



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

05-96779

54. TITULO

METODOS INMUNOCROMATOGRAFICOS DE FASE SOLIDA

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

G01N33/558 // 33/543

71. SOLICITANTE

VEDALAB

DOMICILIO

Alencon, Francia.

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén.

22. BOGOTA, D.C.,

23/09/2005

SS



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Indicacion : 05096/79 00000000

Folio: 36

Fecha (día): 2005-09-23 17:31:14

Remite : 011 PCT-PATENT 379: 002 NACI 411 PRESENTAC

Indicacion: 0000 DIVISION DE NUEVAS INVENCIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 28-10-05

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo I.

☒ Capítulo II.

2

**S LICITANTE
(71)**

Nombre: **VEDALAB**

sociedad constituida y existente bajo las leyes de Francia.

Dirección: ZAT du Londeau, Rue de l'Expansion,
Carise, F-61000 Alençon,
Francia

Domicilio: Alençon,
Francia

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: **EMILIO FERRERO**

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 38 11

Fax: 217 92 11

E-mail: clientes@camyo.com.

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número 438.019 T.P 31.929

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

1. Raphaël DONATI

4, rue d'Ecouvès,
F-61250 Radon,
Francia.

2. Patrick BIGOT

Les Fours à chaux, Route de Boucé,
F-61150 Ecouche,
Francia.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/FR2004/000775

Fecha: 26 de marzo de 2004

Publicación Internacional No. WO 2004/088320 A1

Fecha: 14 de octubre de 2004

6

Título (54)

METODOS INMUNOCROMATOGRAFICOS DE FASE-SÓLIDA

7

Clasificación Internacional (51) G01N 33/558

// 33/543.

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

FR.

(32) Fecha

28 de marzo de 2003

(31) Número de Solicitud

03/03877

9

Comprobante de pago No.: 05 - 69.909

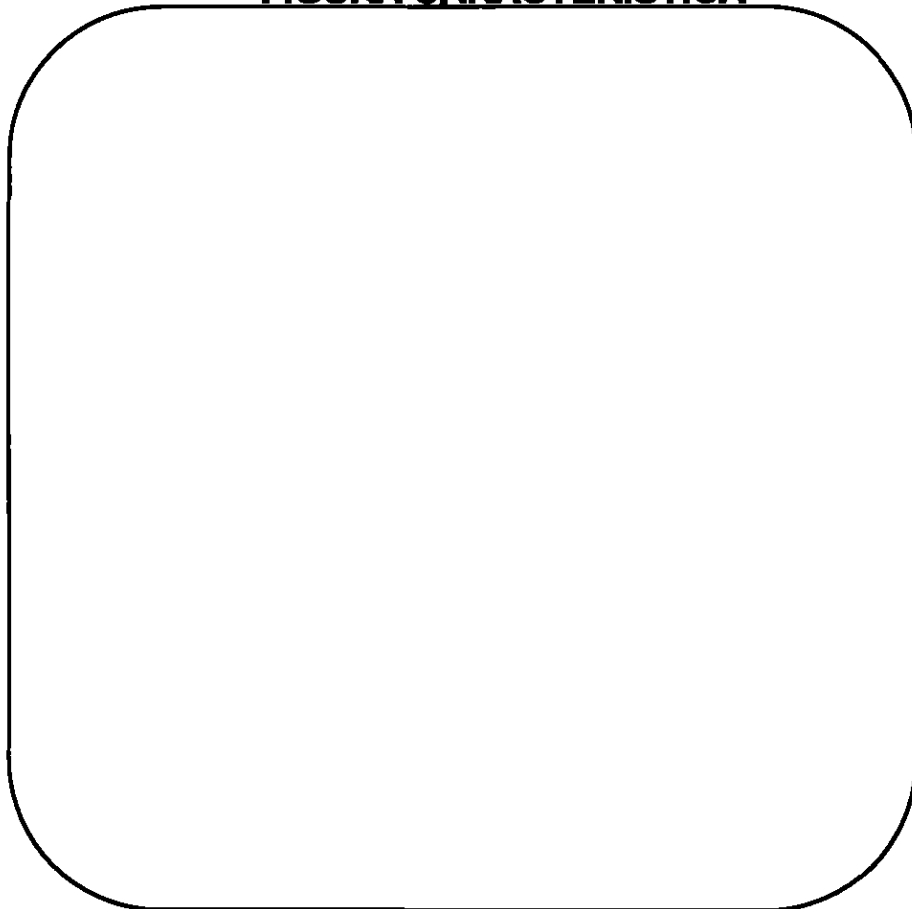
Fecha: 12 de septiembre de 2005

10

Anex s:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 443.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: **HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS.**

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERREROFIRMA : *Emilio Ferrero*

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

1. ☒ **Publicación Internacional WO 2004/088320 A1**

Descripción:

Páginas 26 en el idioma original

Páginas 26 en español

Reivindicaciones: Número (s) 13

Figuras: Número (s) 5

2. ☒ **Forma PCT/RO/101. PCT Request**
3. ☐ **Forma PCT/RO/106. Invitation to Correct Defects.**
4. ☒ **Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.**
5. ☐ **Forma PCT/ISA/220. Notificación De La Transmisión Del Informe De Búsqueda Internacional Y De La Opinión Escrita De La Administración Encargada De La Búsqueda Internacional, O De La Declaración.**
6. ☐ **Forma PCT/ISA/237. Opinión Escrita De La Administración Encargada De La Búsqueda Internacional.**
7. ☐ **Forma PCT/IB/304. Notification Concerning Submission Or Transmittal Of Priority Document.**
8. ☐ **Forma PCT/IB/306. Notification Of The Recoding Of A Change.**
Descripción De Modificación:
9. ☒ **Forma PCT/IB/308. Notice Informing The Applicant Of The Communication Of The International Application To The Designated Offices.**
10. ☐ **Forma PCT/IB/311 From the International Bureau**
11. ☒ **Forma PCT/IB/332. Information Concerning Elected Offices Notified Of Their Election.**
12. ☐ **Forma PCT/IPEA/401. PCT Demand**
13. ☐ **Forma PCT/IPEA/402. Notification Of Receipt Of Demand By Competent International Preliminary Examining Authority.**
14. ☐ **Forma PCT/IPEA/408. Written Opinion.**
15. ☐ **Forma PCT/IPEA/416. Notification Of Transmittal Of The International Preliminary Examination Report.**
16. ☒ **Forma PCT/IPEA/409. Informe Del Examen Preliminar Internacional.**
17. ☐ **Traducción Al Español Del Informe Del Examen Preliminar Internacional.**
18. ☒ **Traducción Al Español De Los Anexos Presentados Junto Con El Informe Del Examen Preliminar Internacional.**
19. ☒ **Extracto de publicación.**

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

(43) Date de la publication internationale
14 octobre 2004 (14.10.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/088320 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
G01N 33/558, 33/543

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/000775

(22) Date de dépôt international : 26 mars 2004 (26.03.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
03/03877 28 mars 2003 (28.03.2003) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
VEDALAB [FR/FR]; ZAT du Loureau, Rue de l'Expansion,
Clerice, F-61000 Alençon (FR).

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : DONATI,
Raphaël [FR/FR]; 4, rue d'Ecouves, F-61250 Radon (FR).
BIGOT, Patrick [FR/FR]; Les Fourès à chaux, Route du
Boucé, F-61150 Ecouche (FR).

(74) Mandataire : Cabinet GERMAIN & MAUREAU; BP
6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

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

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.

(54) Title: SOLID-PHASE IMMUNOCHROMATOGRAPHIC METHODS

(54) Titre : PROCÉDES IMMUNOCHROMATOGRAPHIQUES EN PHASE SOLIDE

(57) Abstract: The invention concerns solid-phase immunochromatographic methods for detecting an analyte in a liquid sample.
In the inventive methods, a binding reagent conjugated with a particulate marker is extemporaneously added in liquid form.

(57) Abrégé : L'invention a pour objet des procédés immunochromatographiques en phase solide pour détecter un analyte dans
un échantillon liquide. Dans les procédés selon l'invention, un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire est ajouté
extemporanément sous forme liquide.

WO 2004/088320 A1

PROCEDES IMMUNOCHROMATOGRAPHIQUES EN PHASE SOLIDE

La présente invention concerne un procédé de détection d'un analyte dans un échantillon liquide.

5 Les tests immunochromatographiques en phase solide sont bien connus de l'homme du métier. Ces tests mettent en œuvre un support solide poreux au sein duquel l'échantillon et les réactifs migrent par diffusion capillaire. On connaît notamment les dispositifs dans lesquels le support solide se présente sous la forme d'un « dip-stick ». Ces tests utilisent un support
10 solide chromatographique comportant une zone de détection sur laquelle est immobilisé un réactif de capture spécifique de l'analyte. Ce support solide est mis en contact avec une solution comprenant d'une part l'échantillon à tester et d'autre part un réactif de liaison marqué spécifique de l'analyte. Cette solution migre par diffusion capillaire dans le support solide jusqu'à la zone portant le
15 réactif de capture immobilisé. Dans un test sandwich, le réactif de liaison marqué se lie à l'analyte alors que ce dernier est immobilisé sur le support solide par le réactif de capture. La présence ou l'absence de l'analyte dans l'échantillon est ainsi mesurée par la détection du réactif marqué.

EP 0 284 232 décrit des tests immunochromatographiques en
20 phase solide dans lesquels le support solide porte directement, sous forme lyophilisée ou déshydratée, le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire. Le réactif conjugué avec le marqueur particulaire est immobile sous forme lyophilisée mais devient mobile dans le support solide à l'état humide. Ainsi, lorsque le support solide est mis en contact avec un échantillon
25 liquide, ce dernier migre par diffusion capillaire dans le support entraînant le réactif de liaison conjugué au marqueur particulaire. Dans ces tests, il n'est pas nécessaire de mélanger préalablement le réactif conjugué et l'échantillon et tous les réactifs nécessaires au test sont donc intégrés au support solide. De plus, le réactif de liaison marqué spécifique de l'analyte est marqué avec un
30 marqueur particulaire détectable par observation directe: Aucune manipulation supplémentaire n'est donc nécessaire pour lire le résultat du test. Ces tests ne nécessitent donc que très peu de manipulations et sont d'un usage facile et rapide.

EP 0 291 194, EP 0 580 411 et EP 0 580 410 décrivent également
35 des dispositifs de test dans lesquels le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire est porté par le support solide. De plus dans ces

dispositifs, le support solide est incorporé dans un boîtier pourvu d'une ouverture pour le dépôt de l'échantillon et d'une fenêtre d'observation pour la lecture des résultats. Le boîtier facilite la préhension du dispositif et protège le support solide. En outre, ces brevets décrivent également des dispositifs dans
5 lesquels l'une des extrémités du support solide est saillante par rapport au boîtier pour faciliter le dépôt de l'échantillon liquide. Cette extrémité saillante du support solide peut ainsi être directement mise en contact avec un flux d'urine par exemple.

WO 00/00288 décrit des dispositifs améliorés comprenant un
10 boîtier et un support solide. Le support solide étant pourvu d'un organe de captation mobile pour une meilleure collecte de l'échantillon.

EP-A1-0 458 231 concerne des tests immunologiques en phase solide pour la détection d'un analyte dans un échantillon liquide. Ces tests mettent en œuvre un support solide, typiquement une membrane, sur laquelle
15 est immobilisé un réactif de capture de l'analyte. Après dépôt de l'échantillon, l'analyte immobilisé sur le support solide est détecté à l'aide d'un réactif de liaison conjugué à l'uréase. Ce document décrit des procédés dans lesquels l'échantillon puis le réactif de liaison marqué sont déposés sur le support solide.

20 EP-A2-0 462 376 décrit des tests immunochromatographiques à migration latérale. Les test décrits mettent en œuvre un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulier. Ce document décrit des tests dans lesquels l'échantillon et le réactif de liaison conjugué sont appliqués séparément sur le support solide ou combinés préalablement au dépôt sur le
25 support pour former une solution test. De préférence, le réactif de liaison conjugué est incorporé au support chromatographique.

US 6,008,056 décrit des dispositifs automatisés pour l'immunochromatographie latérale. Le réactif de liaison marqué est incorporé au support solide ou mélangé avec l'échantillon avant ou lors du dépôt sur le
30 support chromatographique.

EP-A1-1 020 726 décrit des tests immunochromatographiques à migration latérale. L'échantillon est déposé sur le support avant le réactif de liaison marqué ou un mélange comprenant l'échantillon et un ou plusieurs réactifs marqués est déposé sur le support.

WO-A1-97 08620 décrit des procédés de détection d'un analyte dans un échantillon par immunochromatographie quantitative ou semi quantitative. Le réactif de liaison marqué est incorporé au support solide.

5 Cependant, ces tests immunochromatographiques en phase solide présentent parfois une sensibilité et une reproductibilité insuffisantes. Ce problème se pose plus particulièrement pour la détection d'analytes présents à une faible concentration ou par la détection d'analytes dans un échantillon de nature complexe tel que du sang total par exemple. De plus, en raison de ces
10 déficiences de tels tests ne conviennent que pour déterminer l'absence ou la présence d'un analyte dans un échantillon et ne permettent donc que l'obtention d'un résultat qualitatif. Des mesures plus quantitatives ne sont que difficilement réalisables. En outre, on observe fréquemment un bruit de fond important ainsi qu'un effet de zone (ou « Hook effect ») qui altèrent la lisibilité
15 du résultat. L'effet de zone est un effet indésirable bien connu dans les tests immunologiques. Il se produit lorsque l'analyte est présent dans l'échantillon à une concentration très élevée. L'effet de zone peut alors conduire à un résultat négatif concluant de façon aberrante à l'absence de l'analyte dans l'échantillon.

 Pour remédier à ces inconvénients la présente invention propose
20 des procédés immunochromatographiques en phase solide permettant d'obtenir une sensibilité et une reproductibilité accrues tout en limitant le bruit de fond et les effets de zone. Les procédés selon l'invention sont particulièrement adaptés à des échantillons de nature complexe tel que du sang par exemple. Etant donné que le bruit de fond est diminué alors que la
25 sensibilité et la reproductibilité sont accrues, les procédés de la présente invention, permettent avantageusement de détecter plusieurs analytes différents de façon simultanée sur le même support. De plus, l'analyte présent dans l'échantillon liquide peut être mesuré et quantifié grâce aux performances des procédés selon l'invention.

30 Dans les procédés selon la présente invention, le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière est ajouté extemporanément sous forme liquide. Ainsi, dans les procédés selon l'invention l'ordre de dépôt de l'échantillon et des divers réactifs revêt une grande importance pour la performance du test de détection.

Dans un premier mode de réalisation, le procédé de détection d'un analyte dans un échantillon liquide selon l'invention comprend les étapes suivantes :

a) on dispose d'un support solide poreux pourvu d'une zone de collection et d'une zone de détection, un réactif de capture étant immobilisé dans la zone de détection ;

b) on dépose, séparément et successivement, dans la zone de collection du support solide poreux:

i) un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière, le réactif étant sous forme liquide,

ii) l'échantillon liquide,

c) on attend un temps suffisant pour la migration par diffusion capillaire du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et de l'échantillon liquide depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux,

d) on observe la mesure dans laquelle le réactif conjugué à un marqueur particulière se fixe dans la zone de détection.

Avantageusement à l'étape b) on dépose l'échantillon liquide en amont du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière par rapport au sens de migration depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux.

La présente invention concerne également un procédé de détection d'un analyte dans un échantillon liquide comprenant les étapes suivantes :

a) on dispose d'un support solide poreux pourvu d'une zone de collection et d'une zone de détection, un réactif de capture étant immobilisé dans la zone de détection ;

b) on dépose, séparément et successivement, dans la zone de collection du support solide poreux :

i) un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière, le réactif étant sous forme liquide,

ii) l'échantillon liquide,

iii) un diluant sous forme liquide,

c) on attend un temps suffisant pour la migration par diffusion capillaire du réactif conjugué à un marqueur particulière, de l'échantillon liquide et du diluant depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux,

d) on observe la mesure dans laquelle le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière se fixe dans la zone de détection.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection d'un analyte dans un échantillon liquide comprenant les étapes
5 suivantes :

a) on dispose d'un support solide poreux pourvu d'une zone de collection et d'une zone de détection, un réactif de capture étant immobilisé dans la zone de détection ;

b) on dépose, séparément et successivement, dans la zone de
10 collection du support solide poreux:

i) l'échantillon liquide,

ii) un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière, le réactif étant sous forme liquide,

iii) un diluant sous forme liquide,

c) on attend un temps suffisant pour la migration par diffusion
15 capillaire du réactif conjugué à un marqueur particulière, de l'échantillon liquide et du diluant depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux,

d) on observe la mesure dans laquelle le réactif de liaison conjugué
20 à un marqueur particulière se fixe dans la zone de détection.

Avantageusement, à l'étape b) on dépose le diluant sous forme liquide en amont du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et en amont de l'échantillon liquide par rapport au sens de migration depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux.

25 Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et le réactif de capture immobilisé dans la zone de détection permettent de détecter l'analyte par un test sandwich.

Dans un autre mode de réalisation préféré de l'invention, le réactif
30 de liaison conjugué à un marqueur particulière et le réactif de capture immobilisé dans la zone de détection permettent de détecter l'analyte par un test de compétition.

Préférentiellement, le support solide poreux est un support solide poreux en forme de bande ou de bandelette chromatographique.

35 Avantageusement, le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une fenêtre d'observation permettant

d'observer la mesure dans laquelle le réactif conjugué à un marqueur particulaire se fixe dans la zone de détection du support solide poreux.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le support de préhension est pourvu d'au moins une ouverture permettant respectivement le
5 dépôt de l'échantillon liquide, du réactif de liaison conjugué à un marqueur et, le cas échéant, du diluant sur la zone de collection du support solide poreux.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une fenêtre d'observation permettant d'observer la mesure dans laquelle le
10 réactif conjugué à un marqueur particulaire se fixe dans la zone de détection du support solide poreux ; le support solide poreux étant également pourvu d'une première ouverture permettant le dépôt dans la zone de collection du support solide poreux du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire et d'une deuxième ouverture, en amont de la première ouverture, permettant le
15 dépôt dans la zone de collection du support solide poreux de l'échantillon liquide.

Dans un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une fenêtre d'observation permettant d'observer la mesure dans laquelle
20 le réactif conjugué à un marqueur particulaire se fixe dans la zone de détection du support solide poreux ; le support de préhension étant également pourvu d'une première ouverture, permettant le dépôt dans la zone de collection du support solide poreux du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire et de l'échantillon, et d'une deuxième ouverture, en amont de la première
25 ouverture, permettant le dépôt dans la zone de collection du support solide poreux du diluant sous forme liquide.

Préférentiellement, le support de préhension est constitué d'un boîtier.

La présente invention a aussi pour objet un kit de détection d'un
30 analyte dans un échantillon liquide comprenant a) un support solide poreux pourvu d'une zone de collection et d'une zone de détection, un réactif de capture étant immobilisé dans la zone de détection, et b) un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire sous forme liquide.

Avantageusement, le kit de détection d'un analyte dans un
35 échantillon liquide selon l'invention comprend en outre un diluant.

De préférence, le support solide poreux est intégré dans un support de préhension.

Préférentiellement, le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une fenêtre d'observation pour observer la zone de détection du support solide poreux.

Dans un mode de réalisation préféré, le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une ouverture pour le dépôt de l'échantillon liquide et/ou du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire et/ou du diluant dans la zone de collection du support solide poreux.

