



(12) PATENT

(19) NO

(11) 329706

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/546 (2006.01)

G01N 33/554 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20015019	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.04.12 PCT/EP2000/03280
(22)	Inng.dag	2001.10.15	(85)	Videreføringsdag	2001.10.15
(24)	Løpedag	2000.04.12	(30)	Prioritet	1999.04.16, US, 129551
(41)	Alm.tilgj	2001.12.14			
(45)	Meddelt	2010.12.06			
(73)	Innehaver	Biocartis SA, Parc Scientific EPFL, PSE, CH-1024 ECUBLENS, Sveits			
(72)	Oppfinner	Stefan Cornelis de Smedt, Gent, BE-, Belgia			
		Joseph Demeester, Sint-Baafkouterstraat 14, B-9040 Gent, BE-, Belgia			
		Christiaan Hubert Simon Roelant, 's Hertogenlaan 115, B-3000 Leuven, BE-, Belgia			
		Rudi Wilfred Jan Pauwels, Bonheiden, BE-, Belgia			
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Kodet mikrobærer med bundne ligander, fremgangsmåte for koding av slike samt anvendelse derav for påvisning av målanalytter i en prøve			
(56)	Anførte publikasjoner	US 5736332 A			
(57)	Sammendrag				

Kodede mikrobærere og mer spesielt mikrobærere som har koder skrevet på seg. Fremgangsmåter for å skrive kodene på mikrobærerne, fremgangsmåter for å avlese kodene samt fremgangsmåter for å anvende de kodede mikrobærere. En foretrukket fremgangsmåte for å kode mikrobærerne involverer å eksponere mikrobærere som inneholder en blekbar substans, for en høyspatiell oppløsende lyskilde for å bleke kodene på mikrobærerne. De kodede mikrobærere kan for eksempel bli brukt som støttematerialer i kjemiske og biologiske assays og synteser.

Foreliggende oppfinnelse angår kodede mikrobærere som angitt i krav 1 og mer spesielt slike mikrobærere som har koder skrevet på seg. Enhver referanse i foreliggende beskrivelse til koder skrevet "på" mikrobærerne innbefatter koder som er skrevet på overflaten av mikrobærerne så vel som koder skrevet ved en innvendig dybde av mikrobærerne. Foreliggende oppfinnelse angår også fremgangsmåter ved koding av mikrobærere som angitt i krav 10, fremgangsmåter for å lese kodene som angitt i krav 25, samt fremgangsmåter for å anvende de kodede mikrobærere som angitt i krav 29. En foretrukket fremgangsmåte for å kode mikrobærerne innbefatter å eksponere mikrobærere som bærer en blekbar substans til en høyspatiellopløsende lyskilde for å bleke kodene på mikrobærerne. De kodede mikrobærere kan for eksempel bli brukt som støttematerialer i kjemiske og biologiske assays og synteser.

Beskrivelse av relatert teknikk

Oppdagelse av medikamenter og undersøkelse av medikamenter innen det kjemiske og biologiske område involverer vanligvis å utføre assays på meget store antall forbindelser eller molekyler. Disse assays innbefatter typisk å undersøke kjemiske bibliotek for forbindelser av interesse, utvelgelse av spesielle mål-molekyler i forsøksprøver samt generell testing for kjemiske og biologiske interaksjoner av interesse mellom molekyler. Assayene beskrevet ovenfor krever ofte at det utføres tusener av individuelle kjemiske eller biologiske reaksjoner. For eksempel kan et medikamentoppdagelsesassay involvere undersøkelse av tusener av forbindelser mot en spesifikk målanalytt. Enhver forbindelse som blir observert å reagere, binde eller på annen måte samvirke med målanalytten kan gi håp om et antall anvendelser hvor den observerte interaksjon er antatt å være av viktighet.

Et antall praktiske problemer eksisterer ved behandlingen av det store antall individuelle reaksjoner som er nødvendig i assayene beskrevet ovenfor. Kanskje de største problemer angår nødvendigheten av å merke og spore hver reaksjon. For eksempel dersom en reaksjon av interesse blir observert i kun en gruppe av tusener av reaksjoner, så må forskeren være i stand til å bestemme hvilken av de tusener av opprinnelige forbindelser eller molekyler som ga denne reaksjonen.

En konvensjonell metode å spore identiteten av reaksjonene på er ved fysisk å adskille hver reaksjon i et individuelt reaksjonskammer innenfor et høytetthetsmønster og å holde en nedtegnelse av hvilke individuelle reaktanter som ble brukt i hvert kammer. Således kan, for eksempel når en reaksjon av interesse blir observert i et kammer, merket som nummer 5 av 1000, forskeren referere til nedtegnelsen av

reaktanter som ble benyttet i kamrene og vil finne fra nedtegnelsen av kammer 5
hvilke spesifikke reaktanter som var tilstede for å føre til reaksjonen av interesse.
Eksempler på høytetthetsoppsett referert til ovenfor er 384-, 864-, 1.536-, 3.456-
og 9600-brønners mikrotiterplate-beholdere hvor hver brønn av en mikrotiterplate
5 utgjør et reaksjonskammer i miniatyr. Miniaturiserte reaksjonskammere blir benyt-
tet fordi de er plassbesparende og reduserer kostnadene med reagenser som be-
nyttes i assayene.

Anvendelse av mikrotiterplatebeholdere i kjemiske og biologiske assays har imidler-
tid en rekke ulemper. For eksempel krever bruken av platene nøyaktig adskillelse
10 av et meget stort antall frittstående reaksjonskammere i stedet for å tillate alle re-
aksjoner å finne sted fritt, og ofte mer passende, i ett reaksjonskammer. Videre
bærer kravet om at reaksjonsvolumene romlig skal være adskilt fra hverandre, med
seg en fysisk begrensning angående størrelse av den anvendte mikrotiterplate, og
således antallet av forskjellige reaksjoner som kan bli utført på platen.

15 I lys av begrensningene som er beskrevet ovenfor ved bruken av mikrotiterplater,
har enkelte forsøk blitt utført for å utvikle andre muligheter for å følge individuelle
reaksjoner i assays med høy gjennomløpning. Disse metoder har forkastet konseps-
tet med romlig adskillelse av reaksjoner og sporer i stedet de individuelle reaksjoner
på annen måte. For eksempel har det blitt utviklet metoder for å utføre assays med
20 høy gjennomløpning og reaksjoner på mikrobærere som støttematerialer. Hver mik-
robærer kan inneholde en spesiell ligand bundet til sin overflate for å virke som en
reaktant og mikrobæreren kan i tillegg inneholde en "kode" som identifiserer mikro-
bæreren og følgelig identifiserer den spesielle ligand som er bundet til dens overflate.
Disse metoder som er beskrevet ovenfor, tillater "tilfeldig prosessering", noe som
25 betyr at tusener av unikt kodede mikrobærere som hver har en ligand bundet til sin
overflate, alle kan bli blandet og utsatt for et assay samtidig. De mikrobærere som
viser en gunstig reaksjon av interesse mellom den festede ligand og målanalytten,
kan så få sin kode avlest, noe som derved fører til identifikasjon av liganden som ga
den gunstige reaksjonen.

30 Utførelsen av tilfeldig prosessering beskrevet ovenfor krever nøyaktig koding av
hver av mikrobærerne separat og krever nøyaktig og konsistent identifikasjon av
kodene. Fordi assays som bruke tilfeldig prosessering i stor grad støtter seg på
kodingen av mikrobærerne for sine resultater, avhenger kvaliteten av disse assays i
stor grad av kvaliteten og lesbarheten av kodene på mikrobærerne. Forsøk på å
35 kode mikrobærere er fremdeles begrenset til forskjellig farging (Dye-Trak mikro-

sfærer), fluorescent merking (Fluorospheres; Nu-flow), såkalte fjernprogrammerbare matriser med hukommelse (IRORI; US patent nr. 5.751.629), løsbare markører så som oligonukleotider og små peptider (US patent nr. 5.565.324; US patent nr. 5.721.099; US patent nr. 5.789.172. Andre muligheter består for eksempel i å
 5 binde transpondere, dvs. et fremmed materiale, til overflaten til mikrobæreren for å virke som koden (US patent 5.736.332) eller ved å bruke optiske signaturer så som fluoriserende fargestoffer innbakt i mikrosfærerene (WO 98/40726).

Disse kjente metoder som er identifisert ovenfor for å kode mikrobærere, har hver sine ulemper. For eksempel kan mikrobærere som blir skjeltet fra hverandre kun
 10 på basis av sin størrelse, form, farge, fluorescensintensitet eller kombinasjoner derav, ofte ikke gi tilstrekkelige unike lesbare kombinasjoner av disse variabler til å danne det massive antall av unike kombinasjoner som er nødvendig for å følge testen av et tilsvarende stort antall forskjellige molekyler. I tillegg løper enhver mikrobærer som bærer fremmede legemer på sin overflate for å virke som koder så
 15 som løsbare markører eller fluorescente markører, den risiko at de bundne enheter kan innvirke på bindingen eller reaksjonen av de ligand-bundne molekyler på mikrobærerne som målretter analyttene i assayene. Etter adskillelse av mikrobærerne av interesse som oppviser en gunstig reaksjon, involverer metoder for å kode mikrobærere med løsbare markører også ofte det ekstra trinn å spalte og analysere
 20 markørene for til syvende og sist å finne ut identiteten av de underliggende ligander på mikrobærerne som ga de gunstige reaksjoner. Dette spaltningsstrinn utvider naturligvis tiden og arbeidet som er nødvendig for å bestemme resultatene av testene.

I lys av det ovennevnte forblir det innen faget et behov for enkle måter å identifisere enkle mikrobærere i en massiv populasjon av eller identiske mikrobærere, og
 25 spesielt måter for å kode et stort antall enestående koder som ikke behøver å være festet som fremmede legemer til overflatene av mikrobærerne.

Oppsummering av oppfinnelsen

Et mål for oppfinnelsen er å fremskaffe en mikrobærer som er kodet uten behov for
 30 å feste en fremmed gjenstand til overflaten av mikrobæreren for å virke som koden. Et annet mål for foreliggende oppfinnelse er å fremskaffe en fremgangsmåte for å kode mikrobærere som kan gi i hovedsak ubegrensede muligheter med hensyn til å variere de enestående koder som kan være skrevet og avlest på mikrobærerne.

Foreliggende oppfinnelse tilfredsstiller disse mål ved å fremskaffe mikrobærere som har en preservert kode skrevet på overflaten av mikrobæreren eller ved en innvendig dybde av mikrobæreren, og hvori mikrobæreren inneholder en eller flere ligander bundet til mikrobæreren. Foretrukne mikrobærere er mikrobærere inneholdende blekbare substanser, for eksempel fluorescente molekyler. En foretrukket fremgangsmåte for å kode mikrobærerne involverer å eksponere mikrobærere som bærer en blekbar substans til en lyskilde for høyt spatielt oppløsende lys for å bleke kodene på mikrobærerne. Denne metode kan foretrukket innbefatte bleking av koder på fluorescente mikrobærere, hvor bleking danner enten samme eller forskjellige nivåer av fluorescent intensitet innen de blekede deler av koden. En ytterligere foretrukket metode for å kode mikrobærerne er å skrive kodene ved en innvendig dybde hos mikrobærerne.

