

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С
ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро



(43) Дата международной публикации
30 октября 2008 (30.10.2008)

РСТ

(10) Номер международной публикации
WO 2008/130263 A1

(51) Международная патентная классификация:
C07H 15/10 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
C08L 3/00 (2006.01) *C12N 11/00* (2006.01)
C08J 3/00 (2006.01) *G01N 33/531* (2006.01)

(21) Номер международной заявки: РСТ/RU2007/000196

(22) Дата международной подачи:
20 апреля 2007 (20.04.2007)

(25) Язык подачи: Русский

(26) Язык публикации: Русский

(71) Заявитель (для всех указанных государств, кроме
US): ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ
ИМ. В.А.ЭНГЕЛЬГАРДТА РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК (INSTITUT MOLEKUL-
YARNOI BIOLOGII IM V.A. ENGELDARDTA
ROSSISKOI AKADEMII NAUK) [RU/RU]; ул.
Вавилова, д. 32, Москва, 119991, Moscow (RU).

(72) Изобретатели; и

(75) Изобретатели/Заявители (только для US):
ПАНЬКОВ Сергей Васильевич (PANKOV, Sergei
Vasilievich) [RU/RU]; Севастопольский пр., д. 3, к.
8, кв. 24, Москва, 117152, Moscow (RU). РУБИНА
Алла Юрьевна (RUBINA, Alla Yurievna) [RU/RU];
Ленинский пр., д. 91, к. 4, кв. 660, Москва, 117313
Moscow (RU). СОМОВА Ольга Георгиевна (SO-
MOVA, Olga Georgievna) [RU/RU]; ул. Перовская,
д. 38, к. 1, кв. 20, Москва, 111141, Moscow (RU).
МОИСЕЕВА Ольга Владимировна (MOISEEVA,
Olga Vladimirovna) [RU/RU]; ул. Перовская, д. 9,
кв. 47, Москва, 111141, Moscow (RU). ЧЕЧЕТКИН
Владимир Романович (CHECHETKIN, Vladimir
Romanovich) [RU/RU]; ул. Сиреневый бульвар, д. 10,
кв. 3, Троицк, Московская обл., 142190, Troitsk (RU).
СОРОКИН Николай Владимирович (SOROKIN,
Nikolai Vladimirovich) [RU/RU]; Алтуьевское ш.,
д. 42а, кв. 74, Москва, 111141, Moscow (RU).

ДОННИКОВ Максим Юрьевич (DONNIKOV,
Maxim Yurievich) [RU/RU]; ул. Дружбы Народов,
д. 82, кв. 1, п. Чертково, Ростовская обл., 346000,
р. Chertkovo (RU). БУТВИЛОВСКАЯ Вероника
Игоревна (BUTVILOVSKAYA, Veronika Ig-
orevna) [RU/RU]; ул. Чапаева, д. 7, Невинномысск,
Ставропольский край, 357101, Nevinnomyssk (RU).
КОНОВАЛОВА Елизавета Владимировна (KONO-
VALOVA, Elizaveta Vladimirovna) [RU/RU]; пр.
Королева, д. 3в, кв. 32, Королев, Московская обл.,
141070, Korolev (RU). ЗАСЕДАТЕЛЕВ Александр
Сергеевич (ZASEDATELEV, Alexandr Sergeevich)
[RU/RU]; ул. Цюрупы, д. 7, к. 2, кв. 17, Москва,
117418, Moscow (RU).

(74) Агент: ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "СОЮЗПАТЕНТ"
(OBSHESTVO S OGRANICHENNOI OTVET-
STVENNOSTJU "SOJUZPATENT"); ул. Ильинка, д.
5/2, Москва, 103735, Moscow (RU).