Préférentiellement, le support solide poreux est intégré dans un support de préhension en forme de boîtier.

Par « analyte », on entend toute entité chimique, biochimique ou biologique que l'on souhaite détecter dans un échantillon. Parmi les analytes détectés par les procédés selon la présente invention, on citera notamment les protéines, les peptides, les anticorps, les hormones, les stéroïdes, les antigènes dérivés d'agents infectieux ou de cellules tumorales, les agents infectieux tels que les bactéries, les virus ou les parasites, les acides nucléiques (ADN ou ARN), les molécules thérapeutiques, les drogues ou encore les antibiotiques.

Par « détecter », on entend la détermination de la présence ou de l'absence d'un analyte dans un échantillon mais aussi la mesure et la quantification d'un analyte dans un échantillon. En effet, les performances des procédés selon l'invention autorisent la réalisation de mesures quantitatives ou semi quantitatives.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, l'analyte est la hCG (hormone chorionogonadotrope) ou le PSA (antigène prostatique).

Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, l'analyte est un acide nucléique. Dans ce cas, l'acide nucléique présent dans l'échantillon est préférentiellement amplifié préalablement selon des techniques bien connues de l'homme du métier (PCR, etc.). De préférence, cette étape d'amplification permet également de marquer l'acide nucléique amplifié en utilisant des amorces biotinylées ou par incorporation de nucléotides marqués à la biotine par exemple. Alternativement, l'acide nucléique peut être, par exemple, marqué à la biotine à son extrémité 3' à l'aide d'une terminale transférase appropriée. Avant le dépôt l'échantillon est dénaturé soit par choc

thermique soit en présence d'une solution de NaOH 0,2 N, EDTA 0,05 M ou de toute autre méthode appropriée. Cette étape de dénaturation permet d'obtenir des acides nucléiques simple brin.

Par « échantillon liquide », on entend tout échantillon dans lequel
5 l'analyte recherché est en solution ou en suspension. Cet échantillon liquide peut notamment être tout fluide biologique ou corporel. L'échantillon liquide peut également avoir été obtenu directement ou indirectement à partir d'un fluide biologique ou corporel. L'échantillon peut également être un extrait liquide d'un échantillon solide.

10 Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, l'échantillon liquide est de l'urine, du sang total, du plasma ou du sérum.

Les réactifs mis en œuvre dans les procédés selon la présente invention sont bien connus de l'homme du métier.

Le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et le
15 réactif de capture sont spécifiques de l'analyte recherché dans l'échantillon.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et le réactif de capture immobilisé dans la zone de détection du support solide permettent de détecter l'analyte par un test sandwich.

20 Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et le réactif de capture spécifique de l'analyte immobilisé dans la zone de détection du support solide permettent de détecter l'analyte par un test de compétition.

Les tests sandwich et les tests par compétition sont bien connus de
25 l'homme du métier. Dans un test sandwich, le réactif de capture spécifique de l'analyte et le réactif de liaison marqué sont prédéterminés pour se lier respectivement et spécifiquement avec l'analyte, par exemple sur deux sites épitopiques, identiques ou différents de l'analyte. Dans un test par compétition, le réactif de liaison marqué est identique ou analogue à l'analyte, pour se lier
30 avec le réactif de capture, en compétition avec l'analyte.

Par « réactif de capture », on entend toute entité chimique biochimique ou biologique susceptible de se lier spécifiquement avec l'analyte.

Dans le cas d'un test par compétition, le réactif de capture se lie également au réactif de liaison. L'analyte et le réactif de capture forment
35 typiquement un couple ligand/anti-ligand, antigène/anticorps, ADN/ARN ou ADN/ADN. Ainsi, si l'analyte est un antigène ou un haptène, le réactif de

capture est par exemple un anticorps spécifique de l'analyte. Si l'analyte est un anticorps, le réactif de capture est l'antigène reconnu par l'anticorps ou un anticorps reconnaissant spécifiquement l'analyte. Si l'analyte est un acide nucléique, le réactif de capture est par exemple une sonde ADN
5 complémentaire.

Le réactif de capture immobilisé est préférentiellement un anticorps polyclonal ou monoclonal ayant une forte affinité pour l'analyte et plus préférentiellement il s'agit d'un anticorps monoclonal.

Le réactif de capture spécifique de l'analyte est immobilisé sur le
10 support solide selon des techniques connues de l'homme du métier. Ce réactif de capture est immobilisé de telle façon qu'il ne soit pas mobile à l'état humide. Cette immobilisation peut s'effectuer par exemple par absorption ou par un couplage covalent. Lorsque le réactif de capture est un acide nucléique, il est par exemple fixé sur un support de type nitrocellulose par un traitement UV ou
15 par toute autre technique connue de l'homme du métier.

Par « réactif de liaison », on entend toute entité chimique biochimique ou biologique susceptible de se lier spécifiquement avec l'analyte ou avec le réactif de capture en compétition avec l'analyte.

Par « lier » ou « liaison », on entend toute liaison forte, par exemple
20 covalente ou toute liaison faible, par exemple du type antigène/anticorps ou avidine/streptavidine.

Le réactif de liaison est par exemple un anticorps, un antigène ou un acide nucléique.

Tout autre réactif de liaison connu de l'homme du métier peut être
25 utilisé tel que un (ou des anticorps) monoclonal aux antibiotine, de l'avidine, de la streptavidine, ou de la polytroptavidine. Ces réactifs peuvent être natifs ou recombinants.

Dans un test par compétition, le réactif de liaison est par exemple l'analyte lui-même ou un analogue approprié de l'analyte. Par analogue approprié de l'analyte, on entend un analogue se liant de manière spécifique
30 au réactif de capture spécifique de l'analyte. Le réactif de liaison marqué est donc l'analyte conjugué à un marqueur particulière ou un analogue de l'analyte conjugué à un marqueur particulière.

Dans un test de type sandwich, le réactif de liaison se lie de façon
35 spécifique à l'analyte. Le réactif de liaison marqué est donc par exemple un anticorps spécifique de l'analyte conjugué à un marqueur particulière.

Lorsque l'analyte est un acide nucléique marqué à la biotine, le réactif de liaison est typiquement un anticorps anti-biotine conjugué à un marqueur particulaire tel que de l'or colloïdal par exemple.

Le réactif de liaison est conjugué à un marqueur particulaire
5 permettant une mesure ou une observation directe du résultat du test. Le marqueur particulaire peut être observé directement à l'œil nu lorsqu'il est concentré dans la zone de détection du support solide. La mesure du marqueur particulaire peut s'effectuer directement à l'œil nu ou à l'aide d'un appareil de mesure. Cette mesure se fait par une observation directe ne nécessitant pas
10 de manipulation supplémentaire. Typiquement, les marqueurs particuliers sont constitués de particules de petite taille insolubles dans l'eau et qui forment donc des suspensions en phase liquide c'est-à-dire une dispersion de particules solides dans un liquide.

Les marqueurs particuliers sont bien connus de l'homme du
15 métier. On connaît notamment les marqueurs particuliers colorés ou fluorescents. A titre d'exemple, on citera l'or colloïdal, les particules de latex colorées, les particules de latex fluorescentes et les particules conjugués à l'avidine ou à la streptavidine.

Parmi les marqueurs permettant une observation directe à l'œil nu
20 on citera aussi les marqueurs de type dextran (Hansen T.M., *IVD Technology* 4, 35-40, 2003). Le réactif de liaison est alors conjugué à une chaîne de dextran (dérivé de polysaccharide) portant des fluorophores.

Le réactif de liaison est conjugué au marqueur particulaire selon des techniques connues.

25 Dans les procédés selon la présente invention, le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire est sous forme liquide.

Par « réactif sous forme liquide », on entend tout réactif dans lequel le réactif de liaison est en solution ou en suspension. La préparation du réactif de liaison conjugué au marqueur particulaire sous forme liquide se fait selon
30 des techniques décrites dans la littérature. Habituellement, le réactif de liaison conjugué est en solution ou en suspension dans une solution saline tamponnée. Cette solution peut également comprendre des agents stabilisants et d'autres composés tels que des anti-bactériens ou des anti-fongiques. Parmi les agents stabilisants on citera par exemple la sérum albumine bovine (BSA)
35 et la caséine.

Dans certains procédés selon la présente invention, un diluant est utilisé lorsque l'échantillon liquide est du plasma, du sérum ou du sang total par exemple. Ce diluant migre dans le support solide entraînant l'échantillon et le réactif de liaison marqué. Typiquement ce diluant est composé d'une solution saline tamponnée, Il peut également comprendre un détergent ou tout autre composant nécessaire à la réaction.

Dans les procédés de détection d'acides nucléiques, le diluant peut être constitué d'un tampon d'hybridation. De tels tampons d'hybridation sont bien connus de l'homme du métier.

Les supports solides poreux mis en œuvre dans les tests immunochromatographiques selon l'invention sont bien connus de l'homme du métier (EP 0 284 232). La porosité du support permet la diffusion capillaire de l'échantillon et des réactifs à l'état liquide ou humide.

A titre d'exemple, le support solide poreux peut être constitué de divers supports chromatographiques, de cellulose, de nylon, de nitrocellulose, de polyéthylène ou de fibre de verre.

Le support solide peut être constitué d'une ou de plusieurs parties distinctes. Les différentes parties du support pouvant être constituées de matériaux différents. Lorsque le support solide est constitué de différentes parties ou de différents matériaux, ces éléments sont disposés de telle façon à permettre la continuité de l'écoulement capillaire dans le support solide.

De préférence, le support solide poreux est un support solide poreux en forme de bande ou de bandelette chromatographique.

Le support solide peut ainsi se présenter sous la forme d'une bande chromatographique constituée de plusieurs bandelettes superposés ou chevauchantes.

Typiquement, le support solide poreux comporte une zone de collection de l'échantillon et une zone de détection portant le réactif de capture. Ces zones sont disposées de façon à permettre la continuité de l'écoulement capillaire depuis la zone de collection jusqu'à la zone de détection. La zone de collection et la zone de détection sont deux zones distinctes et séparées du support solide poreux. L'échantillon, le réactif de liaison marqué et le cas échéant le diluant sont déposés au niveau de la zone de collection et migrent à travers le support solide poreux jusqu'à la zone de détection. Le support solide poreux est ainsi par exemple constitué d'une bande chromatographique dont

l'une des extrémités constitue la zone de collection, la zone de détection étant situé à proximité de l'autre extrémité de la bande.

Ces zones peuvent par exemple être présentes dans un même plan sur une bande constitué d'un matériau unique. Avantageusement, un matériau spécifique correspond à chaque zone du support solide. Un matériau absorbant poreux peut par exemple être utilisé pour la zone de collection de l'échantillon.

La zone de collection de l'échantillon du support solide peut ainsi être constitué d'un organe de captation en matériau absorbant. Cet organe de captation peut être directement mis en contact avec un flux d'urine par exemple. Le support solide peut également comprendre un organe de captation mobile tel que décrit dans WO 00/00288.

La zone de détection du support solide poreux peut également comporter un deuxième réactif de capture immobilisé sur le support poreux en aval du premier réactif de capture. Ce deuxième réactif de capture immobilisé permet de contrôler le bon déroulement du test en vérifiant par exemple la migration du réactif de liaison conjugué au marqueur particulaire dans le support solide. Le deuxième réactif de capture est par exemple un anticorps spécifique du réactif de liaison.

Dans les procédés selon la présente invention, le réactif de liaison marqué, l'échantillon et le cas échéant le diluant sont déposés séparément, successivement et sous forme liquide dans la zone de collection du support solide. Le dépôt extemporané du réactif de liaison marqué sous forme liquide avant l'échantillon et/ou avant le diluant permet de diminuer bruit de fond et effet de zone tout en augmentant la sensibilité grâce au contact immédiat et total entre l'échantillon et le réactif de liaison marqué. La reproductibilité des procédés selon l'invention est également considérablement augmentée par le dosage précis du réactif de liaison marqué ajouté sous forme liquide.

De plus, dans les procédés selon la présente invention le dépôt extemporané du réactif de liaison marqué sous forme liquide avant l'échantillon et/ou avant le diluant permet d'obtenir un effet de lavage qui conduit à une diminution du bruit de fond et de l'effet de zone. Ceci est particulièrement avantageux pour la détection d'analytes dans un échantillon complexe tel que du sang par exemple.

De façon avantageuse, l'échantillon ou le diluant est déposé dans la zone de collection en amont du réactif de liaison marqué.

Afin de contrôler la quantité de réactif de liaison marqué déposé sur la zone de collection du support solide poreux, ce dépôt s'effectue de préférence à l'aide d'une pipette, d'un goutte à goutte ou d'un flacon compte-gouttes.

5 L'échantillon liquide peut également être déposé à l'aide d'une pipette, d'un goutte à goutte ou d'un flacon compte-gouttes. Dans un autre mode de réalisation, le dépôt de l'échantillon est effectué en trempant la zone de collection du support solide dans l'échantillon liquide. Lorsque l'échantillon liquide est de l'urine, la zone de collection du support solide peut aussi être
10 directement mise en contact avec un flux d'urine.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, le support solide poreux est intégré dans un support de préhension. Ce support de préhension peut envelopper partiellement ou totalement le support solide poreux. Habituellement, le support de préhension est en forme de boîtier.

15 Ces supports de préhension ou boîtiers sont notamment décrits dans EP 0 291 194, EP 0 560 411, EP 0 580 410 et dans WO 00/00288.

Le support de préhension facilite la manipulation du support solide poreux et protège celui-ci de l'humidité notamment.

20 Le support de préhension peut être constitué de matériaux divers tel que du carton, du carton plastifié ou plus préférentiellement de matières plastiques. De façon avantageuse, le support de préhension est constitué d'un matériau rigide et imperméable.

Typiquement, le support de préhension est pourvu d'au moins une fenêtre d'observation pour observer la zone de détection du support solide
25 poreux.

Dans un mode de réalisation de l'invention, le support solide poreux peut comprendre une zone de collection saillante par rapport au support de préhension pour le dépôt de l'échantillon liquide et/ou du réactif de liaison marqué et/ou du diluant.

30 Dans un autre mode de réalisation de l'invention, le support de préhension ou le boîtier comprend au moins une ouverture pour le dépôt de l'échantillon liquide et/ou du réactif de liaison marqué et/ou du diluant dans la zone de collection du support solide poreux.

L'invention sera mieux comprise à l'aide des figures et des
35 exemples ci-dessous :

Figures

Figure 1 : Principes des procédés immunochromatographiques de l'invention

- 5 Les régions grisées représentent des parties du support solide constituées d'un matériau absorbant.

Figure 2 : Dispositif pour tests immunochromatographiques

- La figure 2 représente un dispositif comprenant un boîtier comprenant un support solide poreux. Le boîtier est pourvu d'une ouverture (O) pour le dépôt
10 des liquides et d'une fenêtre d'observation (F). La figure 2a représente le dépôt des liquides sur le support solide par l'ouverture dans le boîtier. La figure 2b montre un résultat négatif visible par la fenêtre d'observation (F). La figure 2b montre un résultat positif pour un test sandwich visible par la fenêtre
15 d'observation (F).

T= ligne de test, C= ligne de contrôle, O= ouverture, F= fenêtre d'observation.

Figure 3 : Dispositif pour tests immunochromatographiques à deux puits

- La figure 3 représente un boîtier comprenant un support solide poreux. Le
20 boîtier est pourvu de deux ouvertures distinctes (O1 et O2) pour le dépôt des liquides et d'une fenêtre d'observation. La flèche indique le sens de migration par diffusion capillaire.

O1= ouverture n° 1, O2= ouverture n°2, T= ligne de test, C= ligne de contrôle.

25

Figure 4 : Exemples comparatifs avec diluant

R= réactif de liaison marqué, E= échantillon, D= diluant, T= ligne de test, C= ligne de contrôle.

- 30 **Figure 5 : Exemples comparatifs sans diluant**

R= réactif de liaison marqué, E= échantillon, T= ligne de test, C= ligne de contrôle.

Exemples

Exemple 1 : Procédés immunochromatographiques avec diluant

5 Dispositif

Les procédés ont été mis en œuvre avec les dispositifs représentés à la figure 2 et à la figure 3.

Analyte et échantillon

L'analyte est l'antigène prostatique (PSA) détecté dans du sérum. Le test
10 pourrait être réalisé de la même façon avec du sang total ou du plasma.

Réactifs et diluant

Le réactif de liaison marqué est un anticorps monoclonal ou polyclonal anti-PSA conjugué avec de l'or colloïdal dans un tampon (PBS 0,1M, pH 8) contenant de la sérum albumine bovine (BSA 1%) comme stabilisant.

15 Au niveau de la ligne de test de la zone de détection est immobilisé un premier réactif de capture. Ce premier réactif de capture est un anticorps monoclonal ou polyclonal anti-PSA.

Au niveau de la ligne de contrôle de la zone de détection est immobilisé un deuxième réactif de capture. Ce deuxième réactif de capture est un anticorps
20 monoclonal ou polyclonal dirigé contre l'anticorps du réactif de liaison marqué.

Le diluant est constitué d'un tampon PBS (0,1 M, pH 8) contenant un détergent (0,05% Tween 20).

Procédés

Les différents procédés qui ont été comparés sont représentés dans la figure 4.

25 Les procédés A, B et C sont conformes à l'invention. Dans tous les cas, la quantité d'échantillon et la quantité de réactif de liaison conjugué au marqueur particulière par test étaient identiques quelle que soit le procédé considéré pour ne pas fausser les résultats.

Volume échantillon = 25 µl (Version A, B, C, D, E)

30 Volume diluant = 100 µl (Version A, B, C, D), 150 µl (Version E).

Volume réactif de liaison marqué = 35 µl (Version A, B, C, D), identique mais sous forme déshydratée (Version E).

Les procédés ont été réalisés de la façon suivante :

Version A

- 35 1) Réactif de liaison marqué
2) Echantillon

20

3) Diluant

Version B

- 1) Echantillon dans ouverture 2
- 2) Réactif de liaison marqué dans ouverture 2
- 5 3) Diluant dans ouverture 1 (en amont de l'ouverture 2).

Version C

- 1) Echantillon
- 2) Réactif de liaison marqué
- 3) Diluant

10 Version D

- 1) Echantillon et réactif de liaison marqué pré-mélangés
- 2) Diluant

Version E

- 1) Echantillon
- 15 2) Diluant

Dans ce dernier procédé le réactif de liaison marqué est directement porté par le support solide.

Résultats

- Les performances obtenues pour chacun des procédés ont été mesurées et
- 20 quantifiées à l'aide d'un réflectomètre. L'effet de zone est évalué en utilisant un échantillon très concentré en analyte.

Procédé	Bruit de fond	Effet de zone	Sensibilité	Reproductibilité
A	4	5	5	4
B	5	3	4	4
C	4	4	3	4
D	4	4	2	4
E	3	2	1	2

Classification de 1 à 5 (1 le moins performant, 5 le plus performant).

Exemple 2 : Procédés Immunochromatographiques sans diluant**Dispositif**

- Les procédés ont été mis en œuvre avec les dispositifs représentés à la figure 2 et à la figure 3.

Analyte et échantillon

L'analyte est l'hormone chorionogonadotrope (hCG) détectée dans de l'urine. Le test pourrait être réalisé de la même façon avec du serum ou du plasma.

