de l'invention, les vecteurs de fixation sont eux-mêmes aimantés. Toutefois, des vecteurs de fixation aimantés présentent l'inconvénient de s'agréger même en l'absence d'un champ magnétique. Les vecteurs de fixation seront donc préférentiellement superparamagnétiques.

Les vecteurs de fixation utilisables pour réaliser des réseaux selon la présente invention ont un diamètre compris entre 1 nm et 500  $\mu\text{m}$ , préférentiellement entre 0,5 et 5  $\mu\text{m}$ .

20 Les vecteurs de fixation sont destinés à assurer le couplage des sondes au support. Outre leurs propriétés magnétiques, ils doivent donc être capables de se lier aux sondes, par liaison covalente ou par des interactions fortes, par exemple de type affine. Dans une réalisation préférée de l'invention, le vecteur de fixation porte des éléments capables de se lier spécifiquement à une cible biologique. Un exemple de liaison covalente, spécifique d'un type

25 de cibles, est celle établie par condensation entre une base de Schiff et certains composés de type  $\text{R-NH}_2$ . Des exemples de liaisons non covalentes spécifiques d'une cible biologique sont les interactions affines établies entre

un récepteur et un ligand correspondant, ou entre un antigène et un anticorps le reconnaissant. Il peut aussi s'agir de liaisons hydrogène établies entre deux séquences d'acides nucléiques complémentaires. Dans la suite de ce texte, on dira qu'un vecteur de fixation porte des éléments capables de se lier spécifiquement à une cible biologique lorsqu'il porte des éléments ayant une affinité élevée pour un type de molécules biologiques donné. Suivant le type de sonde considéré, ces éléments peuvent être sélectionnés par exemple dans le groupe comportant les immunoglobulines, les antigènes ou les fragments de ceux-ci, les récepteurs membranaires, les ligands de récepteurs membranaires, l'avidine, la streptavidine, les oligonucléotides poly-T ou poly-U, ou toute molécule chimique ou biologique permettant une interaction spécifique.

L'invention porte également sur le produit de couplage entre une sonde biologique ou chimique et un vecteur de fixation. Suivant la nature de la sonde, le nombre d'exemplaires de la sonde couplés à chaque vecteur de fixation sera compris entre 1 (par exemple, quand la sonde est une cellule) et  $10^8$  (par exemple, pour une sonde nucléique). En particulier, l'invention porte sur le produit de couplage entre une sonde d'acide nucléique et un vecteur de fixation. La sonde d'acide nucléique est préférentiellement une sonde d'ADN simple brin d'une taille supérieure à 50 nucléotides, mais il peut aussi s'agir d'un oligonucléotide simple brin ou d'ADN double brin. Chaque produit de couplage entre un vecteur de fixation et une sonde d'acide nucléique porte un nombre compris entre  $10^3$  et  $10^8$ , préférentiellement entre  $10^5$  et  $10^7$  sondes nucléotidiques.

L'utilisation d'un produit de couplage formé d'une sonde biologique ou chimique et d'un vecteur de fixation, pour la fabrication d'un réseau organisé de sondes biologiques ou chimiques, fait aussi partie intégrante de l'invention.

Dans les réseaux de l'invention, chaque sonde couplée à son vecteur de fixation est déposée en un point dont le diamètre est compris entre  $10\ \mu\text{m}$  et  $1\ \text{mm}$ , préférentiellement entre  $50$  et  $200\ \mu\text{m}$ . Le diamètre des points sera choisi par l'homme du métier en fonction du type d'application considérée, en particulier en fonction du type de sonde utilisée.

Chaque point des réseaux de l'invention comporte entre  $10^5$  et  $10^{10}$  sondes, préférentiellement entre  $10^8$  et  $10^{10}$  sondes. Le nombre de sondes par point est le produit du nombre de vecteurs de fixation par point, multiplié par le nombre de sondes liées en moyenne à un vecteur de fixation. Ces deux paramètres sont contrôlables expérimentalement. Le nombre de sondes liées en moyenne à un vecteur de fixation dépend notamment de la « capacité » du vecteur, c'est-à-dire du nombre moyen de sites de liaison de chaque vecteur. Cette « capacité » est indiquée par les fournisseurs de billes magnétiques fonctionnalisées. Le nombre de vecteurs de fixation par point sera calculé par l'homme du métier pour que la densité de vecteurs de fixation par unité de surface soit telle que les vecteurs de fixation forment une monocouche. Les réseaux de l'invention peuvent donc avantageusement avoir des points de densité homogène, c'est-à-dire que chaque point comporte théoriquement le même nombre de sondes.

La densité des réseaux de l'invention est comprise entre 1 et 100000 points par  $\text{cm}^2$ , préférentiellement entre 10 et 1000 points par  $\text{cm}^2$ .

L'invention porte également sur des procédés de fabrication d'un réseau organisé de sondes biologiques ou chimiques, liées à un support par couplage magnétique à l'aide d'un vecteur de fixation. Un premier procédé de l'invention, décrit à l'exemple 1, comporte les étapes suivantes :

- A) liaison des sondes au vecteur de fixation,
- B) dépôt sur un support magnétique, des sondes couplées au vecteur de fixation, selon un réseau organisé.

Un autre procédé de fabrication, illustré à l'exemple 2, d'un réseau organisé de sondes biologiques ou chimiques, liées à un support par couplage magnétique à l'aide d'un vecteur de fixation, comporte les étapes suivantes :

5 A) couplage magnétique d'un vecteur de fixation en des coordonnées connues d'un support,

B) liaison des sondes sur les vecteurs de fixation.

Dans le procédé décrit ci-dessus, l'étape de couplage du vecteur de fixation au support peut être effectuée en utilisant un masque.

10 Ce masque, percé de fenêtres régulièrement espacées, est préférentiellement opaque au champ magnétique, si bien que les vecteurs de fixation se fixeront uniquement au niveau desdites fenêtres. Alternativement, le masque peut être perméable au champ magnétique. Dans ce cas, les vecteurs de fixation se fixeront dans un premier temps sur toute la surface du support, couverte ou non par le masque. Dans un deuxième temps, le  
15 masque sera soigneusement retiré, de façon à retirer les vecteurs de fixation qui n'étaient pas directement en contact avec le support.

Un procédé alternatif de fabrication d'un réseau organisé de sondes biologiques ou chimiques, liées à un support par couplage magnétique à l'aide d'un vecteur de fixation, est décrit à l'exemple 3, et comporte les  
20 étapes suivantes :

A) liaison des sondes au vecteur de fixation,

B) dépôt des sondes couplées au vecteur de fixation sur une lame non aimantée, selon un réseau organisé

C) transfert du réseau de l'étape B sur un support magnétique.

25 Dans tous les procédés de l'invention décrits ci-dessus, le dépôt des vecteurs de fixation, couplés ou non aux sondes, sur le support, magnétique

ou non, est réalisé par n'importe quel moyen que l'homme du métier peut imaginer. Il peut être effectué par exemple à l'aide de pipettes, micro-pipettes, pipettes piezzo-électriques, buses, aiguilles, ou de petits électro-aimants dont le cœur en fer doux serait constitué d'une aiguille d'un diamètre  
5 inférieur à 200  $\mu\text{m}$  à l'extrémité.

