



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/543 (2020.08); B01J 19/00 (2020.08); B32B 3/12 (2020.08); B32B 27/06 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2018118166, 18.11.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.11.2016

Дата регистрации:
09.02.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
18.11.2015 GB 1520341.7

(43) Дата публикации заявки: 18.12.2019 Бюл. № 35

(45) Опубликовано: 09.02.2021 Бюл. № 4

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 18.06.2018

(86) Заявка РСТ:
GB 2016/053608 (18.11.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2017/085509 (26.05.2017)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ФИТЦДЖЕРАЛЬД Питер (GB),
ЛАМОН Джон (GB),
МАККОННЕЛЛ Иван (GB),
БЕНЧИХ Элоуард (GB),
УПАДХЬЯЙ Дипеш (GB),
РИЧАРДСОН Киаран (IE)

(73) Патентообладатель(и):

РЭНДОКС ЛЭБОРЭТРИЗ ЛТД (GB),
РЭНДОКС ТЕОРАНТА (IE)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 2012035081 A1, 09.02.2012. EP
0895083 A2, 03.02.1999. WO 2013130674 A1,
06.09.2013. WO 02092833 A2, 21.11.2002. US
2003219816 A1, 27.11.2003.

(54) УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ, ОТНОСЯЩИЕСЯ К ПОДЛОЖКАМ ДЛЯ ПРИКРЕПЛЕНИЯ
МОЛЕКУЛ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области аналитической химии и лабораторной диагностики и представляет собой керамическую подложку для микроматрицы, содержащую покрытие в виде маскирующего материала и несколько дискретных реакционных зон, пригодных для прикрепления одного или более связующего вещества, причем упомянутые зоны представляют собой непокрытые области на

подложке, в которой маскирующий материал содержит пигмент, акриловую смолу, эпоксидную смолу и структурирующее вещество, причём структурирующее вещество представляет собой воск ПТФЭ. Изобретение обеспечивает повышение отношения сигнал/шум, что приводит к повышению чувствительности метода обнаружения аналита. 9 з.п. ф-лы, 5 ил., 2 табл., 4 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
B01J 19/00 (2006.01)
B32B 3/12 (2006.01)
B32B 27/06 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

G01N 33/543 (2020.08); B01J 19/00 (2020.08); B32B 3/12 (2020.08); B32B 27/06 (2020.08)

(21)(22) Application: **2018118166**, 18.11.2016

(24) Effective date for property rights:
18.11.2016

Registration date:
09.02.2021

Priority:

(30) Convention priority:
18.11.2015 GB 1520341.7

(43) Application published: **18.12.2019** Bull. № 35

(45) Date of publication: **09.02.2021** Bull. № 4

(85) Commencement of national phase: **18.06.2018**

(86) PCT application:
GB 2016/053608 (18.11.2016)

(87) PCT publication:
WO 2017/085509 (26.05.2017)

Mail address:
**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**FITZGERALD, Peter (GB),
LAMONT, John (GB),
MCCONNELL, Ivan (GB),
BENCHIKH, Elouard (GB),
UPADHYAY, Deepesh (GB),
RICHARDSON, Ciaran (IE)**

(73) Proprietor(s):

**RANDOX LABORATORIES LTD (GB),
RANDOX TEORANTA (IE)**

(54) IMPROVEMENTS RELATING TO SUBSTRATES FOR ATTACHING MOLECULES

(57) Abstract:

FIELD: analytical chemistry; laboratory diagnostics.

SUBSTANCE: invention is a ceramic substrate for a microarray, comprising a coating in the form of a masking material and several discrete reaction zones, suitable for attachment of one or more binder, said zones being uncoated regions on the substrate, wherein the masking material contains a pigment, acrylic resin,

epoxy resin and a structuring agent, wherein the structuring agent is a PTFE wax.

EFFECT: invention provides higher signal-to-noise ratio, which increases sensitivity of the analyte detection method.

10 cl, 5 dwg, 2 tbl, 4 ex

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к усовершенствованиям подложек для прикрепления связующих веществ. В частности, настоящее изобретение направлено на создание усовершенствованной подложки микроматрицы. В другом аспекте обеспечен усовершенствованный состав, для использования в нанесении покрытия подложку для прикрепления связующих веществ и в частности, для использования в нанесении покрытия на подложку для микроматрицы. В другом аспекте изобретения обеспечен усовершенствованный способ для анализа микроматрицы.

Уровень техники

Использование изготовленных матриц молекул при выявлении и определении характеристик аналитов хорошо известно. Например, изготовленные матрицы полинуклеотидов широко используются в технологиях секвенирования ДНК и в исследованиях гибридизации для выявления генетических изменений у пациента. Иммуноанализ также хорошо известен для выявления аналитов, таких как специфические белки или другие связующие вещества, за счет их свойств, таких как антигены или антитела.

Подложки для микроматриц обычно содержат материал, поддерживающий жесткость, содержащий несколько реакционных зон, расположенных в разделенных в пространстве областях на подложке. Обеспечение нескольких реакционных зон допускает одновременное тестирование нескольких аналитов или биомаркеров в образце. Микроматрицы являются важными лабораторными инструментами, позволяющими не только осуществлять более сложный анализ состояния пациента, но также экономить время и расходы, связанные с лабораторными испытаниями. Обычно микроматрицы изготавливают путем осаждения или «окрашивания» молекул или молекулярных фрагментов на подложке, с образованием матрицы реакционных зон. Для получения приемлемого качества данных, маркировка должна быть однородной, таким образом, чтобы «пятна» имели одинаковый размер и форму. Однако, данные, полученные из имеющихся в данный момент микроматриц, еще имеют простор для достижения повышенной точности и четкости, чтобы они были более эффективными, как в исследовании, так и в используемых клинических условиях. Для решения данной проблемы были получены относительно небольшие данные.

Поэтому, представляется выгодным обеспечение подложки, которая дает высококачественные данные.