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для
каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KR, KZ, LA,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,
MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM,
SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для
каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), европейский патент (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,

[продолжение на следующей странице]

(54) Title: MONOMER AND COMPOSITION FOR PRODUCING LOW-PERCENTAGE HYDROGEL AND/OR HYDROGEL
HAVING A LOW CROSS LINKAGE CONTENT, A HYDROGEL AND A BIOCHIP BASED THEREON

(54) Название изобретения: МОНОМЕР И КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НИЗКОПРОЦЕНТНОГО ГИДРОГЕЛЯ
И/ИЛИ ГИДРОГЕЛЯ С НИЗКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ПОПЕРЕЧНЫХ "СШИВОК", ГИДРОГЕЛЬ И БИОЧИП НА ЕГО
ОСНОВЕ

(57) Abstract: The invention relates to molecular biology and bioorganic chemistry, in particular to hydrogels based on cross-linked
polymers with oligonucleotides, proteins, nucleic acids or any other biologically significant compounds which are immobilised
therein, and to biochips which are based on the inventive hydrogels and are used in molecular biology for DNA sequencing and
mapping, for detecting mutations, in analytical chemistry, for immunoassay and in many other medical applications.

(57) Реферат: Изобретение относится к области молекулярной биологии, биоорганической химии и касается гидрогелей
на основе сетчатых полимеров с иммобилизованными в них олигонуклеотидами, белками, нуклеиновыми кислотами
или любыми другими биологически значимыми соединениями, а также биочипов на основе предлагаемых гидрогелей,
используемых в молекулярной биологии при секвенировании и картировании ДНК, детектировании мутаций, в
аналитической биохимии, при проведении иммуноанализа и ряда других медицинских приложений.



WO 2008/130263 A1



MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

Опубликована:

— с отчётом о международном поиске

Мономер и композиция для получения низкопроцентного гидрогеля и/или гидрогеля с низким содержанием поперечных “сшивок”, гидрогель и биочип на его основе.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области молекулярной биологии, биоорганической химии и касается гидрогелей на основе сетчатых полимеров с иммобилизованными в них олигонуклеотидами, белками, нуклеиновыми кислотами или любыми другими биологически значимыми соединениями, а также биочипов на основе предлагаемых гидрогелей, используемых в молекулярной биологии при секвенировании и картировании ДНК, детектировании мутаций, в аналитической биохимии, при проведении иммуноанализа и ряда других медицинских приложений.

Уровень техники

Известны гидрогели с иммобилизованными биологически активными соединениями на основе сетчатых полимеров, получаемые методом радикальной полимеризации акриламида, метакриламида, N-[трис(гидроксиметил)метил]акриламида, 2-гидроксиэтилметакрилата в присутствии модифицированных или немодифицированных биологически значимых соединений и различных “сшивающих” агентов, таких как: N,N'-метиленбисакриламид, N,N'-(1,2-дигидроксиэтиленбисакриламид), полиэтиленгликольдиакрилат (ПЭГДА) и N,N'-диаллилзамещенный диамид винной кислоты (патенты US 5932711, RU 2175972, US 6656725, RU 2206575, RU 2216547).

Известно, что кислород воздуха ингибирует полимеризацию перечисленных выше мономеров, и для получения гидрогелей с достаточной механической прочностью, при полимеризации на воздухе, необходимо значительно увеличивать общее содержание мономера и сшивающего агента до 10% и выше, как в патенте US 5932711. В данных условиях степень иммобилизации биологически значимого соединения при иммобилизации в капле объемом 1-2 нл не превышает 10%.

Проблема ингибирования полимеризации перечисленных выше мономеров и “сшивающих” агентов кислородом воздуха снимается при полимеризации в атмосфере инертного газа (азот, аргон, углекислый газ и т.д.). В таких условиях можно получить гели с общим содержанием мономера и сшивающего агента $\geq 3\%$, доля сшивающего

агента может быть снижена до 3% (патенты RU 2206575, RU 2216547), а степень иммобилизации в капле объемом 1-2 нл повышена до 50-60%.