Réactifs

- 10 Le réactif de liaison marqué est un anticorps monoclonal ou polyclonal anti-hCG conjugué avec de l'or colloïdal dans un tampon (PBS 0,1M, pH 8) contenant de la sérum albumine bovine (BSA 1%) comme stabilisant.
- Au niveau de la ligne de test de la zone de détection est immobilisé un premier réactif de capture. Ce premier réactif de capture est un anticorps monoclonal
- 15 ou polyclonal anti-hCG.
- Au niveau de la ligne de contrôle de la zone de détection est immobilisé un deuxième réactif de capture. Ce deuxième réactif de capture est un anticorps monoclonal ou polyclonal dirigé contre l'anticorps du réactif de liaison marqué.

Procédés

- 20 Les différents procédés qui ont été comparés sont représentés dans la figure 5. Les procédés A et B sont conformes à l'invention. Dans tous les cas, la quantité d'échantillon et la quantité de réactif de liaison conjugué au marqueur particulière par test étaient identiques quelle que soit le procédé considéré pour ne pas fausser les résultats.
- 25 Volume échantillon = 100 µl (Version A, B, D); 100 µl + 35 µl (Version E)
Volume réactif de liaison marqué = 35 µl (Version A, B, D), identique mais sous forme déshydratée (Version E).

Les procédés ont été réalisés de la façon suivante :

Version A

- 30 1) Réactif de liaison marqué
2) Echantillon

Version B

- 1) Réactif de liaison marqué dans ouverture 2
2) Echantillon dans ouverture 1

35 **Version D**

- 1) Echantillon et réactif de liaison marqué pré-mélangés

Version E

1) Echantillon

Dans ce dernier procédé le réactif de liaison marqué est directement porté par le support solide.

5 Résultats

Les performances obtenues pour chacun des procédés ont été mesurées et quantifiées à l'aide d'un réflectomètre. L'effet de zone est évalué en utilisant un échantillon très concentré en analyte.

Procédé	Bruit de fond	Effet de zone	Sensibilité	Reproductibilité
A	4	4	4	4
B	5	5	1	4
D	3	1	5	4
E	3	3	3	2

10

Classification de 1 à 5 (1 le moins performant, 5 le plus performant).

Exemple 3 : Procédé de détection de la morphine (test compétition)

15 Dispositif

Ce procédé a été mis en œuvre avec le dispositif représenté à la figure 2.

Analyte et échantillon

L'analyte est la morphine détectée dans de l'urine.

Réactifs

20 Le réactif de liaison marqué est un haptène morphine-BSA conjugué à des particules d'or colloïdal dans un tampon (PBS 0,1M, pH 8) contenant de la sérum albumine bovine (BSA 1%) comme stabilisant.

Au niveau de la ligne de test de la zone de détection est immobilisé un réactif de capture. Ce premier réactif de capture est un anticorps monoclonal anti-

25 morphine.

Procédé

Dépôt de 35 µl de réactif de liaison conjugué au marqueur particulaire puis dépôt de 150 µl d'urine dans le même puit du boîtier. Lecture des résultats 5 minutes plus tard.

Résultats

Par rapport à un test mettant en œuvre un support solide portant le réactif de liaison conjugué sous forme déshydratée, le bruit de fond est diminué et la reproductibilité est améliorée.

5

Exemple 4 : Procédé de détection d'un acide nucléique

Dispositif

Ce procédé est mis en œuvre avec le dispositif représenté à la figure 2.

- 10 Le dispositif comprend une bandelette de nitrocellulose sur laquelle est fixée (par traitement UV ou par toute autre technique) une sonde spécifique d'un acide nucléique d'*E.coli* ou de *Chlamydia*. La bandelette est incluse dans un boîtier en plastique pourvu d'une ouverture pour le dépôt des réactifs et d'une fenêtre d'observation.

15 Analyte et échantillon

L'analyte recherché dans l'échantillon est un ADN ou un ARN d' *E.coli* ou de *Chlamydia*. L'acide nucléique est préalablement amplifié selon des méthodes classiques comme par exemple la PCR. Le marquage de l'ADN est réalisé au moyen d'amorces biotinylées ou par incorporation de nucléotides marqués à la

20 biotine. Alternativement, l'extrémité 3' des acides nucléiques est marquée à la biotine à l'aide d'une terminale transférase.

Réactifs

Le réactif de liaison marqué est un anticorps polyclonal de lapin anti-biotine marqué à l'or colloïdal.

- 25 Le tampon d'hybridation est un tampon PBS contenant 0,1% de Tween 20. D'autres tampons d'hybridation peuvent être utilisés.

Procédé

Les acides nucléiques amplifiés et marqués à la biotine (échantillon) sont dénaturés soit par choc thermique, soit en présence de NaOH 1,2N, EDTA

30 0,05 M.

25 µl d'échantillon dénaturé sont déposés dans le puit échantillon (ouverture). 40 µl de réactif de liaison marqué (conjugué anti-biotine) sont ensuite déposés dans le puit échantillon. Ces deux premières étapes peuvent être inversées.

- 150 µl à 200 µl de tampon d'hybridation sont ensuite déposés dans le puit
- 35 échantillon.

Résultats

- Lorsque l'acide nucléique recherché est présent dans l'échantillon il migre par diffusion depuis la zone de collection jusqu'à la zone de détection où il se fixe à la sonde immobilisée sur le support. Une bande rouge apparaît dans la zone test (lecture du test 10 à 20 minutes après les dépôts). La ligne de contrôle
- 5 apparaît également dans la zone de détection et montre la bonne fonctionnalité des réactifs.

REVENDICATIONS

1) Procédé de détection d'un analyte dans un échantillon liquide
5 comprenant les étapes suivantes :

a) on dispose d'un support solide poreux pourvu d'une zone de collection et d'une zone de détection, un réactif de capture étant immobilisé dans la zone de détection ;

b) on dépose, séparément et successivement, dans la zone d
10 collection du support solide poreux:

i) un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière, le réactif étant sous forme liquide,

ii) l'échantillon liquide,

c) on attend un temps suffisant pour la migration par diffusion
15 capillaire du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et de l'échantillon liquide depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux,

d) on observe la mesure dans laquelle le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière se fixe dans la zone de détection.

20

2) Procédé selon la revendication 1 dans lequel à l'étape b) on dépose l'échantillon liquide en amont du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière par rapport au sens de migration depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux.

25

3) Procédé de détection d'un analyte dans un échantillon liquide comprenant les étapes suivantes :

a) on dispose d'un support solide poreux pourvu d'une zone de collection et d'une zone de détection, un réactif de capture étant immobilisé
30 dans la zone de détection ;

b) on dépose, séparément et successivement, dans la zone de collection du support solide poreux :

i) un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière, le réactif étant sous forme liquide,

35 ii) l'échantillon liquide,

iii) un diluant sous forme liquide,

c) on attend un temps suffisant pour la migration par diffusion capillaire du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire, de l'échantillon liquide et du diluant depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux,

5 d) on observe la mesure dans laquelle le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire se fixe dans la zone de détection.

4) Procédé de détection d'un analyte dans un échantillon liquide comprenant les étapes suivantes :

10 a) on dispose d'un support solide poreux pourvu d'une zone de collection et d'une zone de détection, un réactif de capture étant immobilisé dans la zone de détection ;

b) on dépose, séparément et successivement, dans la zone de collection du support solide poreux:

15 i) l'échantillon liquide,

ii) un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire, le réactif étant sous forme liquide,

iii) un diluant sous forme liquide,

20 c) on attend un temps suffisant pour la migration par diffusion capillaire du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire, de l'échantillon liquide et du diluant depuis la zone de collection jusqu'à la zone de détection du support solide poreux,

d) on observe la mesure dans laquelle le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire se fixe dans la zone de détection.

25

5) Procédé selon l'une des revendications 3 ou 4 dans lequel à l'étape b) on dépose le diluant sous forme liquide en amont du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire et en amont de l'échantillon liquide par rapport au sens de migration depuis la zone de collection jusqu' à la zone de

30 détection du support solide poreux.

6) Procédé selon l'une des revendications 1-5 dans lequel le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire et le réactif de capture immobilisé dans la zone de détection permettent de détecter l'analyte par un

35 test sandwich.

7) Procédé selon l'une des revendications 1-5 dans lequel le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et le réactif de capture immobilisé dans la zone de détection permettent de détecter l'analyte par un test de compétition.

5

8) Procédé selon l'une des revendications 1-7 dans lequel le support solide poreux est un support solide poreux en forme de bande ou de bandelette chromatographique.

10

9) Procédé selon l'une des revendications 1-8 dans lequel le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une fenêtre d'observation permettant d'observer la mesure dans laquelle le réactif conjugué à un marqueur particulière se fixe dans la zone de détection du support solide poreux.

15

10) Procédé selon la revendication 9 dans lequel le support de préhension est pourvu d'au moins une ouverture permettant respectivement le dépôt de l'échantillon liquide, du réactif de liaison conjugué à un marqueur et, le cas échéant, du diluant dans la zone de collection du support solide poreux.

20

11) Procédé selon la revendication 2 dans lequel le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une fenêtre d'observation permettant d'observer la mesure dans laquelle le réactif conjugué à un marqueur particulière se fixe dans la zone de détection du support solide poreux ; le support solide poreux étant également pourvu d'une première ouverture permettant le dépôt dans la zone de collection du support solide poreux du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et d'une deuxième ouverture, en amont de la première ouverture, permettant le dépôt dans la zone de collection du support solide poreux de l'échantillon liquide.

30

12) Procédé selon la revendication 5 dans lequel le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une fenêtre d'observation permettant d'observer la mesure dans laquelle le réactif conjugué à un marqueur particulière se fixe dans la zone de détection du support solide poreux ; le support de préhension étant également pourvu d'une première ouverture, permettant le dépôt dans la zone de collection du support

35

24

solide poreux du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et de l'échantillon, et d'une deuxième ouverture, en amont de la première ouverture, permettant le dépôt dans la zone de collection du support solide poreux du diluant sous forme liquide.

5

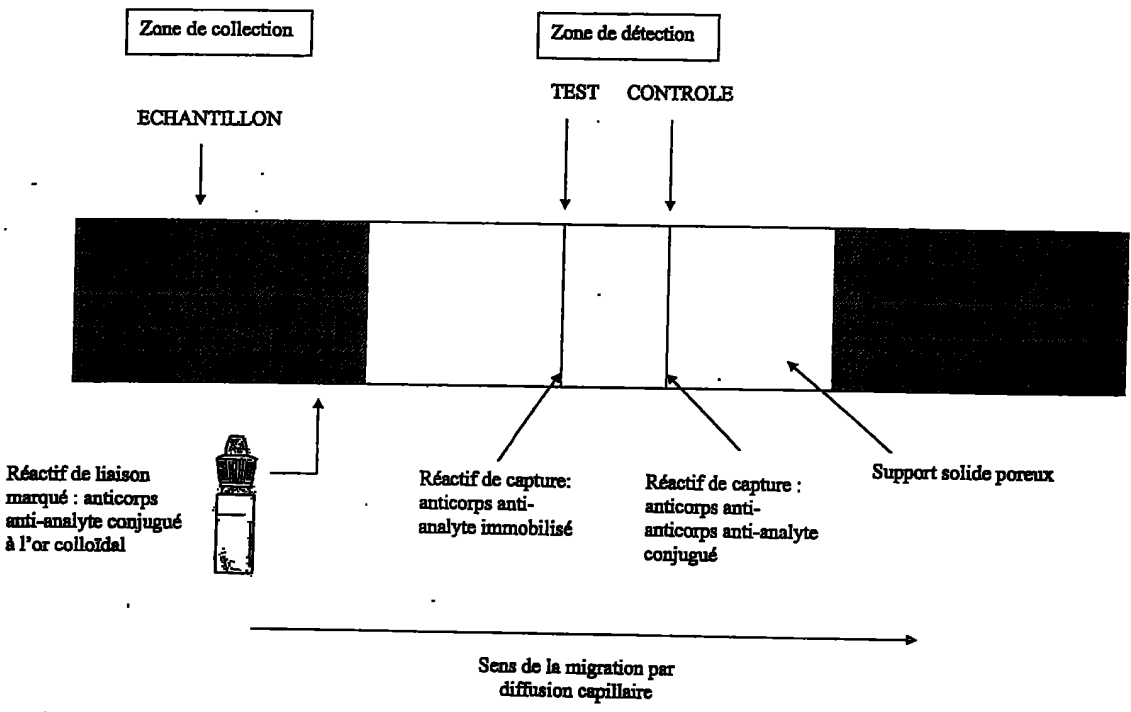
13) Procédé selon l'une des revendications 9-12 dans lequel le support de préhension est constitué d'un boîtier.

Fig. 1

WO 2004/08320

1/5

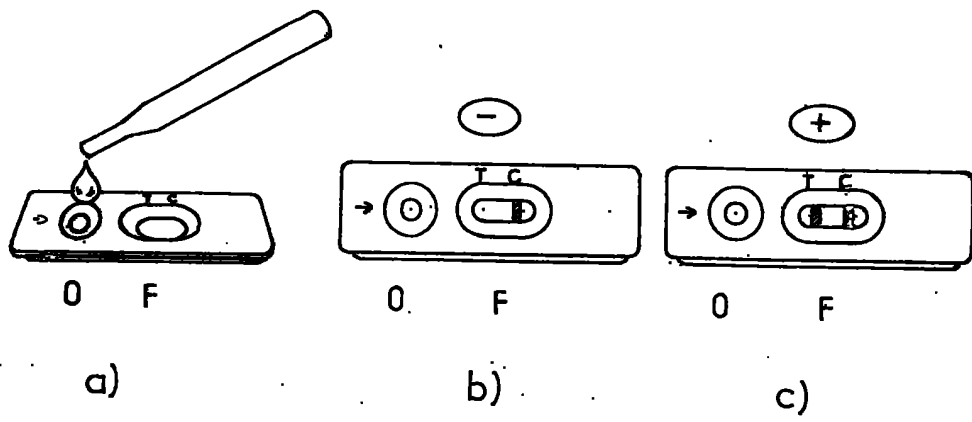
PCT/FR2004/00075



28

2/5

FIG 2



31

WO 2004/088320

PCT/FR2004/000775

3/5

FIG3

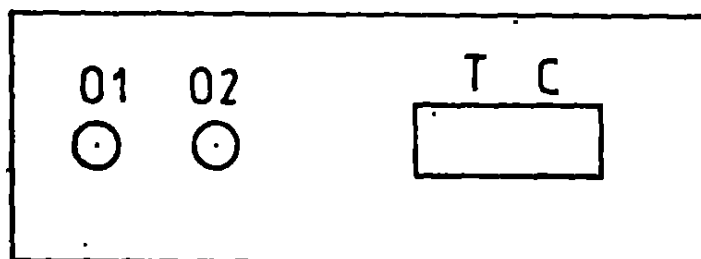
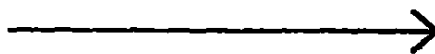


FIG 4

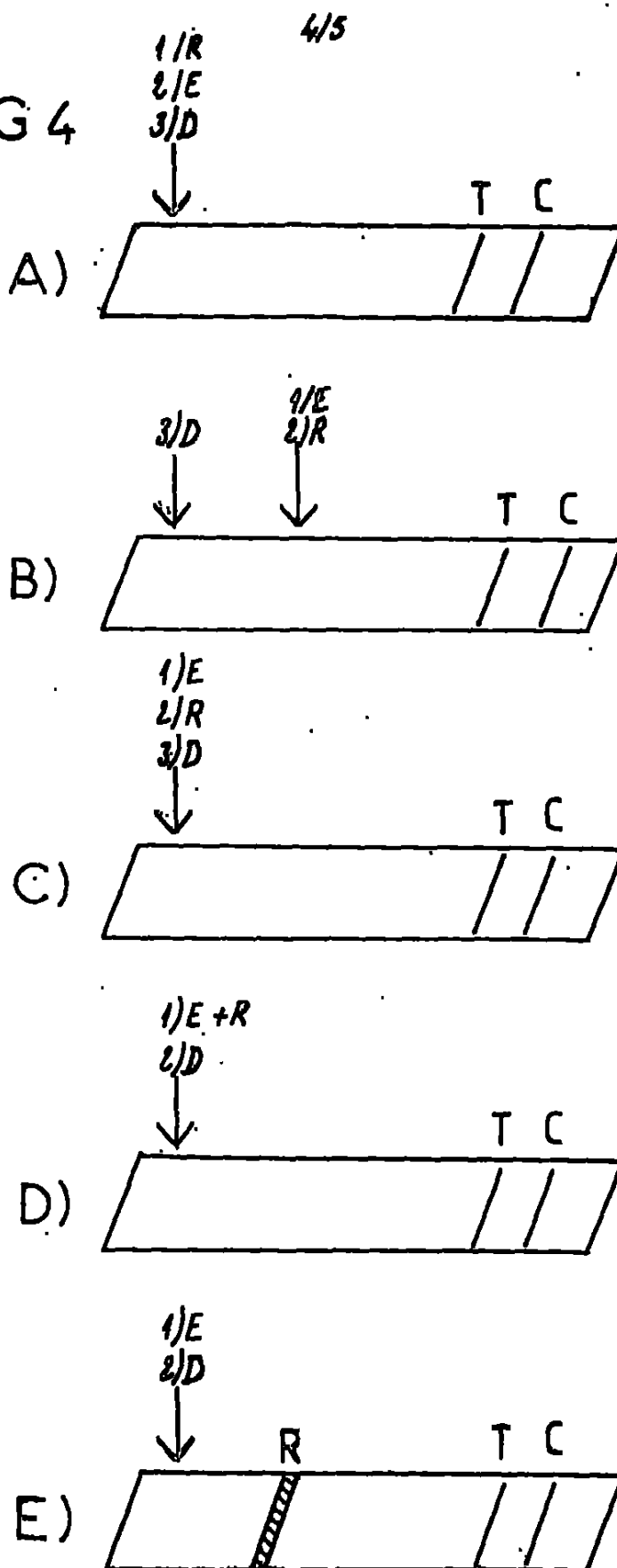
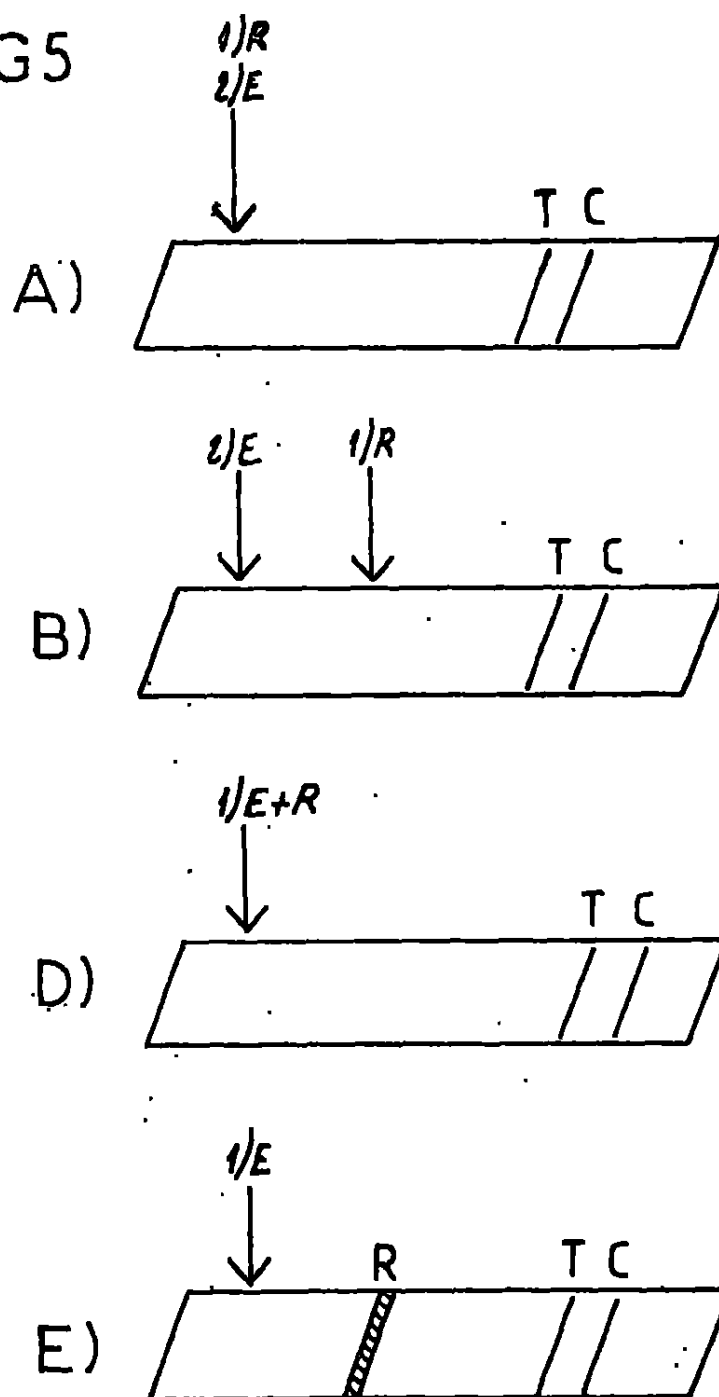


FIG 5



✓ 34

METODOS INMUNOCROMATOGRAFICOS DE FASE-SÓLIDA

La presente invención se relaciona con un método para detectar un analito en un muestra líquida.

