

**(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С
ДОГОВОРОМ О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (PCT)**

**(19) ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**
Международное бюро



(43) Дата международной публикации:
24 апреля 2003 (24.04.2003)

(10) Номер международной публикации:
WO 03/033539 A1

(51) Международная патентная классификация⁷:
C07K 17/08, C07H 21/00, C08F 220/56, C12Q 1/68,
C08F 220/00

РУБИНА Алла Юрьевна [RU/RU]; 125493 Москва, ул. Авангардная, д. 13, кв. 76 (RU) [**RUBINA, Alla Jurievsna, Moscow (RU)**]. **ПАНЬКОВ Сергей Васильевич** [RU/RU]; 443011 Самара, ул. Волжская, д. 42а, комн. 510 (RU) [**PANKOV, Sergei Vasilievich, Samara (RU)**].

(21) Номер международной заявки: PCT/RU01/00420

(74) Агент: **АГУРЕЕВ Александр Павлович**; ООО «СОЮЗПАТЕНТ»; 103735 Москва, ул. Ильинка, д. 5/2 (RU) [**AGUREEV, Alexander Pavlovich; OOO «SOJUZPATENT», Moscow (RU)**].

(22) Дата международной подачи:
16 октября 2001 (16.10.2001)

(81) Указанные государства (национально): RU, US.

(25) Язык подачи: русский

(84) Указанные государства (регионально): европейский патент (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(26) Язык публикации: русский

Опубликована

C отчётом о международном поиске.

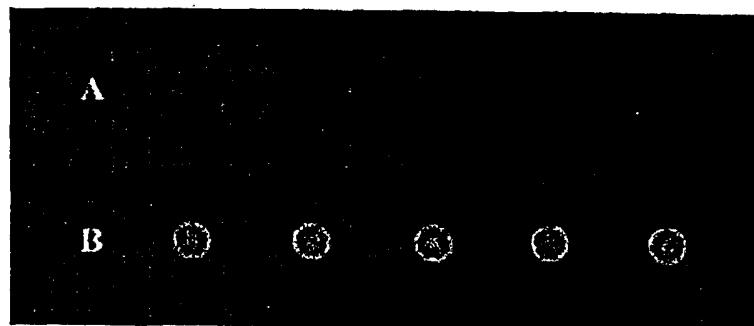
(72) Изобретатели; и

(75) Изобретатели/Заявители (только для (US)): **МИРЗАБЕКОК Андрей Дарьевич** [RU/RU]; 117420 Москва, ул. Профсоюзная, д. 43, корп. 1, кв. 1 (RU) [**MIRZABEKOK, Andrei Darievich, Moscow (RU)**].

В отношении двухбуквенных кодов, кодов языков и других сокращений см. «Пояснения к кодам и сокращениям», публикуемые в начале каждого очередного выпуска Бюллетеня PCT.

(54) Title: COMPOSITION FOR POLYMERISING IMMOBILISATION OF BIOLOGICAL MOLECULES AND METHOD FOR PRODUCING SAID COMPOSITION

(54) Название изобретения: КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ПОЛИМЕРИЗАЦИОННОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛ И СПОСОБ ЕЁ ПОЛУЧЕНИЯ



WO 03/033539 A1

(57) Abstract: The invention relates to molecular biology and bioorganic chemistry, more specifically to a composition for mobilising, in polymeric carriers, oligonucleotides, proteins, nucleic acids and other molecules which contain active groups in the groups thereof, including amino and sulphydryl groups. Said invention also relates to the method for immobilising various molecules, including oligonucleotides, proteins, nucleic acids and any other molecules which contain active groups in the groups thereof including amino and sulphydryl groups in a porous polymer produced on the base of the inventive composition by means of an addition or substitution reaction (radical, nucleophilic, electrophilic etc) during the synthesis of said polymer upon photo and chemical initiation of polymerisation. The inventive composition and the method for immobilising molecules in a polymeric carrier with the aid of said compositions can be used for various purposes, including the production of microchips used in molecular biology for DNA sequencing and mapping, detecting mutations and for other medical applications.

[Продолжение на след. странице]

(57) Реферат: Изобретение относится к области молекулярной биологии и биоорганической химии и касается композиции для иммобилизации в полимерных носителях олигонуклеотидов, белков, нуклеиновых кислот или любых других молекул, содержащих в своей структуре активные группы, в том числе амино- или сульфгидрильные группы, а также способа иммобилизации различных молекул, в том числе, олигонуклеотидов, белков, нуклеиновых кислот или любых других молекул, содержащих в своей структуре активные группы, в том числе амино- или сульфгидрильные группы, в составе пористого полимера, получаемого на основе предлагаемой композиции в условиях реакции присоединения или замещения (радикального, нуклеофильного, электрофильного и т.д.) в момент синтеза полимера при фото- и химическом инициировании полимеризации.

Предлагаемая композиция, а также способ иммобилизации молекул в полимерном носителе с использованием этих композиций могут быть использованы в различных приложениях, в том числе, для изготовления микрочипов, находящих применение в молекулярной биологии при секвенировании и картировании ДНК, детектировании мутаций и целого ряда медицинских приложений.

КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ПОЛИМЕРИЗАЦИОННОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛ И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области молекулярной биологии и биоорганической химии и касается композиции для иммобилизации в полимерных носителях олигонуклеотидов, белков, нуклеиновых кислот или любых других молекул, содержащих в своей структуре активные группы, в том числе амино- или сульфогидрильные группы, а также способа иммобилизации различных молекул, в том числе, олигонуклеотидов, белков, нуклеиновых кислот или любых других молекул, содержащих в своей структуре активные группы, в том числе амино- или сульфогидрильные группы, в составе пористого полимера, получаемого на основе предлагаемой композиции в условиях реакции присоединения или замещения (радикального, нуклеофильного, электрофильного и т.д.) в момент синтеза полимера при фото- и химическом инициировании полимеризации.