Сущность изобретения

В соответствии с аспектом изобретения, обеспечена подложка, содержащая покрытие в виде маскирующего материала и несколько отдельных реакционных зон, на которые должны быть нанесены одно или более связующих веществ, таким образом, чтобы они были ковалентно связаны, причем упомянутые зоны должны представлять собой непокрытые области на подложке.

Неожиданно было обнаружено, что покрытая подложка по настоящему изобретению обеспечивает повышенную чувствительность обнаружения и качество изображения, особенно при использовании цифровых датчиков. Покрытые области подложки снижают неспецифическое связывание и поперечное сшивание пятен и, таким образом, снижается фоновый шум, что приводит к повышенному отношению сигнал/шум. Это означает, что полученный сигнал пропорционален степени «подлинного» связывания, которое возникло между образцом и мишенями на подложке. Также достигается повышенное пространственное разрешение.

Кроме того, использование покрытой подложки согласно настоящему изобретению

способствует повышенной точности осаждения связующих веществ. На подложке могут быть изготовлены отметки внутренней калибровки, для обеспечения точной идентификации дискретных реакционных зон, для надлежащего осаждения биомолекулы внутри зон.

5 Описание чертежей

Фиг. 1 показывает схематические иллюстрации микроматриц, обладающих от низкого до высокого формата плотности матрицы на поле 9 мм x 9 мм. Каждая микроматрица на Фигуре 1 содержит подложку 1, покрытие в виде маскирующего материала 2 и непокрытые дискретные реакционные зоны 3a, 3b, 3c.

10 Фиг. 2 показывает изображения эталонных пятен в матрице формата 7x7. Фиг. 2a показывает изображение подложки 1 без заданных дискретных реакционных зон. Фиг. 2b показывает изображение подложки 1, содержащей покрытие в виде маскирующего материала 2, имеющей заданные не кремниевые дискретные реакционные зоны.

Фиг. 3 показывает изображение бестиреоидиновой матрицы, содержащей эталонные 15 пятна, FT4 (бестироксиновые), FT3 (трийодтирониновые) и ТТГ (тиреотропный гормон) иммобилизационные антитела. В случае, если FT4 и FT3 являются конкурирующими образцами, то ТТГ представляет собой сэндвичевый образец. Фиг. 3a показывает изображение подложки 1 без заданных дискретных реакционных зон. Фиг. 3b показывает изображение с использованием подложки 1, содержащей покрытие в виде маскирующего 20 материала 2, и с заданными дискретными реакционными зонами.

Фигуры 2 и 3 показывают микроматрицы согласно настоящему изобретению, которые обладают низким сигналом фонового шума и противопомутнительными свойствами.

Фиг. 4 показывает повышение чувствительности обнаружения микроматрицы согласно настоящему изобретению по сравнению с контрольным образцом. Это 25 изображение показывает образец ТТГ (тиреотропный гормон) для определения более низких уровней чувствительности. Первый столбец показывает ожидаемую чувствительность, 2-й и 5-й столбец показывают измеренную чувствительность, соответственно, на непокрытой и покрытой подложке. 3-й и 6-й столбец показывают типичный трехмерный пиксельный график, принимаемый цифровым датчиком. 4-й и 30 7-й столбец показывают повышение отношения сигнал/шум.

Подробное описание изобретения.

Настоящее изобретение обеспечивает подложку, содержащую покрытие в виде маскирующего материала и несколько дискретных реакционных зон, к которым должно 35 быть прикреплено одно или более связующих веществ, причем упомянутые зоны представляют собой непокрытые области на подложке.

Является предпочтительным, чтобы подложка представляла собой подложку микроматрицы 5x5, 7x7, 10x10, 20x20 или 30x30. Термин микроматрица не предназначен для ограничения выявлением какой-либо конкретно молекула, а охватывает все типы матриц, включающие в себя РНК, ДНК, белковые матрицы, и любые другие матрицы 40 для выявления биомолекул или биомолекулярных фрагментов. Является предпочтительным, чтобы связующие вещества были прикреплены к микроматрице, представляющей собой белки. Является более предпочтительным, чтобы связующие вещества были прикреплены к микроматрице, представляющей собой антитела. Является наиболее предпочтительным, чтобы подложка представляла собой подложка 45 микроматрицы белка.

Сама по себе подложка может содержать любой подходящий материал, известный специалистам в данной области техники. Является предпочтительным, чтобы подложка содержала кремний, оксиды металлов, керамику, стекло или пластик. Является более

предпочтительным, чтобы подложка представляла собой керамическую подложку. Является более предпочтительным, чтобы керамика была на основе оксида алюминия. Наиболее предпочтительным является, чтобы подложка представляла собой белую керамическую подложку. Это дает наибольший контраст между подложкой и покрытием

5 в виде маскирующего материала, который наносят на подложку.

Керамическая подложка может быть изготовлена для обеспечения диапазона размеров зерен (1-30 мкм). Предпочтительный размер частиц керамической подложки, используемой в этом изобретении, составляет менее 20 мкм, предпочтительно, менее 10 мкм. Сниженный размер частиц придает наиболее усовершенствованную

10 однородность поверхности, которая, в свою очередь, обеспечивает повышенные рабочие характеристики биологических образцов.

Предпочтительный материал керамики состоит примерно из 96% глинозема (Al_2O_3) с размером частиц в диапазоне 4-8 мкм. Материал является вакуумонепроницаемым и обладает топографией поверхности 0,6-0,8 мкм, когда она нанесена. Однородность

15 поверхности может быть повышена способом полировки, что дает поверхность с неравномерностью 0,4-0,5 мкм. Дополнительное повышение достигается путем шлифования и полировки, что дает поверхность с неравномерностью 0,05-0,1 мкм.

Является предпочтительным, чтобы покрытие было не кремнийсодержащим покрытием, и предпочтительно, чтобы в нем отсутствовал элементарный кремний или

20 соединение, включающее в себя кремний. Кремнийсодержащие покрытия известны из работ согласно уровню техники, например, кремнийорганический материал. Однако, авторы изобретения обнаружили, что при использовании такого покрытия, кремний может загрязнять дискретные реакционные зоны, которые оказывают неблагоприятное влияние на прикрепление связующего вещества.