I en annen foretrukket utførelsesform blir et stort antall kjemiske forbindelser eller biologiske molekyler bundet til et tilsvarende stort antall mikrobærere ifølge oppfinnelsen, hvor de mikrobærer-bundne ligander blir blandet og omsatt samtidig i henhold til en utvelgende eller undersøkende oppskrift, og de ligander som reagerer blir identifisert ved å avlese koden på mikrobærerne til hvilke de er bundet.

De kodede mikrobærere ifølge oppfinnelsen muliggjør samtidig analyse av et stort antall analytter i et enkelt reaksjonskammer ved å bruke en enkel prøvealiquot. Anvendelse av mikrobærerne ifølge oppfinnelsen i assays og reaksjoner med høy gjennomløpning er derfor svært overlegen i forhold til anvendelsen av konvensjonell mikrotiterplate-teknologi.

Mikrobærerne ifølge oppfinnelsen fremskaffer også et så godt som ubegrenset antall koder som kan bli skrevet og avlest på mikrosfærene, og de er følgelig overlegne i forhold til kjente mikrobærere som er kodet med fargede eller fluorescente markører og som bærer et mer begrenset antall muligheter for koding. Mikrobærerne ifølge oppfinnelsen er også overlegne i forhold til mikrobærere kodet med enheter festet til overflatene av mikrobærerne. Dette er fordi skriften på mikrobærerne ifølge oppfinnelsen ikke bærer risikoen som er assosiert med kjente mikrobærere for potensielt å influere på analytt/ligand-interaksjoner som finner sted på overflatene av mikrobærerne.

Ytterligere trekk og fordeler ved oppfinnelsen blir gitt i beskrivelsen som følger. Fordelene ved oppfinnelsen vil bli forstått og oppnådd med de kodede mikrobærere samt fremgangsmåter spesielt påpekt i beskrivelsen.

Kort beskrivelse av tegningene

Figur 1 illustrerer et antall prinsipper ved konvensjonell mikrofotolyse og SCAMP.

Figur 2a og 2b illustrerer en strekkode og ringkode ved å bruke forskjellige intensiteter som er angitt ved de forskjellige farger som er vist i figurene.

- 5 Figur 3a og 3b illustrerer konfokale bilder av et midtre plan av en FD148-dex-ma mikrosfære for (øvre) og etter bleking (nedre) av en strimmel på 3 μm ved omtrent 10 μm under overflaten av mikrosfæren.

- 10 Figur 4 illustrerer fluorescens gjenvinningskurver av FD148 i 148-dex-ma mikrosfærer (A) og FITC i dex-ma mikrosfærer pålagt FITC ved neddykking av en FITC-oppløsning (B).

Figur 5 illustrerer et konfokalt bilde av et midtre plan av en FD 148-dex-ma mikrosfære etter bleking og en tilfeldig geometri med SCAMP.

- 15 Figur 6a og 6b illustrerer konfokale bilder av det midtre plan i en 45 μm FITC-merket latex-kule en time etter bleking av en strekkode (Figur 6a) og strekkode pluss tall (Figur 6b).

Figur 7 illustrerer et konfokalt bilde av et midtre plan i en 45- μm FITC-merket latexkule en time etter bleking av koden R1247.

Figur 8 illustrerer et konfokalt bilde av et midtre plan i en 45- μm FITC-merket latexkule en time etter bleking av logoen til Ghent University.

- 20 Figur 9 illustrerer et konfokalt bilde av et midtre plan i en 45- μm FITC-merket latexkule en time etter bleking av logoen til Tibotec-selskapet.

Figur 10a illustrerer konfokale bilder av koder bleket til forskjellige intensiteter, og Figur 10b til 10d illustrerer grafisk de forskjellige intensiteter innen kodene.

- 25 Figur 11a og 12a illustrerer konfokale bilder av koder bleket til forskjellige intensiteter, og Figur 11b og 12b illustrerer grafisk de forskjellige intensiteter innen de respektive koder.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

I en utførelsesform angår foreliggende oppfinnelse mikrobærere som har koder skrevet på seg som angitt i krav 1. Mikrobærerne ifølge oppfinnelsen kan være laget av for eksempel ethvert materiale som rutinemessig blir benyttet ved høy-
5 gjennomløpnings undersøkelsesteknologi og diagnoser. For eksempel kan mikrobærerne være laget av et fast stoff, et semi-fast stoff eller en kombinasjon av et fast og et semi-fast stoff. Eksempler på slike materialer innbefatter lateks, polystyren, fornettede dextraner, metylstyren, polykarbonat, polypropylen, cellulose, polyakrylamid og dimetakrylamid. Foretrukne materialer innbefatter lateks, po-
10 lystyren og fornettede dextraner. Mikrobærerne kan også være prokaryote eller eukaryote celler.

Mikrobærerne kan være av enhver form og størrelse som lar seg kode og anvende som mikrobærere. For eksempel kan mikrobærerne være i form av sfærer eller i form av kuler som ikke nødvendigvis er sfæriske. Mikrobærerne kan være for ek-
15 sempel sylindriske eller ovale av form. Når de er sfæriske av form kan mikrobærerne ha for eksempel en diameter på 1 til 200 μm .

Kodene skrevet på mikrobærerne kan ha enhver form, utforming eller være ethvert symbol som kan bli skrevet eller lest på mikrobærerne. For eksempel kan kodene bli skrevet som tall eller bokstaver, eller som koder i form av symboler, bilder,
20 strekkoder, ringkoder eller tredimensjonale koder. Ringkoder likner strekkoder bortsett fra at konsentriske sirkler blir brukt i stedet for rette linjer. En ring kan for eksempel inneholde den samme informasjon som en strek. Kodene kan bli skrevet på overflaten av mikrobærerne eller ved en innvendig dybde av mikrobærerne. For eksempel kan kodene bli skrevet ved en innvendig dybde av mikrobærerne og mer
25 spesielt i sentralplanet av mikrobærerne. Avhengig av formen på mikrobærerne kan et sentralplan være en foretrukket beliggenhet for å skrive koden fordi dette kan gi det største overflatearealet som er tilgjengelig for skriving. Videre kan det for mikrobærere som har buede overflater, være mer fordelaktig å skrive kodene ved en innvendig dybde heller enn på de buede overflater. Dette er fordi det ofte
30 kan være mer passende å skrive og lese kodene på et flatt plan enn på en buet overflate.

Mikrobærerne ifølge oppfinnelsen kan inneholde en blekbar substans, og kodene på mikrobærerne kan være i form av blekede mønstre innen de blekbare deler av mikrobærerne. Mikrobærerne kan inneholde den blekbare substans enten på overfla-

ten av mikrobæreren eller også innen legemet av mikrobæreren. Enhver referanse i foreliggende søknad til bleking av substanser "på" mikrobærerne innbefatter bleking ved overflaten av mikrobæreren så vel som bleking ved en innvendig dybde av mikrobærerne. Foretrukne blekbare substanser innbefatter blekbare fluorescente eller elektromagnetisk strålingsabsorberende substanser. Mikrobærerne kan inneholde blekbare luminoforer. Eksempler på luminoforer som kan bli brukt innbefatter fluorescerende substanser, fosforiserende substanser eller scintillatorer. Blekbare kjemiluminescente, bioluminescente eller fargende substanser kan bli brukt. De blekbare substanser kan mer spesielt være fluorescein isotiocyanat ("FITC"), fykoerytriner, coumariner, lucifergul og rhodamin. De blekbare substanser bør bli valgt slik at når bleking foregår, forblir koden på mikrobæreren i den tidsperiode som er ønsket for anvendelsen av mikrobærerne og enhver nødvendig avlesing av kodene. Således er en viss mengde av diffusjon av ikke-blekede molekyler inn i de blekede områder akseptabel så lenge den anvendelige levetid av koden blir opprettholdt.

Koder bleket på mikrobærere kan også bli skrevet slik at de har forskjellige fluorescensintensiteter eller farge innen blekede områder hos mikrobærerne. For eksempel kan en bleket kode inneholde flere forskjellige grader av bleking for derved å ha flere forskjellige fluorescensintensiteter innen det blekede område som et hele. Således kan mikrobærere bli kodet ikke bare ved formen av mønsteret som er bleket på mikrobærerne, men også ved bruken av forskjellige fluorescensintensiteter inne i mønsteret.

I en annen utførelsesform angår oppfinnelsen en fremgangsmåte for å skrive koder på mikrobærere som angitt i krav 10. Fremgangsmåten kan bli brukt til å skrive kodene enten på overflatene av mikrobærerne eller ved en innvendig dybde av mikrobærerne. Kodene kan bli skrevet på mikrobærerne ved for eksempel å bruke en høyspatielt oppløsende lyskilde så som laser, en lampe eller en kilde som sender ut røntgenstråler, α - og β -stråler, ionestråler eller enhver form for elektromagnetisk stråling. Kodene kan også bli skrevet på mikrobærerne via fotokromisering eller kjemisk etsing. En foretrukket fremgangsmåte for å skrive kodene er via anvendelse av en høyspatielt oppløsende lyskilde, og spesielt en laser eller en lampe i kombinasjon med et konfokalt mikroskop. En annen foretrukket fremgangsmåte for å skrive kodene er ved å bleke koden i en blekbar substans på mikrobæreren. Foretrukne blekbare substanser i foreliggende fremgangsmåte innbefatter de substanser som er identifisert ovenfor i beskrivelsen av mikrobærerne og innbefatter fluorescente molekyler. Med hensyn til volumet av materialet som kan bli bleket i

mikrobærerne, er et eksempel på et slikt volum mellom en kubikk nanometer og åtte kubikk millimeter av mikrobæreren.

En foretrukket fremgangsmåte for å skrive kodene på mikrobærerne er via bruken av sveipende mikrofotolyse ("SCAMP"). De tekniske trekk ved SCAMP ble først beskrevet i P. Wedekind et al., "Scanning microphotolysis: a new photobleaching technique based on fast intensity modulation of a scanned laser beam and confocal imaging", *Journal of Microscopy*, vol. 176, s. 23-32 (1994). Den ovennevnte artikkel beskriver bruken av SCAMP for blekingen og visualiseringen av mønstre i et tynt fluorescent lag av neglelakk. Artikkelen antyder ikke bruken av SCAMP for å kode mikrobærere.

Det har blitt benyttet SCAMP for å skrive koder på mikrobærerne ved å bleke fluorescente molekyler inne i mikrobærerne. Fotobleking er et velkjent fenomen som angår svinn av farger grunnet det forhold at visse bølgelengder av lys, når det skinner på et gitt pigment, vil gjøre at pigmentets molekyler resonnerer og til slutt brytes ned. Dette er også grunnen til at fluorescente molekyler ofte har en tendens til å bleke når de eksiteres av en kraftig laserstråle med en spesiell bølgelengde.

I mange år ble fluorescens mikrofotolyse ("MP")-teknikker, også kalt fluorescensgjenvinning etter fotobleking ("FRAP") brukt for å studere mobiliteten av fluorescente molekyler i både biologiske medier så som celler og vev, og ikke biologiske medier. Peters og Scholtz, "Fluorescence photobleaching techniques", i *New Techniques of Optical Microscopy and Microspectroscopy*, R. J. Cherry (ed.), MacMillan, New York, s. 199-228 (1991); De Smedt et al., "Structural Information on Hyaluronic Acid Solutions as Studied by Probe Diffusion Experiments", *Macromolecules*, vol. 27, s. 141-146 (1994); De Smedt et al., "Diffusion of Macromolecules in Dextran Methacrylate Solutions and Gels as Studied by Confocal Scanning Laser Microscopy", *Macromolecules*, vol. 30, s. 4863-4870 (1997).