Предлагаемая композиция, а также способ иммобилизации молекул в полимерном носителе с использованием этих композиций могут быть использованы в различных приложениях, в том числе, для изготовления микрочипов, находящих применение в молекулярной биологии при секвенировании и картировании ДНК, детектировании мутаций и целого ряда медицинских приложений.

Уровень техники

Из литературы известно, что при синтезе полимеров методом радикальной полимеризации независимо от способа ее инициирования (фото-, термическое, радиационное или химическое инициирование) используются циклические соединения или соединения, содержащие две и более кратные связи [1].

[1] А.М. Шур, Высокомолекулярные соединения, М: Высшая школа, 1981, с. 82-143.

Реакция протекает по радикальному цепному механизму через стадии инициирования, роста цепи и обрыва цепи. Такая природа радикальной полимеризации создает благоприятные условия для включения различных молекул, в том числе олигонуклеотидов, белков, нуклеиновых кислот, содержащих в своей структуре амино-, сульфогидрильную или другие активные группы, в структуру полимера. Возможны по меньшей мере два пути включения:

1. Участие молекул, содержащих в своей структуре амино-, сульфогидрильную

или другие активные группы, в реакции передачи цепи с образованием аминильных, сульфонильных или других активных радикалов. Данные радикалы способны включаться в структуру полимера как на стадии роста цепи так и на стадии обрыва цепи при межмолекулярной рекомбинации [2,3,4].

- 5 [2] A. Good and J.C. Thynne, J. Chem.Soc., 1967, p. 684.
[3] C.J. Micheida and D.H. Campbel, J.Amer.Chem.Soc., 1976, 98, p. 6728.
[4] C.J. Micheida and D.H. Campbel, Tetrahedron Letters, 1977, p. 577.

2. Участие молекул, содержащих в своей структуре амино-, сульфгидрильную или другие активные группы, в реакции нуклеофильного присоединения с 10 ненасыщенными соединениями [5], существующими на разных стадиях полимеризации, а именно с исходными мономерами, растущими ненасыщенными макрорадикалами и ненасыщенными макромолекулами.

[5] Общая органическая химия, Т.3., Азотсодержащие соединения, под. ред. Н.К. Кочеткова, М: Химия, 1982, с. 61-62.

15 **Сущность изобретения**

Сущность изобретения заключается в том, что предлагаются:

композиция для иммобилизации молекул, в том числе олигонуклеотидов, белков и нуклеиновых кислот, содержащих в своей структуре активные группы, в том числе амино- и/или сульфгидрильные группы, в полимерных носителях 20 (полимерах) в условиях реакции присоединения или замещения (радикального, нуклеофильного, электрофильного и т.д.) в момент синтеза полимера при фото- и химическом инициировании полимеризации; и

способ иммобилизации молекул, в том числе олигонуклеотидов белков и нуклеиновых кислот, содержащих в своей структуре активные группы, в том числе 25 амино- и/или сульфгидрильные группы, в полимерных носителях (полимерах) в условиях реакции присоединения или замещения (радикального, нуклеофильного, электрофильного и т.д.) в момент синтеза полимера при фото- и химическом инициировании полимеризации.

Предлагаемые композиция и способ иммобилизации различных молекул в 30 полимерном носителе с использованием этих композиций, будут использоваться в различных приложениях, в том числе, для изготовления микрочипов.

Для иммобилизации молекул, содержащих в своей структуре активные группы, в том числе амино- или сульфгидрильные группы, в полимерных носителях

нами предлагается композиция следующего состава:

$$K = A^a + B^b + C^c + D^d + E^e + F^f$$

где:

K- композиция;

5 **A**- акриламид, метакриламид, N-{тристриптаноил(гидроксиметил)метил}-акриламид, 2-гидроксиэтилметакрилат или мономер на основе производных акриловой, метакриловой, коричной, кротоновой, винилбензойной или других непредельных кислот;

10 **B**- N,N'-метиленбисакриламид, N,N'-1,2-дигидрокси-этанобисакриламид, полиэтиленгликольдиакрилат, их смесь или симметричный или несимметричный сивающий агент на основе производных акриловой, метакриловой, коричной, кротоновой, винилбензойной или других непредельных кислот;

15 **C**- олигонуклеотид, нуклеиновая кислота, протеин или другая молекула, несущая активную группу, в том числе, амино или сульфогидрильную группу;

15 **D**- глицерин, сахароза, полиспирты или другое высококипящее соединение;

15 **E**- вода, диметилформамид, диметилсульфоксид и другие полярные и неполярные растворители;

20 **F**- персульфат аммония, персульфат калия, метиленовый синий, флуоресцеин, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, перекись водорода, N,N-диметиламинопиридин, триэтиламин, ацетон или любой инициатор для химического или фотоинициирования полимеризации.

25 **a,b,c,d,e,f** - процентное содержание каждого компонента в композиции (X=m/v×100% , для твердых веществ, или X=v/v×100% для жидких веществ).

3%≤a+b≤40%; 0%≤c≤10%; 0%≤d≤95%; 0%≤e≤95%, 0%≤f≤90%;.

25 Наряду с полимерами иного назначения, указанную выше композицию предлагается использовать для изготовления олигонуклеотидных, белковых, ДНК(РНК) и других биологических микрочипов.

В заявленной композиции, для изготовления биологических микрочипов предлагается использовать следующие компоненты:

30 • Мономеры, составляющие основу формируемого полимерного носителя.

В качестве мономеров, образующих линейный полимер, могут быть

использованы производные акриловой, метакриловой, коричной, винилбензойной, кротоновой или других непредельных кислот, в том числе, их сложные эфиры и амиды. Например, акриламид, метакриламид, N-{тристриптоксигидроксиметил)-метил}-акриламид, 2-гидроксиэтилметакрилат, метилметакрилат и т.д.