Может быть использовано любое подходящее не кремниевое маскирующее вещество или покрытие. Является предпочтительным, чтобы покрытие содержало одну или более смол, выбранных из перечня акриловых, алкидных, эпоксидных, углеводородных, феноловых или фторполимерных, таких как политетрафторэтилен (ПТФЭ). Покрытие также может содержать любые подходящие растворители для краски и/или добавки

30 для краски. Особо предпочтительные растворители краски включают в себя циклогексан, бутоксиэтанол и ароматические дистилляты. Особо предпочтительный добавки к краске включают в себя углеродную сажу (черный пигмент), минеральное масло (смачивающее вещество), нефтяной дистиллят, дибутилфталат (пластификатор), соли кобальта, марганца или циркония (осушающее вещество), комплексон алюминия и титана

35 (хелатирующий агент), антиокислители, поверхностно-активные вещества и пеногасители.

Является предпочтительным, чтобы покрытие (маскирующий материал) содержал эпоксидную и акриловую смолу, пигмент и структурирующее вещество. Может присутствовать один пигмент, или может быть использовано несколько пигментов.

40 Эпоксидную и акриловую смолу используют для повышения вязкости краски, реологических свойств и адгезии к подложке. Пигмент придает темный цвет, предпочтительно, черный цвет, а следовательно, придает краске оптическую непрозрачность. Структурирующее вещество придает поверхности подложки гидрофильные/гидрофобные свойства, а также способствуют адгезии к подложке.

Является предпочтительным, чтобы пигмент присутствовал в количестве 1-15 мас.% от маскирующего состава (маскирующего материала); эпоксидная смола присутствовала в количестве 10-60 мас.%, акриловая смола присутствовала в количестве 1-20 мас.%, а структурирующее вещество присутствовало в количестве 10-60 мас.%.

Является более предпочтительным, чтобы пигмент, предпочтительно, черный пигмент присутствовал в количестве 1-8 мас.% от маскирующего состава; эпоксидная смола присутствовала в количестве 15-50 мас.% от маскирующего состава, акриловая смола присутствовала в количестве 2-15 мас.% от маскирующего состава, а структурирующее

5

вещество присутствовало в количестве 15-50 мас.% от маскирующего состава. Является наиболее предпочтительным, чтобы пигмент, предпочтительно, черный пигмент, присутствовал в количестве 5 мас.% от маскирующего состава; эпоксидная смола присутствовала в количестве 30 мас.% от маскирующего состава, акриловая смола присутствовала в количестве 10 мас.% от маскирующего состава, а

10

структурирующее вещество присутствовало в количестве 20 мас.% от маскирующего состава. В предпочтительном варианте воплощения в маскирующем материале используют угольный черный пигмент, предпочтительно, Elftex 285. Является предпочтительным, чтобы акриловая смола представляла собой В-67. Является предпочтительным, чтобы

15

структурирующее вещество представляло собой воск ПТФЭ, такой как CERAFLLOUR® 965. Является предпочтительным, чтобы маскирующий материал содержал эпоксидную смолу, предпочтительно, Epikote 1004.

20

Является наиболее предпочтительным, чтобы пигмент представлял собой Elftex 285, акриловая смола представляла собой В-67, эпоксидная смола представляла собой Epikote 1004, а структурирующее вещество представляло собой CERAFLLOUR® 965. Покрытие (маскирующий материал) может дополнительно содержать одно или более

25

веществ, выбранных из перечня растворителей, таких как этанол, пропанол, ксилол, дигликоль, бутиловый эфир; диспергирующие вещества; вещества для втирания пигментов; вещества для ровноты окраски; вещества для втирания пигментов и/или сшивающие вещества. Является предпочтительным, чтобы покрытие имело угол контакта 20-175°, более предпочтительно, 20-170° более предпочтительно, 90-120°, даже более предпочтительно, примерно 110°. Измерение проводят с использованием следующего протокола: угол

30

контакта измеряют с использованием измерителя угла контакта KSV CAM200, снабженного автоматического дозатора, управляемого с использованием шагового электродвигателя, СИД-источника и ПЗС-камеры. Измеритель угла контакта подключают к программным средствам для дозирования работы контроллера, захвата изображений и анализа изображений. Капли деионизированной воды 3,5 мкл дозированно выпускают на подложку в заданном местоположении, а изображение

35

захватывают с использованием ПЗС-камера. Анализ изображения выполняют с использованием программы для оценки угла контакта капли воды. Является предпочтительным, чтобы толщина покрытия, нанесенного на подложку, составляла 1-100 мкм толщины, предпочтительно, 2-50 мкм толщины. Это вызывает образование дискретной реакционной зоны, которая также имеет скважину глубиной

40

1-100 мкм, предпочтительно, 2-50 мкм, соответственно. Наиболее предпочтительным является, чтобы толщина покрытия составляла 3-20 мкм, а результирующая глубина скважины составляла 3-20 мкм.

45

Стенки дискретных реакционных зон, или скважин, образованы окружающим покрытием. Когда буферный раствор, содержащий антитело или другую биомолекулу, наносят на дискретные реакционные зоны, антитело, или биомолекула иммобилизуется на активированной поверхности. Стенки каждой дискретной реакционной зоны поглощают рассеянный свет, что ведет к улучшенному считыванию данных.

Является предпочтительным, чтобы подложка содержала гидрофобное маскирующее

покрытие и несколько дискретных реакционных зон, к которым должно быть прикреплено одно или более связующих веществ, причем упомянутые зоны представляют собой непокрытые области на подложке.