Однако для решения ряда задач по гибридизации на гелевых элементах биочипа больших фрагментов ДНК, для увеличения выхода полимеразной цепной реакции при проведении ПЦР на гелевых элементах биочипа, а также для повышения чувствительности количественного иммуноанализа на гелевых элементах биочипа, необходимо получение гидрогелей, пористость которых выше, чем у известных аналогов. Повышения пористости возможно достичь за счет значительного уменьшения в композиции для изготовления гелей содержания “сшивающего” агента или мономера и “сшивающего” агента одновременно. Полимеризация таких композиций не может быть осуществлена с использованием известных композиций (патенты US 5932711, RU 2175972, US 6656725, RU 2206575, RU 2216547), а требует специальных подходов.

Поставленная задача решается предлагаемым изобретением.

Раскрытие изобретения

В результате проведенных обширных научных исследований авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что в качестве мономера для получения низкопроцентных гидрогелей и гидрогелей с низким содержанием поперечных “сшивок” может быть использовано производное на основе О-замещенного сахара и/или N-замещенного аминсахара, содержащее при гидроксильной или аминогруппе, соответственно, непредельный остаток.

В данном изобретении предлагаются низкопроцентные гидрогели и гидрогели с низким содержанием поперечных “сшивок” с иммобилизованными в них олигонуклеотидами, белками, нуклеиновыми кислотами или другими биологически значимыми соединениями, получаемые при химически или фотохимически инициируемой радикальной полимеризации композиций с низким содержанием сшивающего агента или мономера и сшивающего агента одновременно.

Гидрогели с новыми свойствами могут быть получены при химическом или фотохимическом инициировании полимеризации композиций с новыми мономерами на основе N-замещенных аминсахаров и О-замещенных сахаров, используя известные способы изготовления биочипов (патенты RU 2206575, RU 2216547).

Таким образом, в своем первом аспекте настоящее изобретение относится к мономеру для получения низкопроцентного гидрогеля и/или гидрогеля с низким

содержанием поперечных “сшивок”, который представляет собой производное на основе О-замещенного сахара и/или N-замещенного аминосахара, содержащее при гидроксильной или аминогруппе, соответственно, неопределенный остаток.

В одном из воплощений сахар представляет собой низкомолекулярное соединение класса углеводов, выбранное из группы, состоящей из моносахаридов и олигосахаридов. В предпочтительном воплощении сахар представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из сахарозы, D-глюкозы, D-аллозы, D-альтروزы, D-маннозы, D-гулозы, D-идозы, D-талозы, D-фруктозы, D-рибозы, D-арабинозы, D-ксилозы, D-лихсозы, D-эритрулозы, D-рибулозы, D-ксилулозы, D-психозы, D-сорбозы, D-магатозы или их дезоксианалога, или их аналога с L конфигурацией, или смеси изомеров с L и D конфигурациями.

В следующем воплощении аминосахар представляет собой природный или синтетический сахар, в котором одна или несколько гидроксильных групп заменены на аминогруппу. В предпочтительном воплощении аминосахар представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из 2-амино-2-дезоксид-глюкозы, 2-амино-2-дезоксид-аллозы, 2-амино-2-дезоксид-альтروزы, 2-амино-2-дезоксид-маннозы, 2-амино-2-дезоксид-гулозы, 2-амино-2-дезоксид-идозы, 2-амино-2-дезоксид-талозы, 2-амино-2-дезоксид-галактозы, или их аналога с L-конфигурацией, или смеси изомеров с D и L конфигурацией.

В следующем воплощении в мономере в качестве неопределенного остатка содержится группа, содержащая кратную связь, способную вступать в реакцию фото- или химически иницируемой полимеризации. В предпочтительном воплощении в качестве неопределенного остатка используют метакрильную, акрильную, винильную, аллильную, 4-винилбензоильную, или метилен-4-фениленвинильную группу.