5 В качестве сшивающих агентов для образования трехмерных гелевых структур используются соединения, содержащие в своей структуре два и более непредельных фрагмента, хотя бы один из которых активен в реакциях присоединения или замещения (радикальном, нуклеофильном, электрофильном, и т.д.). Например, N,N'-метиленбисакриламид, N,N'-метиленбис-метакриламид, N,N'-
10 1,2-дигидрокси-этилбисакриламид и т.д. или симметричные и несимметричные эфиры, амиды и смешанные производные акриловой, метакриловой, коричной, кротоновой, винилбензойной или других непредельных кислот.

15 Общее содержание мономера, образующего линейный полимер, (A) и сшивающего агента (B) в композиции лежит в интервале 3-40% (3<T<40), а их соотношение находится в пределах 97:3-60:40% (3<C<40).

Различные сочетания и соотношения мономеров позволяют получать полимеры, с заданной величиной пор.

- *Олигонуклеотиды, белки, нуклеиновые кислоты, несущие в своей структуре активные группы, в том числе амино и сульфогидрильные группы.*

20 Для иммобилизации олигонуклеотидов, нуклеиновых кислот, белков или других молекул в полимерном носителе в момент его синтеза при химическом и фотохимическом инициировании необходимо, чтобы иммобилизуемые молекулы содержали активные группы, способные вступать в реакции присоединения или замещения (радикального, нуклеофильного, электрофильного и т.д.) с фрагментами формируемого полимера в момент его синтеза. В частности, в качестве таких активных групп нами предлагаются амино- и сульфогидрильные группы.

Олигонуклеотиды, содержащие в своей структуре амино- или сульфогидрильные группы, получают в условиях стандартной фосфорамидитной химии с использованием доступных в продаже фосфордиамидитов.

30 Фрагменты ДНК с амино- или сульфогидрильной группой получают в условиях симметричной или ассиметричной полимеразной цепной реакции с использованием синтетического праймера, несущего терминальную амино- или сульфогидрильную группы [6] или аминированием фрагментов ДНК по методике,

приведенной в работе [7].

[6] Yasunaga, S., Kimura, A., Hamaguchi, K., Ronningen, K. S., and Sasazuki, T., *Tissue Antigens.*, 1996., 47., 37–48.

[7] Proudnikov D, Timofeev E, Mirzabekov A., *Anal Biochem.* 1998, 15;259(1), P. 5 34-41.

Молекулы белков содержащие свободные амино-, сульфгидрильные и другие активные группы используют для иммобилизации в нативном виде, без дополнительных модификаций.

Содержание молекул с активными группами (С) в композициях варьируется в 10 пределах $0\% \leq c \leq 10\%$.

- Среда, используемая для иммобилизации молекул с амино и сульфгидрильными группами в полимерных носителях.

В качестве среды для полимеризационной иммобилизации молекул предлагаются вода, водные растворы поливинилового спирта, сахарозы, 15 диметилформамида, диметилсульфоксида или других полярных водорастворимых и неполярных соединений, а также безводные растворы диметилсульфоксида, диметилформамида, формамида и т.д. Содержание воды (Е) в композиции варьируется в пределах 0%-95% (v/v), высококипящего компонента (D) 0%-95% (m/v; v/v).

20 В растворы для полимеризации могут добавляться различные соединения, например, глицерин, для получения композиции различной вязкости, позволяющие варьировать размер гелевых элементов микрочипа при фиксированном диаметре пина робота.

- Инициаторы для химического и фотоинициирования.

25 Для инициирования радикальной полимеризации при синтезе полимерного носителя предлагается использовать инициаторы и промоторы полимеризации, растворимые в воде и органических средах. А именно: персульфат аммония, персульфат калия, перекись водорода, соли двухвалентного железа, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, триэтиламин, перекись бензоила, . динитрилазадиизомаслянной кислоты, N,N-диметиламинопиридин, ацетон, 30 метиленовая синь, флуоресцеин и т.д.

- Мономер, ковалентно пришитый к поверхности стекла.

Для модификации поверхности стекла с целью ковалентного связывания полимерного носителя с поверхностью предлагаются следующие реагенты: 3-триметокси-силилпропилметакрилат, 3-триметоксисилил-пропилметакриламид, 3-триметоксисилилпропил-акриламид, 3-глицидилокси-пропилтри-метоксисилен.

5 Такой спектр модифицирующих агентов позволяет получать надежную связь полимера со стеклом в широком диапазоне рН среды (2-12) и температуре (-10°C-100°C).

10 Различные сочетания компонентов композиции позволяют получать полимерные носители, пористость которых может варьироваться в широких пределах и позволяет использовать данные носители для многих приложений, в частности для изготовления биочипов.

15 Другим аспектом данного изобретения является способ иммобилизации молекул, в том числе олигонуклеотидов, белков и нуклеиновых кислот, содержащих в своей структуре активные группы, в составе линейного или трехмерного пористого полимера, получаемого на основе композиции состава:

$$K = A^a + B^b + C^c + D^d + E^e + F^f$$

где:

K- композиция;

20 **A**- акриламид, метакриламид, N-{трист(гидроксиметил)метил}-акриламид, 2-гидроксиэтилметакрилат или мономер на основе производных акриловой, метакриловой, коричной, кротоновой, винилбензойной или других непредельных кислот;

25 **B**- N,N'-метиленбисакриламид, N,N'-1,2-дигидрокси-этилбисакриламид, полиэтиленгликольдиакрилат, их смесь или симметричный или несимметричный сивающий агент на основе производных акриловой, метакриловой, коричной, кротоновой, винилбензойной или других непредельных кислот;

C- олигонуклеотид, нуклеиновая кислота, протеин или другая молекула, несущая активную группу, в том числе, амино или сульфогидрильную группу;

D- глицерин, сахароза, полиспирты или другое высококипящее соединение;

30 **E**- вода, диметилформамид, диметилсульфоксид и другие полярные и неполярные растворители;

F- персульфат аммония, персульфат калия, метиленовый синий, флуоресцеин, N,N,N',N'-тетраметилэтilenдиамин, перекись водорода, N,N-

диметиламинопиридин, триэтиламин, ацетон или любой инициатор для химического или фотоинициирования полимеризации.

a,b,c,d,e,f - процентное содержание каждого компонента в композиции ($X=m/v \times 100\%$, для твердых веществ, или $X=v/v \times 100\%$ для жидких веществ).