Los ensayos de inmunocromatografía de fase sólida son bien conocidas para aquellos expertos en el arte. Estos ensayos usan un soporte sólido poroso dentro del cual la muestra y el reagente migran por difusión capilar. Dispositivos en los cuales el soporte sólido es en la forma de un " palillo sumergible" son particularmente conocidos. Estos ensayos usan un soporte cromatográfico sólido que comprende una zona de detección sobre la cual un reagente de captura específico para el analito esta inmovilizado. Este soporte sólido es llevado en contacto con una solución que incluye, primeramente, la muestra a ser ensayada y, secundariamente, un reagente de fijación marcado específico para el analito. Esta solución migra, por difusión capilar, en el soporte sólido hasta la zona que contiene el reagente de captura inmovilizado. En un ensayo sandwich, el reagente de fijación marcado se pega al analito, mientras que este es inmovilizado en el soporte sólido por el reagente de captura. La presencia o ausencia del analito en la muestra es así medida a través de la detección del reagente marcado.

La EP 0 284 232 describe ensayos inmunocromatográficos de fase sólida en los cuales el soporte sólido directamente porta, en forma liofilizada o deshidratada, el agente de fijación conjugado a un marcador particulado. El reagente conjugado con el marcador particulado esta inmóvil en forma liofilizada, pero se vuelve móvil en un estado húmedo. Así, cuando el soporte sólido es traído en contacto con la muestra líquida, esta migra por difusión capilar en el soporte, incorporando el reagente de fijación conjugada al marcador particulado. En estos ensayos, no es necesario mezclar el reagente conjugado y la muestra de ante mano, y todos los reagentes necesarios para el ensayo son en consecuencia integrados dentro del soporte sólido.

235

En adición, el reagente de fijación marcado del analito específico es marcado con un marcador particulado que puede ser detectado por observación directa. Manipulaciones adicionales no son en consecuencia necesarias para leer los resultados del ensayo. Estos ensayos en consecuencia solo requieren un poco número de manipulaciones y son fácil y rápidas para usar.

Las EP 0 291 194, EP 0 560 411 y EP 0 560 410 también describen dispositivos de ensayo en los cuales el reagente de fijación conjugado a un marcador particulado es llevado en un soporte sólido. En adición, en estos dispositivos, el soporte sólido es incorporado dentro de un estuche provisto de una abertura para depositar la muestra y con una ventana para observación para leer los resultados. El estuche facilita la cogida del dispositivo y protege el soporte sólido. Adicionalmente, esas patentes también describen dispositivos en los cuales uno de los extremos del soporte sobresale del estuche para facilitar la deposición de la muestra. Este extremo sobresaliente del soporte sólido puede así se llevado en contacto con una corriente de orina, por ejemplo.

WO 00/00288 describe dispositivos mejorados que incluyen un estuche y un soporte sólido. El soporte sólido es provisto con un miembro colector movable para una mejor recolección de la muestra.

EP-A1-0 458 231 se relaciona con un inmunoensayo de fase sólida para detectar un analito en una muestra líquida. Estos ensayos usan un soporte sólido, típicamente una membrana, sobre la cual un reagente para capturar el analito esta inmovilizada. Después de que la muestra ha sido depositada, el analito inmovilizado sobre el soporte sólido es detectado usando un reagente de fijación conjugado a ureasa. Ese documento describe métodos en los cuales la muestra y luego el reagente de fijación marcado soon depositados sobre el soporte sólido.

La EP-A2-0 462 276 describe un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral. Los ensayos descritos usan un reagente de fijación conjugado a un marcador particulado. Ese documento describe ensayos en los cuales la muestra y el reagente de fijación conjugado son aplicados separadamente al soporte sólido o combinados antes de la deposición sobre el soporte para formar así la solución de ensayo. Preferiblemente, el reagente de fijación conjugado esta incorporado dentro del soporte cromatográfico.

US 6,008,056 describe dispositivos automatizados para inmunocromatografia lateral. El agente de fijación marcado esta incorporado dentro del soporte sólido o mezclado con la muestra antes o durante la deposición sobre el soporte cromatográfico.

EP-A1-1 020 726 describe ensayos de inmunocromatográficos de flujo lateral. La muestra es depositada sobre el soporte antes que el agente de fijación marcado, o una mezcla que incluye la muestra y uno mas reagentes marcados es depositada sobre el soporte.

WO-A1-97 09620 describe métodos para detectar un analito en un muestra con inmunocromatografia cuantitativa o semicuantitativa. El reagente de fijación marcado es incorporado dentro del soporte sólido.

Sin embargo, estos ensayos inmunocromatográficos algunas veces exhiben insuficiente sensibilidad a reproducibilidad. Este problema se desarrolla mas particularmente para la detección de analitos presentes en bajas concentraciones o con la detección de analitos en una muestra de tipo complejo, tal como una sangre completa, por ejemplo. En adición, debido a estas deficiencias, tales ensayos son solo adecuados para determinar la ausencia o presencia de un analito en una muestra, y solo en consecuencia permiten obtener un resultado cualitativo. Medidas que son más cuantitativas pueden solo ser hechas con dificultad. En adición, un considerable ruido de fondo y tambien una zona efecto (o " zona gancho") son comúnmente observadas,

lo cual deteriora la facilidad de lectura de los resultados. El efecto de gancho es un efecto indeseable bien conocido en inmunoensayos. Ocurre que cuando el analito esta presente en la muestra en una concentración muy alta. El efecto gancho puede luego producir un resultado negativo, llevando a una conclusión equivocada de que el analito esta ausente de la muestra.

Con el propósito de remediar estas limitaciones, la presente invención propone métodos inmunocromatográficos de fase sólida que hacen posible obtener una sensibilidad y reproducibilidad incrementada mientras que al mismo tiempo limitan los ruidos de fondo y los efectos de gancho. Los métodos de acuerdo a la invención son particularmente adecuados para muestras de tipo complejo, tales como sangre, por ejemplo. Dado que el ruido de fondo es disminuido mientras que la sensibilidad y reproducibilidad incrementada, los métodos de la presente invención hacen posible ventajosamente detectar muchos analitos diferentes simultáneamente en el mismo soporte. Adicionalmente, el analito presente en la muestra líquida puede ser medido y cuantificado debido a los niveles de desempeño de los métodos de acuerdo a la presente invención.

En los métodos de acuerdo a la presente invención, el reagente de fijación conjugado a un marcador particulado es adicionado extemporaneamente en forma líquida. Así, en los métodos de acuerdo a la invención, el orden de disposición de la muestra y de los varios reagentes es de gran importancia para la efectividad del ensayo de detección.

En una primera incorporación, el método para detectar un analito en una muestra líquida de acuerdo a la invención comprende los siguientes pasos:

- a) un soporte sólido poroso provisto con una zona de recolección y una zona de detección, un reagente de captura esta inmobilizado en la zona de detección;

- b) los siguientes son depositados, separadamente y sucesivamente, en la zona de recolección del soporte sólido poroso:
 - i. un reagente de fijación conjugado a un marcador particulado, el reagente esta en forma líquida.
 - ii. La muestra líquida,
- c) una cantidad de tiempo suficiente para la migración, por difusión capilar, del agente de fijación conjugado a un marcador particulado y de la muestra líquida desde la zona de recolección a la zona de detección del soporte sólido poroso, es permitida que transcurra,
- d) la extensión en la cual el reagente conjugado a un marcador particulado se fija en la zona de detección es observada.

Ventajosamente, en el paso b) , la muestra líquida es depositada antes del reagente de fijación conjugado a la marcador particulado, en relación con la dirección de migración desde la zona de recolección a la zona de detección del soporte sólido poroso.

La presente invención también se relaciona a un método para detectar un analito en una muestra líquida, que incluye los siguientes pasos:

- a) un soporte sólido poroso provisto con una zona de recolección y una zona de detección, un reagente de captura esta inmovilizado en la zona de detección;
- b) los siguientes son depositados, separadamente y sucesivamente, en la zona de recolección del soporte sólido poroso:
 - i. un reagente de fijación conjugado a un marcador particulado, el reagente esta en forma líquida.
 - ii. La muestra líquida,
 - iii. Un diluyente en forma líquida

- c) una cantidad de tiempo suficiente para la migración, por difusión capilar, del agente de fijación conjugado a un marcador particulado y de la muestra líquida desde la zona de recolección a la zona de detección del soporte sólido poroso, es permitida que transcurra,
- d) a extensión en la cual el reagente conjugado a un marcador particulado se fija en la zona de detección es observada

Un objeto de la presente invención es también un método para detectar un analito en una muestra líquida de acuerdo a la invención comprende los siguientes pasos:

- a) un soporte sólido poroso provisto con una zona de recolección y una zona de detección, un reagente de captura esta inmovilizado en la zona de detección;
- b) los siguientes son depositados, separadamente y sucesivamente, en la zona de recolección del soporte sólido poroso:
 - i. la muestra líquida
 - ii. un reagente de fijación conjugado a un marcador particulado, el reagente esta en forma líquida,
 - iii. un diluyente en forma líquida
- c) una cantidad de tiempo suficiente para la migración, por difusión capilar, del agente de fijación conjugado a un marcador particulado y de la muestra líquida desde la zona de recolección a la zona de detección del soporte sólido poroso, es permitida que transcurra,
- d) la extensión en la cual el reagente conjugado a un marcador particulado se fija en la zona de detección es observada.

Ventajosamente, en el paso b) , el diluyente en forma líquida es depositado corriente arriba del reagente de fijación conjugado a la marcador particulado, y corriente arriba de la muestra líquida, en relación con la dirección de migración desde la zona de recolección a la zona de detección del soporte sólido poroso.

En una incorporación preferida de la invención, el reagente de fijación conjugado al marcador particulado y al reagente de captura inmovilizado en la zona de detección hacen posible detectar el analito por medio de un ensayo sandwich.

En otra incorporación preferida de la invención, el reagente de fijación conjugado con una marcador particulado y el reagente de captura inmovilizado en la zona de detección hacen posible detectar el analito por medio de un ensayo de competencia.

Preferiblemente, el soporte sólido poroso es un soporte sólido poroso en la forma de una banda cromatográfica o una banda estrecha.

Ventajosamente, el soporte sólido poroso esta integrado dentro de un soporte para ser agarrado provisto con al menos una ventana de observación para observar la extensión en la que el reagente conjugado a una marcador particulado se fija en la zona de detección del soporte sólido poroso.

En una incorporación particular de la invención, el soporte para ser agarrado es provisto con al menos una abertura para depositar, respectivamente, la muestra líquida, el reagente de fijación conjugado a un marcador y, donde es apropiado, el diluyente, sobre la zona de recolección del soporte sólido poroso.

En una incorporación ventajosa de la invención, el soporte sólido poroso es integrado dentro de un soporte para ser cogido provisto con al menos una ventana de observación para observar la extensión a la cual el reagente conjugado al marcador particulado se fija en la zona de detección del soporte sólido poroso; el soporte sólido poroso esta también provisto con una primera abertura para depositar el reagente de fijación conjugado a un marcador particulado en la zona de recolección del soporte sólido poroso y con una segunda abertura, corriente arriba de la primera, para depositar la muestra líquida en la zona de recolección del soporte sólido poroso.

En otra incorporación ventajosa de la invención, el soporte sólido poroso esta integrado dentro de un soporte para ser agarrado provisto con al menos una ventana de observación para observar la extensión en la cual el reagente conjugado a un marcador particulado se fija en la zona de detección del soporte sólido poroso; el soporte para ser agarrado esta también provisto con una primera abertura para depositar el reagente de fijación conjugado al marcador particulado y la muestra en la zona de recolección del soporte sólido poroso, y con una segunda abertura, corriente arriba de la primera abertura, para depositar el diluyente en forma líquida en la zona de recolección del soporte sólido poroso.

Preferiblemente, el soporte para ser agarrado consiste de un estuche.

Un objeto de la presente invención es también un kit para detectar un analito en una muestra líquida, que comprende a) un soporte sólido poroso provisto con una zona de recolección y una zona de detección, un reagente de captura esta inmovilizado en la zona de detección, y b) un reagente de fijación conjugado a un marcador particulado en una forma líquida.

Ventajosamente, el kit para detectar un analito en una muestra líquida de acuerdo a la presente invención también incluye un diluyente.

Preferiblemente, el soporte sólido poroso esta integrado dentro de un soporte para ser agarrado.

Preferiblemente, el soporte sólido poroso esta integrado dentro de un soporte para ser agarrado provisto con al menos una ventana de observación para observar la zona de detección del soporte sólido poroso.

En una incorporación preferida, el soporte sólido poroso esta integrado dentro de un soporte para ser agarrado provisto con al menos una abertura para depositar la muestra líquida y/o el reagente de fijación conjugado con el marcador particulado y/o el diluyente en la zona de recolección del soporte sólido poroso.

Preferiblemente, el soporte sólido poroso esta integrado dentro de un soporte para ser agarrado en la forma de un estuche.

El término " analito" es usado para indicar cualquier entidad química, bioquímica o biológica que se desea detectar en una muestra. Dentro de los analitos detectados por medio de los métodos de acuerdo a la presente invención, se hace mención particular a las proteínas, péptidos, anticuerpos, hormonas, esteroides, antígenos derivados de agentes infecciosos tales como bacterias, virus o parásitos, ácido nucleicos (DNA o RNA), moléculas terapéuticas, drogas o antibióticos.

El término " detectar" es usado para indicar la presencia o la ausencia de un analito en una muestra, pero también para medir y cuantificar un analito en una muestra. Esto es debido a que los niveles de desempeño de los métodos de acuerdo con la presente invención hacen posible realizar medidas cuantitativas y semicuantitativas.

En una incorporación particular de la invención, el analito es hCG (hormona gonadotrófica coriónica) o PSA (antígeno prostático específico).

En otra incorporación particular de la invención, el analito es un ácido nucleico. En este caso, el ácido nucleico presente en la muestra es preferiblemente amplificado de antemano de acuerdo a técnicas bien conocidas a aquellos expertos en el arte (PCR, etc). Preferiblemente este paso de amplificación también hace posible marcar el ácido nucleico amplificado usando primers biotinilados o por incorporación nucleotidos marcados con biotina, por ejemplo.

Alternativamente, el ácido nucleico puede, por ejemplo, ser marcado con biotina en su extremo 3' usando una transferasa terminal apropiada. Antes de ser depositada, la muestra es denaturada, o por choque de calor o en la presencia de una solución de NaOH 0.2 N, EDTA 0.05 M o cualquier otro método apropiado. Este paso de denaturación hace posible obtener un ácido nucleico de cadena-sencilla..

El término " muestra líquida" es usado para indicar cualquier muestra en la cual el analito que esta siendo buscado esta en solución o en suspensión. La muestra líquida puede ser en particular cualquier fluido biológico o del cuerpo. La muestra líquida puede también haber sido obtenida directa o indirectamente de un fluido biológico o de cuerpo. La muestra puede también ser un líquido extraído de una muestra sólida.

En una incorporación preferida de la invención, la muestra líquida es orina, sangre completa, plasma o suero.

Los reagentes usados en los métodos de acuerdo a la presente invención son bien conocidos a aquellos con experiencia en el arte.

Los agentes de fijación conjugados a una marcador particulado y el reagente de captura son específicos para una analito que este siendo buscado en la muestra.

En una incorporación particular de la invención, el reagente de fijación conjugado a un marcador particulado y el reagente de captura inmovilizado en la zona de detección del soporte sólido hacen posible detectar el analito por medio de un ensayo sandwich.

En otra incorporación particular de la invención, el reagente de fijación conjugado con el marcador particulado y el reagente de captura inmovilizado del analito específico en la zona de detección del soporte sólido hacen posible detectar el analito por un ensayo de competencia.

Los ensayos sandwich y de competencia son bien conocidos a aquellos con experiencia en el arte. En un ensayo sandwich el reagente de captura del analito específico y el reagente de fijación marcado son predeterminados para así fijarse respectivamente y específicamente con el analito, por ejemplo sobre dos sitios epitopos idénticos o diferentes del analito. En un ensayo de competencia, el reagente de fijación marcado es idéntico o similar al analito, para así fijarse con el reagente de captura, en competencia con el analito.

El término "reagente de captura" es usado para significar cualquier entidad química, bioquímica o biológica capaz de fijarse específicamente con el analito.

En el caso de los ensayos de competencia, el reagente de captura también se fija a reagente de fijación. El analito y el reagente de captura típicamente forman una pareja ligante/anti-ligante, antígeno/anticuerpo, DNA/RNA o DNA/DNA. Así, si el analito es un antígeno o un haptén, el reagente de captura es, por ejemplo, un anticuerpo específico para el analito. Si el analito es un anticuerpo, el agente de recaptura es un antígeno reconocido por el anticuerpo o un anticuerpo que específicamente reconoce el analito. Si el analito es un ácido nucleico, el reagente de captura es, por ejemplo, una sonda de DNA complementaria.

El reagente de captura inmovilizado es preferiblemente un anticuerpo poli o monoclonal que tiene una gran afinidad por el analito, y es mas preferiblemente un anticuerpo monoclonal.

El reagente de captura del analito específico es inmovilizado en el soporte sólido de acuerdo a técnicas conocidas a aquellos expertos en el arte. Este reagente de captura es inmovilizado en tal forma que no es movable en estado húmedo. Esta inmovilización puede ser realizada por ejemplo, por absorción o por enlace covalente. Cuando el reagente de captura es un ácido nucleico, es, por ejemplo, fijado a un soporte de tipo

12/15

nitroceluloso por tratamientos UV o por cualquier otra técnica conocida a aquellos expertos en el arte.

El término "reagente de fijación" es usado para indicar cualquier entidad química, bioquímica y biológica capaz de fijarse específicamente con un analito o con un reagente de captura en competencia con el analito .

El término " fijar " o " fijación" es usado para significar cualquier enlace fuerte, por ejemplo, covalente o cualquier enlace débil, por ejemplo del tipo antígeno/anticuerpo o avidina/estreptoavidina.

El agente de fijación es, por ejemplo, un anticuerpo, un antígeno o un ácido nucleico.