Un procédé particulier de l'invention, décrit à l'exemple 4, permet la fabrication d'un réseau organisé de sondes constituées de molécules d'acide nucléique simple brin dont la taille peut être comprise entre 20 et 5000 nucléotides, mais de préférence entre 100 et 500 nucléotides. Ce procédé  
10 comporte les étapes suivantes :

- A) amplification des sondes à partir d'amorces nucléotidiques dont l'une au moins est biotinylée,
- B) dénaturation des sondes par chauffage suivi d'un refroidissement rapide,
- 15 C) couplage des sondes biotinylées sur des billes paramagnétiques, superparamagnétiques ou ferromagnétiques liées à de l'avidine ou de la streptavidine,
- D) précipitation magnétique des sondes liées aux billes,
- E) élimination des sondes non liées par lavage,
- 20 F) resuspension des sondes couplées aux billes à une concentration choisie,
- G) dépôt des sondes couplées aux billes sur un support.

Dans une mise en œuvre préférée des procédés décrits ci-dessus, l'étape de liaison de la sonde au vecteur de fixation est réalisée à une concentration de  
25 sondes saturante pour le vecteur de fixation. Ceci permet notamment de connaître le nombre de sondes liées en moyenne à chaque vecteur de fixation, de façon aisément reproductible.

L'invention porte également sur un support capable de présenter un magnétisme structuré, permanent ou électro-induit, pour la fabrication d'un réseau de sondes biologiques ou chimiques tels que ceux décrits ci-dessus. Un support préféré de l'invention présente un magnétisme structuré permanent. De façon encore préférée, un support de l'invention présente une magnétisation statique découplée de tout champ électrique et est inerte pour toute molécule chargée. En effet, la plupart des polymères biologiques, et particulièrement l'ADN, sont chargés et donc sensibles aux champs électriques, même de très petit voltage, comme décrit dans les articles de Meller et al (Meller, A., L. Nivon, et al. (2000). "Rapid nanopore discrimination between single polynucleotide molecules." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(3): 1079-84. Meller, A., L. Nivon, et al. (2001). "Voltage-driven DNA translocations through a nanopore." *Phys Rev Lett* **86**(15): 3435-8). L'induction d'un champ magnétique par une bobine est en général accompagnée d'un champ électrique résiduel (dépendant de la géométrie de la bobine). L'utilisation d'un champ électromagnétique induit par une bobine dont la géométrie ne permettrait pas d'annihiler complètement ce champ électrique résiduel résulterait donc en une adsorption aspécifique des molécules chargées sur la surface du support. De plus, un tel champ électrique pourrait modifier les caractéristiques physico-chimiques des molécules. Par exemple, dans certaines conditions, le gradient ionique induit par ce champ électrique pourrait détériorer les hélices d'ADN.

Un réseau organisé de vecteurs de fixation couplés à un support par une interaction magnétique entre le support et les vecteurs de fixation fait aussi partie de la présente invention.

Enfin, l'invention porte sur un kit pour la fabrication d'un réseau organisé de sondes biologiques ou chimiques, comprenant un support magnétique et des vecteurs de fixation. Un tel kit est particulièrement intéressant pour permettre à des laboratoires de recherche ou d'analyse de fabriquer eux-mêmes, à moindre frais, des réseaux de sondes particulièrement adaptés à leurs

besoins. Par exemple, ce kit peut permettre à un laboratoire d'élaborer une puce à ADN « à façon », éventuellement en mettant en œuvre le dernier procédé mentionné ci-dessus.

5 De manière préférée mais non limitative, le support magnétique présent dans un kit de l'invention est optiquement neutre et comporte un aimant permanent. Le cas échéant, ce support présente un magnétisme structuré.

Dans une version particulière des kits de l'invention, les vecteurs de fixation sont déjà fixés au support, suivant un réseau organisé.

10 Les vecteurs de fixation présents dans les kits selon l'invention sont par exemple des billes paramagnétiques, superparamagnétiques, ou ferromagnétiques.

Dans une réalisation avantageuse des kits de l'invention, le vecteur de fixation est fonctionnalisé, c'est-à-dire qu'il porte des éléments capables de se lier spécifiquement à une cible biologique.

15 Les kits de l'invention peuvent être destinés à plusieurs types d'utilisation, ou être destinés à être utilisés avec un type donné de sondes. Par exemple, un kit comportant comme vecteurs de fixation des billes portant des oligonucléotides comportant une extrémité poly-T ou poly-U sera plus spécifiquement employé pour fabriquer des puces d'ARN messager ou  
20 d'ADNc sur lesquels on greffe une queue poly A. En revanche, un kit dans lequel le vecteur de fixation est couplé à de la streptavidine ou à de l'avidine peut être utilisé pour n'importe quel type de sonde qu'il est possible de biotinyler.

25 Les kits de l'invention peuvent comporter en outre une ou plusieurs sonde(s) de contrôle, éventuellement liées au vecteur de fixation. Il peut s'agir par exemple d'une sonde d'ADN simple brin codant un fragment de la  $\beta$ -actine, si le kit est destiné à fabriquer des puces pour analyser l'expression de gènes

dans des cellules eucaryotes. Un kit peut aussi comprendre d'une part, la sonde contrôle libre, et d'autre part, la sonde contrôlée déjà fixée sur le vecteur de fixation, ce qui permettra à l'utilisateur de contrôler l'étape de couplage des sondes sur les vecteurs de fixation. Les kits peuvent aussi  
5 comprendre des vecteurs de fixation couplés à des sondes marquées, destinés à calibrer le dépôt des vecteurs de fixation sur le support. Ces exemples ne sont pas limitatifs, et l'homme du métier est apte à imaginer tout type de kit comprenant des éléments supplémentaires destinés à faciliter son utilisation, à permettre une interprétation plus précise des résultats, ou à  
10 cibler un type particulier d'application.

Les exemples et figures ci-après, illustrent la mise en œuvre et l'intérêt de la présente invention, sans toutefois en limiter la portée.

Légende des figures :

Fig. 1 : Fixation de la sonde à la particule aimantée

15 Fig. 2 : Réalisation d'une magnéto-puce

Fig. 3 : Réalisation d'un réseau de billes fonctionnalisées

A) par dépôts successifs

B) par dépôt en une étape en utilisant un cache imperméable au champ magnétique.

20 Fig. 4 : Réseau de billes magnétiques organisé

Fig. 5 : Dépôt des sondes sur un réseau préalablement magnétiquement organisé

Fig. 6 : Image en fluorescence, scannée à 5  $\mu\text{m}$  de résolution, de la formation d'un complexe entre les sondes nucléiques et les vecteurs de  
25 fixation sur la lame :

- A) sonde marquée en Cy3 non fonctionnalisée avec la biotine
- B) sonde marquée en Cy3 fonctionnalisée avec la biotine en 5'
- C) sonde marquée en Cy5 non fonctionnalisée
- D) sonde marquée en Cy5 fonctionnalisée avec biotine en 5'
- E) particule seule.