Mobiliteten av fluorescente molekyler kan bli målt ved å bleke (fotolysere) de fluorescente molekyler som beveger seg i det fokale område av en lysstråle, som spesielt kan være en laserstråle (Figur 1: A, B). Umiddelbart etter en kort blekeprosess, typisk omkring ti millisekunder, måler en sterkt svekket laserstråle gjenvinningen av fluorescensen i det fotoblekede område grunnet diffusjonen av fluorescente molekyler fra de omliggende ublekede områder inn i det blekede område (Figur 1: B, C). Den karakteristiske diffusjonstid, som er et mål for diffusjonskoeffisienten, og fraksjonene av henholdsvis immobile og mobile fluorescente mo-

lektyler, kan bli avledet fra fluorescensgjenvinningen i det blekede område (Figur 1: D).

Den mobile fraksjon, R, defineres som:

$$R = \frac{F(\infty) - F(0)}{F(i) - F(0)}$$

5 hvor F(i) er fluorescensintensiteten av den blekede flekk før bleking, F(0) er fluorescensintensiteten av den blekede flekk like etter bleking og F(∞) er fluorescensintensiteten av den blekede flekk en lang tid etter bleking.

I fotoblekingsforsøk som bruker et konvensjonelt (ikke-scannende) lysmikroskop, blir et stasjonær (laser) lysstråle fokusert på prøven under både blekeprosessen og gjenvinningsperioden. Den stasjonære posisjon av (laser) lysstrålen under blekeprosessen resulterer i et fotobleket område som har en sirkulær form. Selv om
10 ikke-scannende lysmikroskoper teknisk sett gir et bestrålt område på 2 µm eller mindre i diameter, så opptrer en utvidelse av den blekede flekk ofte grunnet den stasjonære laserstråle. Dette resulterer i store sirkulære blekede flekker som er typisk 10 µm – 20 µm i diameter eller til og med større, slik som vist skjematisk i
15 Figur 1: B-II.

Tilgjengeligheten av scannende laserlysmikroskoper åpnet nye muligheter for mikrofotolysemetoder. Kombinasjonen av fotolyse, lysstrålescanning og konfokal mikroskopi førte til utviklingen av SCAMP. I SCAMP opptrer bleking under scanning av en prøve ved å skifte mellom lave overvåkende og høye fotoblekende laserintensitetsnivåer i mindre enn et mikrosekund ved å bruke en intensitetsmodulerende anordning så som en akusto-optisk modulator ("AOM"). Kombinasjonen av bleking
20 under scanning og bruken av AOM som gir ekstremt korte blekende pulser, forhindrer utvidelse av den blekede flekk som opptrer ved konvensjonell mikrofotolyse grunnet lengre fotoblekingstider og den stasjonære laserstråle. SCAMP muliggjør
25 blekede flekker på mindre enn en mikrometer i prøven.

Figur 1 illustrerer skjematisk hvordan SCAMP foregår for å måle mobiliteten av fluorescente molekyler. For det første blir fluorescensen langs en x-linje i planet av interesse i en prøve målt ved å scanne denne linje (Figur 1: A – stiplet linje). For

det andre blir et lite segment (for eksempel 3 μm) på denne x-akse, hvor diffusjonen må undersøkes, utvalgt for å bli bleket (Figur 1: B-I). Lengden, posisjonen så vel som antallet av segmenter kan velges fritt av SCAMP-programmet. Fotoblekingen av dette segment opptrer på den tid laserstrålen sveiper over dette segmentet fulgt av en temporær sterk økning i intensiteten av laserstrålen. Typisk er forholdet mellom fotoblekende og overvåkende intensitetsnivåer av laserstrålen større enn 100.

Ettersom SCAMP tar i bruk et konfokalt mikroskop blir fluorescenspåvisning ikke bare mulig ved overflaten av prøven, men også ved en tilfeldig dybde i prøven med lite interferens av spredt stråling fra nivåer som er ute av fokus hos prøven (slik som påtreffes i et konvensjonelt mikroskop). I motsetning til dette, når en fluorescenslampe for bestråling og et konvensjonelt (ikke-fokalt) mikroskop blir brukt, blir kun overflaten av kulene typisk observert. En innkoding ved en innvendig dybde er følgelig generelt vanskelig å observere med et vanlig mikroskop, men blir godt synlig med konfokal optikk. Både de konfokale og scannende trekk ved mikroskopet tillater fotolysering og avlesing av mikroområder ved veldefinerte steder inne i mikrobæreren. Foreliggende oppfinnelse er klart forskjellig fra alle andre applikasjoner som til nå er beskrevet innen faget, for eksempel kan anvendelsen av høyspatiell oppløsning av SCAMP irreversibelt merke mikrosfærer innvendig ved spesifikke dybder og å avlese denne innkoding med konfokale teknikker.

Fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen for å skrive koder på mikrobærere kan også involvere bleking av mikrobærerne for å danne forskjellige intensitetsnivåer i substansene bleket i koden. I tillegg til å vise informasjonen i utformingen av koden i seg selv, kan informasjonen også bli gitt ved forskjellige intensiteter i de blekede mønstrene. Muligheten for å kode mikrobærerne med forskjellige intensiteter kan tillate mindre koder på mikrobærerne for således å spare plass, men noe som fremdeles gir samme antall eller flere av unike identifikasjoner for å kode mikrobærerne. Som et eksempel er det mulig i henhold til oppfinnelsen å bleke fire forskjellige intensiteter i kulene. Dette kan bli utført på et antall måter, for eksempel ved gjentatt bleking over enkelte deler av kulen i forhold til andre, eller ved å tilføre forskjellige nivåer av akustisk energi i et AOM for å danne et antall forskjellige laserenergier som vil gi blekede mønstre med forskjellige intensiteter basert på kraften av laserlys som benyttes for hver del av koden. Figur 2a og 2b er to eksempler på koder bleket ved å bruke forskjellige intensiteter, en med et strekmønster, den andre med et ringmønster. De forskjellige intensiteter i kodene er representert ved

forskjellige farger i figurene. Forskjellige intensitetsnivåer kan også bli kombinert med forskjellige bredder i de kodende elementer, så som streker i strekkoder.

En annen utførelsesform av oppfinnelsen angår avlesing av kodene på de kodede mikrosfærer ifølge oppfinnelsen som angitt i krav 25 ved å bruke et konfokalt mikroskop. Spesielt kan kodene bli avlest ved å suspendere mikrobærerene i et vandig miljø, ved å plassere mikrobærerene mellom to glassplater eller ved å plassere dem i mikrokapillærer og observere kodene gjennom et konfokalt mikroskop.

En annen utførelsesform av oppfinnelsen angår å anvende de kodende mikrosfærer ifølge oppfinnelsen som angitt i krav 29. Mikrobærerene kan bli brukt som støttematerialer for måling av biomolekylære interaksjoner, for oppdagelse av medikamenter, for reseptorbindingsassays, terapeutika, medisinsk diagnostikk, kombinatorisk kjemi, isolering og opprensning av målmolekyler, innfangning og påvisning av makromolekyler for analytiske formål, selektiv fjerning av forurensninger, enzymatisk katalyse, kjemiske modifikasjoner, hybridiseringsreaksjoner og forensiske applikasjoner.

Mikrobærerene kan fortrinnsvis virke som støttematerialer for kjemiske og biologiske assays og syntese. I denne kapasitet kan de inneholde en eller flere ligander bundet til overflaten av mikrobærerene. De ligandbundne mikrobærere kan så bli satt i kontakt med målanalytter for å bestemme tilstedeværelsen eller fraværet av spesielle analytter av interesse, eller kan virke som støttematerialer for kombinatoriske kjemiske reaksjoner utført på den mikrobærer-bundne ligand. Eksempler på målanalytter for de mikrobærerbundne ligander innbefatter antigener, antistoff, reseptorer, haptener, enzymer, proteiner, peptider, nukleinsyrer, medikamenter, hormoner, patogener, toksiner eller ethvert annet kjemikalium eller molekyler av interesse. Uansett om en mikrobærerbundet ligand binder seg til eller reagerer med målanalytten eller ikke, kan dette bli bestemt ved konvensjonelle teknikker benyttet innen faget for den aktuelle bestemmelse. For eksempel kan reaksjonen bli indikert med en luminometrisk respons. Reaksjonen kan bli indikert med en kolorimetrisk, kjemiluminometrisk eller fluorometrisk respons. Liganden som er bundet til mikrobæreren av interesse, kan bli utformet slik at ved nærvær av analytten av interesse til hvilken den er målrettet, blir en optisk signatur hos mikrobæreren endret. For eksempel kan en slik endring i optisk signatur være et resultat av en fotokjemisk reaksjon som inntreffer når bindingen eller reaksjonen finner sted mellom liganden og analytten. Mikrobærerene kan så bli observert under mikroskop for å påvise en fluorescens assosiert med den fotokjemiske reaksjon.

Et stort spektrum av kjemiske og biologiske funksjonaliteter kan bli festet som ligander til mikrobærerne ifølge oppfinnelsen. Disse funksjonaliteter innbefatter alle funksjonaliteter som rutinemessig blir brukt ved høyeffekts screeningteknologi og diagnose. Ligandene kan bli festet til mikrobærerne ved metoder som konvensjonelt benyttes for å feste ligander til mikrobærere generelt innbefattende ved hjelp av en kovalent binding og via direkte festing eller festing via en linker. Videre kan mikrobærerne bli funksjonalisert på en mengde måter for å tillate festing av en initial reaktant.

Mikrobærerne ifølge oppfinnelsen kan bli brukt ved fremgangsmåter til å påvise tilstedeværelsen eller fraværet av en eller flere målanalytter i en prøve, og som omfatter det å velge en eller flere ligander som binder til eller reagerer med en eller flere analytter, det å binde ligander til et antall mikrobærere ifølge oppfinnelsen, det å korrelere identiteten av ligandene med kodene på mikrobærerne til hvilke ligandene er bundet, det å sette en eller flere analytter i kontakt med de ligandbundne mikrobærere, det å observere enhver mikrobærer på hvilke ligandene analytten har bundet seg eller reagert med den mikrobærerbundne ligand og avlese kodene på mikrobærerne for å identifisere enhver ligand med hvilken denne ene eller flere analytter har reagert for derved å bestemme tilstedeværelsen eller fraværet av den ene eller flere analytter.

En foretrukket utførelsesform av den ovennevnte metode er hvor målanalytten er en nukleinsyre, spesielt DNA eller RNA, og hvor minst en mikrobærerbundet ligand er det reverse komplement av nukleinsyren. Mikrobærerne ifølge oppfinnelsen er således anvendelige ved DNA-hybridisering. Mikrobærerne er også anvendelige for enzymbaserte assays og immunoassays. Mikrobærerne kan også bli brukt i assays som utføres for å lete etter spesielle forbindelser i prøver, og også for å påvise og isolere forbindelser fra disse prøver. Mikrobærerne kan også bli brukt som støttematerialer for å danne eller for å omsette deler i et kombinatorisk kjemisk bibliotek.