В своем следующем аспекте изобретение относится к композиции (К) для получения низкопроцентного гидрогеля и/или гидрогеля с низким содержанием поперечных “сшивок”, содержащей:

М-мономер настоящего изобретения, составляющий основу формируемого геля;

С-сшивающий агент;

Р-растворитель.

В одном из воплощений в качестве мономера (**М**) дополнительно используют, по меньшей мере, один другой неопределенный мономер. В предпочтительном воплощении в качестве, по меньшей мере, одного другого неопределенного мономера

используют соединение, выбранное из группы, включающей метакриламид, акриламид, 2-гидроксиэтилметакрилат и 2-гидроксиэтилметакриламид.

В следующем воплощении в качестве сшивающего агента (С) используют, по меньшей мере, одно неопределенное соединение, содержащее две и более кратных связи. В предпочтительном воплощении в качестве, по меньшей мере, одного неопределенного соединения используют соединение, выбранное из группы, включающей *N,N'*-метиленбисакриламид, *N,N'*-(1,2-дигидроксиэтилен)бисакриламид, полиэтиленгликольдиакрилат.

В следующем воплощении растворитель (Р) представляет собой раствор органического и/или неорганического соединения. В предпочтительном воплощении растворитель выбирают из группы, состоящей из водного раствора глицерина, сахара, бетаина, полиспирта; раствора глицерина, сахара, бетаина или полиспирта в диметилсульфоксиде (ДМСО); раствора глицерина, сахара, бетаина или полиспирта в диметилформамиде (ДМФА).

В еще одном из воплощений композиция настоящего изобретения дополнительно содержит, по меньшей мере, один инициатор и/или промотор полимеризации (Ини). В предпочтительном воплощении инициатор и/или промотор полимеризации представляет собой инициатор для химически инициируемой полимеризации и/или промотор для фотоинициированной полимеризации. В наиболее предпочтительном воплощении, по меньшей мере, один инициатор и/или промотор полимеризации выбирают из группы, состоящей из персульфата аммония, персульфата калия, пероксида водорода, бензоилпероксида, азоизобутиронитрила (AIBN), метиленового синего, флуоресцеина, *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамина, 4-(*N,N*-диметиламино)пиридина, триэтиламина и ацетона.

В еще одном из воплощений композиция настоящего изобретения дополнительно содержит, по меньшей мере, один ингибитор полимеризации (Инг). В предпочтительном воплощении, по меньшей мере, один ингибитор полимеризации (Инг) представляет собой соединение, предотвращающие спонтанную полимеризацию. В наиболее предпочтительном воплощении, по меньшей мере, одно соединение, предотвращающее спонтанную полимеризацию, представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из *n*-бензохинона, *o*-нитрофенола, *p*-нитрофенола, нитробензола, *o*-динитробензола, *m*-динитробензола и *p*-динитробензола.

В следующем воплощении композиция настоящего изобретения дополнительно содержит, по меньшей мере, один флуоресцентный краситель (Кр). В

предпочтительном воплощении в качестве, по меньшей мере, одного красителя используют краситель, выбранный из группы, состоящей из Texas Red, флуоресцеина, Cy 5, Cy 3, BODIPY.

В еще одном из воплощений настоящего изобретения композиция дополнительно содержит биологически значимое соединение (Б). В предпочтительном воплощении биологически значимое соединение (Б) способно к иммобилизации в гидрогеле в момент его формирования. В наиболее предпочтительном воплощении композиция настоящего изобретения содержит в качестве биологически значимого соединения, по меньшей мере, одно соединение, выбранное из группы, состоящей из олигонуклеотида, нуклеиновой кислоты, белка, олигосахарида, антитела или низкомолекулярного лиганда.

В своем следующем аспекте настоящее изобретение относится к гидрогелю, представляющему собой низкопроцентный гидрогель и/или гидрогель с низким содержанием поперечных “сшивок”, полученный путем фото- или химически индуцированной полимеризации композиции настоящего изобретения.