5

L'observation est réalisée avec un scanner GMS 428 à 5 µm de résolution.

Fig. 7 : Image en fluorescence, scannée à 5 µm de résolution, de l'hybridation de la cible nucléique sur le complexe bille/sonde :

- A) sonde non marquée fonctionnalisée avec biotine en 5', cible marquée en Cy3
- B) sonde non fonctionnalisée avec biotine, cible marquée en Cy3
- C) sonde non marquée fonctionnalisée avec biotine en 5', cible marquée en Cy5
- D) sonde non fonctionnalisée avec biotine, cible marquée en Cy5

10

15

L'observation est réalisée avec un scanner GMS 428 à 5 µm de résolution.

Fig. 8 : Image en fluorescence, scannée à 5 µm de résolution, de la fixation d'une cible et d'une sonde protéiques sur un vecteur de fixation :

- A) les particules sont pré-incubées avec le sérum albumine (BSA), puis avec l'extrait total protéique total marqué en Cy3
- B) les particules sont pré-incubées avec l'anticorps non spécifique, puis avec de la BSA non marquée, puis avec l'extrait total marqué en Cy3
- C) les particules sont pré-incubées avec l'anticorps spécifique x, puis avec de la BSA non marquée, puis avec l'extrait total marqué en Cy3
- D) protéine marquée en Cy3, déposée après les lavages.

20

25

L'observation est réalisée avec un scanner GMS 428 à 5 µm de résolution.

Fig. 9 : réseau de billes fonctionnalisées avec des sondes marquées en Cy3, à une densité de 625 par  $\text{cm}^2$ , observées avec un scanner GMS 428 à 5  $\mu\text{m}$  de résolution. La surface scannée était un carré de 0,75 cm de côté.

5 **Exemple I : Procédé de fabrication d'une magnéto-puce par dépôt en une étape**

Les sondes sont fixées à des particules aimantées, par exemple des billes magnétiques multipolaires. La fixation à la bille se fait, soit par une liaison covalente, ou toute autre liaison chimique, par exemple l'établissement d'une  
10 base SCHIFF, soit par une liaison non covalente, comme par exemple les liaisons streptavidine / biotine ou anticorps / antigène (figure 1).

L'ensemble vecteur de fixation / sondes est ensuite déposé à la densité souhaitée sur une petite surface de quelques  $\mu\text{m}^2$  du support aimanté. On obtient ainsi aux coordonnées déterminées du support, un point de sondes  
15 identiques à la densité souhaitée. L'opération est réalisée autant de fois que nécessaire pour obtenir un micro réseau de points de sondes différents. On notera que plusieurs points peuvent être réalisés simultanément (figure 2).

**Exemple II : Procédé de fabrication d'une magnéto-puce par dépôt en deux étapes**

20 Une alternative au protocole décrit à l'exemple I est possible en utilisant une liaison non covalente entre les vecteurs de fixation et les sondes. En effet, dans ce dernier cas, il est possible de dissocier le dépôt des billes fonctionnalisées et des sondes sur la surface magnétique. Ainsi, à titre  
d'exemple, les billes fonctionnalisées par la streptavidine sont d'abord  
25 déposées sur le support magnétique de façon à créer un réseau régulier de billes magnétiques où chaque point est constitué d'une densité de billes bien

définie. Le réseau peut être créé de deux manières, soit par dépôts successifs comme précédemment (figure 3A), soit en une seule opération en utilisant un masque (figure 3B).

5 Le réseau de billes magnétiques sera réalisé en utilisant un masque « isolant pour le champ magnétique » ne laissant démasquées que les surfaces de la lame aimantée destinées à recevoir les billes, le reste de la surface de la lame aimantée étant masqué (cf. fig. 3B). Donc, seules les parties libres de l'aimant pourront immobiliser les billes magnétiques. Le masque de dépôt des billes pourra être une lame de silice structurée par traitement chimique  
10 ou un film plastique architecturé au laser.

Si le support présente un magnétisme structuré, par exemple s'il s'agit d'une lame de silice dans laquelle sont incrustés des micro-aimants, le réseau de vecteurs de fixation peut être réalisé en une seule opération sans nécessité d'utiliser un masque.

15 On obtient ainsi en un seul dépôt un réseau de billes magnétiques organisé (figure 4).

Dans une deuxième étape, on déposera sur chaque point de billes magnétiques les sondes spécifiques couplées à la biotine en concentration saturante pour la streptavidine (figure 5). La même stratégie peut être suivie  
20 pour toutes les liaisons vecteur de fixation / sonde faisant intervenir une liaison non covalente.

Après le dépôt, les sondes non fixées sont éliminées par ajout de streptavidine libre et lavage.

25 On obtient ainsi un micro réseau de points, eux-mêmes constitués de sondes spécifiques à la densité souhaitée et fixés durablement sur le support à des coordonnées déterminées.

**Exemple III : Procédé de fabrication d'une magnéto-puce par réplique**

Une dernière variante consiste à réaliser le dépôt des sondes liées au vecteur de fixation sur une lame de verre puis à transférer les couples constitués par les billes magnétiques et les sondes qui leur sont fixées à une  
5 lame aimantée.

Le transfert peut se faire simplement par rapprochement de la lame aimantée au-dessus de la lame de verre, le couple bille aimantée/sonde sautant spontanément à des coordonnées équivalentes, de la lame de verre à la  
lame aimantée.

**Exemple IV : Préparation et utilisation d'une magnéto-puce de sondes d'ADN simple brin**

- Préparation des lames

Dans une première étape de fabrication, l'attraction magnétique est fournie par des lames aimantées de 35 x 25 mm pour une épaisseur de 1 mm.

15 Deux types de composition pour les lames sont expérimentés, d'une part des lames composées de néodyme fer bore, qui peuvent fournir une aimantation maximale de 1,3 T, d'autre part des lames aimantées de samarium cobalt qui peuvent fournir une aimantation maximale de 1 T.

20 Pour chaque type de lames, deux orientations de champs d'aimantation seront expérimentées : d'une part, un champ perpendiculaire à la plus grande surface de la lame, et d'autre part, une aimantation parallèle à la plus grande surface de la lame. Pour chaque champ, quatre forces différentes seront utilisées : 0.2, 0.5 et 1 ou 1.3 T.

- Le vecteur de fixation

Dans une première expérience, les vecteurs de fixation utilisés sont des billes (Dynabeads) d'un diamètre de 2,8  $\mu\text{m}$ , constituées de polymère, incluant des oxydes de fer ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$  10-14%) d'une susceptibilité de  $8.10^{-3}$  cgs par unité. Les particules d'oxyde fournissent la réactivité au champ magnétique. Ces billes sont recouvertes de manière covalente de molécules de streptavidine capables de fixer la biotine. La densité des récepteurs streptavidine est de  $7.10^5$  à  $10^6$  en moyenne par bille.