Mikrobærerne ifølge oppfinnelsen kan også bli brukt i fremgangsmåter og i anordninger som benyttes for effektiv og rask undersøkelse av et stort antall komponenter hvor variasjonen kan foreligge i hver eller begge av en ligand bundet til en mikrobærer eller en oppløselig analyttkomponent hvor det foreligger interesse for å bestemme opptreden av en interaksjon mellom de to komponenter. Anordningene innbefatter en mikrorekke så som for eksempel et fast støttemateriale på hvilket de bundne ligander har blitt plassert i et på forhånd bestemt register samt en leser for å påvise interaksjonen mellom komponentene. Fremgangsmåten kan involvere å

preparere mikrorekken så som for eksempel det faste støttemateriale for festing av liganden, og derpå kombinere liganden og analytten for å sette i gang enhver interaksjon mellom komponentene, og deretter bestemme tilstedeværelsen av en interaksjon mellom komponentene og spesielle områder.

- 5 Mikrorekken vil normalt involvere et antall forskjellige komponenter. I teorien behøver det bare være en komponent, men det kan være så mange som 10^5 . Selv om antallet komponenter vanligvis ikke vil overstige 10^5 , kan antallet individuelt kodede mikrobærere være vesentlig høyere.

10 Den bundne ligand kan for eksempel være en organisk enhet så som et enkelt molekyl eller sammensetninger av molekyler, ligander og reseptorer, nukleinsyre-bundne komponenter, RNA, enkeltkjede- og dobbeltkjedebindende proteiner, som ikke krever at det finnes en bindende ligand festet til nukleinsyren, oligonukleotidet, proteinene.

15 De kodede mikrobærere i mikrorekken kan være arrangert i spor. Overskrifter er anbrakt for å angi seter slik at spesielle interaksjoner raskt kan bli påvist. Spesielt skiver som har sirkulære spor med overskrifter som definerer seter på sporene slik at positive signaler kan bli tolket i relasjon til informasjonen gitt av overskriften. De sirkulære spor er foretrukket konsentriske og har et tverrsnitt i området 5 til 5000 μm . Forskjellige modifikasjoner er mulige så som på forhånd preparerte seg-

20 menter som så kan bli festet til skiven for undersøkelse.

Foreliggende oppfinnelse er ytterligere illustrert ved de følgende eksempler som videre beskriver for den vanlige fagpersonen hvordan oppfinnelsen skal utføres. De følgende eksempler er illustratoriske for oppfinnelsen og beskriver forskjellige gunstige egenskaper hos visse utførelsesformer av oppfinnelsen.

25 Eksempel 1

Dextran-metakrylat ("dex-ma"), benyttet for å fremstille dex-ma mikrosfærer, ble syntetisert og karakterisert som beskrevet i detalj i W.N.E. van Dijk-Wolthius et al., "Reaction of Dextran with Glycidyl Methacrylate: An Unexpected Transesterification", *Macromolecules*, vol. 30, s. 3411 til 3413 (1997) hvis beskrivelse er inkorporert heri per referanse. Dex-ma mikrosfærer ble fremstilt ved radikal-

30 polymerisering ved å bruke N,N,N',N'-tetrametylen-etylendiamin og kaliumpersulfat fra en dex-ma/polyetylenglykol(PEG)-emulsjon. Se Stenekes et al., "The Prepara-

tion of Dextran Microspheres in an All-Aqueous System: Effect of the Formulation Parameters on Particle Characteristics", *Pharmaceutical Research*, vol. 15, s. 557-561 (1998), hvis beskrivelse er inkorporert heri per referanse. Konsentrasjonen av dex-ma-oppløsning (i fosfatbuffer ved pH 7) var 10% (w/w). Substitusjonsgraden av dex-ma, som er antallet metakrylatmolekyler per 100 glykopyranosyl-enheter, var 4. Konsentrasjonen av PEG-oppløsning i fosfatbuffer ved pH 7 var 24% w/w, mens den gjennomsnittlige molekylvekt av PEG var 10.000 g/mol (Merck). En por-sjon mikrosfærer (FD148-dex-ma mikrosfærer) ble fremstilt ved nærvær av fluore-scinisotiocyanat-merket dextran (med en molekylvekt på 148.000 g/mol). En and-
 10 re porsjon av mikrosfærer ble preparert med fluorescenisotiocyanat ("FITC") ved neddykking av dex-ma-mikrosfærene, etter de var ferdig fremstilt, i en FITC-oppløsning (0,01 mg/ml i fosfatbuffer ved pH 7,2). Både FD148 og FITC var inn-skaftet fra Sigma. SCAMP-forsøk ble utført på begge porsjoner av mikrosfærer som forklart i Eksempel 2.

15 Eksempel 2

SCAMP ble installert på et Bio-Rad MRC1024 konfokalt sveipende lasermikroskop ("CLSM") ved å følge arbeidet til Wedekind et al., "Scanning micorphotolysis: a new photobleaching technique based on fast intensity modulation of a scanned laser beam and confocal imaging", *Journal of Microscopy*, vol. 176, s. 23-32 (1994) og
 20 Wedekind et al., "Line-Scanning Micorphotolysis for Diffraction-Limited Measure-ments of Lateral Diffusion", *Biophysical Journal*, vol. 71, s. 1621-1632 (1996). Et 40x oljeimmersjonsobjektiv og en kraftig 2 W (som representerer den maksimalt mulige utgående effekt) argon laser (Spectra Physics 2017), benyttet for å oppnå tilstrekkelig fotobleking i løpet av de ekstremt korte fotoblekingstider, ble brukt i
 25 SCAMP-forsøkene på dex-ma mikrosfærene fremstilt i henhold til Eksempel 1. Bøl-gelengden til laserstrålen, også under blekingen, var 488 nm.

I dette eksempel ble SCAMP-forsøkene utført ved omtrent 10 μm under overflaten av dex-ma mikrosfærene. Dette foregikk eksperimentelt som følger. Først ble fluorescensen langs en x-linje av et midtre plan av en dex-ma mikrosfære målt ved
 30 å scanne denne linje i 400 millisekunder (Figur 1: A-stiplet linje). Derest ble et 3 μm segment på denne x-linjen valgt ut til å bli bleket (Figur 1: B-I). Lengden, po-sisjonen så vel som antallet segmenter kan velges fritt av SCAMP-dataprogrammet. Fotoblekingen av dette segment oppsto når laserstrålen sveipte over dette segment fulgt av en temporær sterk økning av intensiteten av laserstrålen. Forholdet mel-
 35 lom overvåkende og fotoblekende intensitetsnivåer av laserstrålen var 1:500. For å

måle fluorescensgjenvinningen i den blekede stripe sveipte en sterkt svekket laserstråle langs den utvalgte x-linje i omtrent 4 sekunder.

Figur 3a og 3b viser de konfokale bilder av et midtre plan i en FD148-dex-ma mikrosfære henholdsvis før og 2 minutter etter bleking av 3 μm -segmentet. Diameteren av mikrosfæren er omtrent 25 μm . Sistnevnte bilde viser at den blekede flekken forblir sort, noe som indikerer at etter 2 minutter opptrådte ingen fluorescensgjenvinning i det blekede område av mikrosfæren. Figur 4 (kurve A) viser at fluorescensen i det blekede segment i dette forsøket ikke ble gjenvunnet, noe som tillot konklusjonen at innenfor tidsskalaen av dette forsøk var de "store" FD148-kjeder fullstendig immobilisert i området av dex-ma mikrosfæren som ble undersøkt.

Mens FD148-kjeder kunne bli sterisk innfanget i dex-ma-polymernetttverket slik de var tilstede under dannelsen av mikrosfærene, kunne dette ikke foregå for små FITC-molekyler når de ble tilført i dex-ma-mikrosfærer ved neddykking av de fullstendig polymeriserte dex-ma-sfærer i en FITC-oppløsning. I dette tilfelle var en fullstendig fluorescensgjenvinning forventet og eksperimentelt bekreftet. Figur 4 (kurve B) viser at FITC-molekyler tilført omkring 10 μm under overflaten av mikrosfæren, forblir mobil.

Ved siden av den tekniske mulighet for å fotobleke små segmenter i en prøve, er det å bruke scannende mikroskoper lett for spesielt å velge ut mikroområdene i prøven hvor bleking må opptre ettersom laserstrålen kan bli posisjonert lokalt. Videre, ettersom lengden, posisjonen så vel som antallet segmenter kan velges fritt i SCAMP-forsøk, kan enhver form for geometri i prøven bli fotobleket. Figur 5 viser det konfokale bilde i et midtre plan av en FD148-dex-ma mikrosfære 2 minutter etter bleking av et kors, en sirkel og et rektangel i mikrosfærene.

Eksempel 3

SCAMP-forsøk ble også utført på 45 μm FITC blekede latex-kuler innkjøpt fra PolylaB i Antwerpen, Belgia. SCAMP ble installert på en Bio-Rad MRC1024 CSLM ved å følge arbeidet til Wedekind et al. (1994) og Wedekind et al. (1996). Et 100 x objektiv og en kraftig argon-laser (Spectra Physics 2017), benyttet for å oppnå tilstrekkelig fotobleking under de ekstremt korte fotoblekingstider, ble brukt i SCAMP-forsøkene på de 45 μm FITC-merkede latexkuler. Intensiteten av Spectra Physics laseren ble stilt inn ved 300 mW, noe som resulterte i en overvåkende og fotoblekende laserintensitet på henholdsvis 75 μW og 20 mW (målt ved enden av den op-

tiske fiber som sender laserstrålen inn i det konfokale sveipende lasermikroskop). Følgelig var forholdet mellom overvåkende og fotoblekende laserintensitet lik 1:266. Bølgelengden av laserstrålen, også under bleking, var 488 nm.

SCAMP-målinger ble utført i midtplanet av de 45 μm FITC-merkede latexkuler. Dette ble utført som følger. Først ble bildet zoomet inn inntil latexkulen dekket bildet fullstendig. Derneft ble markøren av interesse definert, og det ble, med SCAMP-dataprogram, indikert hvor markøren måtte bli bleket på latex-kulen. Merkingen inntraff på den tid som laserstrålen sveipte over midtplanet på de 45 μm FITC-merkede latexkuler. En temporær sterk økning i intensiteten av laserstrålen (fra 75 μW til 20 mW) inntraff når laserstrålen sveipte over segmentene som måtte bli bleket for å danne markøren av interesse. Ettersom skannet tilsvarte 6 ms per "x-linje" (Figur 1A) og ettersom et bilde av det konfokale plan (d.v.s. midtplanet av latexkulen) består av 512 "x-linjer", tok det 3.072 sekunder å merke en latexkule.

Figurene 6 til 9 viser de konfokale bilder av et midtplan i 45 μm FITC-merkede latexkuler en time etter bleking av en strekkode (Figur 6a), en strekkode pluss tall (Figur 6b), tallet R1247 (Figur 7), logoen til Ghent University (Figur 8) og logoen til Tibotec Company (Figur 9). Bildene viser at de blekede segmenter forblir sorte, noe som indikerer at ingen signifikant fluorescensgjenvinning fant sted i de blekede segmenter av latexkulene.