В еще одном своем аспекте настоящее изобретение относится к биочипу, представляющему собой подложку с иммобилизованным на нем слоем гидрогеля в соответствии с настоящим изобретением.

В одном из воплощений биочип характеризуется тем, что слой гидрогеля представляет собой сплошной слой.

В альтернативном воплощении биочип характеризуется тем, что слой гидрогеля разделен пустыми промежутками на ячейки. В предпочтительном воплощении ячейки образуют регулярную одномерную или двумерную структуру (массив).

В следующем воплощении биочип характеризуется тем, что слой геля содержит по меньшей мере одно иммобилизованное биологически значимое соединение. В одном из предпочтительных воплощений иммобилизация по меньшей мере одного биологически значимого соединения в слое гидрогеля осуществляется в момент формирования гидрогеля при химически- и фотохимически инициированной полимеризации. В другом из предпочтительных воплощений иммобилизация, по меньшей мере, одного биологически значимого соединения в слое гидрогеля осуществляется после того, как гидрогель сформирован.

В еще одном из воплощений биочип характеризуется тем, что каждая гидрогелевая ячейка биочипа содержит иммобилизованный флуоресцентный краситель.

Краткий перечень фигур

Далее изобретение будет подробнее раскрыто со ссылкой на фигуры, на которых:

Фиг. 1. показывает внешний вид гелевых элементов биочипов (А,Б), полученных методом фотоинициируемой полимеризации композиций К1-К84 (см. табл.). Биочипы (А, Б) получены в соответствии с примером 2 (способ 1). Фотографии получены в видимом проходящем свете.

Фиг. 2 показывает результат гибридизации флуоресцентно меченного зонда (126 н.о.) на олигонуклеотидном биочипе, изготовленном с использованием композиций К85, К86.

Олигонуклеотиды 5'-TTC TGG TCC ATG AAT TGG-OCH₂CH(CH₂OH)(CH₂)₄-NH₂ (А) и 5'-GTT CTG GTC TAT GAA TTG G -OCH₂CH(CH₂OH)(CH₂)₄-NH₂ (Б) иммобилизовались в гидрогелях, изготовленных на основе композиций К85, К86. Композиции К85 и К86 полимеризовались в соответствии с примером 2 (способ 1). Полученные биочипы гибридизовались в течение 3 часов с флуоресцентно меченным зондом (126 н.о.), полностью комплементарным иммобилизованному олигонуклеотиду (А).

Фиг. 3 иллюстрирует сравнительную эффективность прохождения асимметричной мультиплексной ПЦР на гелевых элементах биочипа. Гелевые элементы получены на основе одной из известных в литературе композиций (К87) (патент RU 2216547) и одной из заявляемых композиций (К86) (см. табл. 1). Об эффективности прохождения ПЦР свидетельствует величина флуоресцентного сигнала, получаемого с элемента биочипа после прохождения реакции.

Фиг. 4 (А) отображает вид кинетических кривых (рост флуоресцентного сигнала во времени), полученных в гелях различного состава для образования бинарного комплекса антиген-антитело. В качестве антигена был выбран серологический онкомаркер рака простаты (PSA), меченный флуоресцентным красителем Cy5. В гелях на основе композиций К88-К91, иммобилизованы моноклональные антитела к этому маркеру в равных концентрациях. Во всех гелях в качестве основного мономера использовали 2-метакриламидо-2-дезоксид-Д-глюкозу.

Фиг. 4 (Б) демонстрирует флуоресцентное изображение микрочипа после проведения анализа.

Осуществление изобретения

В данном изобретении предлагаются мономеры на основе О-замещенных сахаров и N-замещенных аминсахаров для получения гидрогелей методом фото- или химически иницируемой полимеризации. Природа мономеров такова, что позволяет получать низкопроцентные гидрогели и гели с низким содержанием поперечных “сшивок” используя известные способы изготовления биочипов (патенты RU 2206575, RU 2216547).