- Le dépôt des spots ou unité d'hybridation

Le dépôt du couple vecteur (bille) / sonde (molécule d'ADNc simple brin) est effectué dans un premier temps à l'aide d'une plume de 0,2 mm à l'extrémité. La concentration de billes choisies pour chaque dépôt sera telle qu'un dépôt représentera 6000 billes environ, ce qui correspondra à  $6.10^9$  molécules sondes par unité d'hybridation, si tous les sites streptavidine sont saturés. Dans ces conditions, on obtient un dépôt mono-couche de billes (chaque bille repose directement sur la lame).

- Préparation des sondes

A partir de couples d'amorces biotinylées en 5', soit sur l'amorce directe, soit sur l'amorce reverse, soit sur les deux amorces, on effectue l'amplification par PCR de la région spécifique du gène à étudier. On obtient ainsi pour chaque PCR une séquence double brin. Cette séquence est biotinylée respectivement en 5' du brin codant, 5' du brin reverse ou biotinylée en 5' sur les deux brins selon la construction choisie. Dans chaque cas, les doubles brins sont dénaturés par trempage, puis couplés à des billes magnétiques fonctionnalisées avec la streptavidine. Le nombre de billes magnétiques ajoutées est calculé de sorte que les sites streptavidine soient saturés par la biotine des ADN. Ainsi, toutes les billes auront fixé  $n$  molécules d'ADN simple brin, où  $n$  représente le nombre de sites streptavidine par bille. Le couple bille / ADN simple brin est précipité dans un champ magnétique puis lavé

pour éliminer l'ADN non fixé à la biotine (dans le cas où seule l'une des amorces était biotinylée, on ne retient qu'un des deux brins de la double hélice d'ADN). Le couple bille magnétique (vecteur) / ADN simple brin (sonde) est resuspendu à la concentration souhaitée pour obtenir une concentration finale souhaitée en ADN ; dans ce cas, on obtient directement la molarité des ADN qui dépend de la concentration en billes.

- Préparation du réseau

L'ensemble vecteur de fixation (bille magnétique) / sondes (ADN simple brin) est déposé à l'aide d'une plume ou d'une pipette piezzo électrique à la densité souhaitée sur une petite surface de 100 à 300  $\mu\text{m}$  de côté. On obtient ainsi aux coordonnées déterminées du support, une unité d'hybridation de sondes identiques à la densité souhaitée. L'opération est réalisée autant de fois que nécessaire pour obtenir un micro réseau de points de sondes différentes. On notera que plusieurs points peuvent être réalisés simultanément.

- L'hybridation

La lame ainsi réalisée est alors directement hybridée avec un mélange d'ADNc marqués en fluorescence. Ces ADNc sont obtenus par RT-PCR (en présence de Cy3<sup>TM</sup> par exemple, comme marqueur fluorescent) des ARNm extraits des cellules étudiées. Il est également possible de réaliser une co-hybridation à partir de deux extraits d'ARN qui fourniront des ADNc marqués respectivement en Cy3<sup>TM</sup> et Cy5<sup>TM</sup>.

Après lavage de la lame pour éliminer les molécules d'ADNc non hybridées, la quantification de la fluorescence au niveau de chaque point indiquera le taux d'hybridation, donc la proportion de chaque type de molécules.

Le marquage n'est pas limitatif ; les mêmes expériences peuvent être réalisées avec des ADNc en radioactivité.

**Exemple V : Magnéto-puce de sondes d'ADN simple brin ciblant les gènes GAPDH et HPRT.**

Un exemple de magnéto-puce a été réalisé en utilisant comme sondes les séquences suivantes obtenues par amplification spécifique (PCR). Pour chaque séquence les trois constructions décrites précédemment sont réalisées :

- séquence 5' biotinylé sur le brin codant,
- séquence 5' biotinylé sur le brin anti sens
- séquence 5' biotinylé sur les deux brins.

Les séquences soulignées correspondent aux amorces spécifiques utilisées pour amplifier les sondes.

**Sondes choisies pour le gène GAPDH.**

CTGGTGTCTTCACCACCATGGAGAAGGCCGGGGCCCACTTGAAGGGTG  
 GAGCCAAACGGGTCATCATCTCCGCCCTTCTGCCGATGCCCCATGT  
 TTGTGATGGGTGTAACCACGAGAAATGACAACACTCAAGATTGT  
 CAGCAATGCATCCTGCACCACCAACTGCTTAGCCCCCTGGCCAAGT  
 CATCCATGACAACTTTGGCATTGTGGAAGGGCTCATGACCACAGTCCAT  
 GCCATCACTGCCACCCAGAAGACTGTGGATGGCCCCTCTGAAAGCTG  
 TGGCGTGATGGCCGTGGGGCTGCCAGAACATCATCCCTGCATCCACT  
 GGTGCTGCCAAGCTGTGGCAAGGTCATCCCAGAGCTGAACGGGAA  
 GCTCACTGGCATGGCCTTCCGTGTTCTACCCCCAATGTGTCCTCGTG  
 GATCTGACGTGCCGCTGGAGAAACCTGCCAAGTATGATGACATCAAG  
AAGGTGGTGA

25

WO 02/43855

PCT/FR01/03780

28

TTCACCACCATGGAGAAGGCCGGGGCCCACTTGAAGGTGGAGCCAAA  
 CGGGTCATCATCTCCGCCCTTCTGCCGATGCCCCCATGTTTGTGATGG  
 GTGTGAACCACGAGAAATATGACAACACTCAAGATTGTCAGCAATGC  
 ATCCTGCACCACCAACTGCTTAGCCCCCTGGCCAAGGTCATCCATGAC  
 5 AACTTTGGCATTGTGGAAGGGCTCATGACCACAGTCCATGCC

Sondes choisies pour le gène HPRT

GCTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAGTGTGGATACAGGCCAGACTTTGTT  
 GGATTTGAAATCCAGACAAGTTTGTGGATATGCCCTTGACTATAA  
 10 TGAGTACTTCAGGAATTTGAATCACGTTTGTGTCATTAGTAAACTGGAA  
 AAGCCAAATACAAAGCCTAAGATGAGCGCAAGTTGAATCGCAAATACG  
 AGGAGTCCGTGATGTTGCCAGTAAAATTAGCAGGTGTTCTAGTCTG  
TG  
 15 AGGAGATGGGAGGCCATCACATTGTGGCCCTCTGTGTGCTCAAGGGGG  
 GCTATAAGTTCTTTGCTGACCTGCTGGATTACATTAAGCACTGAATAGA  
 AATAGTGATAGATCCATTCTATGACTGTAGATTTTATCAGACTGAAGAG  
 CTACTGTAATGATCAGTCAACGGGGGACATAAAAGTTATTGGTGGAGAT  
 GATCTCTCAACTTTAACTGGAAAGAATGTCTTGATTGTTGAAGATATAAT  
 20 TGACTGGTAAAACAATGCAAACCTTTCCTGGTTAAGCAGTACA  
 GCCCCAAAATGGTTAAGGTTGCAAGCTTGTGGTAAAAGGACCTCTCG  
 AAGTGTGGATACAGGCCAGACTTTGTTGGATTTGAAATCCAGACAAG  
 TTTGTTGTTGGATATGCCCTTGACTATAATGAGTACTTCAGGAATTTGAA  
 TCACGTTTGTGTCATTAGTGAAACTGGAAAAGCCAAATACAAAGCC  
 25

**Exemple VI :** Vérification de la formation d'un complexe entre les sondes nucléiques et les vecteurs de fixation sur la lame.