5 $3\% \leq a+b \leq 40\%; 0\% \leq c \leq 10\%; 0\% \leq d \leq 95\%; 0\% \leq e \leq 95\%, 0\% \leq f \leq 90\%;$.

Предпочтительно для целей данного изобретения полимер получают полимеризацией смесей (A+B) из сочетаний акриламида, метакриламида, N-{трис(гидроксиметил)-метил}акриламида, N,N'-метиленбисакриламида, N,N'-1,2-дигидроксиэтил-бисакриламида, полиэтиленгликольдиакриамида или других непредельных соединений.

Предпочтительно, когда молекулы, в том числе олигонуклеотиды, белки и нуклеиновые кислоты, содержащие в своей структуре активные группы, в том числе амино- и/или сульфидрильные группы, реагируют с фрагментами формируемого полимерного носителя (полимера) в момент его синтеза в условиях реакции присоединения или замещения (радикального, нуклеофильного, электрофильного и т.д.) при фото или химическом инициировании полимеризации.

Кроме того, олигонуклеотиды, содержащие активные группы, в том числе амино- и/или сульфидрильные группы, аминированная ДНК, ДНК с включенной сульфидрильной группой, а также белки перед процессом иммобилизации не подвергаются модификации.

Далее способ характеризуется тем, что иммобилизацию белков в полимерном носителе осуществляют либо по сульфидрильным группам, либо по аминогруппам, либо по третьим функциональным группам аминокислот.

Далее способ характеризуется тем, что иммобилизацию олигонуклеотидов в полимерном носителе осуществляют либо по 5'-концу олигонуклеотида, либо по 3'-концу олигонуклеотида.

Дополнительно заявленный способ характеризуется тем, что сформированный слой полимера связан с подложкой ковалентно либо ковалентно не связан с указанной подложкой.

30 Причем указанный сформированный на подложке слой полимера представляет собой трехмерный гель.

Далее сформированный на подложке слой полимера представляет собой сплошной непрерывный слой.

Дополнительно сформированный на подложке слой полимера разделен пустыми промежутками на несколько ячеек, причем каждая из ячеек может содержать либо не содержать иммобилизованные макромолекулы, а макромолекулы иммобилизованные в разных ячейках могут различаться по своей природе и 5 свойствам.

Упомянутые выше ячейки образуют регулярную одномерную или двумерную структуру (массив).

Предпочитительно осуществлять нанесение полимеризационной смеси на подложку при помощи автоматического устройства (робота), снабженного одним 10 или несколькими микродиспенсерами, причем названные микродиспенсеры могут быть микродиспенсарами стержневого типа или бесконтактными микродиспенсарами струйного типа. Более того, в способе могут быть использованы несколько микродиспенсеров, которые образуют регулярную структуру.

Способ согласно данному изобретению предполагает, что одна или несколько 15 подложек с нанесенными на них каплями композиции перед полимеризацией выдерживаются в герметичном контейнере, содержащем аналогичную композиционную смесь в количестве, превышающем суммарное количество полимеризационной смеси, нанесенной на подложки, более чем в 2 раза.

Кроме того, одна или несколько подложек с нанесенными на них каплями 20 композиции перед полимеризацией и в процессе ее размещаются в герметичном контейнере в безкислородной инертной атмосфере с контролируемой влажностью.

Способ предполагает, что названный контейнер заполняется одним из следующих газов: N₂, Ar, CO₂,

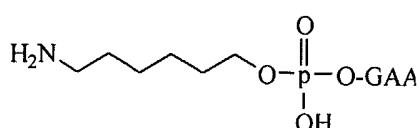
и газовая среда в контейнере с подложками непрерывно или периодически 25 обновляется.

Краткое описание рисунков

Изобретение поясняется с помощью рисунков, где на

Рис. 1 показана схема иммобилизации олигонуклеотидов с терминальной амино-группой на модифицированном стекле.

30 Иммобилизованный олигонуклеотид(С=130pmol/μl):



гибридизованный флуоресцентно меченный олигонуклеотид:

5' -CTCAGTTC-TexRed (1 μ M, 1M NaCl). Гели для иммобилизации:

A {метакриламид:N,N'-метиленбисакриламид-T5%, C5%};

B {акриламид:N,N'-метиленбисакриламид-T5%, C5%}.

5 Рис 2 показана иммобилизация ДНК, несущих амино- и сульфогидрильные группы на модифицированном стекле.

Гель для иммобилизации ДНК: метакриламид:N,N'-метиленбисакриламид-T5%, C5%; иммобилизованная ДНК ($C=1 \times 10^3$ г/мл): выделена из тимуса теленка и подвергнута процедуре аминирования по протоколу, приведенному в работе [4];

10 гибридизованный флуоресцентно меченный олигонуклеотид:

5'-CTCAOTTC-TexRed(1 μ M, 1M NaCl). A и B - гели, не содержащие и содержащие иммобилизованную ДНК, соответственно.