Непредельная группа мономера представляет собой метакрильную, акрильную, винильную, аллильную, 4-винилбензоильную, метилен-4-фениленвинильную или любую другую, способную вступать в реакцию фото- или химически иницируемой полимеризации и находящуюся при атоме кислорода в сахарах и атоме азота в аминсахарах.

Сахара представляют собой низкомолекулярные соединения класса углеводов, конкретно – моносахариды и олигосахариды (А. Терней, Современная органическая химия, т. 2, М.: Мир, 1981, с. 420, 453), такие как, например: сахароза, D-глюкоза, D-аллоза, D-альтроза, D-манноза, D-гулоза, D-идоза, D-талоза, D-фруктоза, D-рибоза, D-арабиноза, D-ксилоза, D-ликсоза, D-эритрулоза, D-рибулоза, D-ксилулоза, D-псикоза, D-сорбоза, D-магатоза или их дезоксианалоги, или аналоги с L конфигурацией, или смеси изомеров с L и D конфигурациями.

Аминсахара представляют собой природные или синтетические сахара, в которых одна или несколько гидроксильных групп заменены на аминогруппу, например: 2-амино-2-дезоксид-D-глюкоза, 2-амино-2-дезоксид-D-аллоза, 2-амино-2-дезоксид-D-альтроза, 2-амино-2-дезоксид-D-манноза, 2-амино-2-дезоксид-D-гулоза, 2-амино-2-дезоксид-D-идоза, 2-амино-2-дезоксид-D-талоза, 2-амино-2-дезоксид-D-галактоза или их аналоги с L-конфигурацией или смеси изомеров с D и L конфигурацией.

О- и N-замещенные сахара и аминсахара получают ацилированием или алкилированием сахаров и аминсахаров различными производными непредельных карбоновых кислот или непредельных спиртов, или алкилгалогенидов, соответственно.

Мономеры на основе О-замещенных сахаров и N-замещенных аминсахаров используются для получения низкопроцентные гидрогелей или гелей с низким содержанием поперечных “сшивок”.

Гидрогели получают при фото- или химическом иницировании полимеризации композиций ($K=M+C+P$), включающих мономер (M), сшивающий агент (C) и растворитель (P). Композиции дополнительно могут включать

биологически значимое соединение (**Б**), инициатор или промотор полимеризации (**Иниц**), ингибитор полимеризации (**Инг**).

Мономер (**М**) представляет собой О-замещенный сахар или N-замещенный аминсахар, содержащий при атоме кислорода или азота любую неопределенную группу, в том числе: метакрильную, акрильную, винильную, аллильную, 4-винилбензоильную и метилен-4-фениленвинильную, способную вступать в реакцию фото- или химически иницируемой полимеризации.

Кроме того, в качестве мономера могут использоваться смеси О-замещенных сахаров или N-замещенных аминсахаров с известными мономерами для реакции фото- или химически иницируемой полимеризации, в том числе с амидами или сложными эфирами неопределенных кислот: метакриламидом, акриламидом, 2-гидроксиэтилметакрилатом, 2-гидроксиэтилметакриламидом и т.д.

Использование различных сочетаний сахарсодержащих мономеров и мономеров, не содержащих сахар, в композиции позволяет получать гидрогели с заданным содержанием сахарных остатков на одно элементарное звено полимера.

Продуктом полимеризации мономера является полимер линейной структуры, содержащий одну молекулу сахара на одно или несколько элементарных звеньев полимера.

Сшивающий агент (**С**) представляет собой любое неопределенное соединение, содержащее две и более кратные связи, в том числе: *N,N'*-метиленбисакриламид, *N,N'*-(1,2-дигидроксиэтилен)бисакриламид и полиэтиленгликольдиакрилат. Продуктом полимеризации сшивающего агента (**С**) является сетчатый полимер с двумерной или трехмерной сеткой.