Les vecteurs de fixation utilisés ici sont des particules de polystyrène  $Fe_2O_3$  paramagnétiques de 1  $\mu m$  de diamètre, fonctionnalisées par la streptavidine. La sonde correspond au fragment du gène GAPDH indiqué à l'exemple précédent. Elle est fonctionnalisée ou non par la biotine en 5', sur un seul des deux brins (le brin sens).

Amorces définissant la séquence: 5' CTGGTGTCTTCACCACCATG 3'

5' TCACCACCTTCTTGATGCATC 3'

Les sondes sont marquées soit en Cy3<sup>TM</sup> soit en Cy5<sup>TM</sup> tout le long de la séquence lors d'une amplification par PCR.

Les produits de PCR sont précipités, re-suspendus, dénaturés à 100°C, trempés à 0°C puis incubés avec les particules, à 4°C pendant 60 minutes. Les complexes obtenus sonde/vecteur sont précipités par activation magnétique et lavés trois fois en tampon 10X SSC et 1 fois dans un tampon 3X SSC. Le culot est re-suspendu dans un tampon 3X SSC.

Un aliquot de la solution obtenue est prélevé à l'aide d'une aiguille et déposé sur une lame 20 x 30 x 1 mm magnétique de 1T. Le dépôt est rincé 3 fois au tampon 10X SSC.

La figure 6 montre le résultat des dépôts suivants :

- A) sonde marquée en Cy3 non fonctionnalisée avec la biotine
- B) sonde marquée en Cy3 fonctionnalisée avec la biotine en 5'
- C) sonde marquée en Cy5 non fonctionnalisée
- D) sonde marquée en Cy5 fonctionnalisée avec biotine en 5'
- E) particule seule.

Cette figure montre que la fixation des sondes sur la particule est bien spécifique (absence de marquage fluorescent lorsque la sonde n'est pas

fonctionnalisée par la biotine), et que le complexe bille/sonde est bien retenu sur la lame magnétique (figures B et D).

**Exemple VII : Vérification de l'hybridation de la cible nucléique sur le complexe bille sonde.**

5 Les sondes se composent d'un fragment de la séquence du gène GAPDH fonctionnalisé ou non par la biotine en 5' sur le brin sens.

Les cibles se composent du produit de PCR de la GAPDH marqué tout le long de la séquence en Cy3<sup>TM</sup> ou Cy5<sup>TM</sup>.

10 Les vecteurs de fixation sont des particules de polystyrène Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>paramagnétiques de 1 µm de diamètre fonctionnalisées par la streptavidine.

15 Les sondes sont dénaturées à 100°C, trempées à 0°C puis complexées avec des particules à 4°C pendant 60 min. Les complexes obtenus sonde/vecteur sont précipités par activation magnétique et rincés quatre fois en tampon 10X SSC. Le culot est re-suspendu dans un tampon formamide 25%, les cibles dénaturées sont alors mélangées avec les sondes et sont hybridées à 50°C.

Un aliquot de la solution obtenue est prélevé à l'aide d'une aiguille et déposé sur une lame 20 x 30 x 1 mm magnétique de 1T. Le dépôt est rincé 3 fois avec un tampon 10X SSC et une fois avec un tampon 3X SSC.

20 Les résultats sont montrés sur la figure 7, où les différents points correspondent aux conditions suivantes :

- A) sonde non marquée fonctionnalisée avec biotine en 5', cible marquée en Cy3
- B) sonde non fonctionnalisée avec biotine, cible marquée en Cy3

C) sonde non marquée fonctionnalisée avec biotine en 5', cible marquée en Cy5

D) sonde non fonctionnalisée avec biotine, cible marquée en Cy5

5 Les cibles sont donc capables de s'hybrider sur la sonde lorsqu'elle est fixée à la particule, et il y a très peu d'absorption non spécifique.

La cible est bien retenue sur la lame par l'intermédiaire du vecteur.

**Exemple VIII : Vérification de fixation de cible et de sonde protéique sur un vecteur de fixation.**

10 Les vecteurs sont des particules de polystyrène  $Fe_2O_3$  paramagnétiques de 1  $\mu m$  de diamètre, capables d'adsorber les protéines à leur surface, de façon aspécifique.

La sonde est ici un anticorps spécifique d'une protéine x.

La cible est une protéine x contenue dans un extrait cellulaire marqué au Cy3.

15 Un anticorps non spécifique de la protéine x, et ne reconnaissant aucun élément de l'extrait cellulaire contenant la cible, est utilisé comme témoin.

Différentes hybridations ont été réalisées, dont le résultat apparaît sur la figure 8:

20 Figure 8 A : les particules ont été pré-incubées avec le sérum albumine (BSA), puis avec l'extrait protéique total marqué en Cy3.

Il apparaît une fixation non spécifique.

Figure 8 B : les particules ont été pré-incubées avec l'anticorps non spécifique, puis saturées avec de la BSA non marquée, puis incubées avec l'extrait total marqué en Cy3.

Il apparaît la même fixation non spécifique que lors de la pré-hybridation à la BSA.

5 Figure 8 C : les particules ont été pré-incubées avec l'anticorps spécifique x, saturées avec de la BSA non marquée, puis incubées avec l'extrait total marqué en Cy3.

L'intensité du signal de fluorescence est augmentée par rapport à l'hybridation aspécifique. Il y a bien une hybridation spécifique avec les anticorps anti-x.

10 La fixation non spécifique observée dans cette expérience est importante. Cette fixation non spécifique peut être éliminée en utilisant des particules paramagnétiques de type silicate ou silicium telles que les « silica particul » ou les « beads silica », sur lesquels sont greffées des fonctions SH.

15 Ces particules n'adsorbent pas les protéines, donc éliminent l'absorption aspécifique. Les anticorps pourront être fixés par exemple par le thiol de la chaîne lourde après réduction. Le site de fixation spécifique sera donc constitué d'une chaîne légère et d'une chaîne lourde liée covalement à la particule par un pont S-S.

20 **Exemple IX : Faisabilité d'un réseau de particules paramagnétiques sur un support possédant une aimantation statique de 1T.**

25 Les billes fonctionnalisées avec des sondes marquées en Cy3 ont été déposées à une densité de 625 par  $\text{cm}^2$  sur un support présentant une aimantation statique de 1T. Le réseau obtenu a ensuite été lavé trois fois avec une solution 10X SSC, puis une fois en solution 3X SSC. Le résultat, illustré à la figure 9, montre la stabilité du réseau obtenu.