Verdiene av zoom-valget hos det Bio-Rad MRC1024 konfokale sveipende lasermikroskop var som følger: 1,61 i Figur 6a, 1,00 i Figur 6b, 3,07 i Figur 7, 1,00 i Figur 8 og 1,00 i Figur 9. Den høye spatielle oppløsning av SCAMP til å bleke merker blir observert i Figur 6a og 6b. Merket i Figur 6a består av 3 forskjellige linjetyper: en med en stor bredde (2,5 μm), en med medium bredde (1,25 μm) og en med en smal bredde (0,62 μm). Alle linjer er plassert ved 1,25 μm fra hverandre.

Eksempel 4

De følgende forsøk viser metoder for å bleke koder i fluorescente mikrobærere, hvor kodene inneholder forskjellige intensitetsnivåer grunnet forskjellige grader av bleking. Mikrobærerne benyttet i de følgende forsøk var 45 μm FITC-merkede latexkuler innkjøpt fra PolylaB i Antwerpen, Belgia.

For et sett av blekeforsøk ble en 60x forstørrelse og en 300 mW laserenergi benyttet for å danne mønsteret vist i Figur 10a. Firkantene i øverste rekke av figuren har en

bredde på 32 pixel ($=2,46 \mu\text{m}$) i dataprogrammet og er adskilt fra hverandre med ytterligere 32 pixel. Bleking forstørret dem i realiteten. Firkantene i nederste rad av figuren er halvparten av denne størrelse.

Som vist i Figur 10a, er blekingen av flere intensiteter mulig. Ved for eksempel å
 5 anta et platånivå på 200 analoge til digitale enheter ("ADU"), er bleking mulig fra minst nivåer på omtrent 50 til 200 ADU. Følgelig kan nivåer bli bleket over et intervall på omkring 25% av den opprinnelige fluorescensintensitet. Fotografiet i Figur 10a viser at for eksempel nivåer av bleking i det minste er mulig. Disse seks nivåer av bleking er synlige fra de seks firkanter som er bleket i øverste rekke i
 10 Figur 10a. Fluorescensintensitetene av disse firkanter er vist i kurven i Figur 10c. De seks firkanter med forskjellig fluorescensintensitet ble oppnådd ved gjentatt bleking (1 til 6 ganger). Ved å bruke seks kodende seter som har seks forskjellige nivåer av fluorescensintensitet muliggjør 6^6 , eller 46656 forskjellige koder.

Serien av de ti mindre blekede firkanter vist i Figur 10a, viser klart at bleking ved
 15 gjentatt scanning ikke er lineær. Disse firkanter er kun halvparten så brede som de foregående, men forblir klart skjelnbare. Intensitetsnivåene for disse markeringer er vist i kurven i Figur 10d. Til sist er intensiteten av en enkelt blekeflekk mellom de to rader av eks og ti kodende seter vist i Figur 10b.

Et andre forsøk ble utført for å bleke en kode effektivt med 8 kodende seter (data-
 20 programbredde av 1 strek $= 24 \text{ pix} \times 0,069 \mu\text{m}/\text{pix} = 1,66 \mu\text{m}$ adskilt ved ytterligere 24 pixel) og 8 forskjellige intensiteter (noe som tillater $8^8 = 16777216$ forskjellige koder). Den utgående laserenergi ble valgt til å være 200 mW. Fotografiet av mikrobæreren fra dette forsøk er illustrert i Figur 11a, og kurven som indikerer de forskjellige intensitetsnivåer av de individuelle koder, er vist i Figur 11b. De for-
 25 skjellige intensiteter er klart synlige. Denne kode i Figur 11a er tallet 1 5 2 6 3 7 4 8.

Figur 12a og 12b illustrerer et annet eksempel på åtte kodende seter som har åtte
 forskjellige intensiteter. I dette tilfellet ble bleking utført med 250 mW i stedet for 200 mW som i det tidligere tilfelle, og ble utført ved å bruke $0,056 \text{ mm}/\text{pix}$. Koden
 30 i dette eksempel var 1 3 2 6 5 8 7 4. Fotografiet av kodene samt en kurve av de forskjellige intensiteter av kodene, er vist i henholdsvis Figur 12a og 12b.

P a t e n t k r a v

1. Kodet mikrobærer,
k a r a k t e r i s e r t v e d at mikrobæreren er kodet med en preservert kode
skrevet på overflaten av mikrobæreren eller ved en innvendig dybde av mikrobære-
5 ren, og hvori mikrobæreren inneholder en eller flere ligander bundet til mikrobære-
ren.
2. Kodet mikrobærer ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at koden er skrevet ved en innvendig dybde av mik-
robæreren.
- 10 3. Kodet mikrobærer ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at koden er skrevet i sentralplanet av mikrobæreren.
4. Kodet mikrobærer ifølge ethvert av kravene 1 til 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at mikrobæreren er en mikrosfære.
5. Kodet mikrobærer ifølge krav 4,
15 k a r a k t e r i s e r t v e d at mikrobæreren har en diameter på 1 til 200 μm .
6. Kodet mikrobærer ifølge ethvert av kravene 1 til 5,
k a r a k t e r i s e r t v e d at koden har blitt skrevet ved å eksponere mikrobæ-
reren for en elektromagnetisk kilde.
7. Kodet mikrobærer ifølge krav 6,
20 k a r a k t e r i s e r t v e d at koden har blitt skrevet ved å eksponere mikrobæ-
reren til en kilde som sender ut røntgenstråler, α -stråler, β -stråler eller ionestråler.
8. Kodet mikrobærer ifølge krav 6,
k a r a k t e r i s e r t v e d at koden har blitt skrevet ved å eksponere mikrobæ-
reren til en høyspatielt oppløsende lyskilde.
- 25 9. Kodet mikrobærer ifølge ethvert av kravene 1 til 8,
k a r a k t e r i s e r t v e d at koden har blitt skrevet ved fotobleking, fotokrome-
ring eller kjemisk etsing.

10. Fremgangsmåte ved koding av en mikrobærer, k a r a k t e r i s e r t v e d at metoden omfatter å skrive en preservert kode på overflaten av mikrobæreren eller ved en innvendig dybde av mikrobæreren.
11. Fremgangsmåte ifølge krav 10,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at koden er skrevet ved en innvendig dybde av mikrobæreren.
12. Fremgangsmåte ifølge krav 11,
k a r a k t e r i s e r t v e d at koden er skrevet i sentralplanet av mikrobæreren.
13. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 10 til 12,
10 k a r a k t e r i s e r t v e d at mikrobæreren er en mikrosfære.
14. Fremgangsmåte ifølge krav 13,
k a r a k t e r i s e r t v e d at mikrobæreren har en diameter på 1 til 200 μm .
15. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 10 til 14,
k a r a k t e r i s e r t v e d at metoden omfatter å eksponere mikrobæreren for en elektromagnetisk kilde for å skrive koden på mikrobæreren.
16. Fremgangsmåte ifølge krav 15, k a r a k t e r i s e r t v e d at metoden omfatter å eksponere mikrobæreren til en kilde som sender ut røntgenstråler, α -stråler, β -stråler eller ionestråler for å skrive koden på mikrobæreren.
17. Fremgangsmåte ifølge krav 15,
20 k a r a k t e r i s e r t v e d at metoden omfatter å eksponere mikrobæreren til en høyspatielt oppløsende lyskilde for å skrive koden på mikrobæreren.
18. Fremgangsmåte ifølge krav 17,
k a r a k t e r i s e r t v e d at lyskilden er en laser eller en lampe.
19. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 10 til 18,
25 k a r a k t e r i s e r t v e d at koden skrives ved fotobleking, fotokromering eller kjemisk etsing.

20. Fremgangsmåte ifølge krav 19,
karakterisert ved at koden blir skrevet på mikrobæreren ved bleking av mikrobæreren.

21. Fremgangsmåte ifølge krav 20,
5 karakterisert ved at mikrobæreren omfatter fluorescente molekyler og som også er særpreget ved at koden blir skrevet ved å bleke de fluorescente molekyler.

22. Fremgangsmåte ifølge krav 21,
karakterisert ved at koden blir skrevet ved å bleke de fluorescente molekyler for å danne to eller flere forskjellige nivåer av resulterende fluorescensintensitet i den blekede del av koden.
10

23. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 10 til 22,
karakterisert ved at mikrobæreren omfatter et materiale valgt fra gruppen omfattende et fast stoff, et semifast stoff og en kombinasjon av et fast og et semifast stoff.
15

24. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 10, 11, 12 og 15 til 23,
karakterisert ved at mikrobæreren er en prokaryot eller en eukaryot celle.

25. Fremgangsmåte ved avlesing av en kodet mikrobærer som krevet i ethvert av kravene 1 til 9,
20 karakterisert ved at den omfatter å observere koden med et konfokalt mikroskop.

26. Fremgangsmåte ved påvisning av tilstedeværelsen eller fraværet av en eller flere målanalytter i en prøve,
25 karakterisert ved at fremgangsmåten omfatter å velge ut en eller flere kodede mikrobærere som angitt i ethvert av kravene 1 til 9 og som har en ligand bundet til seg, korrelere identiteten av ligandene med koder på mikrobærerne til hvilke ligandene er bundet, sette en eller flere analytter i kontakt med de ligandbundne mikrobærere, observere enhver mikrobærer på hvilken analytten har bundet til eller reagert med den mikrobærerbundne ligand og avlese kodene på mikrobærerne for å identifisere enhver ligand med hvilken den ene eller flere analytter
30

har reagert for derved å bestemme tilstedeværelsen eller fraværet av en eller flere analytter.

27. Fremgangsmåte ifølge krav 26,

5 k a r a k t e r i s e r t v e d at målanalytten er en nukleinsyre, og som også er særpreget ved at minst en mikrobærerbundet ligand er det reverse komplement av nukleinsyren.

28. Fremgangsmåte ifølge krav 27,

k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten involverer DNA-hybridisering.