Является предпочтительным, чтобы покрытие было темнее подложки. Это придаст контраст между дискретными реакционными зонами и окружающей покрытой областью. Является более предпочтительным, чтобы подложка была белая, а покрытие имело любой цвет в диапазоне от белого до черного. Любой цвет, отличный от белого, придаст контраст между дискретными реакционными зонами и окружающей покрытой областью. Контраст между дискретными реакционными зонами и окружающей областью покрытой подложки дает лучшее пространственное разрешение и позволяет получать точные данные, даже при высокой плотности дискретных реакционных зон. Термин «маскирующий» материал здесь означает любой материал, используемый для покрытия подложки, предпочтительно, имеющий более цвет, чем подложка. Является предпочтительным, чтобы маскирующий материал имел цвет в диапазоне от белого до черного. Является более предпочтительным, чтобы маскирующий материал имел матовую поверхность.

Покрытие (маскирующий материал) может быть изготовлен с использованием технологий, известных специалистам в данной области техники. Обзор способа представлен на Фигуре 5.

Настоящее изобретение позволяет использовать стандартный прибор для точного отображения молекул, расположенных в матрице. Является предпочтительным, чтобы покрытие было нанесено с использованием технологий трафаретной печати, известных специалистам в данной области техники. Подложки обрабатывают трафаретной печатью, для обеспечения дискретных реакционных зон, которые представляют собой непокрытые области на подложке.

Является предпочтительным, чтобы дискретными реакционными зонами были только непокрытые области подложки. Это дает возможность для роботизированной программы физически размещать круговые элементы и надлежащим образом осаждают связующие вещества в конкретном местоположении. Это является особо важным при повышении плотности дискретных реакционных зон, которое может повысить общий риск отказов биочипов, расположенных по координатам x и y реакционных зон.

Термин микроматрица, используемый в настоящей работе, относится здесь к подложке, которая обладает высокой плотностью дискретных реакционных зон. Точные данные могут быть получены, с использованием приблизительно до 1000 дискретных реакционных зон на область подложки 9 мм x 9 мм. Даже при этой высокой плотности дискретных реакционных зон, получаются высококачественные пятна, имеющие четкие границы. Преимущества, такие как повышенная точность данных, видны также при более низкой плотности, такой как у подложек, имеющих 4 дискретные реакционные зоны на площадь подложки 81 мм².

Подложка может представлять собой крупную подложку микроматрицы, например, размером приблизительно 100 мм x 99 мм, в которой подложка содержит квадратные подсекции, например, те, которые обладают размером приблизительно 9 мм x 9 мм, и в которой каждая квадратная подсекция содержит сетку дискретных реакционных зон. Количество дискретных реакционных зон в каждой квадратной подсекции находится в диапазоне от 2x2 до 30x30, предпочтительно, каждая квадратная секция содержит сетку дискретных реакционных зон 5x5, 10x10, 20x20, или 30x30. Является предпочтительным, чтобы каждая дискретная реакционная зона составляла приблизительно 0,1-1 мм в диаметре.

В предпочтительном варианте воплощения, покрытие в виде маскирующего материала у кромки подложки 100mm x 99 мм отсутствует, для создания непокрытой границы. Предпочтительными являются независимые маркеры, такие как квадратные или эллиптические рисунки, изготовленные на этой области непокрытой кромки. Это предусматривает калибровку нанодозатора, для облегчения точной идентификации дискретных реакционных зон, для надлежащего осаждения связующих веществ в реакционных зонах.

Является предпочтительным, чтобы микроматрица обладала плотностью дискретных реакционных зон в диапазоне 0,08-15 зон/мм², более предпочтительно, 0,2-13 зон/мм², и даже более предпочтительно, 0,25-13 зон/мм². Высококачественные данные могут быть получены даже при этих высоких плотностях.

Является предпочтительным, чтобы подложка обладала толщиной в диапазоне 0,5-5 мм, более предпочтительно, 0,5-3 мм, наиболее предпочтительно, 0,5-1,5 мм, и даже более предпочтительно, примерно 0,5 мм.

Особо предпочтительные микроматрицы согласно изобретению обладают следующими параметрами:

Тип матрицы	Миллиметры		Плотность матрицы (число зон/мм ²)
	Диаметр окружности	Шаг между окружностями	
2×2	0,75	1,4	0,08
5×5	0,75	1,4	0,48
7×7	0,75	1,0	0,89
10×10	0,6	0,8	1,56
20×20	0,305	0,41	5,81
30×30	0,205	0,275	12,76

Является предпочтительным, чтобы квадратные подсекции разрушались под воздействием друг друга. При изготовлении подложек по настоящему изобретению, исходную подложку, изготовленную из стекла, керамики, пластика или кремния, например, подвергают лазерному скрайбированию, предпочтительно, до половины толщины подложки для обеспечения простоты разрушения.

В предпочтительном варианте воплощения, подложка содержит одно или более связующих веществ, иммобилизованных на поверхности, предпочтительно, иммобилизованных на дискретных реакционных зонах.

Молекулы, иммобилизованные на подложке, могут представлять собой любые подходящие молекулы для использования в образце аналита. Например, молекулы, расположенные в матрице, могут представлять собой полинуклеотиды, например, ДНК, РНК или их функциональные аналоги. В качестве альтернативы, могут быть использованы белки и пептиды, например, ферменты, антитела, рецепторы или гормоны. Молекулы также могут представлять собой вирусы или органические соединения.

Связующие вещества, иммобилизованные на поверхности подложки, могут представлять собой любое вещество, которое может связываться с аналитами, представляющими интерес, например, биомолекулами, в частности, с антителами, аптамерами, фагами и олигонуклеотидами, а не с такими биомолекулами, как молекулярно-импринтными полимерами. Является предпочтительным, чтобы связующие вещества, иммобилизованные на поверхности подложки, представляли собой белки. Является более предпочтительным, чтобы связующие вещества представляли собой антитела. Термин «антитела» относится к иммуноглобулинам, который специфически распознает эпитоп на мишени, как определено характеристиками связывания переменных доменов

иммуноглобулина тяжелых и легких цепей (VHS и VLS), точнее говоря, области, определяющие комплементарность (complementarity-determining regions, CDR). Из уровня техники известны многие потенциальные формы антител, которые могут включать в себя, но не ограничены, несколько интактных моноклональных антител или

5 поликлональных смесей, содержащих интактные моноклональные антитела, фрагменты антител (например, Fab, Fab' и фрагменты Fv, линейные антитела с одной цепью и мультиспецифичные антитела, содержащие фрагменты антител), одноцепочечные

10 переменные фрагменты (single-chain variable fragments, scFvs), мультиспецифичные антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела и пептидированные белки, содержащие домены, необходимые для распознавания данного эпитопа на мишени.