Cualquier otro agente de fijación conocido a aquellos expertos en el arte puede ser usado, tal como uno (o más) anticuerpo (o anticuerpos) monoclonal anti-biotina, avidina, estreptavidina o polistreptavidina. Estos reagentes pueden ser naturales o recombinados.

En un ensayo de competencia, el reagente de fijación es, por ejemplo, el analito mismo o un análogo apropiado del analito. La expresión " análogo apropiado del analito" es usado para significar un análogo que se fija específicamente al reagente de captura del analito específico.. El reagente de fijación marcado es en consecuencia el analito conjugado a un marcador particulado o un análogo del analito conjugado al marcador particulado.

En un ensayo sandwich, el reagente de fijación se fija específicamente al analito. El reagente de fijación marcado es en consecuencia, por ejemplo, un anticuerpo específico para el analito, conjugado al marcador particulado. Cuando el analito es un ácido

nucleico marcado con biotina, el reagente de fijación es típicamente un anticuerpo anti-biotina conjugado al marcador particulado tal como oro coloidal, por ejemplo.

El reagente de fijación es conjugado a un marcador particulado para permitir medidas directas o la observación de los resultados del ensayo. El marcador particulado puede ser observado directamente a simple vista cuando está concentrado en la zona de detección del soporte sólido. El marcador particulado puede ser medido directamente a simple vista o usando un dispositivo de medición. Esta medición es realizada por observaciones directas que no requieren ninguna manipulación adicional. Típicamente, el marcador particulado consiste de pequeñas partículas que son insolubles al agua y que en consecuencia forman suspensiones de fase líquida, es decir, dispersiones de partículas sólidas en un líquido.

Los marcadores particulados son bien conocidos a aquellos expertos en el arte. Marcadores particulados coloreados o fluorescentes son conocidos en particular. A modo de ejemplo, se hace mención a oro coloidal, partículas de latex coloreadas, partículas de latex fluorescente y partículas conjugadas a avidina o estreptoavidina.

Entre los marcadores para observación directa a simple vista, se hace mención de marcadores del tipo dextran (Hasen T.M, *IVD Technology* 4, 35-40, 2003). El reagente de fijación es luego conjugado a una cadena dextran (derivados polisacáridos) portando fluoróforos.

El reagente de fijación es conjugado al marcador particulado de acuerdo con técnicas conocidas.

En los métodos de acuerdo a la presente invención, el reagente de fijación conjugado a un marcador particulado está en forma líquida.

El término "reagente en forma líquida" es usado para significar cualquier reagente en el cual el reagente de fijación esta en solución o en suspensión. La preparación del reagente de fijación conjugado al marcador particulado en forma líquida es realizado de acuerdo a técnicas descritas en la literatura. Usualmente, el reagente de fijación esta en solución o en suspensión en una solución salina amortiguada . Esta solución puede también incluir estabilizadores y otros compuestos, tales como agentes antibacteriales o antihongos. Entre los estabilizadores, se hará mención, por ejemplo, de albúmina de suero bovino (BSA) y caseína.

En ciertos métodos de acuerdo a la presente invención, un diluyente es usado cuando la muestra líquida es plasma, suero o sangre completa, por ejemplo. Este diluyente migra en el soporte sólido, incorporando la muestra y el reagente de fijación marcado. Típicamente, este diluyente esta compuesto de una solución salina amortiguada; puede también incluir un detergente o cualquier otro componente requerido para la reacción.

En los métodos para detectar ácidos nucleicos, el diluyente puede consistir de una amortiguadora de hibridización. Tales amortiguadoras (buffer) de hibridización son bien conocidas a aquellos expertos en el arte.

Los soportes sólidos porosos usados en los ensayos inmunocromatográficos de acuerdo a la invención son bien conocidos a aquellos expertos en el arte (EP 0 284 232). La porosidad del soporte permite la difusión capilar de la muestra y de los reagente en estado líquido o húmedo.

A modo de ejemplo, el soporte sólido poroso puede consistir de varios soportes cromatográficos, de celulosa, de nylon, de nitrocelulosa, de polietileno o de fibra de vidrio.

El soporte sólido puede consistir de uno o más partes diferentes. Las varias partes del soporte pueden consistir de diferentes materiales. Cuando el soporte sólido consiste de varias partes o de varios materiales, estos elementos son dispuestos para permitir continuidad del flujo capilar en el soporte sólido.

Preferiblemente, el soporte sólido poroso es un soporte sólido poroso en la forma de una banda cromatográfica o una banda estrecha.

El soporte sólido puede así estar en la forma de una banda cromatográfica consistente de varias bandas estrechas superimpuestas o traslapadas.

Típicamente, el soporte de sólidos porosos comprende una zona para recoger la muestra y una zona de detección que lleva el reagente de captura. Estas zonas son dispuestas para permitir continuidad del flujo capilar desde la zona de recolección a la zona de detección. La zona de recolección y la zona de detección son dos zonas distintas y separadas del soporte sólido poroso. La muestra, el reagente de fijación marcado y, donde sea apropiado, el diluyente son depositados en la zona de recolección y migran a través del soporte sólido poroso a la zona de detección. El soporte sólido poroso consiste así, por ejemplo, de una banda cromatográfica, uno de cuyos extremos constituye la zona de recolección, la zona de detección está localizada en las proximidades del otro extremo de la banda.

Estas zonas pueden, por ejemplo, estar presentes en el mismo plano en una banda consistente de un solo material. Ventajosamente, un material específico corresponde a cada zona del soporte sólido. Un material poroso absorbente puede, por ejemplo, ser usado para la zona de recolección de la muestra.

La zona de recolección de la muestra del soporte sólido puede así consistir de un miembro recolector hecho de un material absorbente. Este miembro recolector puede

ser directamente llevado en contacto con una corriente de orina, por ejemplo. El soporte sólido puede también incluir un miembro recolector móvil como se describe en WO 00/00288.

La zona de detección del soporte sólido poroso puede también comprender un segundo reagente de captura inmovilizado en el soporte poroso corriente abajo del primer reagente de captura. Este segundo reagente de captura inmovilizado hace posible chequear que el ensayo este progresando correctamente, verificando, por ejemplo, la migración del reagente de fijación conjugado al marcador particulado en el soporte sólido. El segundo reagente de captura es, por ejemplo, un anticuerpo específico para el reagente de fijación.

En los métodos de acuerdo a la presente invención, el reagente de fijación marcado, la muestra y, donde sea apropiado, el diluyente son depositados separadamente, sucesivamente y en una forma líquida en la zona de recolección del soporte sólido. La disposición extemporánea del reagente de fijación marcado en forma líquida antes de la muestra y/o antes del diluyente hace posible la disminución del ruido de fondo y el efecto gancho a la vez que incrementa la sensibilidad, debido al inmediato y completo contacto entre la muestra y el reagente de fijación marcado. La reproducibilidad de los métodos de acuerdo a la invención es también considerablemente incrementada por el hecho que la dosis de reagente de fijación marcado adicionada en forma líquida es precisa.

En adición, en los métodos de acuerdo a la presente invención, la disposición extemporánea del reagente de fijación marcado en forma líquida antes de la muestra y/o antes del diluyente hace posible obtener un efecto de lavado que resulta en un decrecimiento del ruido de fondo y del efecto gancho. Esto es particularmente ventajoso para la detección de analitos en una muestra compleja como de sangre, por ejemplo.

Ventajosamente, la muestra o el diluyente es depositado en la zona de recolección corriente arriba del reagente de fijación marcado.

Para controlar la cantidad de reagente de fijación depositado en la zona de recolección del soporte sólido poroso, esta deposición es preferiblemente realizada usando una pipeta, un gotero o una botella gotero.

La muestra líquida puede también ser depositada usando una pipeta, un gotero o una botella gotero. En otras incorporación, la deposición de la muestra es realizada por empapado de la zona de recolección del soporte sólido en la muestra líquida. Cuando la muestra líquida es orina, la zona de recolección del soporte sólido puede también ser traída en contacto directo con la muestra de orina.

En una incorporación preferida de la invención, el soporte sólido poroso esta integrado dentro de un soporte para ser agarrado. Este soporte para agarre puede envolver parcialmente o completamente el soporte sólido poroso. Usualmente, el soporte para agarre es en la forma de un estuche.

Estos soportes para ser cogido o estuche son descritos en particular en EP 0 291 194, EP 0 560 411, EP 0 560 410, y en WO 00/00288.

El soporte para ser agarrado facilita la manipulación del soporte sólido poroso y lo protege contra humedad en particular.

El soporte para agarre puede consistir de varios materiales como cartón, cartón plastificado o, mas preferiblemente, plásticos. Ventajosamente, el soporte de agarre consiste de un material rígido e impermeable.

Típicamente, el soporte de agarre es provisto con al menos una ventana de observación para observar la zona de detección del soporte sólido poroso.

En una incorporación de la invención, el soporte sólido poroso puede incluir una zona de recolección que sobresale del soporte de agarre, para depositar la muestra líquida y/o el reagente de fijación marcado y/o el diluyente.

En otra incorporación de la invención, el soporte para agarre o el estuche comprende al menos una abertura para depositar la muestra líquida y/o el reagente de fijación marcado y/o el diluyente en la zona de recolección del soporte sólido poroso.

La invención será entendida más claramente a partir de las figuras y ejemplos siguientes:

Figuras

Figura 1: Principios de los métodos inmunocromatográficos de la invención, las zonas sombreadas representan partes del soporte sólido que consisten de un material absorbente.

Figura 2: Dispositivo de ensayo inmunocromatográfico

La Figura 2 representa un dispositivo que comprende un estuche que incluye el soporte sólido poroso. El estuche está provisto de una abertura (O) para depositar los líquidos y con una ventana de observación (F). La Figura 2 a representa la deposición de los líquidos sobre el soporte sólido a través de la abertura en el estuche. La Figura 2 b muestra un resultado negativo que es visible a través de la ventana de observación (F). La Figura 2 c muestra un resultado positivo para un ensayo sandwich que es visible a través de la ventana de observación (F).

T = línea de ensayo, C = línea de control, O = abertura, F = ventana de observación.

Figura 3: Dispositivo de ensayo cromatográfico de dos pozos

La Figura 3 representa un estuche que comprende un soporte sólido poroso. El estuche es provisto con dos aberturas diferentes (O1 y O2) para depositar los líquidos y con una ventana de observación. La flecha indica la dirección de la migración de la difusión capilar.

O1 = abertura No 1, O2 = abertura No 2, T = línea de ensayo, C = línea de control.

Figura 4: Ejemplos comparativos con diluyente

R = reagente de fijación marcado, E = muestra, D = diluyente, T = línea de ensayo, C = línea de control.

Figura 5: Ejemplos comparativos sin diluyente

R = reagente de fijación marcado, E = muestra, D = diluyente, T = línea de ensayo, C = línea de control.

Ejemplos

Ejemplo 1 : Métodos inmunocromatográficos con dispositivo diluyente

Los métodos fueron realizados con los dispositivos representados en la figura 2 y la figura 3.

Analito y muestra

El analito es antígeno prostático específico (PSA) detectado en suero. El ensayo pudo ser realizado en la misma forma con la sangre total o plasma.

Reagentes y diluyente

El reagente de fijación marcado es un anticuerpo monoclonal o policlonal anti-PSA conjugado con oro coloidal en una solución amortiguadora (0.1M PBS, pH 8) que contiene albúmina de suero bovino (1% BSA) como estabilizador.

Un primer reagente de captura es inmovilizado en la línea de ensayo de la zona de detección. Este primer reagente de captura es un anticuerpo monoclonal o policlonal anti-PSA.

Un segundo reagente de captura esta inmovilizado en la línea de control de la zona de detección. Este segundo reagente de captura es un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra el anticuerpo del reagente de fijación marcado.

El diluyente consiste de una amortiguadora PBS (0.1 M, pH 8) que contiene un detergente (0.05% Tween 20).

Métodos

Los diferentes métodos que fueron comparados son representados en la figura 4. Los métodos A, B, y C están de acuerdo con la invención. En todos los casos, la cantidad de muestra y la cantidad de reagente de fijación conjugado al marcador particulado, por ensayo, fueron idénticos cualquiera el método considerado, para así no distorsionar los resultados.

Volumen de la muestra = 25 µl (versión A, B, C, D, E)

Volumen de diluyente = 100 µl (versión A, B, C, D), 150 µl (versión E)

Volumen de reagente de fijación marcado = 35 µl (versión A, B, C, D), identico pero en forma deshidratada (versión E)

Los métodos fueron realizados en la siguientes manera:

Versión A

- 1) reagente de fijación marcado
- 2) Muestra
- 3) diluyente

Versión B

- 1) muestra en la abertura 2
- 2) reagente de fijación marcado en la abertura 2
- 3) diluyente en abertura 1 (corriente arriba de la abertura 2)

Versión C

- 1) muestra
- 2) reagente de fijación marcado
- 3) diluyente

Versión D

- 1) muestra
- 2) diluyente

En el último método, el reagente de fijación marcado es directamente llevado por el soporte sólido.

Resultados

Los niveles de desempeño obtenidos para cada uno de los métodos fueron medidos y cuantificados usando un reflectómetro . El efecto gancho es evaluado usando una muestra muy concentrada de analito.

Método	Ruido de Fondo	Efecto Gancho	Sensitividad	Reproducibilidad
A	4	5	5	4
B	5	3	4	4
C	4	4	3	4
D	4	4	2	4
E	3	2	1	2

22

Clasificaciones de 1 a 5 (1 es el menos efectivo, 5 es el mas efectivo)

Ejemplo 2: Métodos Inmunocromatográficos sin diluyente

Dispositivo

Los métodos fueron llevados a cabo con los dispositivos representados en la figura 2 y en la figura 3.

Analito y muestra

El analito es la hormona gonadotrópica coriónica (hCG) detectada en la orina. El ensayo puede ser llevado a cabo de la misma manera con suero o plasma.

Reagentes

El reagente de fijación marcado es un anticuerpo monoclonal o policlonal anti-hCG conjugado con oro coloidal en una solución amortiguadora (0.1M PBS, pH 8) que contiene albúmina de suero bovino (1% BSA) como estabilizador.

Un primer reagente capturado es inmovilizado en la línea de ensayo de la zona de detección. Este primer reagente de captura es un anticuerpo monoclonal o policlonal anti-hCG.

Un segundo reagente de captura esta inmovilizado en la línea de control de la zona de detección. Este segundo reagente de captura es un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra el anticuerpo del reagente de fijación marcado.

Métodos

Los diferentes métodos que fueron comparados están representados en la figura 5.

23/3/56

Los métodos A y B están de acuerdo con la invención. En todos los casos, la cantidad de muestra y la cantidad de reagente de fijación conjugado al marcador particulado, por ensayo, fueron idénticos cualquiera el método considerado, para así no distorsionar los resultados.

Volumen de muestra = $100\ \mu\text{l}$ (Versión A, B, D); $100\ \mu\text{l} + 35\ \mu\text{l}$ (Versión E)

Volumen de reagente de fijación marcado = $35\ \mu\text{l}$ (Versión A, B, D), idéntico pero en forma deshidratada (versión E).

Los métodos fueron realizados de la siguiente manera:

Versión A

- 1) reagente de fijación marcado
- 2) muestra

Versión B

- 1) reagente de fijación marcado en la abertura 2
- 2) muestra en la abertura 1

Versión D

- 1) muestra y agente de fijación marcado premezclados

Versión E

- 1) muestra

En el último método el reagente de fijación marcado es directamente llevado por el soporte sólido.

Resultados

Los niveles de desempeño obtenidos para cada uno de los métodos fueron medidos y cuantificados utilizando un reflectómetro. El efecto gancho es evaluado utilizando una muestra muy concentrada de analito.

2-57

Método	Ruido de Fondo	Efecto Gancho	Sensitividad	Reproducibilidad
A	4	4	4	4
B	5	5	1	4
D	3	1	5	4
E	3	3	3	2

Clasificaciones de 1 a 5 (1 es el menos efectivo, 5 es el mas efectivo)

Ejemplo 3: Método para detectar morfina (ensayo de competencia)

Dispositivo

Este método fue llevado a cabo con el dispositivo representado en la figura 2.

Analito y muestra

El analito es morfina detectada en la orina.

Reagentes

El reagente de fijación marcado es un haptene-BSA de morfina conjugado con partículas de oro coloidal en una solución amortiguadora (0.1M PBS, pH 8) que contiene albúmina de suero bovino (1% BSA) como estabilizador.

El reagente de captura es inmovilizado en la línea de ensayo de la zona de detección.

Este primer reagente de captura es un anticuerpo monoclonal anti-morfina.

Método

35 µl de agente de fijación conjugado al marcador particulado fueron depositados y luego 150 µl de orina fueron depositados en la misma abertura del estuche. 5 minutos después, los resultados son leídos.

25/10/18

Resultados

Comparado con un ensayo utilizando un soporte sólido llevando el reagente de fijación conjugado en forma deshidratada, el ruido de fondo decrece y la reproducibilidad es mejorada.

Ejemplo 4: Método para detectar un ácido nucleico

Dispositivo

Este método es llevado a cabo con el dispositivo representado en la figura 2.

El dispositivo consta de una banda delgada de nitrocelulosa a la cual se adhiere una sonda específica para un ácido nucleico de *E.coli* o de *Chlamidia* (por tratamiento UV o por cualquier otra técnica). La banda delgada es embebida en una caja plástica provista con una abertura para la deposición de los reagentes y con una ventana de observación.

Analito y muestra

El analito que está siendo buscado en la muestra es un DNA o un RNA de *E.coli* o de *Chlamidia*. El ácido nucleico es amplificado de antemano de acuerdo con métodos convencionales tales como, por ejemplo, PCR. El DNA es marcado por medio de primers biotinilados o por incorporación de nucleótidos marcados con biotina. Alternativamente el extremo 3' de los ácidos nucleicos es marcado con biotina utilizando una transferasa terminal.

Reagentes

El reagente de fijación marcado es un anticuerpo policlonal anti-biotin de conejo marcado con oro coloidal.

La amortiguadora de hibridización es una amortiguadora PBS conteniendo 0.1% de Tween 20. Se pueden utilizar otras amortiguadoras de hibridización.

Método

Los ácidos nucleicos amplificados y biotina-marcados (muestra) son desnaturalizados o por choque de calor, o en la presencia de 1.2N NaOH, 0.05M EDTA.

25 µl de muestra desnaturalizada son depositados en el agujero (abertura) de muestra.

40 µl de reagente de fijación marcado (conjugado anti-biotina) son entonces depositados en el agujero de muestra. Estos dos pasos pueden ser invertidos.

150 µl a 200 µl de amortiguadora de hibridización son entonces depositados en el agujero de muestra.