Рис 3 показан иммуноанализ на микрочипе. Микрочип содержит иммобилизованные моноклональные антитела к зеленому флуоресцирующему белку (Ab-GFP), а – фетопротеину (Ab-AFP), иммуноглобулину G человека (Ab-HIgG) и иммуноглобулину G человека (HIgG). Концентрации антител в геле, мкг/мл: 630(ряд 1), 315(ряд 2), 210 (ряд 3), 130(ряд 4), 60(ряд 5), 40 (ряд 6). Антитела проявляли зеленым флуоресцирующим белком (а) и антителами к HIgG меченным флуоресцеином(б).

20 Далее изобретение будет пояснено с помощью примеров, иллюстрирующих предпочтительные варианты осуществления изобретения. Эти примеры не должны восприниматься, как ограничивающие объем изобретения. Специалисты в данной области смогут найти многочисленные улучшения, которые также входят в объем притязаний данного изобретения и которые отражены в формуле изобретения.

25 Примеры

Пример 1. Иммобилизация олигонуклеотидов, содержащих алифатическую аминогруппу в полимерном носителе

К раствору метакриламида и N,N'-метиленбисакриламида в 3M N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамине в воде (1.25 μ l, 40% (m/v), 19:1) приливают раствор олигонуклеотида в воде (2.3 μ l, $C=1\text{nmol}/\mu\text{l}$) и глицерин (6.45 μ l). Смесь тщательно перемешивают. Раствор наносят с помощью робота “GMS 417 Arraer” на стекло, обработанное Bind-Silane. Полученный массив капель облучают ультрафиолетом ($\lambda=312$ нм, 30 мин, $T=55^\circ\text{C}$) в среде сухого аргона, отмывают в воде (4 ч, $T=60^\circ\text{C}$) и

высушивают на воздухе ($T=25^{\circ}\text{C}$) в безпылевой атмосфере. В данном примере использована композиция состава: **A**-метакриламид, **B**- N,N' -метиленбисакриламид, **C**- олигонуклеотид, **D**-глицерин, **E**-вода, **F**- $\text{N},\text{N},\text{N}',\text{N}'$ -тетраметилэтилендиамин, **a+b=5.00%**, **c=0.0006%**; **d=65.00%**; **e=20.00%**, **f=10.00%**.

5 Полученный олигонуклеотидный микрочип использовали для проведения гибридизаций, PCR и т.д.

На рис.1 приведен результат гибридизации на олигонуклеотидном микрочипе, полученном по выше приведенной методике.

Пример 2. Иммобилизация аминированной ДНК в полимерном носителе

10 Методика аналогична, приведенной в примере 1.

Для иммобилизации использовалась ДНК из тимуса теленка, аминированная по протоколу, приведенному в работе [4]. Концентрация ДНК в полимеризационной смеси $C=1\text{мг}/\text{мл}$. В данном примере использована композиция состава: **A**-метакриламид, **B**- N,N' -метиленбисакриламид, **C**- ДНК, **D**-глицерин, **E**-вода, **F**- $\text{N},\text{N},\text{N}',\text{N}'$ -тетраметилэтилендиамин, **a+b=5.00%**, **c=0.00023%**; **d=65.00%**; **e=20.00%**, **f=10.00%**.

На рис. 2 приведен результат гибридизации на ДНК-микрочипе, полученном по выше приведенной методике.

Пример 3. Иммобилизация белка в полимерном носителе

20 Методика аналогична, приведенной в примере 1.

К раствору полимеризационной смеси приливают раствор нативного белка в боратном буфере ($\text{pH } 8.3$). Концентрация белка в полимеризационной смеси $C=630\mu\text{г}/\text{мл}$. Смесь тщательно перемешивают. Раствор наносят с помощью робота “GMS 417 Arraer” на стекло, обработанное Bind-Silane. Полученный массив капель облучают ультрафиолетом ($\lambda=312 \text{ нм}$, 40 мин, $T=27^{\circ}\text{C}$) в среде сухого аргона. Далее белковые микрочипы отмывают в фосфатном солевом буфере (0.01M , $\text{pH } 7.0$.) содержащем 0.1% Tween 20, затем выдерживают 1 час в фосфатном солевом буфере (0.01M , $\text{pH } 7.0$.) содержащем и 1% BSA и 5% сахарозы и используют для проведения различных типов анализа.

30 В данном примере использована композиция состава: **A**-метакриламид, **B**- N,N' -метиленбисакриламид, **C**- ДНК, **D**-глицерин, **E**-вода, **F**- $\text{N},\text{N},\text{N}',\text{N}'$ -тетраметилэтилендиамин, **a+b=5.00%**, **c=0.0001%**; **d=65.00%**; **e=20.00%**, **f=10.00%**.

На рисунке 3 приведены результаты иммуноанализа на микрочипе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиции состава:

$$K = A^a + B^b + C^c + D^d + E^e + F^f$$

где:

5 K- композиция;

A- акриламид, метакриламид, N-{тристриптилметил}-акриламид, 2-гидроксиэтилметакрилат или мономер на основе производных акриловой, метакриловой, коричной, кротоновой, винилбензойной или других непредельных кислот;

10 B- N,N'-метиленбисакриламид, N,N'-1,2-дигидрокси-этанбисакриламид, полиэтиленгликольдиакрилат, их смесь или симметричный или несимметричный сивающий агент на основе производных акриловой, метакриловой, коричной, кротоновой, винилбензойной или других непредельных кислот;

15 C- олигонуклеотид, нуклеиновая кислота, протеин или другая молекула, несущая активную группу, в том числе, амино или сульфогидрильную группу;

D- глицерин, сахароза, полиспирты или другое высококипящее соединение;

E- вода, диметилформамид, диметилсульфоксид и другие полярные и неполярные растворители;

20 F- персульфат аммония, персульфат калия, метиленовый синий, флуоресцеин, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, перекись водорода, N,N-диметиламинопиридин, триэтиламин, ацетон или любой инициатор для химического или фотоинициирования полимеризации.

a,b,c,d,e,f - процентное содержание каждого компонента в композиции (X=m/v×100% , для твердых веществ, или X=v/v×100% для жидких веществ).