29. Anvendelse av en kodet mikrobærer som angitt i ethvert av kravene 1 til 9 ved

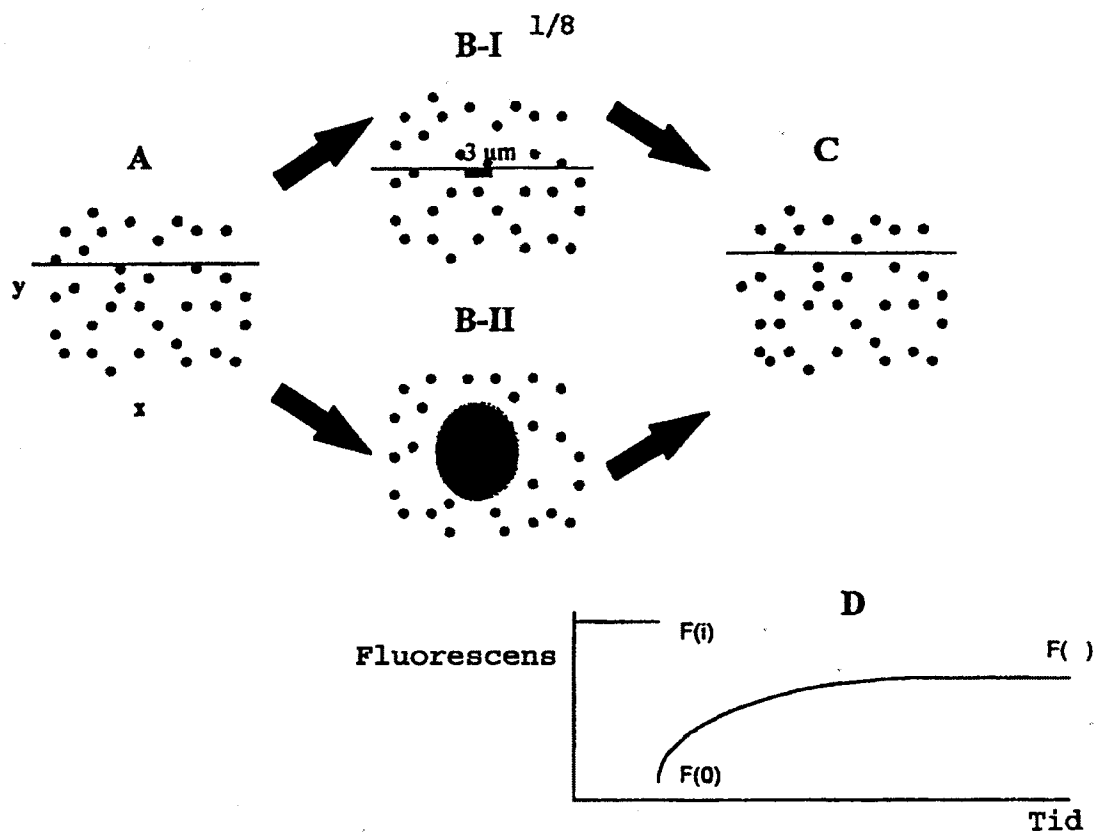
10 påvisning av tilstedeværelse eller fravær av en eller flere målanalytter i en prøve, og som omfatter å sette en mikrobærerbundet ligand i kontakt med minst en analytt, påvise hvorvidt analytten har reagert med eller bundet til liganden, og avlese koden av enhver mikrobærer på hvilken enhver reaksjon eller binding har foregått.

30. Kjemisk bibliotek.

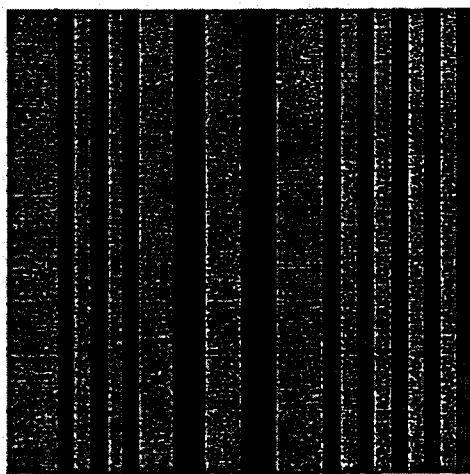
15 k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter de individuelle deler av biblioteket bundet til et antall av kodede mikrobærere som angitt i ethvert av kravene 1 til 9.

31. Kjemisk bibliotek ifølge krav 31,

k a r a k t e r i s e r t v e d at biblioteket er et kombinatorisk kjemisk bibliotek.

