



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/53 (2017.08); G01N 33/532 (2017.08)

(21)(22) Заявка: 2017124874, 12.07.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.07.2017

Дата регистрации:
23.01.2018

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 12.07.2017

(45) Опубликовано: 23.01.2018 Бюл. № 3

Адрес для переписки:
119526, Москва, пр-т Вернадского, 101, корп. 1,
ИПМех РАН, патентный отдел

(72) Автор(ы):

**Багров Валерий Владимирович (RU),
Жаботинский Владимир Александрович (RU),
Крылов Владимир Иванович (RU),
Лускинович Петр Николаевич (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Общество с ограниченной ответственностью
"Онико-М" (RU),
Общество с ограниченной ответственностью
"Техносистема НТ" (RU)**

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2456618 C2, 20.07.2012. RU
2521639 C2, 10.07.2014. RU 2530718 C2,
10.10.2014. RU 2166751 C1, 10.05.2001. RU
2528885 C2, 20.09.2014. WO 0079276 A1,
28.12.2000.

(54) Способ селективного анализа на основе иммунологических реакций с использованием биочипов

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в частности к средствам исследования и диагностики с помощью биочипов. Способ селективного анализа на основе иммунологических реакций с использованием биочипов включает подготовку пробы, смешение антигенов пробы с суперпарамагнитными частицами, соединенными с антителами к указанным антигенам пробы, транспортировку смеси в зону селективного детектирования по иммунологическим реакциям через капилляры и воздействие на смесь магнитным полем. При этом

воздействие магнитным полем осуществляют во время прохождения смеси через капилляры, перемещая его вдоль капилляров по направлению от входа в них смеси до выхода, причем используют изменяющееся во времени и в пространстве неоднородное магнитное поле. После прохождения по капиллярам смесь последовательно перемещают магнитным полем через все зоны селективного детектирования по иммунологическим реакциям. Изобретение обеспечивает повышение чувствительности. 1 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
G01N 33/53 (2017.08); *G01N 33/532* (2017.08)

(21)(22) Application: **2017124874, 12.07.2017**

(24) Effective date for property rights:
12.07.2017

Registration date:
23.01.2018

Priority:

(22) Date of filing: **12.07.2017**

(45) Date of publication: **23.01.2018** Bull. № 3

Mail address:

**119526, Moskva, pr-t Vernadskogo, 101, korp. 1,
IPMekh RAN, patentnyj otdel**

(72) Inventor(s):

**Bagrov Valerij Vladimirovich (RU),
Zhabotinskij Vladimir Aleksandrovich (RU),
Krylov Vladimir Ivanovich (RU),
Luskinovich Petr Nikolaevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennostyu
"Oniko-M" (RU),
Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennostyu
"Tekhnosistema NT" (RU)**

(54) **METHOD OF SELECTIVE ANALYSIS BASED ON IMMUNOLOGICAL REACTIONS USING BIOCHIPS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, in particular to research and diagnostic tools using biochips. Method of selective analysis based on immunological reactions using biochips includes sample preparation, mixing of sample antigens with superparamagnetic particles, connected with antibodies to said sample antigens, transporting the mixture to the selective detection zone by immunological reactions through capillaries and exposing the mixture to a magnetic field. In this case, the action of the magnetic

field is carried out during the passage of the mixture through the capillaries, moving it along the capillaries in the direction from the entrance of the mixture to the outlet, and an inhomogeneous magnetic field that varies in time and space is used. After passing through the capillaries, the mixture is subsequently moved by a magnetic field through all zones of selective detection according to immunological responses.

EFFECT: invention enables increased sensitivity.

1 cl, 1 dwg

Изобретение относится к медицине, частности к средствам исследования и диагностики с помощью биочипов.

Биологические микрочипы широко используются в диагностике. В основе механизма действия биочипов лежит молекулярное распознавание анализируемых молекул молекулами биополимерами, нанесенными на чип. Это распознавание построено либо на взаимодействии рецепторов с лигандами (например, антител с антигенами), либо на гибридизации комплементарных цепей ДНК. В частности, разработаны биочипы, распознающие короткие олигонуклеотидные последовательности и позволяющие детектировать единичные мутации в генах. Известен способ исследования нуклеиновых кислот и белков с использованием биочипов (DE 10314746). Способ предусматривает подготовку биологической пробы и добавление в нее магнитных частиц с антителами, селективно связывающихся с возбудителями инфекций. В результате перемешивания смеси антитела селективно соединяются с возбудителями инфекций.

После окончания перемешивания смесь перемещают в зону селекции, представляющую собой подложку, на различных частях поверхности которой размещены различные группы антител (моно- или поликлональных) селективно связывающихся с возбудителями инфекций. Измеряя в микроскоп сравнительно (относительно возбудителей инфекций) крупные магнитные частицы через антитела и антигены, связанные с подложкой, определяют тип возбудителей инфекций.

Недостатком известного способа является низкая чувствительность из-за высокого уровня помех, создаваемых антигенами, несвязавшимися при перемешивании с соответствующими антителами соединенными с магнитными частицами.

Известен способ проведения анализов с помощью биочипа (KR 20130093323).