25 3%≤a+b≤40%; 0%≤c≤10%; 0%≤d≤95%; 0%≤e≤95%, 0%≤f≤90%;.

для иммобилизации различных молекул, в составе линейного или трехмерного пористого полимера, в том числе олигонуклеотидов, белков и нуклеиновых кислот, содержащих в своей структуре активные группы, в том числе алифатические амино- и/или сульфогидрильные группы, в полимерных носителях (полимерах) в условиях реакции присоединения или замещения (радикального, нуклеофильного, электрофильного и т.д.) в момент синтеза полимера при фото- и химическом инициировании полимеризации.

2. Способ иммобилизации молекул, в том числе олигонуклеотидов, белков

и нуклеиновых кислот, содержащих в своей структуре активные группы, в составе линейного или трехмерного пористого полимера, получаемого на основе композиции состава:

$$K = A^a + B^b + C^c + D^d + E^e + F^f$$

5 где:

K- композиция;

A- акриламид, метакриламид, N-{тристриптоксигидроксиметил}-акриламид, 2-гидроксиэтилметакрилат или мономер на основе производных акриловой, метакриловой, коричной, кротоновой, винилбензойной или других непредельных 10 кислот;

B- N,N'-метиленбисакриламид, N,N'-1,2-дигидрокси-этилбисакриламид, полиэтиленгликольдиакрилат, их смесь или симметричный или несимметричный сивающий агент на основе производных акриловой, метакриловой, коричной, кротоновой, винилбензойной или других непредельных кислот;

C- олигонуклеотид, нуклеиновая кислота, протеин или другая молекула, несущая активную группу, в том числе, амино или сульфидильную группу;

D- глицерин, сахароза, полиспирты или другое высококипящее соединение;

E- вода, диметилформамид, диметилсульфоксид и другие полярные и неполярные растворители;

F- персульфат аммония, персульфат калия, метиленовый синий, флуоресцеин, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, перекись водорода, N,N-диметиламинопиридин, триэтиламин, ацетон или любой инициатор для химического или фотоинициирования полимеризации.

a,b,c,d,e,f - процентное содержание каждого компонента в композиции 25 (X=m/v×100% , для твердых веществ, или X=v/v×100% для жидких веществ).

$$3\% \leq a+b \leq 40\%; 0\% \leq c \leq 10\%; 0\% \leq d \leq 95\%; 0\% \leq e \leq 95\%, 0\% \leq f \leq 90\%;$$

3. Способ по п. 2, где полимер получают полимеризацией смесей (A+B) из сочетаний акриламида, метакриламида, N-{тристриптоксигидроксиметил}-акриламида, N,N'-метиленбисакриламида, N,N'-1,2-дигидроксиэтил-бисакриламида,

30 полиэтиленгликольдиакриамида или других непредельных соединений.

4. Способ по п.2, где молекулы, в том числе олигонуклеотиды, белки и нуклеиновые кислоты, содержащие в своей структуре активные группы, в том числе амино- и/или сульфидильные группы, реагируют с фрагментами формируемого

полимерного носителя (полимера) в момент его синтеза в условиях реакции присоединения или замещения (радикального, нуклеофильного, электрофильного и т.д.) при фото или химическом инициировании полимеризации.

5. Способ по п. 4, где олигонуклеотиды, содержащие активные группы, в том числе амино- и/или сульфидрильные группы, аминированная ДНК, ДНК с включенной сульфидрильной группой, а также белки перед процессом иммобилизации не подвергаются модификации.

6. Способ по п. 2, где иммобилизацию белков в полимерном носителе осуществляют по сульфидрильным группам.

10 7. Способ по п. 2, где иммобилизацию белков в полимерном носителе осуществляют по аминогруппам.

8. Способ по п. 2, где иммобилизацию белков в полимерном носителе осуществляют по третьим функциональным группам аминокислот.

15 9. Способ по п. 2, где иммобилизацию олигонуклеотидов в полимерном носителе осуществляют по 5'-концу олигонуклеотида.

10. Способ по п. 2, где иммобилизацию олигонуклеотидов в полимерном носителе осуществляют по 3'-концу олигонуклеотида.

11. Способ по п. 2, где сформированный слой полимера ковалентно связан с подложкой.

20 12. Способ по п. 2, где сформированный слой полимера ковалентно не связан с подложкой.

13. Способ по п. 2, где сформированный на подложке слой полимера представляет собой трехмерный гель.

25 14. Способ по п. 2, где сформированный на подложке слой полимера представляет собой сплошной непрерывный слой.

15. Способ по п. 2, где сформированный на подложке слой полимера разделен пустыми промежутками на несколько ячеек, причем каждая из ячеек может содержать либо не содержать иммобилизованные макромолекулы, а макромолекулы иммобилизованные в разных ячейках могут различаться по своей природе и 30 свойствам.

16. Способ по п. 15, где указанные ячейки образуют регулярную одномерную или двумерную структуру (массив).

17. Способ по п. 15, где нанесение полимеризационной смеси на подложку

осуществляется при помощи автоматического устройства (робота), снабженного одним или несколькими микродиспенсерами.

18. Способ по п. 17, где указанные микродиспенсеры являются микродиспенсарами стержневого типа.

5 19. Способ по п. 17, где указанные микродиспенсеры являются бесконтактными микродиспенсарами струйного типа.

20. Способ по п. 17, где используют несколько микродиспенсеров, образующих регулярную структуру.