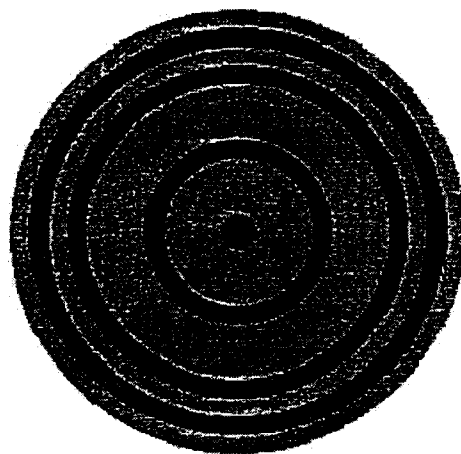


Figur 1



TIBOTEC

Figur 2a

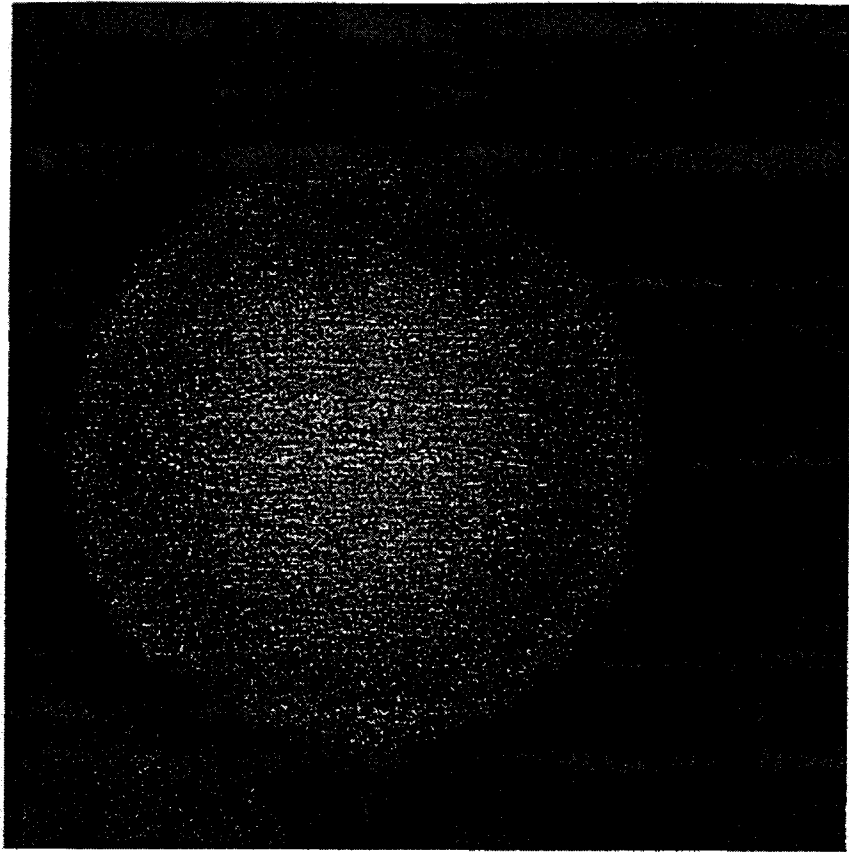


RUG

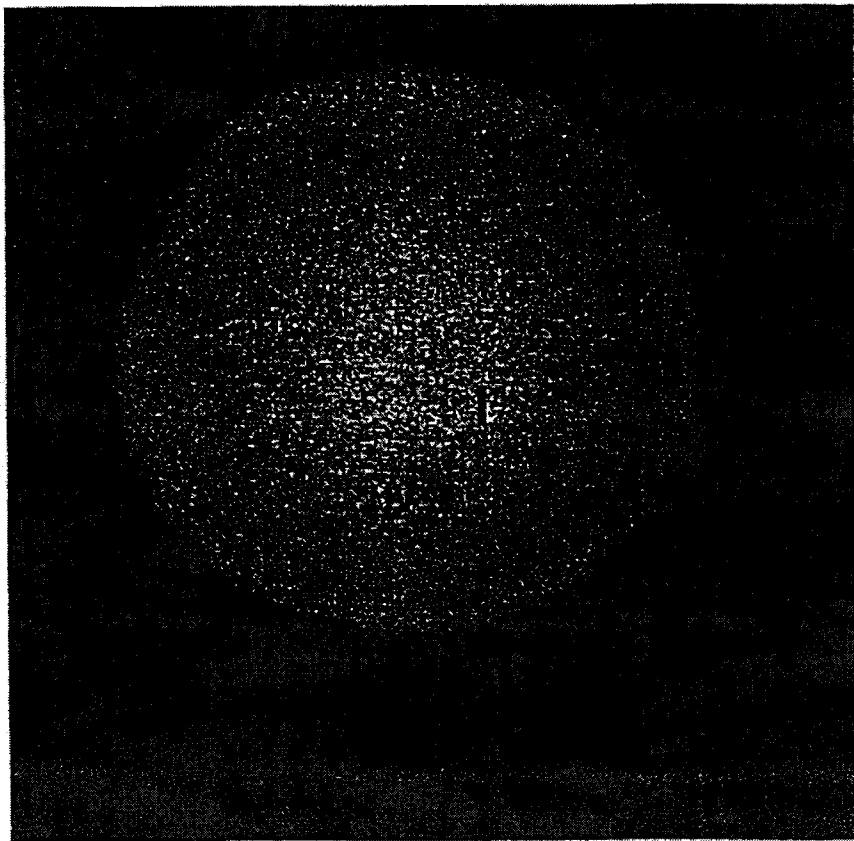
Figur 2b

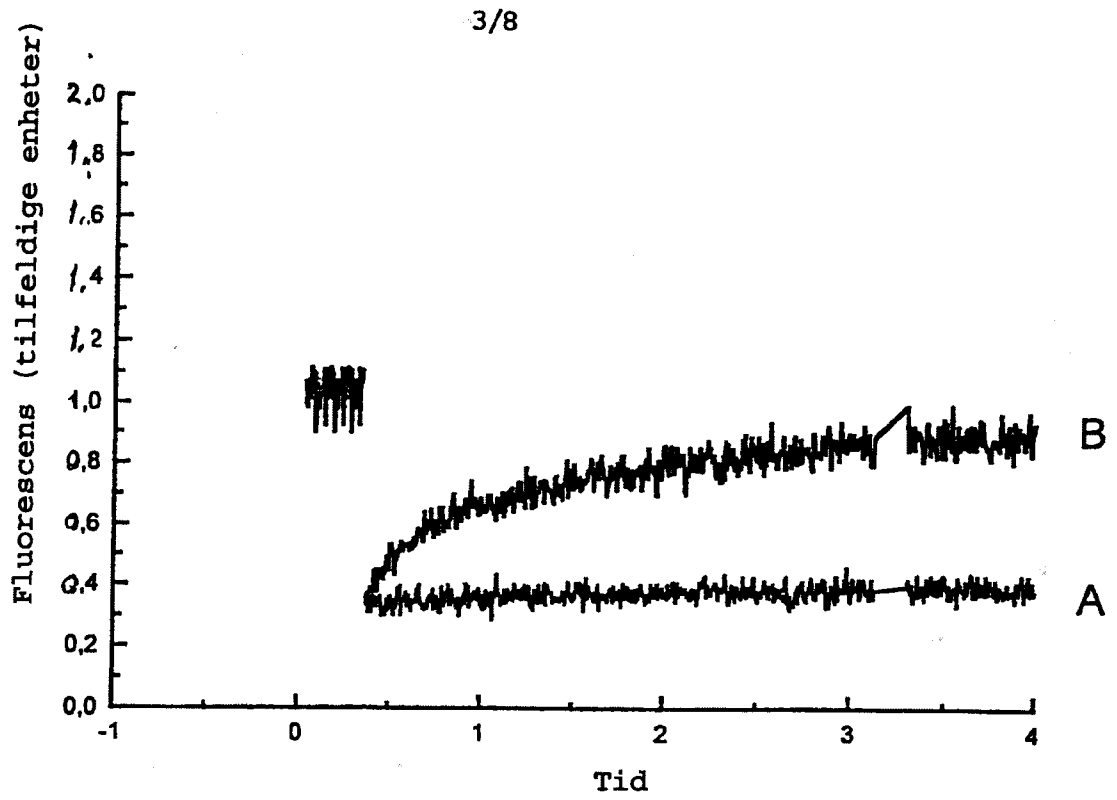
2/8

Figur 3a



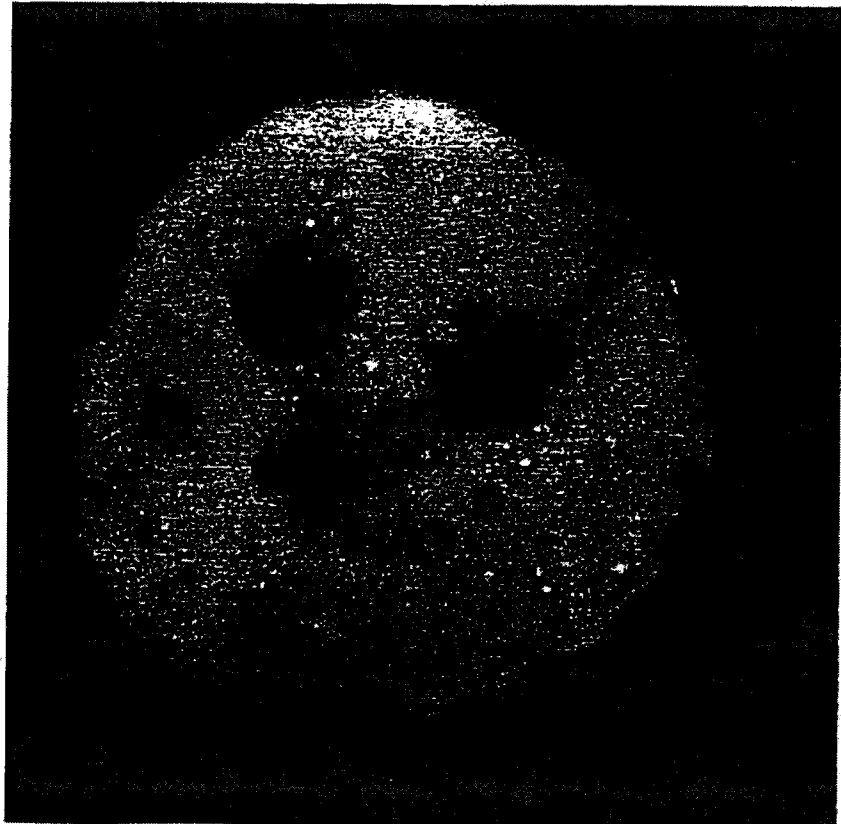
Figur 3b



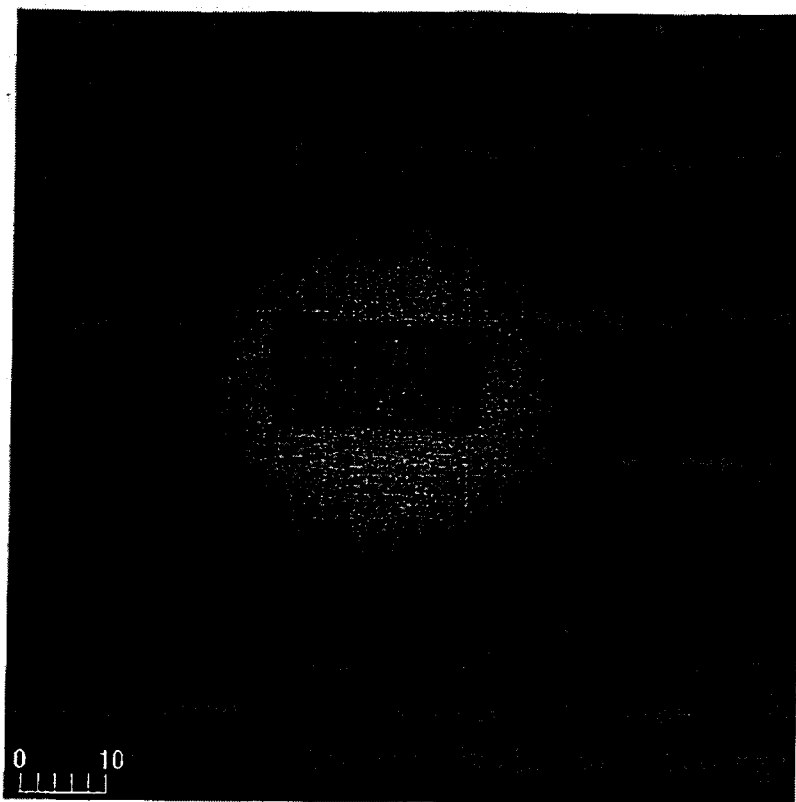
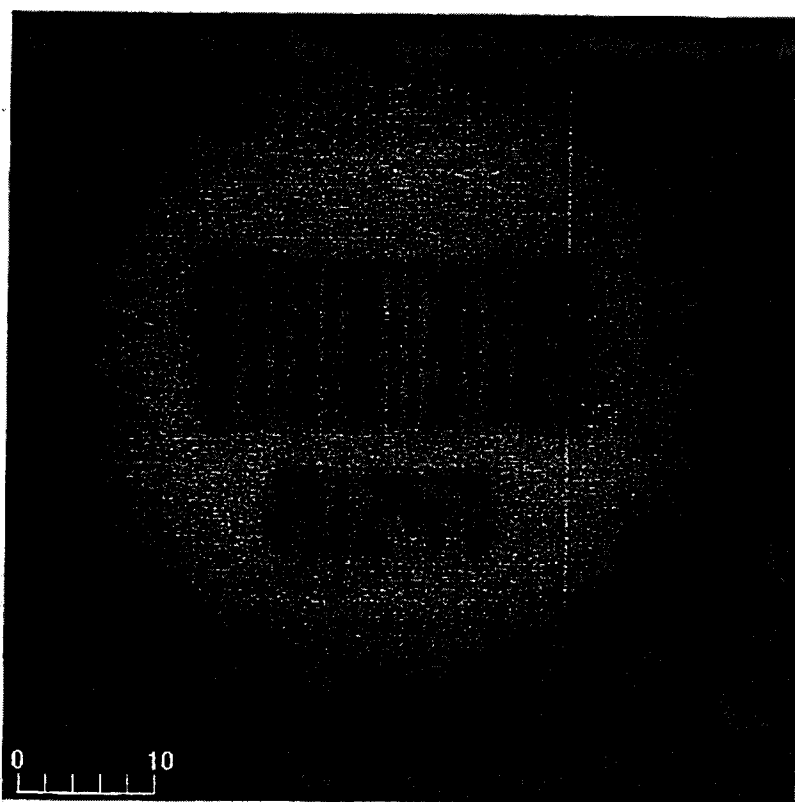


Figur 4

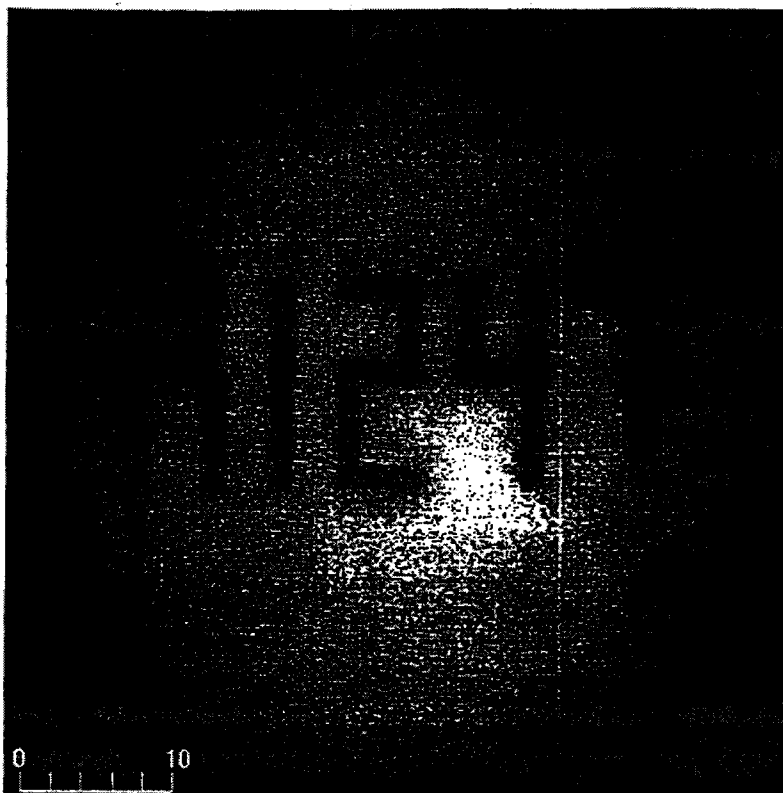
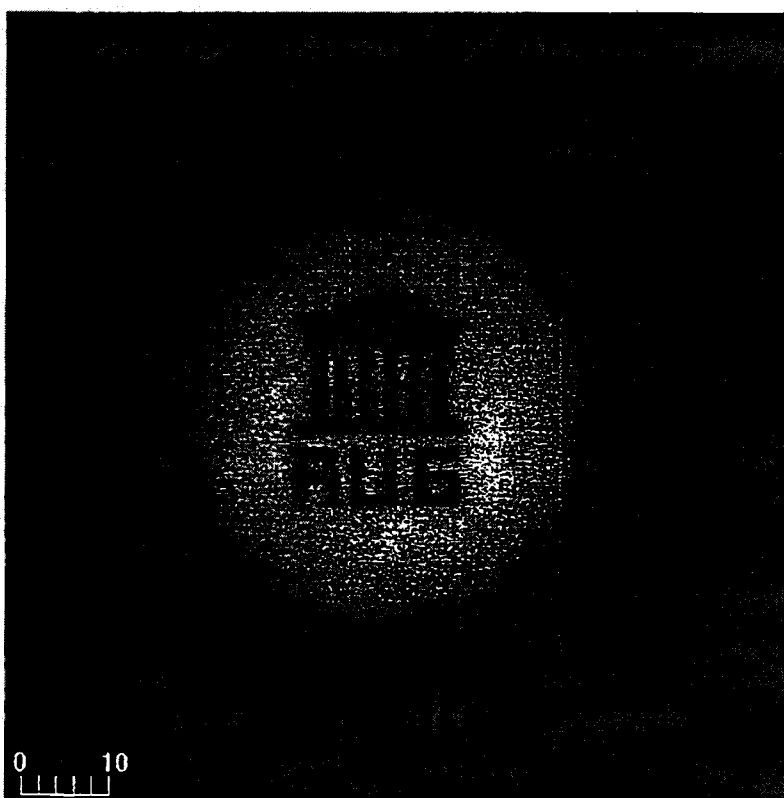
Figur 5