Способ предусматривает подготовку пробы и добавление в нее магнитных наночастиц. Полученная смесь помещается в зону селекции, например на подложку, под которой размещают постоянный магнит. В результате частицы анализатора с соединенными с ними магнитными частицами фиксируются на подложке, подложка высушивается, а ее содержимое исследуется. Распределение анализируемых частиц на подложке зависит от целого ряда факторов. Это и вещество, форма и размеры наночастиц, параметры магнитного поля и т.д., что увеличивает вероятность ошибки при распознавании типа возбудителей инфекции.

Наиболее близким к заявляемому является известный способ анализа заболеваний или патогенных микроорганизмов с применением биочипа и с использованием существующих методов хемилюминесцентного биотестирования, используемых в крупных клинических лабораторных системах (US 2005221281).

Способ предусматривает подготовку пробы, смешение пробы с суперпарамагнитными частицами, соединенными антителами с биоматериалом пробы, транспортировку смеси в зону селекции через капилляры. При этом, чтобы обеспечить транспорт смеси через капилляр, используют средства создания давления на жидкость (шприц, вантуз, микроактюатор и т.д.). После прохождения капилляров и попадания в зону селекции на смесь воздействуют магнитным полем, в результате чего комплексы из суперпарамагнитных частиц, соединенных антителами с биоматериалом пробы, «прилипают» к поверхности кюветы. После прохождения пробы поверхность кюветы промывается для удаления непрореагировавших остатков и выделенные частицы подвергаются анализу.

Недостатками данного способа являются большой уровень помех, создаваемых антигенами, несоединившимися через антитела с магнитными частицами в зоне пробоподготовки. Данные частицы захватываются антителами, фиксированными на

подложке в зоне селективного детектирования, и блокируют в данном месте захват антител с магнитными частицами, которые детектируются в микроскопе. В результате размер зоны детектирования уменьшается, что приводит к уменьшению чувствительности детектирования данным способом.

5 Заявляемый способ направлен на повышение чувствительности детектирования.

Указанный результат достигается тем, что способ селективного анализа на основе иммунологических реакций с использованием биочипов включает подготовку пробы, смешение суперпарамагнитных частиц, соединенных антителами с антигенами пробы, транспортировку смеси в зону селективного детектирования по иммунологическим
10 реакциям через капилляры и воздействие на смесь магнитным полем. При этом воздействие магнитным полем осуществляют во время прохождения смеси через капилляры, перемещая его вдоль капилляров по направлению от входа в них смеси до выхода и используя изменяющееся во времени и в пространстве неоднородное магнитное поле.

15 Отличительными признаками заявляемого способа являются:

- воздействие магнитным полем осуществляют во время прохождения смеси через капилляры, перемещая его вдоль капилляров по направлению от входа в них смеси до выхода;

- используют изменяющееся во времени и в пространстве неоднородное магнитное
20 поле, перемещаемое вдоль капилляров по направлению от входа в них смеси до выхода.

После перемешивания в зоне пробоподготовки часть антигенов пробы может быть не соединена через антитела с суперпарамагнитными частицами. На данные комплексы магнитное поле не действует, и большая их часть останавливается в мертвой пристеночной зоне капилляров, не достигая зоны селективного детектирования по
25 иммунологическим реакциям. На другую часть, с суперпарамагнитными частицами, действует внешнее магнитное поле, перемещающее суперпарамагнитные частицы, соединенные через антитела с антигенами пробы. В результате действия данной фильтрации в зоне селективного детектирования по иммунологическим реакциям
30 уменьшается количество антигенов пробы без суперпарамагнитных частиц, уменьшающих чувствительность данного способа детектирования.

Повышение чувствительности обеспечивается наличием «микрофлюидного эффекта» - формирования мертвой зоны на стенках капилляров. Эффект заключается в следующем.

35 Все материалы из зоны пробоподготовки перемещаются по капиллярам в зону диагностики. Перемещение осуществляется под воздействием диффузии, градиента давления, межатомного взаимодействия. Движение внутри капилляра характеризуется возникновением пристеночной мертвой зоны, в которой частицы практически не перемещаются, поскольку силы взаимодействия с неподвижными атомами стенки препятствуют перемещению частиц.

40 Однако воздействие магнитного поля на суперпарамагнитные частицы создает силы, превосходящие силы взаимодействия, препятствующие перемещению частиц вдоль капилляра. В результате перемещающееся вдоль капилляра магнитное поле будет «тянуть» за собой суперпарамагнитную частицу и соединенные с ней антигены пробы и антитела. Скорость перемещения суперпарамагнитных частиц в результате
45 многократно превышает скорости перемещения непрореагировавших частиц. В результате концентрация суперпарамагнитных частиц на выходе из капилляра становится многократно большей, что уменьшает вероятность ошибки при диагностировании.

Таким образом осуществляется фильтрация (отсев, селекция) непрореагировавших частиц, перемещаемых к зоне селективной детектирования по иммунологическим реакциям.

5 Воздействие неоднородным магнитным полем осуществляют во все время прохождения смеси по капиллярам, перемещая его вдоль капилляров по направлению от входа в них смеси до выхода.