10 21. Способ по п. 15, где к одна или несколько подложек с нанесенными на них каплями композиции перед полимеризацией выдерживаются в герметичном контейнере, содержащем аналогичную композиционную смесь в количестве, превышающем суммарное количество полимеризационной смеси, нанесенной на подложки, более чем в 2 раза.

15 22. Способ по п. 15, где одна или несколько подложек с нанесенными на них каплями композиции перед полимеризацией и в процессе нее размещаются в герметичном контейнере в безкислородной инертной атмосфере с контролируемой влажностью.

23. Способ по п. 22, где контейнер заполняется одним из следующих газов: N₂, Ar, CO₂.

20 24. Способ по п. 22, где газовая среда в контейнере с подложками непрерывно или периодически обновляется.

1/2

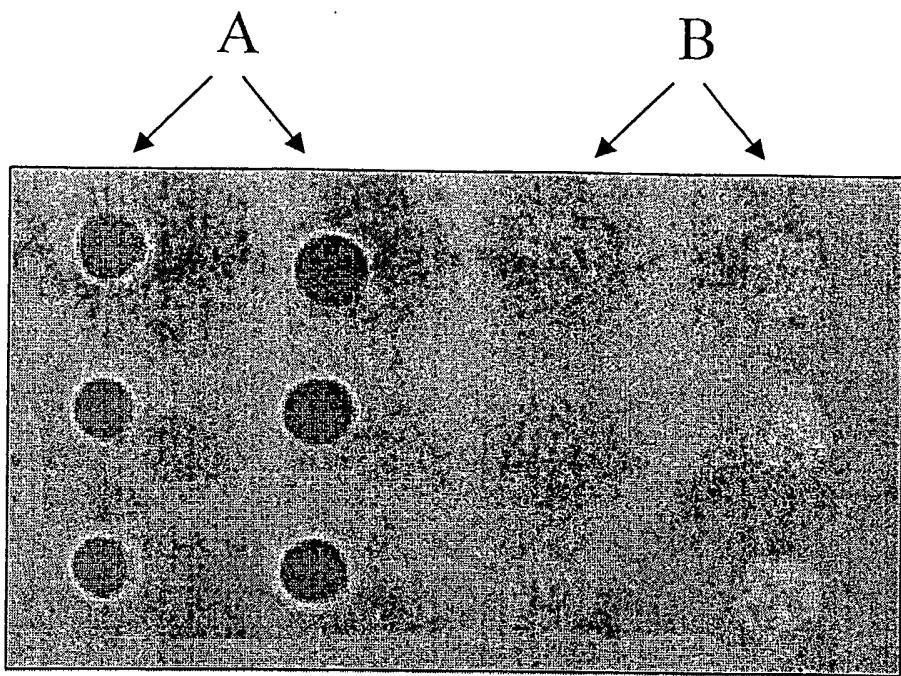


Рис. 1

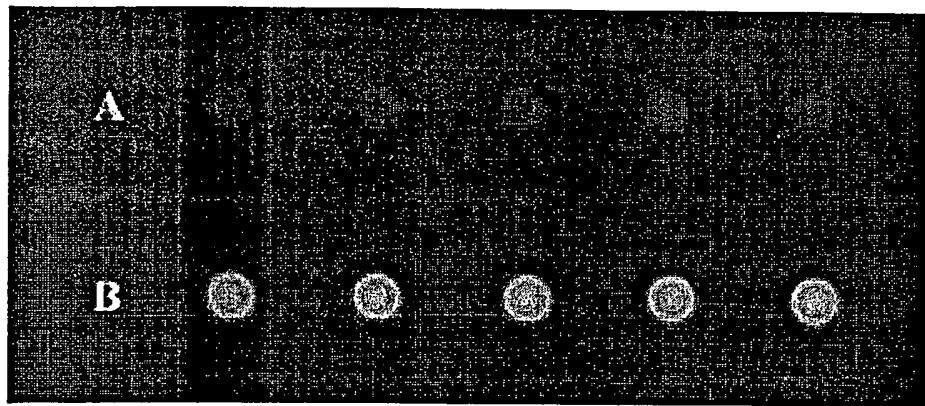


Рис. 2

2/2

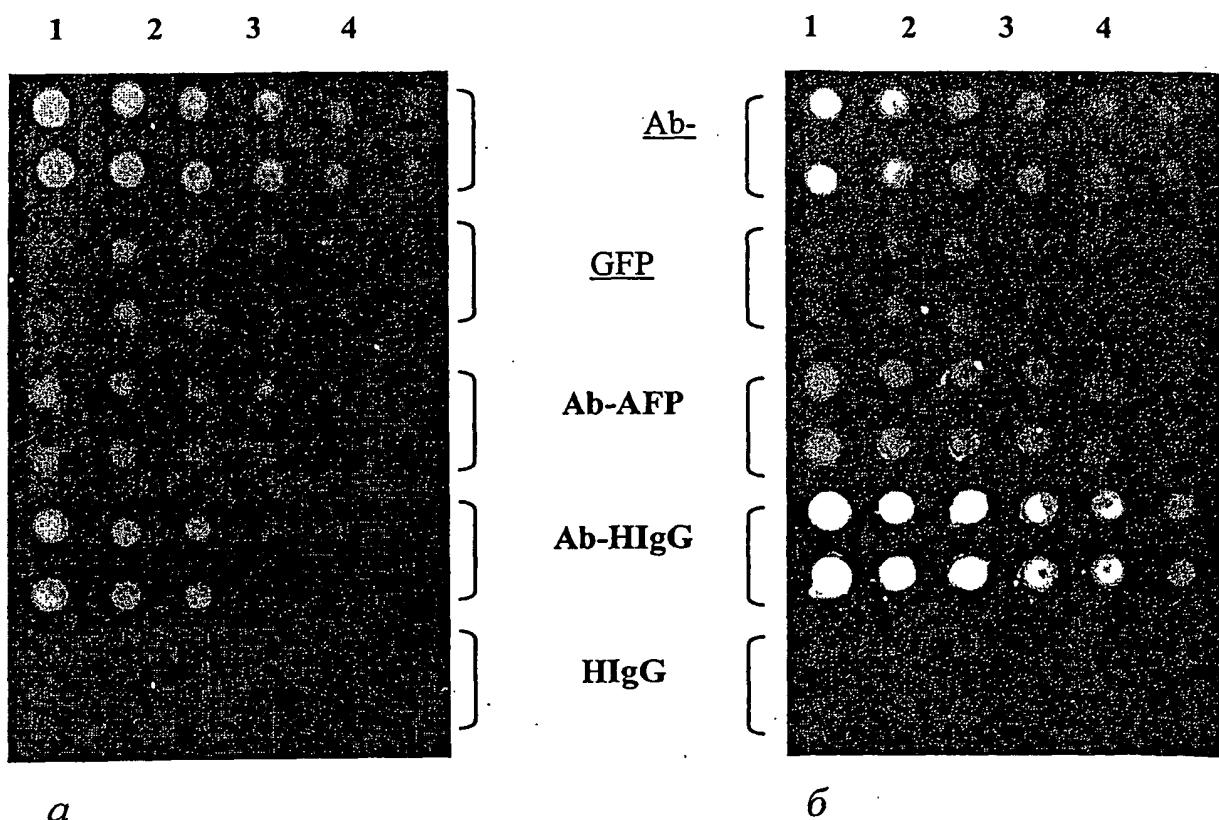


Рис. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 01/00420

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C 07 K 17/08, C 07 H 21/00, C 08 F 220/56, C 12 Q 1/68, C 08 F 220/00

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)

C 07 K 17/02, 17/08, C 07 H 21/00, C 08 F 220/56, C 12 Q 1/68, C 08 F 220/00, G 01 N33/50

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 practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BI RF. M. FIPS, 2001, No. 25, 1st part, RU 99127744 (INSTITUT MOLEKULYARNOI BIOLOGII im. V. A. ENGELGARDTA RAN) 10.09.2001, the claims	1-24
A	RU 2157385 C1 (INSTITUT MOLEKULYARNOI BIOLOGII im. V. A. ENGELGARDTA RAN) 10.10.2000, the claims;	1-24
A	US 5412087 A (AFFYMAX TECHNOLOGIES N.V.), 02.05.1995, the claims, the abstract	1-24
A	US 5574142 A (MICROPROBE CORPORATION), 12.11.1996, the claims, the abstract	1-24
A	US 5837860 A (MOLECULAR TOOL, INC.), 17.11.1998, the claims, the abstract	1-24
A	US 5981734 A (UNIVERSITY OF CHICAGO), 09.11.1999, the claims, the abstract	1-24
A	WO 01/14425 A1 (KIM SUN-YOUNG et al), 01.03.2001, the claims, the abstract	1-24

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 May 2002 (07.05.02)

Date of mailing of the international search report

23 May 2002 (23.05.02)

Name and mailing address of the ISA/

RU

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/RU 01/00420

A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ: C 07 K 17/08, C 07 H 21/00, C 08 F 220/56, C 12 Q 1/68, C 08 F 220/00