Resultados

Cuando el ácido nucleico que está siendo buscado está presente en la muestra, el migra por difusión desde la zona de recolección a la zona de detección, donde él se adhiere a la sonda inmovilizada en el soporte. Aparece una banda roja en la zona de ensayo (el ensayo se lee 10 a 20 minutos después del deposito). La línea de control también aparece en la zona de detección y muestra que los reagentes están funcionando correctamente.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar un analito en una muestra líquida, conformado por los siguientes pasos:
 - a. un soporte sólido poroso provisto con una zona de recolección y una zona de detección, un reagente de captura está inmobilizado en la zona de detección;
 - b. los siguientes son depositados, separadamente y sucesivamente, en la zona de recolección del soporte sólido poroso:
 - i. un reagente de fijación conjugado a un marcador particulado, el reagente está en forma líquida.
 - ii la muestra líquida,
 - c. una cantidad de tiempo suficiente para la migración, por difusión capilar, del agente de fijación conjugado a un marcador particulado y de la muestra líquida desde la zona de recolección a la zona de detección del soporte sólido poroso, es permitida que transcurra,
 - d. la extensión en la cual el reagente conjugado a un marcador particulado se fija en la zona de detección es observada.
2. El método como el reivindicado en la reivindicación 1, en el cual, en el paso b), la muestra líquida es depositada corriente arriba del reagente de fijación conjugado a un marcador particulado, relativa a la dirección de migración desde la zona de recolección hasta la zona de detección del soporte sólido poroso.
3. Un método para detectar un analito en una muestra líquida, comprendiendo los siguientes pasos:
 - a. un soporte sólido poroso provisto con una zona de recolección y una zona de detección, un reagente de captura está inmobilizado en la zona de detección;

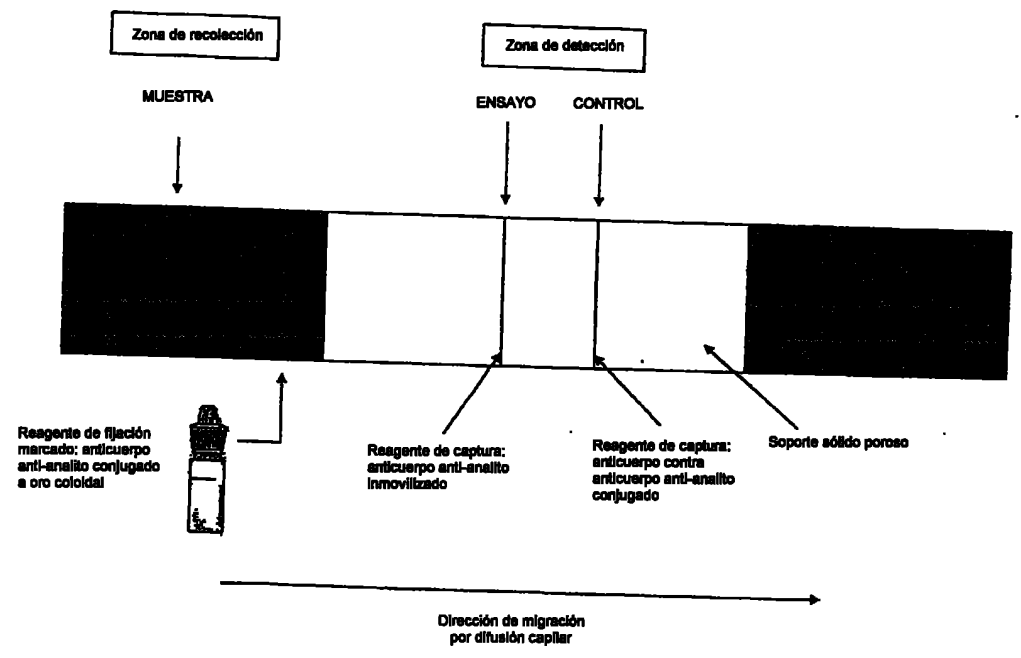
- b. los siguientes son depositados, separadamente y sucesivamente, en la zona de recolección del soporte sólido poroso:
 - i. un reagente de fijación conjugado a un marcador particulado, el reagente esta en forma líquida,
 - ii. la muestra líquida,
 - iii. un diluyente en forma líquida,
 - c. una cantidad de tiempo suficiente para la migración, por difusión capilar, del reagente de fijación conjugado a un marcador particulado, de la muestra líquida y del diluyente desde la zona de recolección a la zona de detección del soporte sólido poroso, es permitida que transcurra,
 - d. la extensión en la cual el reagente conjugado a un marcador particulado se fija en la zona de detección es observada.
4. Un método para detectar un analito en una muestra líquida, comprendiendo los siguientes pasos:
- a. un soporte sólido poroso provisto con una zona de recolección y una zona de detección, un reagente de captura esta inmovilizado en la zona de detección;
 - b. los siguientes son depositados, separadamente y sucesivamente, en la zona de recolección del soporte sólido poroso:
 - i. la muestra líquida
 - ii. un reagente de fijación conjugado a un marcador particulado, el reagente esta en forma líquida,
 - iii. un diluyente en forma líquida
 - c. una cantidad de tiempo suficiente para la migración, por difusión capilar, del reagente de fijación conjugado a un marcador particulado, de la muestra líquida y de el diluyente desde la zona de recolección a la zona de detección del soporte sólido poroso, es permitida que transcurra,

2/62

- d. la extensión en la cual el reagente conjugado a un marcador particulado se fija en la zona de detección es observada.
5. El método como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4, en el cual, en el paso b), el diluyente en forma líquida es depositado aguas arriba del reagente de fijación conjugado a un marcador particulado y aguas arriba de la muestra líquida, relativo a la dirección de migración desde la zona de recolección a la zona de detección del soporte sólido poroso.
6. El método como el reivindicado en una de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual el reagente de fijación conjugado a un marcador particulado y el agente de recaptura inmovilizado en la zona de detección hacen posible detectar el analito por medio de un ensayo sandwich.
7. El método como el reivindicado en una de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual el reagente de fijación conjugado a un marcador particulado y el reagente de captura inmovilizado en la zona de detección hacen posible la detección del analito mediante un ensayo de competencia.
8. El método como el reivindicado en una de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual el soporte sólido poroso es un soporte sólido poroso en la forma de una banda cromatográfica o una banda delgada.
9. El método como el reivindicado en una de las reivindicaciones 1 a 8, en el cual el soporte sólido poroso está integrado dentro de un soporte para ser agarrado provisto con al menos una ventana de observación para observar la extensión en la que el reagente conjugado a un marcador particulado se fija en la zona de detección del soporte sólido poroso.

10. El método como el reivindicado en la reivindicación 9, en el cual el soporte a ser agarrado está provisto con al menos una abertura para depositar, respectivamente, la muestra líquida, el reagente de fijación conjugado a un marcador y, donde es apropiado, el diluyente, en la zona de recolección del soporte sólido poroso.
11. El método como el reivindicado en la reivindicación 2, en el cual el soporte sólido poroso es integrado dentro de un soporte para ser agarrado provisto con al menos una ventana de observación para observar la extensión en la cual el reagente conjugado a un marcador particulado se fija en la zona de detección del soporte sólido poroso; el soporte sólido poroso está también provisto con una primera abertura para depositar el reagente de fijación conjugado a un marcador particulado en la zona de recolección del soporte sólido poroso y con una segunda abertura, aguas arriba de la primera, para depositar la muestra líquida en la zona de recolección del soporte sólido poroso.
12. El método como el reivindicado en la reivindicación 5, en el cual el soporte sólido poroso es integrado dentro de un soporte para ser agarrado provisto con al menos una ventana de observación para observar la extensión en la cual el reagente conjugado a un marcador particulado se fija en la zona de detección del soporte sólido poroso; el soporte para ser agarrado está también provisto con una primera abertura para depositar el reagente de fijación conjugado al marcador particulado y la muestra en la zona de recolección del soporte sólido poroso, y con una segunda abertura, aguas arriba de la primera abertura, para depositar el diluyente en forma líquida en la zona de recolección del soporte sólido poroso.
13. El método como el reivindicado en una de las reivindicaciones 9 a 12, en el cual el soporte para ser agarrado consiste de un estuche.

Fig. 1



3/9/4

2/5

FIG 2

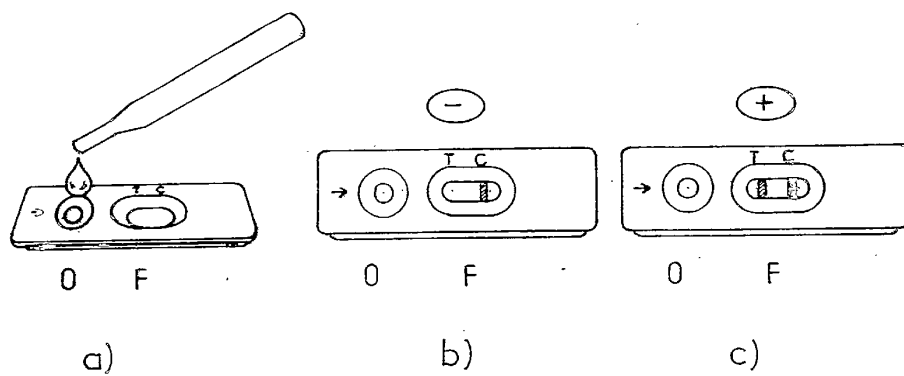


FIG 3

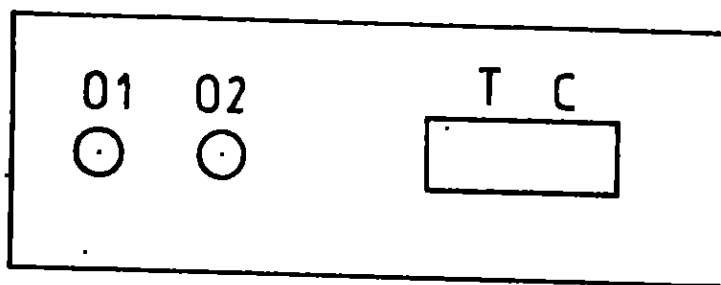


FIG 4

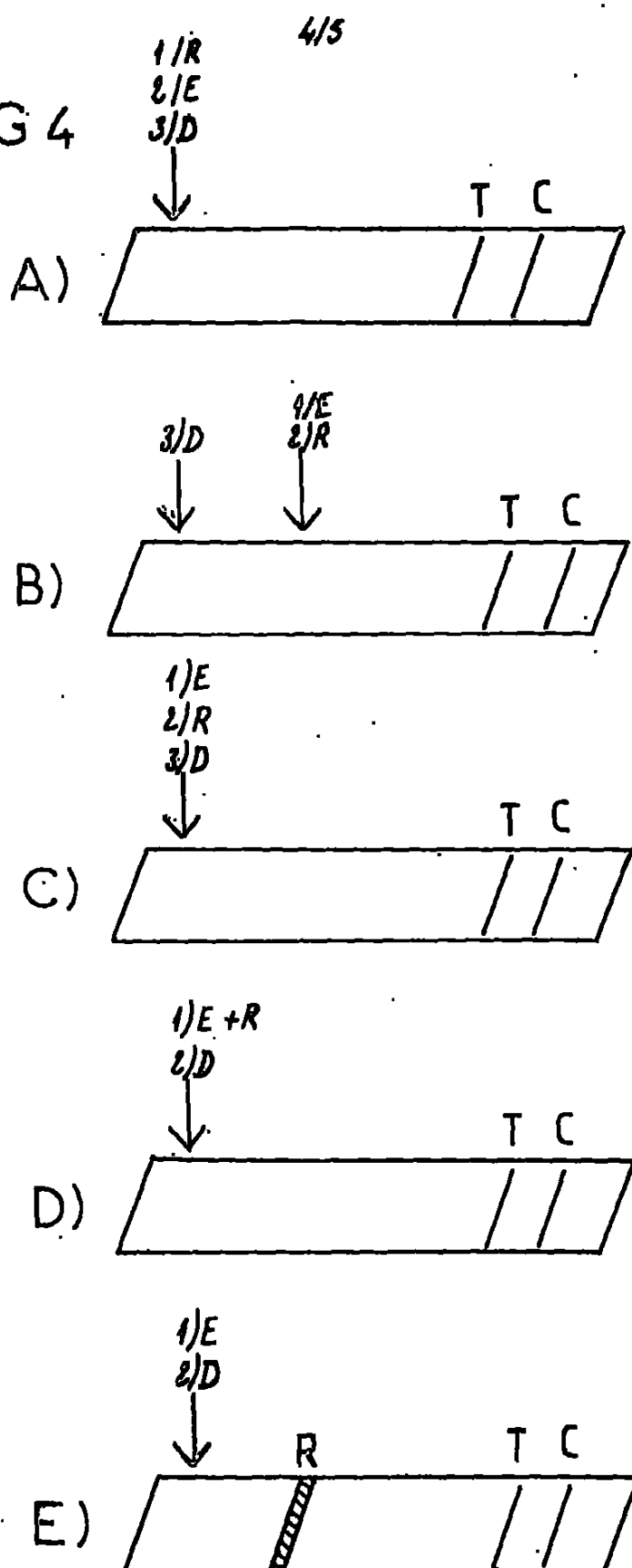
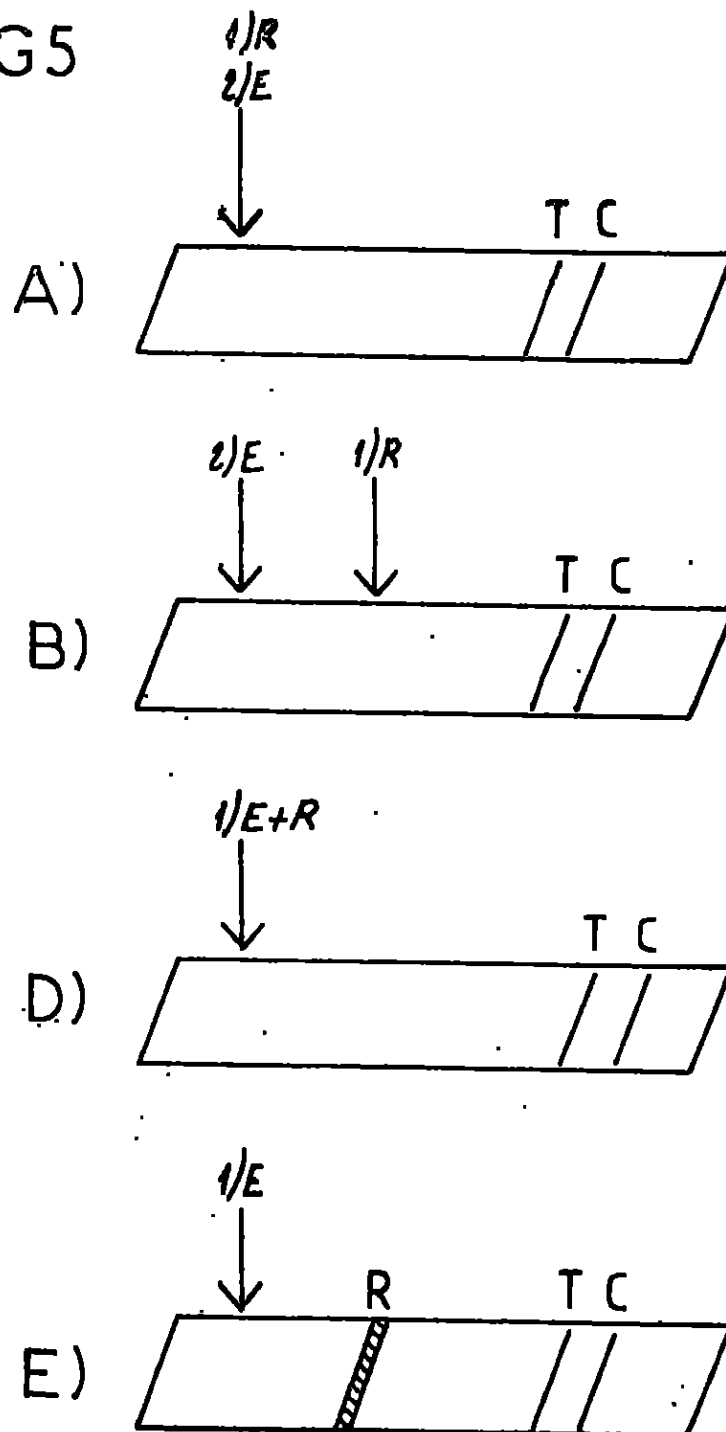


FIG 5



PCT

REQUÊTE

Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets.

Réservé à l'office récepteur

PCT/FR 2004/000775 Demande internationale n°
26 MARS 2004 (26/03/04) Date du dépôt international
INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE DEMANDE INTERNATIONALE PCT Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"
Référence du dossier du déposant ou du mandataire (facultatif) (72 caractères au maximum) KH/SG/BR045765

Cadre n° I TITRE DE L'INVENTION Procédés immunochromatographiques en phase solide	
Cadre n° II DÉPOSANT ☐ Cette personne est aussi inventeur	
Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiqué dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.) VEDALAB ZAT du Londeau Rue de l'Expansion - CERISE 61000 ALENCON [FR]	n° de téléphone n° de télécopieur n° de téléimprimeur n° sous lequel le déposant est inscrit auprès de l'office
Nationalité (nom de l'État) : [Française] [FRANCE]	Domicile (nom de l'État) : FRANCE
Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☒ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire	
Cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)	
Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiqué dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.) Monsieur DONATI Raphaël 4 rue d'Ecouves 61250 RADON [FR]	Cette personne est : ☐ déposant seulement ☒ déposant et inventeur ☐ inventeur seulement (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.) n° sous lequel le déposant est inscrit auprès de l'office
Nationalité (nom de l'État) : [Française] [FRANCE]	Domicile (nom de l'État) : France
Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☒ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire	
☒ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.	
Cadre n° IV MANDATAIRE OU REPRÉSENTANT COMMUN; OU ADRESSE POUR LA CORRESPONDANCE	
La personne dont l'identité est donnée ci-dessous est/à été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme: ☐ mandataire ☐ représentant commun	
Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.) Cabinet GERMAIN & MAUREAU BP 8153 69466 LYON CEDEX 06 FRANCE	n° de téléphone 04 72 69 84 30 n° de télécopieur 04 72 69 84 31 n° de téléimprimeur n° sous lequel le mandataire est inscrit auprès de l'office
☐ Adresse pour la correspondance : cocher cette case lorsque aucun mandataire ni représentant commun n'est/n'a été désigné et que l'espace ci-dessus est utilisé pour indiquer une adresse spéciale à laquelle la correspondance doit être envoyée.	

REPLI PAR RO

REPLI PAR RO

20

REPLI PAR RO

Feuille n° ...2...

PCT/FR 2004 / 000775

Suite du cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S) <i>Si aucun des sous-cadres suivants n'est utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la requête.</i>	
Nom et adresse : <i>(Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)</i> Monsieur BIGOT Patrick Les Fours à chaux Route de Boucé 61150 ECOUCHE [FR]	Cette personne est : ☐ déposant seulement ☒ déposant et inventeur ☐ inventeur seulement <i>(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</i> n° sous lequel le déposant est inscrit auprès de l'office
Nationalité (nom de l'État) : [Française] [FRANCE]	Domicile (nom de l'État) : FRANCE
Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☒ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire	
Nom et adresse : <i>(Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)</i>	Cette personne est : ☐ déposant seulement ☐ déposant et inventeur ☐ inventeur seulement <i>(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</i> n° sous lequel le déposant est inscrit auprès de l'office
Nationalité (nom de l'État) :	Domicile (nom de l'État) :
Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire	
Nom et adresse : <i>(Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)</i>	Cette personne est : ☐ déposant seulement ☐ déposant et inventeur ☐ inventeur seulement <i>(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</i> n° sous lequel le déposant est inscrit auprès de l'office
Nationalité (nom de l'État) :	Domicile (nom de l'État) :
Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire	
Nom et adresse : <i>(Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)</i>	Cette personne est : ☐ déposant seulement ☐ déposant et inventeur ☐ inventeur seulement <i>(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</i> n° sous lequel le déposant est inscrit auprès de l'office
Nationalité (nom de l'État) :	Domicile (nom de l'État) :
Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire	
☐ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.	