Специалистам в данной области техники должны быть понятны стандартные этапы изготовления, которые могут быть использованы для создания покрытой подложки согласно настоящему изобретению. Например, дискретные реакционные зоны могут быть химически активированы для обеспечения иммобилизации связующего вещества.

15 Является предпочтительным, чтобы к поверхности дискретных реакционных зон был добавлен химикат с реакционноспособными функциональными группами. Связующее вещество может быть связано с подложкой через линкер. В частности, является предпочтительным, чтобы поверхность была активирована с использованием покрытия на основе органосилана или полимера, перед осуществлением реакции со связующим

20 веществом. Подложка по настоящему изобретению может быть изготовлена согласно способу, раскрытому, например, в GB-A-2324866 (EP0874242), содержание которых полностью включено в настоящую работу. Конечно, является желательным, чтобы молекулы сохраняли максимальную активность после проведения процедуры иммобилизации. Ковалентная иммобилизация молекул может быть осуществлена с

25 использованием стандартных технологий, обычно с использованием химически активной молекулы линкера, которая может быть активирована при заданных условиях. Является предпочтительным, чтобы в настоящем изобретении была использована технология модифицирования поверхности на основе плазменной полимеризации, нанесение

30 покрытия методом центрифугирования, химическое осаждение из паровой фазы, нанесение покрытия во влажной среде и другие способы нанесения покрытия. Является более предпочтительным, чтобы в способе изготовления для иммобилизации связующих веществ было использовано силанирование. Химическое изменение может быть выполнено перед или после изготовления заданных дискретных реакционных зон.

35 Является предпочтительным, чтобы перед активацией или функционализацией подложки, подложка была подвергнута очистке поверхности.

Подложки по настоящему изобретению продемонстрированы в примерах, приведенных ниже. Эти примеры представлены лишь в качестве иллюстрации, и не должны рассматриваться как ограничивающие настоящее изобретение.

Пример 1

40 Краситель на основе эпоксидной смолы, 25 мас.%, например, Epon8111, Epon8021, Epikote 1004;

Угольный черный пигмент при 5 мас.%, например, Elftex 285, Elftex 415, Elftex 435, Elftex 460;

Диспергирующее вещество при 0,05 мас.%, например, Disperbyk 190, Disperbyk 192,

45 Disperbyk 168;

Акриловая смола при 5 мас.%, например, B-67, B-99N, DM-55,

Смачивающее вещество при 0,2 мас.%, например, SURFYNOL® 104BC, SURFYNOL® 104, SURFYNOL® 104DPM;

Структурирующее вещество при 25 мас.%, например, POLYWAX™ 3000; POLYWAX™ 400; CERAFLOR® 965;

Противовспениватель при 1 мас.%, например, BYK051, 055, 053;

Вещество для ровноты окраски при 3,75 мас.%, например, BYK-358N; BYK-355; BYK-356;

Поперечно-сшивающее вещество при 5 мас.%, например, Silquest A-2120; Silquest A-1110;

Среда растворителя при 30 мас.%, например, этанол, пропанол, ксилол, дигликоль, бутиловый эфир

Пример 2

Краситель на основе эпоксидной смолы 22 мас.%, например, Epon8021;

Угольный черный пигмент при 4 мас.%, например, Elftex 460;

Диспергирующее вещество при 0,05 мас.%, например, Disperbyk 168;

Акриловая смола при 8 мас.%, например, DM-55;

Смачивающее вещество при 0,2 мас.%, например, SURFYNOL® 104BC;

Структурирующее вещество при 20 мас.%, например, POLYWAX™ 3000;

Противовспениватель при 0,85 мас.%, например, BYK051;

Вещество для ровноты окраски при 3,9 мас.%, например, BYK-358N;

Поперечно-сшивающее вещество 6 мас.%, например, Silquest A-1110;

Среда растворителя при 35 мас.%, например, дигликоль

Пример 3

Краситель на основе эпоксидной смолы 30 мас.%, например, Epikote 1004;

Угольный черный пигмент при 5 мас.%, например, Elftex 285;

Диспергирующее вещество при 0,05 мас.%, например, Disperbyk 190;

Акриловая смола при 10 мас.%, например, B-67;

Смачивающее вещество при 0,2 мас.%, например, SURFYNOL® 104BC

Структурирующее вещество при 20 мас.%, например, CERAFLOR® 965;

Противовспениватель при 1 мас.%, например, BYK055;

Вещество для ровноты окраски при 1 мас.%, например, BYK-355;

Поперечно-сшивающее вещество при 2,75 мас.%, например, Silquest A-1110;

Среда растворителя при 30 мас.%, например, бутиловый эфир

Пример 4

Сырьевой керамический лист на основе оксида алюминия, содержащий отполированную верхнюю поверхность и не отполированную нижнюю поверхность, был подвергнут лазерному скрайбированию на нижней поверхности до половины толщины керамического листа, для обеспечения легкого разрушения в ходе сборки биочипа. Керамический лист был подвергнут очистке поверхности, с использованием водной смеси поверхностно-активного вещества, и микроволновой плазменной обработке, с использованием смеси 1:1 Ar и O₂ в течение 10 мин. Поверхность была химически активирована с помощью технологии нанесения покрытия путем влажного силанирования, с последующим термоотверждением при 140°C в течение 2 часов.