При совместной полимеризации мономера (**М**) и сшивающего агента (**С**) получают сетчатые полимеры, набухающие в водной среде (гидрогели). В зависимости от общего содержания (**М**) и (**С**), и их взаимного соотношения можно получать гидрогели с необходимыми характеристиками по диффузии, механической прочности, степени набухания и т.д.

При использовании в качестве мономера (**М**) О-замещенного сахара и/или N-замещенного аминсахара, а также хорошо известных сшивающих агентов (**С**) можно получать гидрогели, в которых $0 < \text{М} + \text{С} \leq 3\%$ (при $0 \leq \text{С} / (\text{С} + \text{М}) \leq 50\%$) и $0 < \text{М} + \text{С} \leq 50\%$ (при $0 \leq \text{С} / (\text{С} + \text{М}) \leq 3\%$), без изменения способа изготовления биочипов, приведенного в патентах RU 2206575, RU 2216547.

Биологически значимое соединение (**Б**) представляет собой любое соединение, способное непосредственно или опосредовано связывать молекулы нуклеотидной, белковой, или сахарной природы, в том числе: олигонуклеотид, нуклеиновую кислоту, белок (антитело, рецептор и т.д.), олигосахарид или низкомолекулярный лиганд. Предпочтительно биологически значимое соединение (**Б**) иммобилизуется в гидрогеле в момент его формирования при фото- или химически инициируемой полимеризации. Для иммобилизации соединение (**Б**) в своей структуре должно содержать:

или любую неопределенную группу, способную сополимеризоваться с мономером (**М**) и сшивающим агентом (**С**), в том числе: акриламидную или метакриламидную;

или группу, химически активную по отношению к мономеру (**М**) и/или сшивающему агенту (**С**), и/или промежуточным соединениям, возникающим при формировании сетчатого полимера, в том числе: amino- или сульфгидрильную группы. Однако биологически значимое соединение может быть иммобилизовано и после того, как гидрогель уже сформирован.

Инициаторы или промоторы радикальной полимеризации (**Иниц**) представляют собой широко известные инициаторы для химически инициируемой полимеризации и промоторы для фотоинициированной полимеризации, в том числе: персульфат аммония, персульфат калия, пероксид водорода, бензоилпероксид, азоизобутиронитрил (AIBN), метиленовый синий, флуоресцеин, *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамин, 4-(*N,N*-диметиламино)пиридин, триэтиламин и ацетон.

Ингибиторы полимеризации (**Инг**) представляют собой соединения, участвующие в процессе передачи цепи с образованием интермедиатов, не способных продолжать цепь, в том числе: *m*-бензохинон, *o*-нитрофенол, *p*-нитрофенол, нитробензол, *o*-(*m*-, *p*-)-динитробензолы.

Ингибиторы в составе композиции (**К**) используются для предотвращения спонтанной полимеризации при хранении композиций (**К**).

Растворитель (**Р**) представляет собой среду для проведения фото- или химически инициируемой полимеризации. Растворитель может быть органической или неорганической природы, а также представлять собой растворы органических и неорганических соединений, в том числе: водные растворы глицерина, сахаров, бетаина, полиспиртов; растворы глицерина, сахаров, бетаина или полиспиртов в диметилсульфоксиде (ДМСО); растворы глицерина, сахаров, бетаина или полиспиртов в диметилформамиде (ДМФА). К основным требованиям, предъявляемым к растворителям, следует отнести высокую температуру кипения, относительно

невысокую вязкость и способность поддерживать протекание радикальной полимеризации.

Флуоресцентный краситель (**Кф**) предназначен для определения степени протекания процесса полимеризации. В качестве флуоресцентного красителя может использоваться, например, Texas Red, флуоресцеин, Cy5, Cy3, BODIPY и другие флуоресцентные красители.

Указанные выше композиции (**К**), содержащие биологически значимые соединения, используются для изготовления биологических микрочипов.