Согласно международной патентной классификации (МПК-7)

B. ОБЛАСТИ ПОИСКА:

Проверенный минимум документации (система классификации и индексы) МПК-7:
C 07 K 17/02, 17/08, C 07 H 21/00, C 08 F 220/56, C 12 Q 1/68, C 08 F 220/00, G 01 N33/50

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, поисковые термины):

C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	БИ РФ, М., ФИПС, 2001, №25, 1 ч., RU 99127744 A (ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ ИМ. В.А.ЭНГЕЛЬГАРДТА РАН), 10.09.2001, формула изобретения;	1-24
A	RU 2157385 C1 ((ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ ИМ. В.А. ЭНГЕЛЬГАРДТА РАН), 10.10.2000, формула изобретения;	1-24
A	US 5412087 A (AFFYMAX TECHNOLOGIES N.V.), 02.05.1995, формула изобретения, реферат;	1-24
A	US 5574142 A (MICROPROBE CORPORATION), 12.11.1996, формула изобретения, реферат;	1-24
A	US 5837860 A (MOLECULAR TOOL, INC.), 17.11.1998, формула изобретения, реферат;	1-24
A	US 5981734 A (UNIVERSITY OF CHICAGO), 09.11.1999, формула изобретения, реферат);	1-24

последующие документы указаны в продолжении графы С.

данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов:

А документ, определяющий общий уровень техники

Т более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

Е более ранний документ, но опубликованный на дату международной подачи или после нее

Х документ, имеющий наибольшее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну и изобретательский уровень

О документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

У документ, порочащий изобретательский уровень в сочетании с одним или несколькими документами той же категории

Р документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета и т.д.

& документ, являющийся патентом-аналогом

Дата действительного завершения международного поиска: 07 мая 2002 (07.05.2002)	Дата отправки настоящего отчета о международном поиске: 23 мая 2002 (23.05.2002)
---	--

Наименование и адрес Международного поискового органа Федеральный институт промышленной собственности РФ, 123995, Москва, Г-59, ГСП-5, Бережковская наб., 30/1. Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА	Уполномоченное лицо: В. Волкова Телефон № 240-25-91
---	---

Форма PCT/ISA/210 (второй лист)(июль 1998)

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/RU 01/00420

С. (продолжение) ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	WO 01/14425 A1 (KIM SUN-YOUNG et al), 01.03.2001, формула изобретения, реферат	1-24