**REVENDEICATIONS**

1. Réseau organisé de sondes biologiques ou chimiques, liées à un support par couplage magnétique à l'aide d'un vecteur de fixation.
- 5 2. Réseau selon la revendication 1, fixé sur un support optiquement neutre.
3. Réseau selon la revendication 1 ou 2, fixé sur un support comportant un aimant permanent.
4. Réseau selon la revendication 1 et 2, fixé sur un support présentant un magnétisme électro-induit.
- 10 5. Réseau selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, fixé sur un support présentant un magnétisme structuré.
6. Réseau selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel le champ magnétique est perpendiculaire ou parallèle au plan du support.
- 15 7. Réseau selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel le vecteur de fixation est paramagnétique, superparamagnétique ou ferromagnétique.
8. Réseau selon la revendication 7, dans lequel le vecteur de fixation est une bille de latex ou de polysaccharides comportant des particules d'oxyde de fer.
- 20 9. Réseau selon la revendication 7 ou 8, dans lequel le vecteur de fixation est une bille multipolaire.
10. Réseau selon la revendication 7 ou 8, dans lequel le vecteur de fixation est capable de s'orienter dans un champ magnétique.

11. Réseau selon la revendication 10, dans lequel le vecteur de fixation est lui-même aimanté.
12. Réseau selon l'une quelconque des revendications 7 à 11, dans lequel le vecteur de fixation a un diamètre compris entre 1 nm et 500  $\mu\text{m}$ ,  
5 préférentiellement entre 0,5 et 5  $\mu\text{m}$ .
13. Réseau selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, dans lequel le vecteur de fixation porte des éléments capables de se lier spécifiquement à une cible biologique.
14. Réseau selon la revendication 13, dans lequel les éléments capables  
10 de se lier spécifiquement à une cible biologique portés par le vecteur de fixation sont sélectionnés dans le groupe comportant les immunoglobulines, les antigènes, les récepteurs membranaires, les ligands de récepteurs membranaires, l'avidine, la streptavidine, les oligonucléotides poly-T ou poly-U.
- 15 15. Réseau selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, dans lequel chaque sonde est déposée en un point dont le diamètre est compris entre 10  $\mu\text{m}$  et 1 mm, préférentiellement entre 50 et 200  $\mu\text{m}$ .
16. Réseau selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, dans lequel  
20 chaque point comporte entre  $10^5$  et  $10^{10}$  sondes, préférentiellement entre  $10^8$  et  $10^{10}$  sondes.
17. Réseau selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, ayant une densité comprise entre 1 et 100000 points par  $\text{cm}^2$ , préférentiellement entre 10 et 1000 points par  $\text{cm}^2$ .
- 25 18. Procédé de fabrication d'un réseau organisé de sondes biologiques ou chimiques, liées à un support par couplage magnétique à l'aide d'un vecteur de fixation, comportant les étapes suivantes :

- A) liaison des sondes au vecteur de fixation,
- B) dépôt sur un support magnétique, des sondes couplées au vecteur de fixation, selon un réseau organisé.
- 5 19. Procédé de fabrication d'un réseau organisé de sondes biologiques ou chimiques, liées à un support par couplage magnétique à l'aide d'un vecteur de fixation, comportant les étapes suivantes :
- A) couplage magnétique d'un vecteur de fixation en des coordonnées connues d'un support,
- B) liaison des sondes sur les vecteurs de fixation.
- 10 20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que l'étape de couplage du vecteur de fixation au support est effectuée en utilisant un masque.
21. Procédé de fabrication d'un réseau organisé de sondes biologiques ou chimiques, liées à un support par couplage magnétique à l'aide d'un vecteur de fixation, comportant les étapes suivantes :
- 15 A) liaison des sondes au vecteur de fixation,
- B) dépôt des sondes couplées au vecteur de fixation sur une lame non aimantée, selon un réseau organisé
- C) transfert du réseau de l'étape B sur un support magnétique.
- 20 22. Procédé selon la revendication 18 ou 21, pour la fabrication d'un réseau organisé de sondes constituées de molécules d'acide nucléique simple brin, comportant les étapes suivantes :
- A) amplification des sondes à partir d'amorces nucléotidiques dont l'une au moins est biotinylée,

- B) dénaturation des sondes par chauffage suivi d'un refroidissement rapide,
- C) couplage des sondes biotinylées sur des billes paramagnétiques, superparamagnétiques ou ferromagnétiques liées à de l'avidine ou de la streptavidine,
- D) précipitation magnétique des sondes liées aux billes,
- E) élimination des sondes non liées par lavage,
- F) resuspension des sondes à une concentration choisie,
- G) dépôt des sondes sur un support.
23. Procédé selon l'une quelconque des revendications 18 à 22, dans lequel l'étape de liaison de la sonde au vecteur de fixation est réalisée à une concentration de sondes saturante pour le vecteur de fixation.
24. Support présentant un magnétisme structuré permanent, pour la fabrication d'un réseau de sondes biologiques ou chimiques, suivant un procédé selon l'une quelconque des revendications 18 à 23.
25. Support selon la revendication 24, dans lequel le magnétisme structuré résulte d'une magnétisation statique découplée de tout champ électrique et est inerte pour toute molécule chargée.
26. Réseau organisé de vecteurs de fixation couplés à un support par une interaction magnétique entre le support et les vecteurs de fixation.
27. Produit de couplage formé d'une sonde d'acide nucléique et d'un vecteur de fixation, dans lequel un vecteur de fixation est couplé à un nombre compris entre  $10^3$  et  $10^8$ , préférentiellement entre  $10^5$  et  $10^7$  molécules d'acide nucléique.
28. Utilisation d'un produit de couplage formé d'une sonde biologique ou chimique et d'un vecteur de fixation, pour la fabrication d'un réseau

organisé de sondes biologiques ou chimiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 17.

- 5 29. Kit pour la fabrication d'un réseau organisé de sondes biologiques ou chimiques, comprenant un support magnétique et des vecteurs de fixation.
30. Kit selon la revendication 29, dans lequel le vecteur de fixation porte des éléments capables de se lier spécifiquement à une cible biologique.