Cadre n° V DÉSIGNATIONS				
Le dépôt de la présente requête vaut, selon la règle 4.9.a), désignation de tous les États contractants liés par le PCT à la date du dépôt international, aux fins de la délivrance de tout titre de protection disponible et, le cas échéant, aux fins de la délivrance à la fois de brevets régionaux et nationaux.				
Cependant,				
☐ DE Allemagne n'est désignée pour aucun titre de protection nationale ☐ KR République de Corée n'est désignée pour aucun titre de protection nationale ☐ RU Fédération de Russie n'est désignée pour aucun titre de protection nationale				
(Les cases mentionnées ci-dessus peuvent être utilisées pour exclure (irrévocablement) les désignations concernées afin d'éviter qu'une demande nationale antérieure dont la priorité est revendiquée ne cesse de produire ses effets en vertu de la législation nationale. Voir les notes relatives au cadre n° V en ce qui concerne les conséquences de telles dispositions de la législation nationale dans ces États et dans certains autres.)				
Cadre n° VI REVENDICATION DE PRIORITÉ				
La priorité de la ou des demandes antérieures suivantes est revendiquée :				
Date de dépôt de la demande antérieure (jour/mois/année)	Numéro de la demande antérieure	Lorsque la demande antérieure est une :		
		demande nationale : pays ou membre de l'OMC	demande régionale : office régional	demande internationale : office récepteur
point 1) 28/03/2003	0303877	FRANCE		
point 2)				
point 3)				
☐ D'autres revendications de priorité sont indiquées dans le cadre supplémentaire.				
L'office récepteur est prié de préparer et de transmettre au Bureau international une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures (seulement si la demande antérieure a été déposée auprès de l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur) indiquées ci-dessus sous :				
☐ tous les points ☒ le point 1) ☐ le point 2) ☐ le point 3) ☐ autre, voir le cadre supplémentaire				
* Si la demande antérieure est une demande ARIPO, indiquer au moins un pays partie à la Convention de Paris pour la protection de la propriété industrielle ou un membre de l'Organisation mondiale du commerce pour lequel cette demande antérieure a été déposée (règle 4.10.b)iii) :				
Cadre n° VII ADMINISTRATION CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE				
Choix de l'administration chargée de la recherche internationale (ISA) (si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont compétentes pour procéder à la recherche internationale, indiquer l'administration choisie; le code à deux lettres peut être utilisé) :				
ISA / EP				
Demande d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure: mention de cette recherche (si une recherche antérieure a été effectuée par l'administration chargée de la recherche internationale ou demandée à cette dernière) :				
Date (jour/mois/année)	Numéro	Pays (ou office régional)		
19/11/2003	FA 632647	FRANCE		
Cadre n° VIII DÉCLARATIONS				
Les déclarations suivantes figurent dans les cadres n° VIII.i) à v) (cocher ci-dessous la ou les cases appropriées et indiquer dans la colonne de droite le nombre de chaque type de déclaration) :				Nombre de déclarations
☐ cadre n° VIII.i)	déclaration relative à l'identité de l'inventeur	:		
☐ cadre n° VIII.ii)	déclaration relative au droit du déposant, à la date du dépôt international, de demander et d'obtenir un brevet	:		
☐ cadre n° VIII.iii)	déclaration relative au droit du déposant, à la date du dépôt international, de revendiquer la priorité d'une demande antérieure	:		
☐ cadre n° VIII.iv)	déclaration relative à la qualité d'inventeur (seulement aux fins de la désignation des États-Unis d'Amérique)	:		
☐ cadre n° VIII.v)	déclaration relative à des divulgations non opposables ou à des exceptions au défaut de nouveauté	:		

72

PCT/FR 2004/000775

Feuille n° ...4...

REMOULI PAR RO

Cadre n° IX BORDEREAU; LANGUE DE DÉPÔT	
La présente demande internationale contient :	
a) sous forme papier le nombre de feuilles suivant :	Le ou les éléments suivants sont joints à la présente demande internationale (cocher la ou les cases appropriées et indiquer dans la colonne de droite le nombre de chaque élément) :
requête (y compris la ou les feuilles pour déclaration) :	1. ☒ feuille de calcul des taxes :
description (à l'exception du listage des séquences ou des tableaux y relatifs) :	2. ☒ original du pouvoir distinct :
revendications :	3. ☐ original du pouvoir général :
abrégé :	4. ☐ copie du pouvoir général; le cas échéant, numéro de référence :
dessins :	5. ☐ explication de l'absence d'une signature :
Sous-total de feuilles :	6. ☐ document(s) de priorité indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s) :
listage des séquences :	7. ☐ traduction de la demande internationale en (langue) :
tableaux y relatifs :	8. ☐ indications séparées concernant des micro-organismes ou autre matériel biologique déposé :
(pour les deux éléments, nombre réel de feuilles s'ils sont déposés sous forme papier, qu'ils soient ou non également déposés sous forme déchiffrable par ordinateur; voir c) ci-après)	9. ☐ listage des séquences sous forme déchiffrable par ordinateur (indiquer type et nombre de supports) :
Nombre total de feuilles : [34] [36]	i) ☐ copie remise aux fins de la recherche internationale en vertu de la règle 13ter seulement (et non en tant que partie de la demande internationale) :
	ii) ☐ (seulement lorsque la case b) i) ou c) i) de la colonne de gauche est cochée) exemplaires supplémentaires, y compris, le cas échéant, copie remise aux fins de la recherche internationale en vertu de la règle 13ter :
	iii) ☐ avec la déclaration pertinente quant à l'identité entre la copie - ou les exemplaires supplémentaires - et le listage des séquences mentionné dans la colonne de gauche :
b) ☐ seulement sous forme déchiffrable par ordinateur (instruction 801.a) i) :	10. ☐ tableaux sous forme déchiffrable par ordinateur relatifs au listage des séquences (indiquer type et nombre de supports) :
i) ☐ listage des séquences :	i) ☐ copie remise aux fins de la recherche internationale en vertu de l'instruction 802.b-quater) seulement (et non en tant que partie de la demande internationale) :
ii) ☐ tableaux y relatifs :	ii) ☐ (seulement lorsque la case b) i) ou c) i) de la colonne de gauche est cochée) exemplaires supplémentaires, y compris, le cas échéant, copie remise aux fins de la recherche internationale en vertu de l'instruction 802.b-quater) :
c) ☐ également sous forme déchiffrable par ordinateur (instruction 801.a) ii) :	iii) ☐ avec la déclaration pertinente quant à l'identité entre la copie - ou les exemplaires supplémentaires - et les tableaux mentionnés dans la colonne de gauche :
i) ☐ listage des séquences :	11. ☐ autres éléments (préciser) :
ii) ☐ tableaux y relatifs :	
Type et nombre de supports (disquette, CD-ROM, CD-R ou autre) sur lesquels figurent le ou les :	
i) ☐ listage des séquences :	
ii) ☐ tableaux y relatifs :	
(exemplaires supplémentaires à indiquer aux points 9.ii) ou 10.ii), dans la colonne de droite)	
Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégé :	Langue de dépôt de la demande internationale : Française
Cadre n° X SIGNATURE DU DÉPOSANT, DU MANDATAIRE OU DU REPRÉSENTANT COMMUN	
À côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire et à quel titre l'intéressé signe (si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête).	
Lyon, le 28 mars 2004	
Dominique GUERRE	
CPI 921104	
Cabinet GERMAIN & MAUREAU	

Réservé à l'office récepteur	
1. Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale :	(26/03/04) 26 MARS 2004
3. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale :	
4. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT :	
5. Administration chargée de la recherche internationale (si plusieurs sont compétentes) : ISA /	6. ☐ Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche
2. Dessins : ☐ reçus : ☐ non reçus :	

Réservé au Bureau international	
Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international :	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR2004/000775

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/558 G01N33/543

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 G01N

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)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 458 231 A (BECTION DICKINSON CO) 27 November 1991 (1991-11-27) column 2, lines 29-50 column 4, lines 26-50	4, 6
Y	column 6, lines 15-30	1-3, 5, 7-13
Y	EP 0 462 376 A (ABBOTT LAB) 27 December 1991 (1991-12-27) page 7, line 43 - page 8, line 28	1-3, 5, 7-13
A	US 6 008 056 A (THIEME THOMAS) 28 December 1999 (1999-12-28) column 3, line 10 - column 4, line 55 -/-	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ 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.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 September 2004

Date of mailing of the international search report

23/09/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Diez Schlereth, D

24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/000775

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1 020 726 A (NITTO DENKO CORP) 19 July 2000 (2000-07-19) page 2, line 40 - page 3, line 27; figure 3	1-13
A	WO 97/09620 A (AGEN BIOMEDICAL LTD ; RYLATT DENNIS BRIAN (AU); MOSS DEAN (AU); JAN) 13 March 1997 (1997-03-13) the whole document	1-13

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/000775

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0458231	A	27-11-1991	US 5139934 A	18-08-1992
			AU 640750 B2	02-09-1993
			AU 7278491 A	28-11-1991
			CA 2037521 A1	26-11-1991
			EP 0458231 A1	27-11-1991
			IE 910682 A1	04-12-1991
			JP 4231874 A	20-08-1992
			JP 6105255 B	21-12-1994
			US 5370994 A	06-12-1994
			US 5328831 A	12-07-1994
EP 0462376	A	27-12-1991	AT 140794 T	15-08-1996
			AU 637489 B2	27-05-1993
			AU 7598691 A	14-11-1991
			CA 2041782 A1	10-11-1991
			DE 69121021 D1	29-08-1996
			DE 69121021 T2	27-02-1997
			EP 0462376 A2	27-12-1991
			ES 2092523 T3	01-12-1996
			JP 4230857 A	19-08-1992
US 6008056	A	28-12-1999	NONE	
EP 1020726	A	19-07-2000	JP 2000019176 A	21-01-2000
			JP 2000019173 A	21-01-2000
			JP 2000019174 A	21-01-2000
			JP 2000019175 A	21-01-2000
			JP 2000028612 A	28-01-2000
			JP 2000028613 A	28-01-2000
			JP 2000028611 A	28-01-2000
			JP 2000028610 A	28-01-2000
			JP 2000028614 A	28-01-2000
			JP 2000206114 A	28-07-2000
			JP 2000221193 A	11-08-2000
			JP 2000221194 A	11-08-2000
			EP 1020726 A1	19-07-2000
			US 6753190 B1	22-06-2004
			WO 0002049 A1	13-01-2000
WO 9709620	A	13-03-1997	AU 710737 B2	30-09-1999
			AU 6782596 A	27-03-1997
			WO 9709620 A1	13-03-1997
			EP 0864090 A1	16-09-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR2004/000775

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 G01N33/558 G01N33/543

Selon la classification internationale des brevets (CIB) 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 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)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 458 231 A (BECTON DICKINSON CO) 27 novembre 1991 (1991-11-27) colonne 2, ligne 29-50 colonne 4, ligne 26-50	4, 6
Y	colonne 6, ligne 15-30	1-3, 5, 7-13
Y	EP 0 462 376 A (ABBOTT LAB) 27 décembre 1991 (1991-12-27) page 7, ligne 43 - page 8, ligne 28	1-3, 5, 7-13
A	US 6 008 056 A (THIEME THOMAS) 28 décembre 1999 (1999-12-28) colonne 3, ligne 10 - colonne 4, ligne 55 -/-	1-13

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ 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 d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *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 théorie constituant 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

10 septembre 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23/09/2004

Nom et adresse postale de l'Administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2200 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-3040, Tx. 31 851 apo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Diez Schlereth, D

27
27

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR2004/000775

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	EP 1 020 726 A (NITTO DENKO CORP) 19 juillet 2000 (2000-07-19) page 2, ligne 40 - page 3, ligne 27; figure 3	1-13
A	WO 97/09620 A (AGEN BIOMEDICAL LTD ; RYLATT DENNIS BRIAN (AU); MOSS DEAN (AU); JAN) 13 mars 1997 (1997-03-13) le document en entier	1-13

TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS

PCT/FR2004/00077

KH SG

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

PREMIER AVIS INFORMANT LE DÉPOSANT
DE LA COMMUNICATION DE LA DEMANDE
INTERNATIONALE (AUX OFFICES DÉSIGNÉS
QUI N'APPLIQUENT PAS LE DÉLAI DE
30 MOIS SELON L'ARTICLE 22.1))

(règle 47.1.c) du PCT)

Destinataire :

Cabinet GERMAIN & MAUREAU
BP 6153
F-69486 Lyon Cedex 08
FRANCE

RECULE
02 NOV 2004

Date d'expédition (jour/mois/année) 28 octobre 2004 (28.10.2004)		
Référence du dossier du déposant ou du mandataire KH/SG/BR045765		
AVIS IMPORTANT		
Demande internationale n° PCT/FR2004/000775	Date du dépôt international (jour/mois/année) 26 mars 2004 (26.03.2004)	Date de priorité (jour/mois/année) 28 mars 2003 (28.03.2003)
Déposant VEDALAB etc		

1. **ATTENTION** : Pour tout office désigné auquel le délai selon l'article 22.1) tel qu'il est en vigueur depuis le 1^{er} avril 2002 (30 mois à compter de la date de priorité) s'applique, se reporter au formulaire PCT/IB/308(Deuxième avis supplémentaire) (qui sera émis à bref délai après l'expiration du délai de 28 mois à compter de la date de priorité).

2. Il est notifié par la présente que l'office ou les offices désignés suivants – auxquels le délai selon l'article 22.1) tel qu'il est en vigueur depuis le 1^{er} avril 2002 ne s'applique pas – ont demandé que la communication de la demande internationale, prévue à l'article 20, soit effectuée conformément à la règle 93bis.1. Le Bureau international a adressé cette communication à la date indiquée ci-dessous :
14 octobre 2004 (14.10.2004)

CH

Conformément à la règle 47.1.c-bis)i), ces offices accepteront le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien été effectuée à la date d'expédition indiquée ci-dessus et il ne sera pas exigé du déposant qu'il fournisse une copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

3. Les offices désignés suivants, auxquels le délai selon l'article 22.1) tel qu'il est en vigueur depuis le 1^{er} avril 2002 ne s'applique pas, n'ont pas demandé, à la date d'expédition du présent avis, que la communication de la demande internationale soit effectuée conformément à la règle 93bis.1 :

FI, LU, SE, TZ, UG, ZM

Conformément à la règle 47.1.c-bis)ii), ces offices accepteront le présent avis comme preuve déterminante du fait que l'État contractant pour lequel cet office agit en tant qu'office désigné n'exige pas du déposant qu'il fournisse en vertu de l'article 22 une copie de la demande internationale.

4. DÉLAIS pour l'ouverture de la phase nationale

Pour le ou les offices désignés mentionnés ci-dessus et à moins qu'une demande d'examen préliminaire international ait été présentée avant l'expiration du délai de 19 mois à compter de la date de priorité (voir l'article 39.1)), le délai applicable pour l'ouverture de la phase nationale sera, sous réserve de ce qui est dit au paragraphe suivant, de 20 MOIS à compter de la date de priorité.

En pratique, des délais autres que celui de 20 mois continueront de s'appliquer, pour des durées diverses, en ce qui concerne certains offices désignés mentionnés ci-dessus. Pour obtenir les mises à jour régulières relatives aux délais applicables (20 ou 21 mois, ou autre délai), office par office, on se reportera à la Gazette du PCT, au bulletin PCT Newsletter ainsi qu'aux chapitres nationaux pertinents dans le volume II du Guide du déposant du PCT, accessibles sur le site Internet de l'OMPI à l'adresse suivante : <http://www.wipo.int/pct/fr/index.html>.

Le déposant est seul responsable du respect de tous les délais visés ci-dessus.

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

Fonctionnaire autorisé

Philippe Becamel

n° de télécopieur+41 22 740 14 35

n° de télécopieur+41 22 338 71 40

Formulaire PCT/IB/308(Premier avis) (janvier 2004)

29

TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS

PCT/FR2004/00077

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

DEUXIÈME AVIS SUPPLÉMENTAIRE INFORMANT
LE DÉPOSANT DE LA COMMUNICATION DE LA
DEMANDE INTERNATIONALE (AUX OFFICES
DÉSIGNÉS QUI APPLIQUENT LE DÉLAI DE
30 MOIS SELON L'ARTICLE 22.1)

Destinataire :

Cabinet GERMAIN & MAUREAU
BP 8153
F-69468 Lyon Cedex 08
FRANCE

(règle 47.1.c) du PCT)

Date d'expédition (jour/mois/année)
28 juillet 2005 (28.07.2005)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
KH/SG/BR045765

AVIS IMPORTANT

Demande internationale n°
PCT/FR2004/000775

Date du dépôt international (jour/mois/année)
26 mars 2004 (26.03.2004)

Date de priorité (jour/mois/année)
28 mars 2003 (28.03.2003)

Déposant

VEDALAB etc

1. **ATTENTION** : Pour tout office désigné auquel le délai selon l'article 22.1) tel qu'il est en vigueur depuis le 1er avril 2002 (30 mois à compter de la date de priorité) ne s'applique pas, se reporter au formulaire PCT/IB/308 (Premier avis) émis antérieurement.
2. Il est notifié par la présente que l'office ou les offices désignés suivants – auxquels le délai selon l'article 22.1) tel qu'il est en vigueur depuis le 1er avril 2002 s'applique – ont demandé que la communication de la demande internationale, prévue à l'article 20, soit effectuée conformément à la règle 93bis.1. Le Bureau international a adressé cette communication à la date indiquée ci-dessous :
14 octobre 2004 (14.10.2004)

AU, AZ, BY, CN, CO, DZ, EP, HU, KG, KP, KR, MD, MK, MZ, NA, RU, SY, TM, US

Conformément à la règle 47.1.c-bis)i), ces offices accepteront le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien été effectuée à la date d'expédition indiquée ci-dessus et il ne sera pas exigé du déposant qu'il fournisse une copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

3. Les offices désignés suivants, auxquels le délai selon l'article 22.1) tel qu'il est en vigueur depuis le 1er avril 2002 s'applique, n'ont pas demandé, à la date d'expédition du présent avis, que la communication de la demande internationale soit effectuée conformément à la règle 93bis.1 :

AE, AG, AL, AM, AP, AT, BA, BB, BG, BR, BW, BZ, CA, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EA, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MA, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PG, PH, PL, PT, RO, SC, SD, SG, SK, SL, TJ, TN, TR, TT, UA, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZW

Conformément à la règle 47.1.c-bis)ii), ces offices accepteront le présent avis comme preuve déterminante du fait que l'État contractant pour lequel cet office agit en tant qu'office désigné n'exige pas du déposant qu'il fournisse en vertu de l'article 22 une copie de la demande internationale.

4. **DÉLAIS** pour l'ouverture de la phase nationale

Pour le ou les offices désignés ou élus mentionnés ci-dessus, le délai applicable pour l'ouverture de la phase nationale sera, sous réserve de ce qui est dit au paragraphe suivant, de 30 MOIS à compter de la date de priorité.

En pratique, des délais autres que celui de 30 mois continueront de s'appliquer, pour des durées diverses, en ce qui concerne certains offices désignés ou élus mentionnés ci-dessus. Pour obtenir les mises à jour régulières relatives aux délais applicables (30 ou 31 mois, ou autre délai), office par office, on se reportera à la *Gazette du PCT*, au bulletin *PCT Newsletter* ainsi qu'aux chapitres nationaux pertinents dans le volume II du *Guide du déposant du PCT*, accessibles sur le site Internet de l'OMPI à l'adresse suivante : <http://www.wipo.int/pct/fr/index.html>.

Le déposant est seul responsable du respect de tous les délais visés ci-dessus.

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

Fonctionnaire autorisé

Athina Nickitas-Etienne

n° de télécopieur+41 22 740 14 35

n° de télécopieur+41 22 338 89 95

TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS

PCT/FR2004/0007.