Химически функционализированная поверхность была загружена на принтер для трафаретной печати. Эмульсионный экран, содержащий желаемый шаблон микроматрицы, был загружен на принтер с краской, выбранной из примеров 1-3, приведенных выше. Конструктивный шаблон был перемещен на лист, с использованием ракеля.

Непрерывная трафаретная печать подложки была достигнута путем повторяющегося воздействия ракеля и потоковой лопатки, которая размазывает краску по экрану.

Свежеотпечатанные листы были подвергнуты термическому отверждению при 140°C в течение 20 минут, с достижением сухой отпечатанной толщины 10-20 мкм.

Керамические листы, подвергнутые воздействию трафаретной печати, были затем загружены на нанодозатор, используемый для осаждения биомолекул. Точная идентификация химически активированных дискретных реакционных зон была достигнута с помощью внутренней калибровочной метки, имеющейся на керамическом листе. Нанодозатор был использован для генерирования матрицы от 5×5 до 30×30 на основе выбранного рисунка печати.

Следующий диапазон диаметров окружности и рисунков составляли:

Тип матрицы	Миллиметры		Плотность матрицы (число зон/мм ²)
	Диаметр окружности	Шаг между окружностями	
2×2	0,75	1,4	0,08
5×5	0,75	1,4	0,48
7×7	0,75	1,0	0,89
10×10	0,6	0,8	1,56
20×20	0,305	0,41	5,81
30×30	0,205	0,275	12,76

Микроматрицы были высушены при комнатной температуре в течение 2 часов, с последующей фиксацией и стабилизацией. Микроматрицы были разрезаны и скомпонованы в несущих скважинах для запуска диагностических испытаний на анализаторах Randox (Международная система внешней оценки качества). Улучшенные данные были визуализированы с помощью цифрового датчика, с использованием технологии хемилюминесценции. Фигуры 2, 3 и 4 показывают изображения и данные, полученные из этих примеров. Фигура. 2 показывает матрицу 5×5 эталонного пятна согласно изобретению, Фигура 3 показывает матрицу 5×5 (бестиреоидиновую) согласно изобретению, а Фигура 4 показывает матрицу 5×5 (бестиреоидиновую) согласно изобретению.

(57) Формула изобретения

1. Керамическая подложка для микроматрицы, содержащая покрытие в виде маскирующего материала и несколько дискретных реакционных зон, пригодных для прикрепления одного или более связующего вещества, причем упомянутые зоны представляют собой непокрытые области на подложке, в которой маскирующий материал содержит пигмент, акриловую смолу, эпоксидную смолу и структурирующее вещество, причём структурирующее вещество представляет собой воск ПТФЭ.

2. Керамическая подложка для микроматрицы по п. 1, в которой:

пигмент, предпочтительно черный пигмент, присутствует в количестве 1-8 мас.% от маскирующего состава;

эпоксидная смола присутствует в количестве 15-50 мас.% от маскирующего состава,

акриловая смола присутствует в количестве 2-10 мас.% от маскирующего состава,

и

структурирующее вещество присутствует в количестве 15-50 мас.% от маскирующего состава.

3. Керамическая подложка для микроматрицы по п. 1 или 2, в которой

пигмент, предпочтительно черный пигмент, присутствует в количестве 5 мас.% от маскирующего состава;

эпоксидная смола присутствует в количестве 30 мас.% от маскирующего состава,

акриловая смола присутствует в количестве 10 мас.% от маскирующего состава, и

структурирующее вещество присутствует в количестве 20 мас.% от маскирующего состава.

4. Керамическая подложка для микроматрицы по любому из предшествующих пунктов, в которой связующие вещества представляют собой белки.

5 5. Керамическая подложка для микроматрицы по любому из предыдущих пунктов, в которой связующие вещества представляют собой антитела.

6. Керамическая подложка для микроматрицы по любому из предыдущих пунктов, в которой маскирующий материал не содержит кремний.

10 7. Керамическая подложка для микроматрицы по любому из предшествующих пунктов, где подложка представляет собой белую керамическую подложку.

8. Керамическая подложка для микроматрицы по любому из предшествующих пунктов, в которой маскирующий материал имеет угол контакта воды 20-175°, предпочтительно 20-170°, более предпочтительно 60-120° и наиболее предпочтительно, примерно, 90-120°.

15 9. Керамическая подложка для микроматрицы по любому из предшествующих пунктов, в которой маскирующий материал является гидрофобным.

10. Керамическая подложка для микроматрицы по любому из предшествующих пунктов, в которой покрытие маскирующего материала нанесено трафаретной печатью.