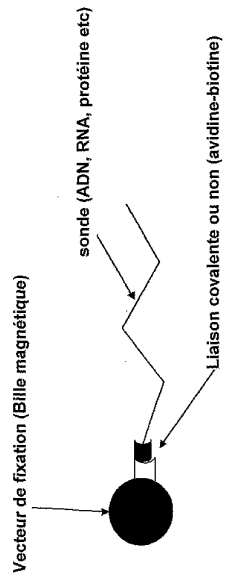


Figure 1

217

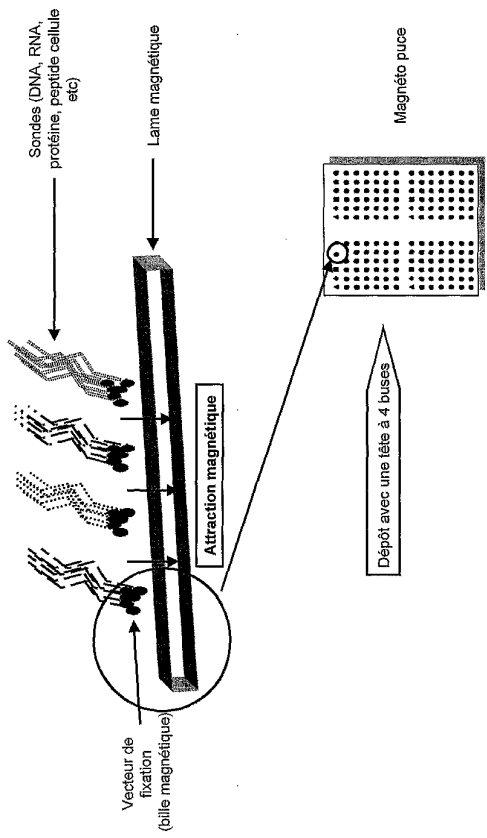


Figure 2

WO 02/43855

PCT/FR01/03780

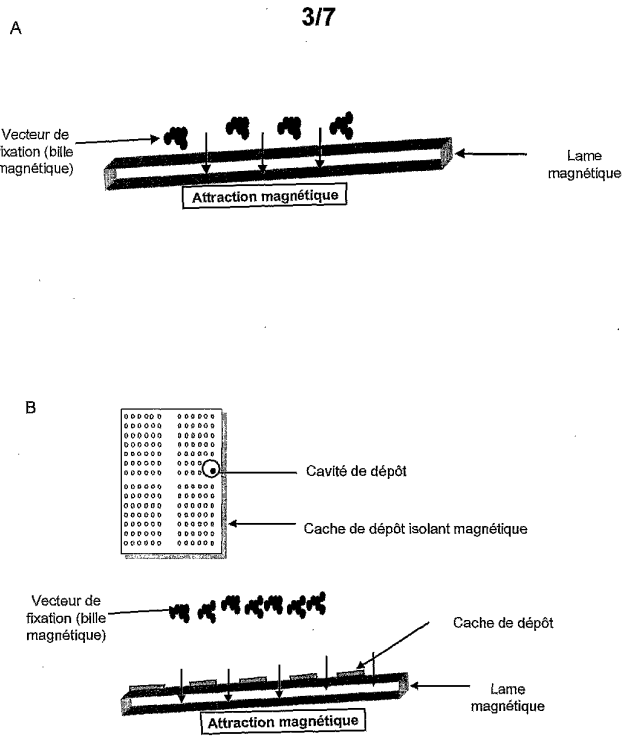


Figure 3

4/7

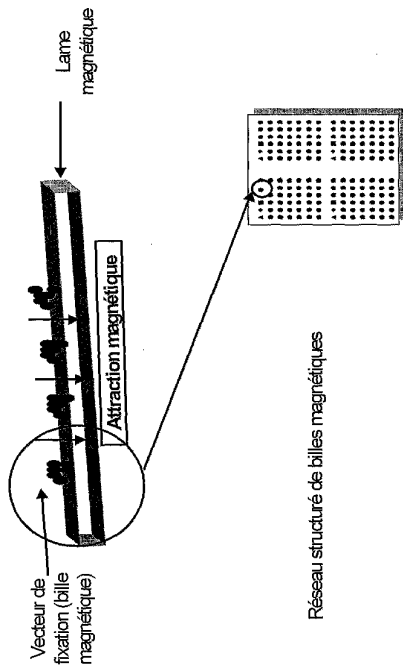


Figure 4

WO 02/43855

PCT/FR01/03780

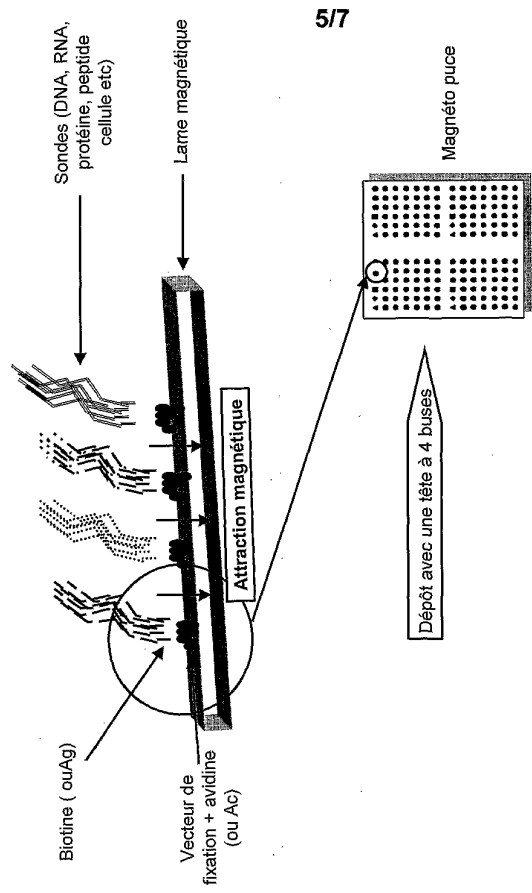


Figure 5

WO 02/43855

PCT/FR01/03780

6/7

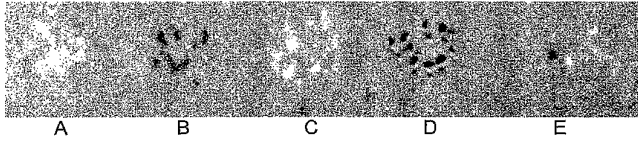


Figure 6

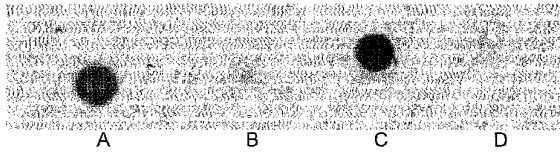


Figure 7

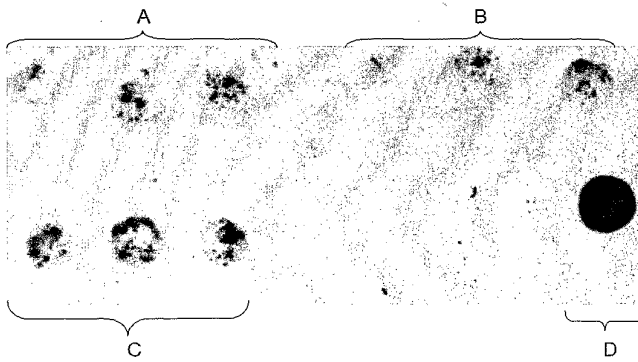


Figure 8

WO 02/43855

PCT/FR01/03780

7/7

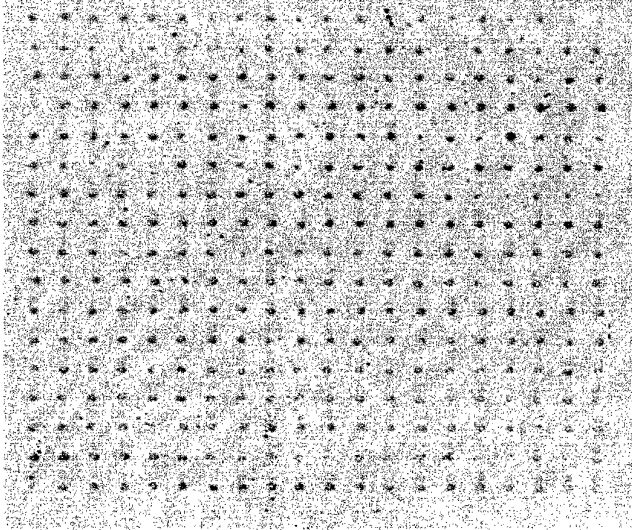


Figure 9

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/FR 01/03780
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 601J19/00 601N33/543		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 601J 601N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, PAJ, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 54882 A (ARTLOON CORPORATION) 21 September 2000 (2000-09-21)  abstract page 7, line 5 -page 8, line 4 page 9, line 1 - line 9 page 10, line 7 - line 15 page 11, line 3 - line 21 page 22, line 9 -page 23, line 2 page 25, line 6 - line 18 page 38, line 1 -page 42, line 17 figures 1,2,4,13-15	1,2, 4-19, 27-30
A	---	3,20-26
A	DE 198 54 003 A (JENOPTIK AG) 25 May 2000 (2000-05-25) the whole document ---	1-30
	---	
	---/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "S" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 May 2002		Date of mailing of the international search report 22/05/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5918 Patentstein 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 01 651 epo nl, Fac. (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Stevnsborg, N

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/FR 01/03780
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 40444 A (BIO-MAGNETICS LTD.) 12 August 1999 (1999-08-12) -----	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1999)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.  
PCT/FR 01/03780

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0054882 A	21-09-2000	CN 1267089 A	20-09-2000
		AU 6045799 A	04-10-2000
		WO 0054882 A1	21-09-2000
		US 6355491 B1	12-03-2002
		US 2002022276 A1	21-02-2002
DE 19854003 A	25-05-2000	DE 19854003 A1	25-05-2000
		GB 2343949 A	24-05-2000
WO 9940444 A	12-08-1999	AU 2439099 A	23-08-1999
		CA 2327798 A1	12-08-1999
		CN 1295669 T	16-06-2001
		EP 1060397 A1	20-12-2000
		WO 9940444 A1	12-08-1999

Form PCT1854/210 (patent family annex) (July 1999)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		Demande internationale No PCT/FR 01/03780
A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 B01J19/00 G01N33/543		
Selon la classification internationale des brevets (CIP) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 B01J G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) MPI Data, PAJ, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 00 54882 A (ARTLOON CORPORATION) 21 septembre 2000 (2000-09-21)  abrégé page 7, ligne 5 -page 8, ligne 4 page 9, ligne 1 - ligne 9 page 10, ligne 7 - ligne 15 page 11, ligne 3 - ligne 21 page 22, ligne 9 -page 23, ligne 2 page 25, ligne 6 - ligne 18 page 38, ligne 1 -page 42, ligne 17 figures 1,2,4,13-15	1, 2, 4-19, 27-30
A	---	3,20-26
A	DE 198 54 003 A (JENOPTIK AG) 25 mai 2000 (2000-05-25) le document en entier  ---  -/-	1-30