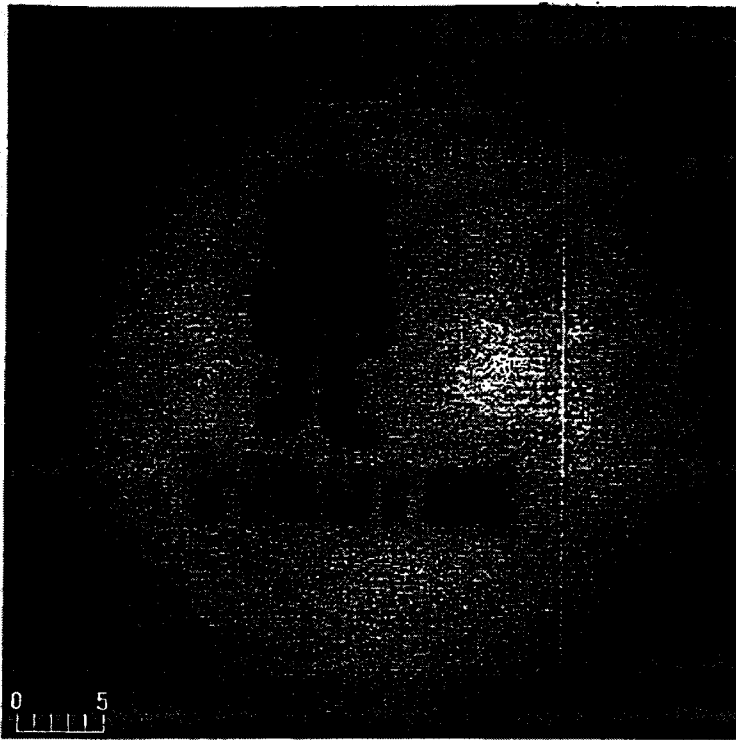


4/8

**Figur 6a****Figur 6b**

5/8

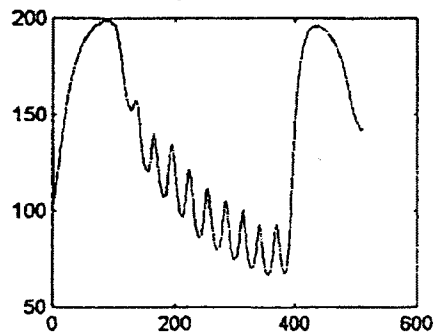
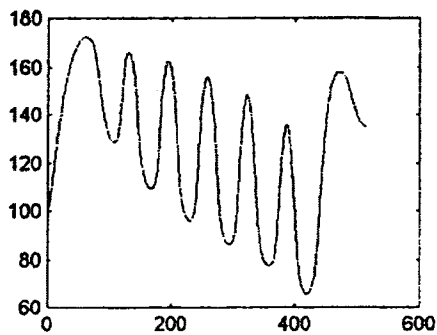
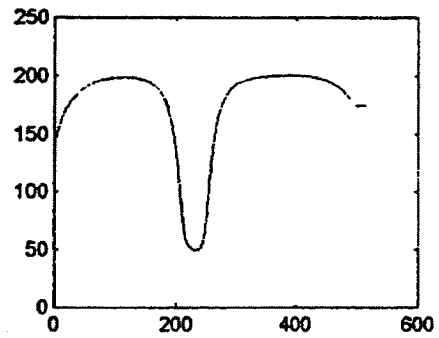
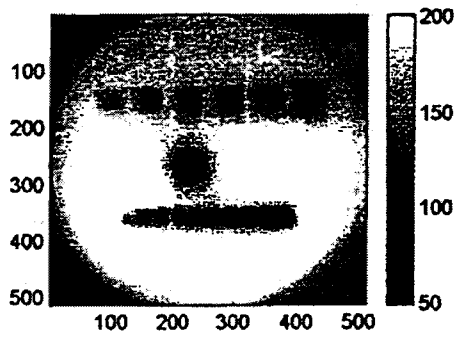
**Figur 7****Figur 8**



Figur 9

Figur 10 a

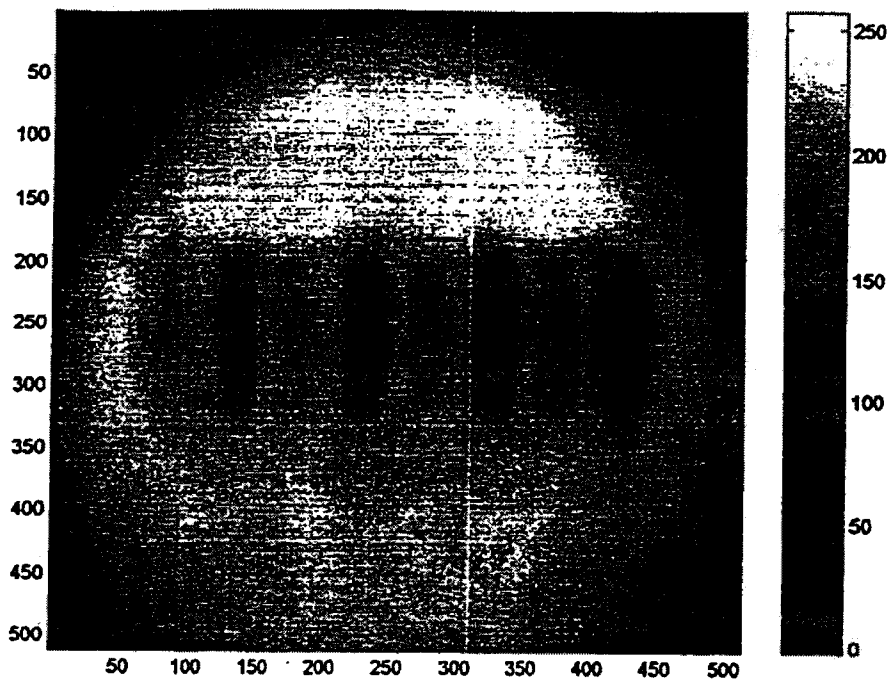
Figur 10 b



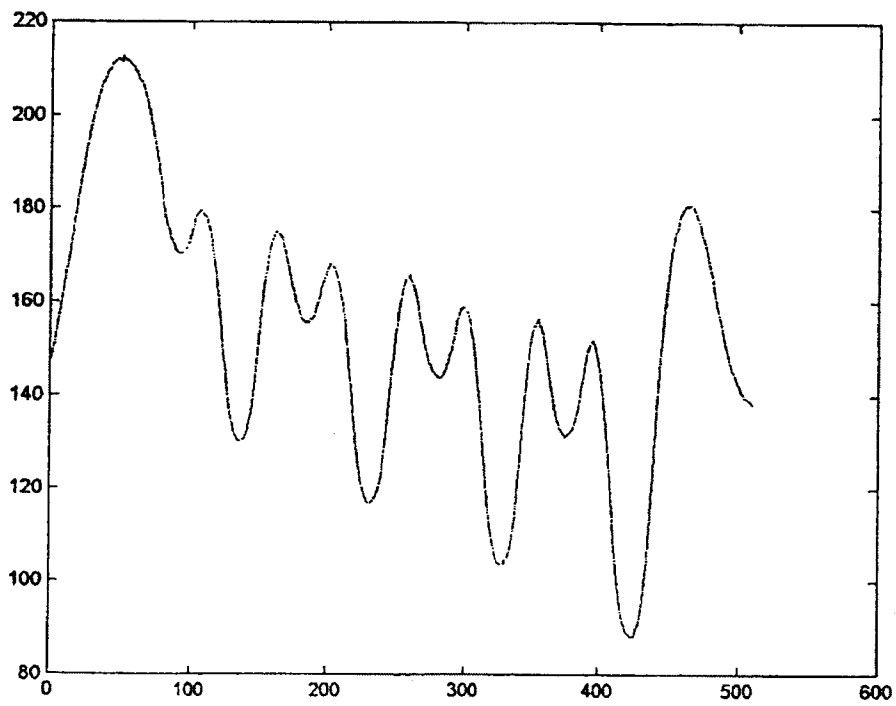
Figur 10 c

Figur 10 d

7/8

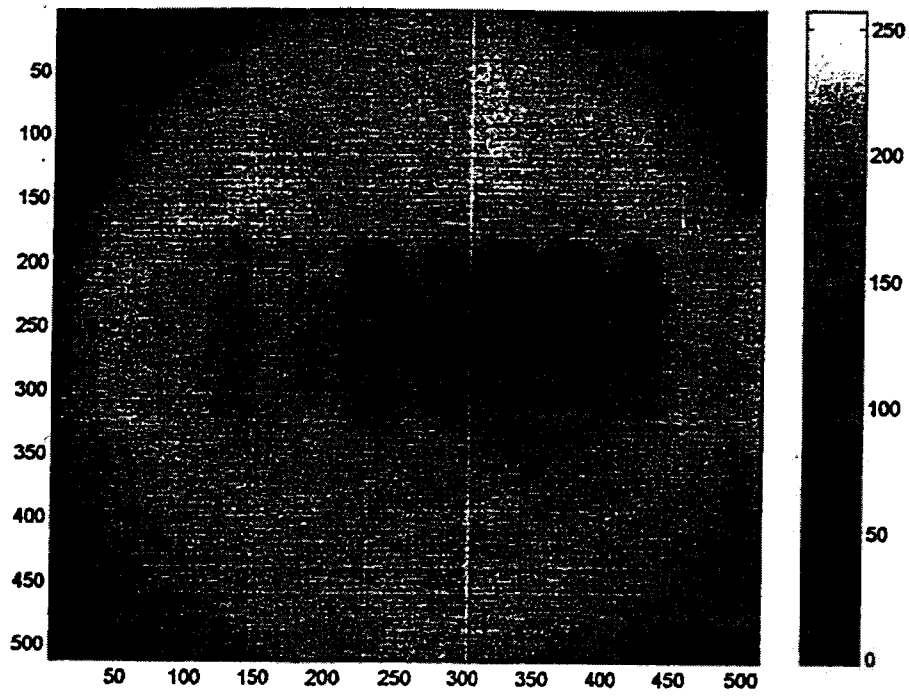


Figur 11a

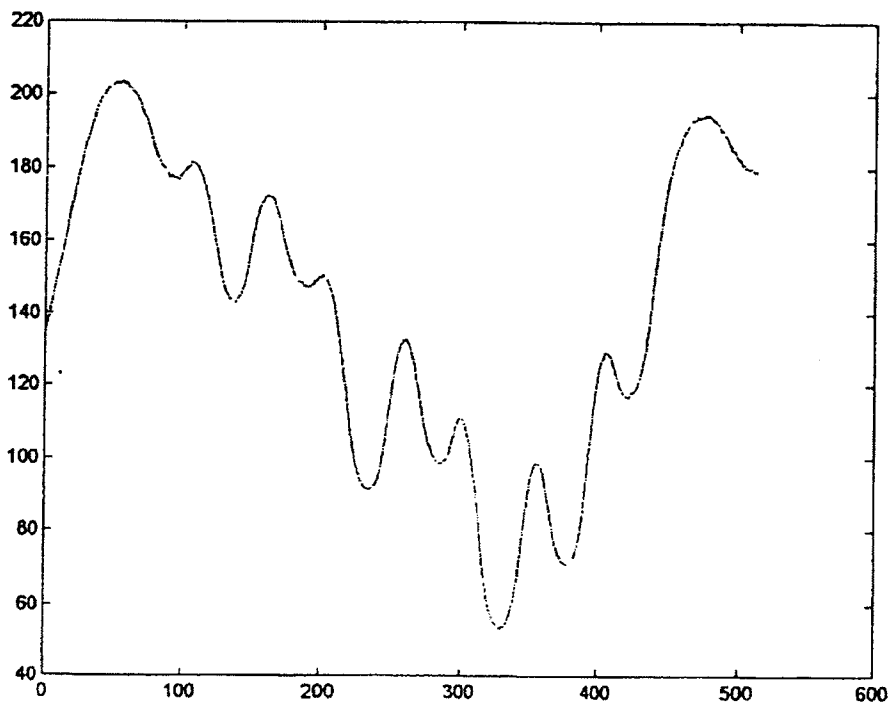


Figur 11 b

8/8



Figur 12 a



Figur 12 b