20

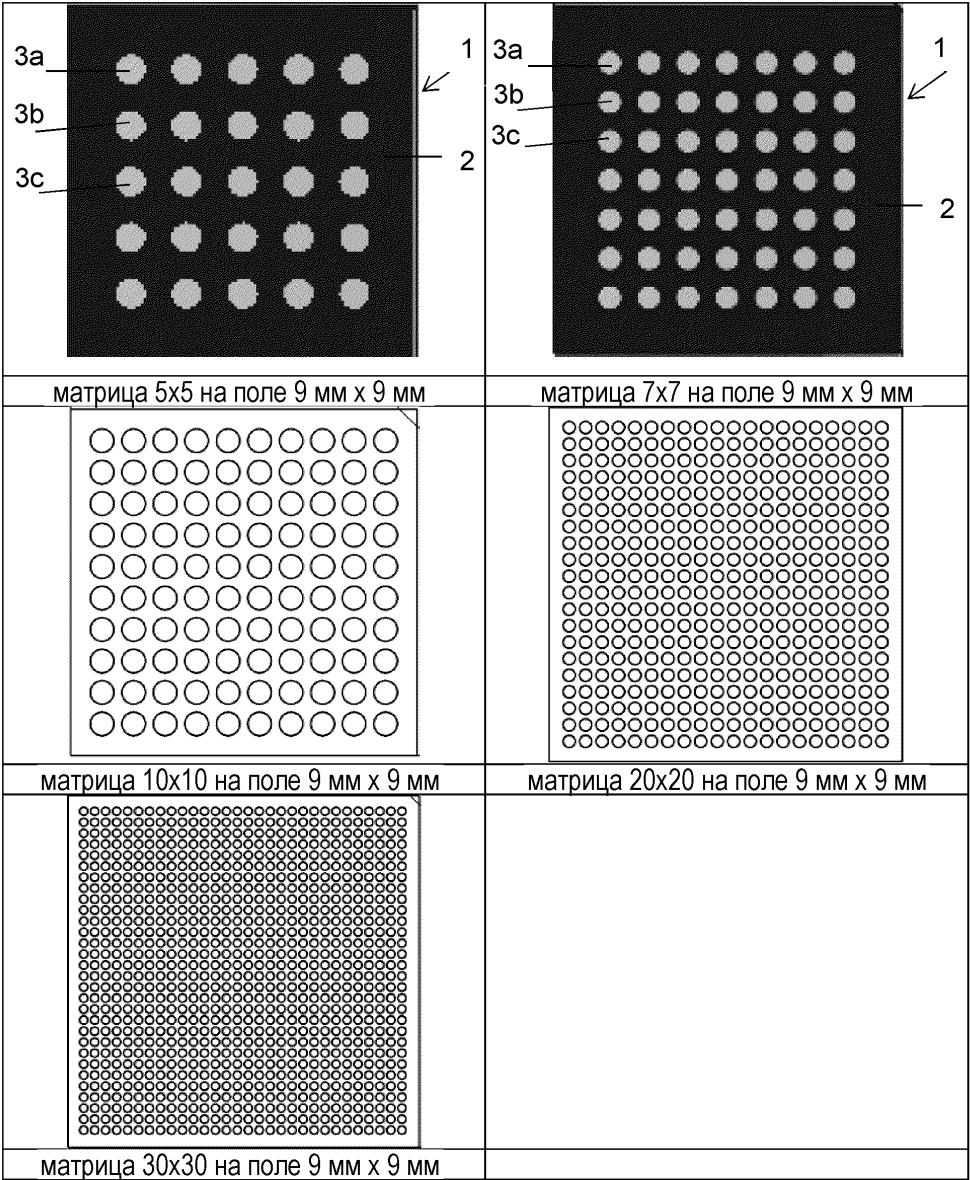
25

30

35

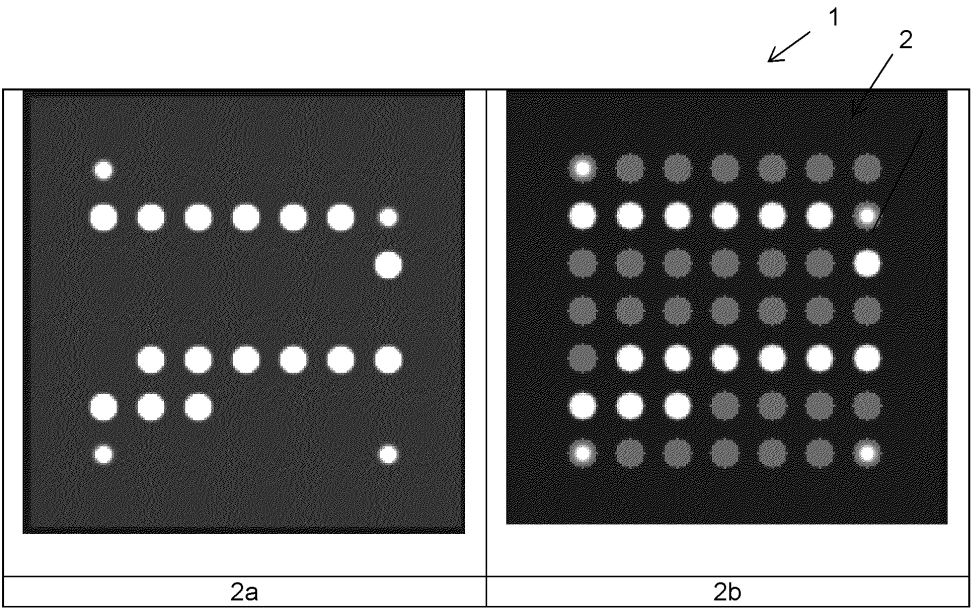
40

45

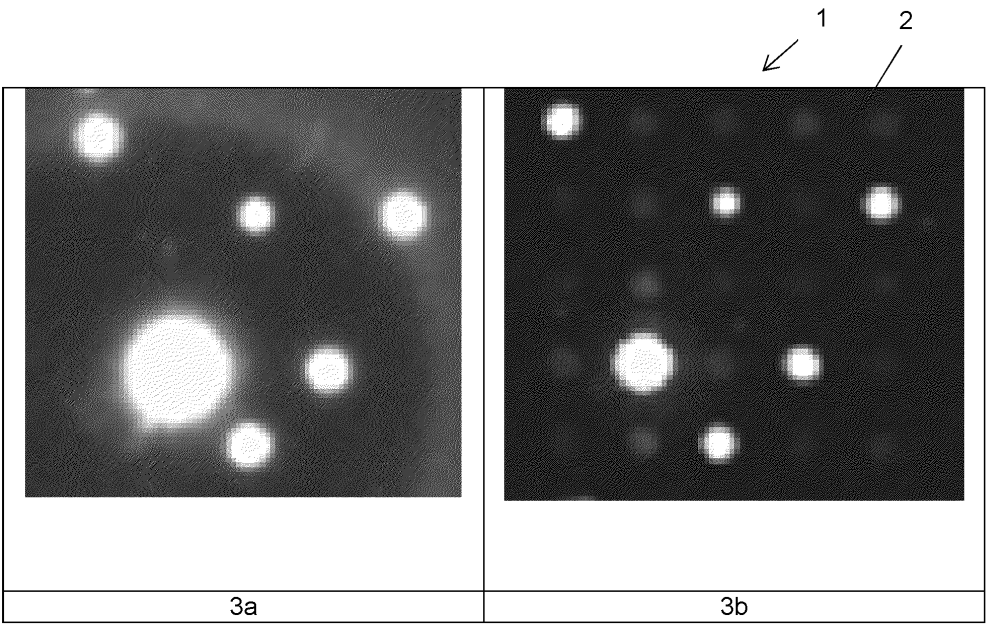


ФИГ.1

2/4

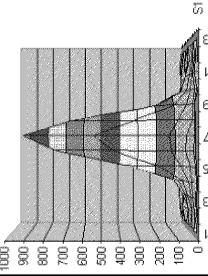
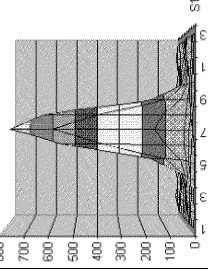
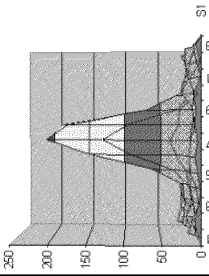
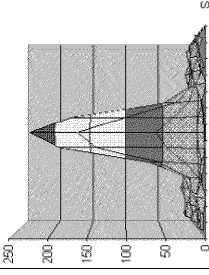
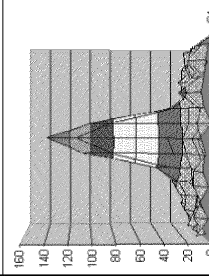
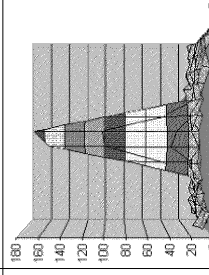