В каждой из областей селективного детектирования по иммунологическим реакциям находятся антитела только определенного типа. Для дальнейшего повышения чувствительности смесь после прохождения по капиллярам последовательно
10 перемещают магнитным полем через все зоны селективного детектирования по иммунологическим реакциям. Таким образом уменьшаются потери антигенов пробы по сравнению с традиционным методом анализа, при котором анализируемые антигены пробы равномерно распределялись по всем областям селективного детектирования.

15 Сущность заявленного способа поясняется примером реализации и фиг. 1, на которой схематично показано течение пробы от зоны подготовки к зоне селекции по капилляру (микроканалу). На фиг. 1 цифрами обозначены: 1 - капилляр; 2 - мертвая зона для микрофлюидного потока; 3 - отдельная суперпарамагнитная частица; 4 - антитело; 5 - антиген пробы; 6 - комплекс, состоящий из антигена пробы, антитела и суперпарамагнитной частицы; 7 - направление вектора силы, действующего на
20 суперпарамагнитную частицу в результате воздействия поля.

Способ реализуется следующим образом.

Биочип состоит из 3-х зон:

- пробоподготовки,
- селекции по суперпарамагнитным частицам (обеспечивается пропуск только их и
25 соединенных с ними антигенами пробы и антителами дальше),
- селекции по иммунологическим реакциям и оптического детектирования.

В зону пробоподготовки вводят:

- антитела, соединенные посредством стрептавидина с суперпарамагнитными
30 частицами;
- антигены пробы.

Ввод данных биологических материалов осуществляют шприцем.

В зоне пробоподготовки осуществляют перемешивание антигенов пробы и соединение их с антителами (предварительно соединенными с суперпарамагнитными частицами). Перемешивание осуществляют перемещающимся внешним магнитным полем.

35 В зоне селекции по суперпарамагнитным частицам осуществляется перемещение комплексов 6 «суперпарамагнитная частица + антиген пробы + с антителом». Перемещение этих комплексов с суперпарамагнитными частицами осуществляют транспортировкой по капиллярам при воздействии на поток внешним перемещающимся магнитным полем. Остальные частицы вследствие микрофлюидного эффекта
40 задерживаются в «мертвом» пристеночном слое.

Из данной зоны селекции выходят в основном только суперпарамагнитные частицы, соединенные с антигенами пробы.

В зоне селекции и детектирования проходят иммунологические селективные реакции соединения антигенов пробы и антител. Для этого осуществляют последовательное
45 перемещение суперпарамагнитных частиц (связанных с антителами и антигенами пробы) внешним магнитным полем через различные секции с антителами. При перемещении через секции производятся селективные иммунологические реакции и их соединение с антителами, закрепленными на подложке. В результате данных реакций закрепленными

на подложке становятся и суперпарамагнитные частицы. Размеры суперпарамагнитных частиц и их оптический контраст многократно превышают по данным характеристикам бактерии и вирусы. Измеряя оптическим способом наличие закрепленных на подложке суперпарамагнитных частиц и их концентрацию, определяют количественные и

5

качественные результаты иммунологических реакций. В современных биочипах антигены пробы распределяют равномерно по зонам детектирования. При этом доля антигенов пробы в ячейке с соответствующими антителами уменьшается в количество секций раз. С целью повышения чувствительности антигены пробы, соединенные с суперпарамагнитными частицами, перемещают

10

последовательно от одной детектирующей секции к другой и т.д. Поэтому при перемещении антигенов пробы через соответствующую зону концентрация антигенов пробы, перемещенных в соответствующую зону, не уменьшается.

(57) Формула изобретения

15

Способ селективного анализа на основе иммунологических реакций с использованием биочипов, включающий подготовку пробы, смешение антигенов пробы с суперпарамагнитными частицами, соединенными с антителами к указанным антигенам пробы, транспортировку смеси в зону селективного детектирования по

20

иммунологическим реакциям через капилляры и воздействие на смесь магнитным полем, отличающийся тем, что воздействие магнитным полем осуществляют во время

25

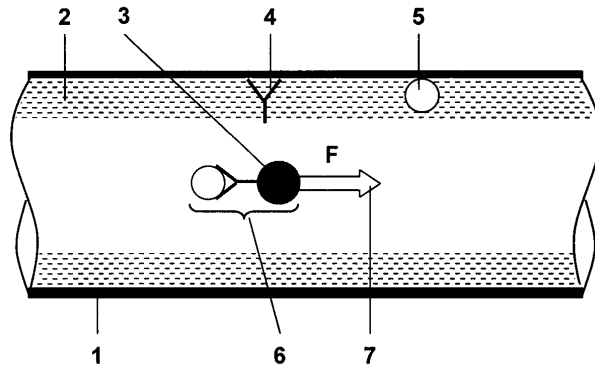
прохождения смеси через капилляры, перемещая его вдоль капилляров по направлению от входа в них смеси до выхода, при этом используют изменяющееся во времени и в пространстве неоднородное магнитное поле, причем после прохождения по капиллярам смесь последовательно перемещают магнитным полем через все зоны селективного

30

35

40

45



Фиг. 1