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication dans une autre citation ou pour une raison spéciale (liste qui s'indique) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la façon consistant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  14 mai 2002		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  22/05/2002
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 LV Rijswijk Tél. (+31-70) 840-2040, Tlx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 840-3076		Functionnaire autorisé  Stevnsborg, N

Formulaire PCT/ISA/210 (septième édition) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		Demande internationale No PCT/FR 01/03780
C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 99 40444 A (BIO-MAGNETICS LTD.) 12 août 1999 (1999-08-12) -----	

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la demande suite) (juillet 1992)

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No  
PCT/FR 01/03780

Document brevet cité ou rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0054882 A	21-09-2000	CN 1267089 A	20-09-2000
		AU 6045799 A	04-10-2000
		WO 0054882 A1	21-09-2000
		US 6355491 B1	12-03-2002
		US 2002022276 A1	21-02-2002
DE 19854003 A	25-05-2000	DE 19854003 A1	25-05-2000
		GB 2343949 A	24-05-2000
WO 9940444 A	12-08-1999	AU 2439099 A	23-08-1999
		CA 2327798 A1	12-08-1999
		CN 1295669 T	16-05-2001
		EP 1060397 A1	20-12-2000
		WO 9940444 A1	12-08-1999

Formulaire PCT/ISA/210 (version famille de brevets) (juin 1992)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/545	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/553	G 0 1 N 33/53	U
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 33/545	A
	G 0 1 N 33/553	
	G 0 1 N 37/00	1 0 2

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 マルグリ ドゥ ロトルー, ジュラール

フランス国 エフ - 9 4 4 1 0 ヴィトリ, リュ デュ ジェニ 6 8

(72) 発明者 コルテュルースキー, ティエリ

フランス国 エフ - 9 1 3 8 0 シリー マザラン, リュ パストゥール 2 9

(72) 発明者 アリベール, オリヴィエ

フランス国 エフ - 9 1 2 5 5 サン - ジェルマン ル コルベイユ, アヴニユ サン - テグジュペリ 4

(72) 発明者 ル ルー, ディアナ

フランス国 エフ - 9 2 1 9 0 ムードン, アヴニユ ドゥ トゥリヴォ 5

F ターム(参考) 4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC01 CC02 CC03 CC08 FA12 FA15

4G075 AA39 BA04 BA05 CA42 CA51

专利名称(译)	固定通过磁力固定和支持物上的生物或化学探针的微阵列		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004525345A</a>	公开(公告)日	2004-08-19
申请号	JP2002545821	申请日	2001-11-29
[标]申请(专利权)人(译)	原子能委员会		
申请(专利权)人(译)	コミッサリア タ レネルジー アトミック		
[标]发明人	ユゴランニコラ マルグリドゥロトルージュラール コルテユルースキーティエリ アリベールオリヴィエ ルルーディアナ		
发明人	ユゴラン,ニコラ マルグリドゥロトルー,ジュラール コルテユルースキー,ティエリ アリベール,オリヴィエ ルルー,ディアナ		
IPC分类号	B01J19/00 C07B61/00 C07H21/00 C12M1/00 C12M1/34 C40B60/14 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/553 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/54326 B01J19/0046 B01J2219/00351 B01J2219/0043 B01J2219/00468 B01J2219/005 B01J2219/00527 B01J2219/00585 B01J2219/00596 B01J2219/00648 B01J2219/00659 B01J2219/0072 C07B2200/11 C07H21/00 C40B60/14		
FI分类号	G01N33/543.541.A G01N33/543.525.C B01J19/00.321 C12M1/00.A C12M1/34.Z G01N33/53.M G01N33/53.U G01N33/545.A G01N33/553 G01N37/00.102		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/CC02 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/FA12 4B029/FA15 4G075/AA39 4G075/BA04 4G075/BA05 4G075/CA42 4G075/CA51		
优先权	2000015398 2000-11-29 FR		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及利用固定化载体通过磁性偶联与支持物结合的有组织的生物或化学探针阵列。支撑件可以包括永磁体并且可以表现出电感应磁化。固定化载体可以由功能化的磁珠构成，以能够特异性结合一种特定类型的生物探针。