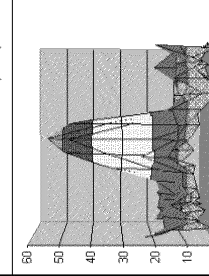
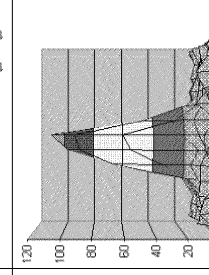


ФИГ.2

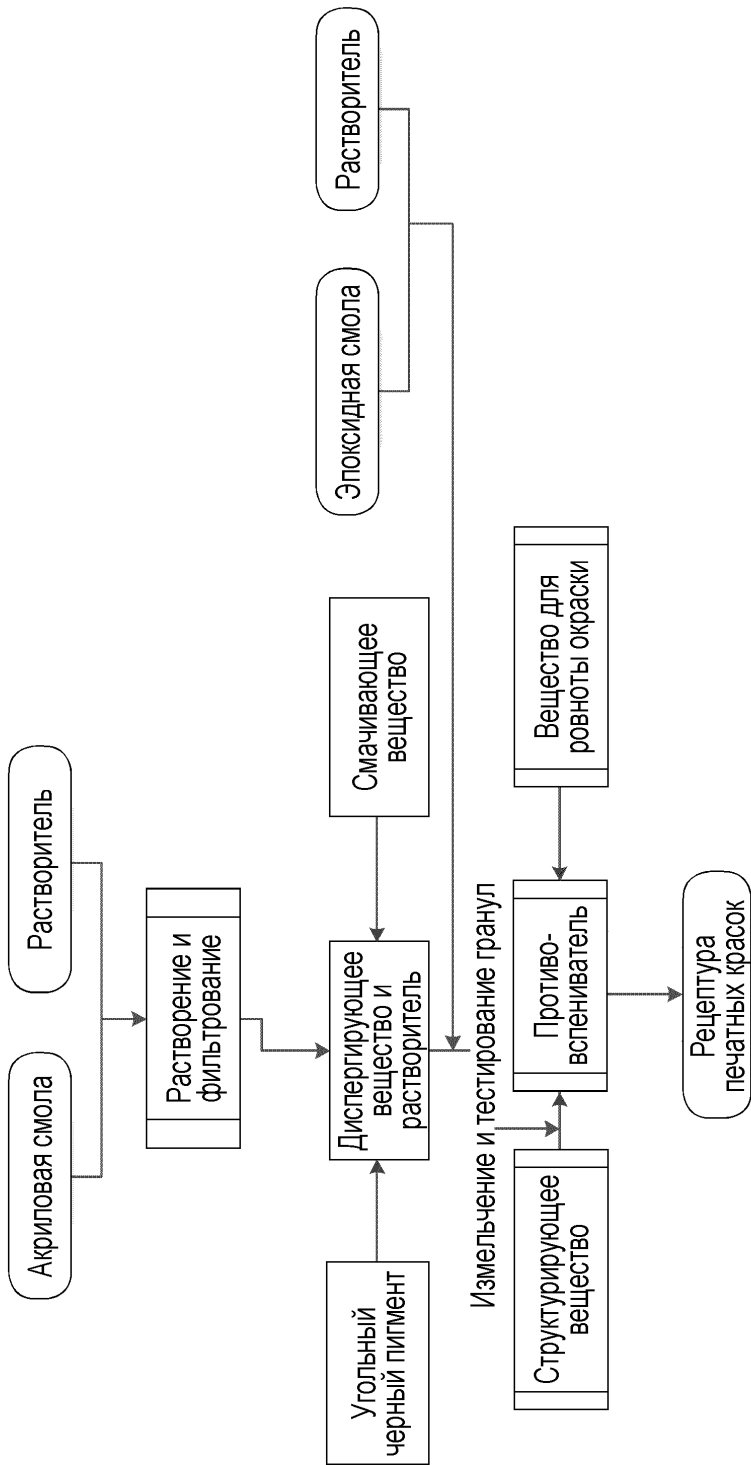


ФИГ.3

ΦNL.4

Подложка без заданных зон		Подложка без заданных зон	
ТТГ-мишень (ММЕ/л)	ТТГ (ММЕ/л)	Пиксельный график ТТГ	Сигнал/шум
0.33	0.338		75
	0.358		127
0.1	0.072		26
	0.096		41
0.05	0.044		18
	0.060		20
0.025	0.010		6
	0.020		17

4/4



ФИГ.5