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

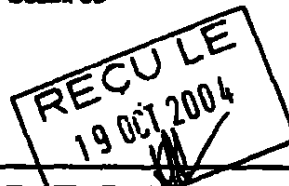
PCT

INFORMATIONS RELATIVES AUX
OFFICES ELUS QUI ONT RECU
NOTIFICATION DE LEUR ÉLECTION

(article 31.7) et règle 61.3 du PCT)

Destinataire :

Cabinet GERMAIN & MAUREAU
BP 6153
F-69466 Lyon Cedex 08
FRANCE



AVIS IMPORTANT

Date d'expédition (jour/mois/année)
14 octobre 2004 (14.10.2004)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
KH/SG/BR045765

Demande internationale n°
PCT/FR2004/000775

Date du dépôt international (jour/mois/année)
26 mars 2004 (26.03.2004)

Date de priorité (jour/mois/année)
28 mars 2003 (28.03.2003)

Déposant

VEDALAB etc

- Le déposant est informé que le Bureau international a, conformément à l'article 31.7), notifié à chacun des offices suivants son élection :
EP: AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR
National: BG, CA, CN, CZ, DE, JP, KP, KR, MN, NO, PL, RO, RU, SK, US
- Les offices suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle ils doivent être notifiés de leur élection: la notification de leur élection leur sera envoyée par le Bureau international seulement à leur demande :
AP: BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW
EA: AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM
OA: BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG
National: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BR, BW, BY, BZ, CH, CO, CR, CU, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MW, MX, MZ, NA, NI, NZ, OM, PG, PH, PT, SC, SD, SE, SG, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW
- Dans la mesure où la ou les élections ont été faites avant l'expiration du délai de 19 mois à compter de la date de priorité, il est rappelé au déposant qu'il doit aborder la "phase nationale" avant l'expiration d'un délai de 30 mois à compter de la date de priorité devant chacun des offices énumérés ci-dessus. Ceci doit être fait moyennant le paiement de la ou des taxes nationales et la remise, le cas échéant, d'une traduction de la demande internationale (article 39.1)a)), de même que, le cas échéant, la remise d'une traduction de toute annexe du rapport préliminaire international sur la brevetabilité (chapitre II du Traité de coopération en matière de brevets) (article 36.3)b) et règle 74.1).

Certains offices ont fixé des délais qui expirent plus tard que celui mentionné ci-dessus. Voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 et, pour plus de précisions quant aux délais applicables, office par office, voir les chapitres nationaux dans le volume II du *Guide du déposant du PCT* et le site Internet de l'OMPI, mis à jour régulièrement.

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

Fonctionnaire autorisé

Philippe Becamel

n° de télécopieur+41 22 740 14 35

n° de télécopieur+41 22 338 71 40

81

TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS

PCT

RAPPORT PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL SUR LA BREVETABILITÉ

(chapitre II du Traité de coopération en matière de brevets)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire	POUR SUITE À DONNER voir formulaire PCT/PEA/16	
Demande internationale No. PCT/FR2004/000775	Date du dépôt international (<i>journalisée</i>) 26.03.2004	Date de priorité (<i>journalisée</i>) 26.03.2003
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB G01N33/558, G01N33/543		
Déposant VEDALAB et al		
1. Le présent rapport est le rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international en vertu de l'article 35 et transmis au déposant conformément à l'article 36. 2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture. 3. Ce rapport est accompagné d'ANNEXES, qui comprennent : a. ☒ un total de (<i>envoyées au déposant et au Bureau international</i>) 4 feuilles, définies comme suit : ☒ les feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou des feuilles contenant des rectifications autorisées par la présente administration (voir la règle 70.16 et l'instruction administrative 807). ☐ des feuilles qui remplacent des feuilles précédentes, mais dont la présente administration considère qu'elles contiennent une modification qui va au-delà de l'exposé de l'invention qui figure dans la demande internationale telle qu'elle a été déposée, comme il est indiqué au point 4 du cadre n° I et dans le cadre supplémentaire. b. ☐ (<i>envoyées au Bureau international seulement</i>) un total de (<i>préciser le type et le nombre de support(s) électronique(s)</i>) , qui contiennent un listing de la ou des séquences ou un ou des tableaux y relatifs, déposés sous forme déchiffrable par ordinateur seulement, comme il est indiqué dans le cadre supplémentaire relatif au listing de la ou des séquences (voir l'instruction administrative 802).		
4. Le présent rapport contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants : ☒ Cadre n° I Base de l'opinion ☐ Cadre n° II Priorité ☐ Cadre n° III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle ☐ Cadre n° IV Absence d'unité de l'invention ☒ Cadre n° V Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration ☐ Cadre n° VI Certains documents cités ☐ Cadre n° VII Irrégularités dans la demande internationale ☐ Cadre n° VIII Observations relatives à la demande internationale		
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 19.07.2004	Date d'achèvement du présent rapport 21.06.2005	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 23699 - 0 Tlx 523656 epmu d Fax: +49 89 23699 - 4485	Fonctionnaire autorisé Diez Schlereth, D N° de téléphone +49 89 2369-7488 	

Formulaire PCT/PEA/409 (janvier 2004)

**RAPPORT PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL
SUR LA BREVETABILITÉ**

Demande internationale n°
PCT/FR2004/000775

Cadre n° V Déclaration motivée selon l'article 35.2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration			
	Nouveauté	Oui: Revendications	1-13
	Activité Inventive	Non: Revendications	
		Oui: Revendications	1-13
	Possibilité d'application Industrielle	Non: Revendications	
		Oui: Revendications	1-13
		Non: Revendications	

2. Citations et explications (règle 70.7) :
voir feuille séparée

**RAPPORT PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL
SUR LA BREVETABILITÉ
(FEUILLE SÉPARÉE)**

Demande internationale n°

PCT/FR2004/000775

Point V

1.) Il est fait référence aux documents suivants:

D1: EP-A-0 458 231

D2: EP-A-0 462 376

2.) L'objet des revendications 1-13 est considéré comme étant nouveau et inventif au sens des articles Art. 33 (2) et (3) PCT, pour les raisons suivantes:

Le document D1 (voir col. 4, l. 26 à col. 6, l. 20), qui est considéré comme étant l'état de la technique le plus proche par rapport à l'objet de la revendication 1, décrit un procédé de détection d'un analyte utilisant un support solide comprenant un réactif de capture immobilisé dans la zone de détection. L'échantillon liquide et le réactif de liaison conjugué sont déposés séparément, successivement et extemporanément sur la zone de collection (dans un "dipstick" la zone de collection est aussi la zone de détection).

D2 décrit un procédé pareil immunochromatographique de détection d'un analyte dans lequel l'échantillon liquide et le réactif de liaison conjugué peuvent être déposés séparément et successivement sur le support (ce document n'indique pas l'ordre préféré de déposition).

Le procédé selon la revendication indépendante 1 diffère de celui décrit dans D1 en ce que le réactif de liaison conjugué est déposé sur la zone de collection avant que l'échantillon. Le contact immédiat et total entre l'échantillon et le réactif de liaison marqué permet de diminuer le bruit de fond et l'effet de zone en augmentant la sensibilité du procédé.

Si bien que D2 décrit la possibilité de prédéposer le réactif de liaison sur le support avant d'ajouter l'échantillon liquide, le réactif de liaison n'est pas déposé "extemporanément et sous forme liquide" avant ledit échantillon liquide (col. 5, l. 34-37; p. 8, l. 24-27).

Donc l'homme du métier fourni avec les documents D1-D2 n'aurait pas inversé l'ordre de déposition des réactifs dans le procédé décrit dans D1 pour diminuer l'effet de zone et n'aurait pas développé un procédé dans lequel le réactif de liaison est déposé avant l'échantillon liquide (ou avant le diluant liquide) tel que celui des revendications indépendantes 1 et 3-4 (D1,

81

**RAPPORT PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL
SUR LA BREVETABILITÉ
(FEUILLE SÉPARÉE)**

Demande internationale n°

PCT/FR2004/000775

col. 4, l. 10-11, décrit un procédé dans lequel le diluant est déposé avant le réactif de liaison conjugué et D2 ne décrit pas la possibilité d'utiliser un diluant).

gb

REVENDECATIONS

1) Procédé de détection d'un analyte dans un échantillon liquide comprenant les étapes suivantes :

a) on dispose d'un support solide poreux pourvu d'une zone de collection et d'une zone de détection, un réactif de capture étant immobilisé dans la zone de détection ;

b) on dépose, séparément, successivement et extemporanément, dans la zone de collection du support solide poreux:

i) un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière, le réactif étant sous forme liquide,

ii) l'échantillon liquide,

c) on attend un temps suffisant pour la migration par diffusion capillaire du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et de l'échantillon liquide depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux,

d) on observe la mesure dans laquelle le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière se fixe dans la zone de détection.

2) Procédé selon la revendication 1 dans lequel à l'étape b) on dépose l'échantillon liquide en amont du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière par rapport au sens de migration depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux.

3) Procédé de détection d'un analyte dans un échantillon liquide comprenant les étapes suivantes :

a) on dispose d'un support solide poreux pourvu d'une zone de collection et d'une zone de détection, un réactif de capture étant immobilisé dans la zone de détection ;

b) on dépose, séparément, successivement et extemporanément dans la zone de collection du support solide poreux :

i) un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière, le réactif étant sous forme liquide,

ii) l'échantillon liquide,

iii) un diluant sous forme liquide,



87

c) on attend un temps suffisant pour la migration par diffusion capillaire du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière, de l'échantillon liquide et du diluant depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux,

d) on observe la mesure dans laquelle le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière se fixe dans la zone de détection.

4) Procédé de détection d'un analyte dans un échantillon liquide comprenant les étapes suivantes :

a) on dispose d'un support solide poreux pourvu d'une zone de collection et d'une zone de détection, un réactif de capture étant immobilisé dans la zone de détection ;

b) on dépose, séparément, successivement et extemporanément dans la zone de collection du support solide poreux:

i) l'échantillon liquide,

ii) un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière, le réactif étant sous forme liquide,

iii) un diluant sous forme liquide,

c) on attend un temps suffisant pour la migration par diffusion capillaire du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière, de l'échantillon liquide et du diluant depuis la zone de collection jusqu'à la zone de détection du support solide poreux,

d) on observe la mesure dans laquelle le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière se fixe dans la zone de détection.

5) Procédé selon l'une des revendications 3 ou 4 dans lequel à l'étape b) on dépose le diluant sous forme liquide en amont du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et en amont de l'échantillon liquide par rapport au sens de migration depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux.

6) Procédé selon l'une des revendications 1-5 dans lequel le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et le réactif de capture immobilisé dans la zone de détection permettent de détecter l'analyte par un test sandwich.



88

7) Procédé selon l'une des revendications 1-5 dans lequel le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulier et le réactif de capture immobilisé dans la zone de détection permettant de détecter l'analyte par un test de compétition.

8) Procédé selon l'une des revendications 1-7 dans lequel le support solide poreux est un support solide poreux en forme de bande ou de bandelette chromatographique.

9) Procédé selon l'une des revendications 1-8 dans lequel le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une fenêtre d'observation permettant d'observer la mesure dans laquelle le réactif conjugué à un marqueur particulier se fixe dans la zone de détection du support solide poreux.

10) Procédé selon la revendication 9 dans lequel le support de préhension est pourvu d'au moins une ouverture permettant respectivement le dépôt de l'échantillon liquide, du réactif de liaison conjugué à un marqueur et, le cas échéant, du diluant dans la zone de collection du support solide poreux.

11) Procédé selon la revendication 2 dans lequel le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une fenêtre d'observation permettant d'observer la mesure dans laquelle le réactif conjugué à un marqueur particulier se fixe dans la zone de détection du support solide poreux ; le support solide poreux étant également pourvu d'une première ouverture permettant le dépôt dans la zone de collection du support solide poreux du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulier et d'une deuxième ouverture, en amont de la première ouverture, permettant le dépôt dans la zone de collection du support solide poreux de l'échantillon liquide.

12) Procédé selon la revendication 5 dans lequel le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une fenêtre d'observation permettant d'observer la mesure dans laquelle le réactif conjugué à un marqueur particulier se fixe dans la zone de détection du support solide poreux ; le support de préhension étant également pourvu d'une première ouverture, permettant le dépôt dans la zone de collection du support



89

24

solide poreux du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et de l'échantillon, et d'une deuxième ouverture, en amont de la première ouverture, permettant le dépôt dans la zone de collection du support solide poreux du diluant sous forme liquide.

13) Procédé selon l'une des revendications 9-12 dans lequel le support de préhension est constitué d'un boîtier.

32 90

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar un analito en una muestra líquida, conformado por los siguientes pasos:
 - a) un soporte sólido poroso provisto con una zona de recolección y una zona de detección, un reagente de captura está inmovilizado en la zona de detección;
 - b) los siguientes son depositados, separadamente, sucesivamente y extemporáneamente, en la zona de recolección del soporte sólido poroso:
 - i. un reagente de fijación conjugado a un marcador particulado, el reagente está en forma líquida.
 - ii. La muestra líquida,
 - c) una cantidad de tiempo suficiente para la migración, por difusión capilar, del agente de fijación conjugado a un marcador particulado y de la muestra líquida desde la zona de recolección a la zona de detección del soporte sólido poroso, es permitida que transcurra,
 - d) la extensión en la cual el reagente conjugado a un marcador particulado se fija en la zona de detección es observada.
2. El método como el reivindicado en la reivindicación 1, en el cual, en el paso b), la muestra líquida es depositada aguas arriba del reagente de fijación conjugado a un marcador particulado, relativa a la dirección de migración desde la zona de recolección hasta la zona de detección del soporte sólido poroso.
3. Un método para detectar un analito en una muestra líquida, comprendiendo los siguientes pasos:

HOJA ENMENDADA

23
91

- a. un soporte sólido poroso provisto con una zona de recolección y una zona de detección, un reagente de captura está inmobilizado en la zona de detección;
- b. los siguientes son depositados, separadamente, sucesivamente y extemporáneamente, en la zona de recolección del soporte sólido poroso:
 - i. un reagente de fijación conjugado a un marcador particulado, el reagente está en forma líquida,
 - ii. la muestra líquida,
 - iii. un diluyente en forma líquida,
- c. una cantidad de tiempo suficiente para la migración, por difusión capilar, del reagente de fijación conjugado a un marcador particulado, de la muestra líquida y del diluyente desde la zona de recolección a la zona de detección del soporte sólido poroso, es permitida que transcurra,
- d. la extensión en la cual el reagente conjugado a un marcador particulado se fija en la zona de detección es observada.

4. Un método para detectar un analito en una muestra líquida, comprendiendo los siguientes pasos:

- a) un soporte sólido poroso provisto con una zona de recolección y una zona de detección, un reagente de captura esta inmobilizado en la zona de detección;
- b) los siguientes son depositados, separadamente, sucesivamente y extemporáneamente, en la zona de recolección del soporte sólido poroso:
 - i. la muestra líquida
 - ii. un reagente de fijación conjugado a un marcador particulado, el reagente esta en forma líquida,
 - iii. un diluyente en forma líquida

HOJA ENMENDADA

- c) una cantidad de tiempo suficiente para la migración, por difusión capilar, del reagente de fijación conjugado a un marcador particulado, de la muestra líquida y de el diluyente desde la zona de recolección a la zona de detección del soporte sólido poroso, es permitida que transcurra,
 - d) la extensión en la cual el reagente conjugado a un marcador particulado se fija en la zona de detección es observada.
5. El método como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4, en el cual, en el paso b), el diluyente en forma líquida es depositado aguas arriba del reagente de fijación conjugado a un marcador particulado y aguas arriba de la muestra líquida, relativo a la dirección de migración desde la zona de recolección a la zona de detección del soporte sólido poroso.
 6. El método como el reivindicado en una de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual el reagente de fijación conjugado a un marcador particulado y el agente de recaptura inmovilizado en la zona de detección hacen posible detectar el analito por medio de un ensayo sandwich.
 7. El método como el reivindicado en una de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual el reagente de fijación conjugado a un marcador particulado y el reagente de captura inmovilizado en la zona de detección hacen posible la detección del analito mediante un ensayo de competencia.
 8. El método como el reivindicado en una de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual el soporte sólido poroso es un soporte sólido poroso en la forma de una banda cromatográfica o una banda delgada.
 9. El método como el reivindicado en una de las reivindicaciones 1 a 8, en el cual el soporte sólido poroso está integrado dentro de un soporte para ser agarrado provisto

con al menos una ventana de observación para observar la extensión en la que el reagente conjugado a un marcador particulado se fija en la zona de detección del soporte sólido poroso.

10.El método como el reivindicado en la reivindicación 9, en el cual el soporte a ser agarrado está provisto con al menos una abertura para depositar, respectivamente, la muestra líquida, el reagente de fijación conjugado a un marcador y, donde es apropiado, el diluyente, en la zona de recolección del soporte sólido poroso.

11.El método como el reivindicado en la reivindicación 2, en el cual el soporte sólido poroso es integrado dentro de un soporte para ser agarrado provisto con al menos una ventana de observación para observar la extensión en la cual el reagente conjugado a un marcador particulado se fija en la zona de detección del soporte sólido poroso; el soporte sólido poroso está también provisto con una primera abertura para depositar el reagente de fijación conjugado a un marcador particulado en la zona de recolección del soporte sólido poroso y con una segunda abertura, aguas arriba de la primera, para depositar la muestra líquida en la zona de recolección del soporte sólido poroso.

12.El método como el reivindicado en la reivindicación 5, en el cual el soporte sólido poroso es integrado dentro de un soporte para ser agarrado provisto con al menos una ventana de observación para observar la extensión en la cual el reagente conjugado a un marcador particulado se fija en la zona de detección del soporte sólido poroso; el soporte para ser agarrado está también provisto con una primera abertura para depositar el reagente de fijación conjugado al marcador particulado y la muestra en la zona de recolección del soporte sólido poroso, y con una segunda abertura, aguas arriba de la primera abertura, para depositar el diluyente en forma líquida en la zona de recolección del soporte sólido poroso.

13.El método como el reivindicado en una de las reivindicaciones 9 a 12, en el cual el soporte para ser agarrado consiste de un estuche.

Traducido por: Guillermo Angel Reyes

HOJA ENMENDADA

Extracto de P Folio 95

95 96

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

MIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO

Indicacion : 10096/79
Fecha (IMP): 2005-09-23 17:31:14
Tramite : 411 PCI-PATENT 379 ASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 1940 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folios: 36

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 69,909
FECHA : SEPTIEMBRE 12 DE 2005

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	31556010	12/09/2005	40,239,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRANITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL :	\$ 443,000.00

SUM: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Obb 14894-841-001-1

96 97

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL
TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ☒	()	()
MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ☒	INCOMPLETA ()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable.



Fecha:

97 98

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO

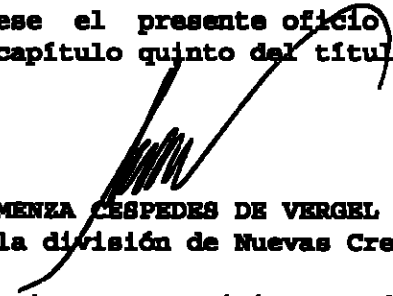
REFERENCIA	Radicación No.	5 96779
	Solicitud internacional	FR2004/000775
	Fecha inicio fase nacional	28/10/2005
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	11091

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.
3. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMONA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 25 JUN 2005
adpa1

11/10/2019