Биочип представляет собой сформированный на подложке слой геля. Слой геля может быть разделен пустыми промежутками на ячейки, причем каждая из ячеек может содержать, либо не содержать иммобилизованные биологически значимые соединения, а биологически значимые соединения, иммобилизованные в разных ячейках, могут различаться по своей природе и свойствам. Ячейки образуют регулярную одномерную или двумерную структуру (массив). Ячейки биочипа, не содержащие биологически значимое соединение, могут использоваться для определения неспецифической сорбции анализируемого образца.

Изготовление биологических микрочипов с использованием композиции (**К**), содержащей О-замещенные сахара и/или N-замещенные аминсахара, может быть осуществлено известными способами (например, раскрытыми в патентах RU 2206575, RU 2216547), включающими следующие этапы:

- а. Изготовление композиции (**К**);
- б. Перенос композиции (**К**) на подложку;
- в. Фото- или химически иницируемая радикальная полимеризация композиции (**К**);
- г. “Отмывка” компонентов композиции (**К**), не вошедших в состав сформированного гидрогеля;
- д. “Осушка” гелевых элементов биочипа.

Этап изготовления композиции состоит в том, что все компоненты композиции в определенных соотношениях тщательно перемешиваются до образования гомогенного раствора, дегазируются, переносятся в емкость для хранения и последующего нанесения на подложку, например в микротитровальный планшет и хранятся при 4°C.

Этап переноса композиций (**К**) на подложку состоит в том, что композиции переносятся в виде капель на подложку любым устройством или приспособлением, в

том числе с помощью автоматического устройства (робота), снабженного одним или несколькими микродиспенсерами стержневого типа или бесконтактными микродиспенсерами струйного типа.

Подложка может быть изготовлена из любого материала, известного в настоящее время, в том числе: стекла, керамики, металла и пластика. Поверхность подложки должна обладать или сильными адгезивными свойствами, или содержать активные группы, способные участвовать в реакции передачи цепи при формировании гидрогеля на ее поверхности. В качестве активной группы может выступать любая группа органической или неорганической природы, в том числе: метакрильная, акрильная, винильная, аллильная, 4-винилбензоильная, метилен-4-фениленвинильная, amino-, сульфо, углеводородная и т.д.

Этап фото- или химически инициируемой радикальной полимеризации состоит в том, что подложки с перенесенными композициями (К) облучаются УФ излучением с длиной волны ≥ 254 при фотоинициировании или подвергаются различным воздействиям для химического инициирования полимеризации, в том числе: повышению температуры, выдерживанию в атмосфере с промотором полимеризации и.д.

Фото- или химическое инициирование полимеризации осуществляется на воздухе или в бескислородной атмосфере в том числе: азоте, аргоне и углекислом газе.

Этап отмывки компонентов композиций (К), не вошедших в состав сформированного гидрогеля, состоит в том, что подложки с композициями (К) после экспозиции УФ излучением отмываются буферными растворами и дистиллированной водой.

Этап осушки гелевых элементов биочипа состоит в том, что подложки с иммобилизованными гелевыми элементами высушиваются на воздухе или на центрифуге и в таком виде хранятся и используются.

В ряде случаев стадии г) и д) являются необязательными. Так, олигонуклеотидные биочипы, полученные с использованием только стадий а)-в), могут успешно использоваться для проведения гибридизаций и ПЦР. Белковые биочипы, полученные без проведения стадий г) и д), прекрасно сохраняются и функционируют после длительного хранения.

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.

Примеры

Пример 1. Синтез 2-метакриламида-2-дезоксид-глюкозы.

К безводному метанолу (50 мл) добавляют триэтиламин (1,52 г, 15,1 ммоль), а затем гидрохлорид 2-амино-2-дезоксид-глюкозы (2,75 г, 9,7 ммоль). К образовавшейся суспензии при перемешивании приливают ангидрид метакриловой кислоты (2,43 г, 15,7 ммоль) и продолжают перемешивать 12 часов при комнатной температуре. По истечении времени раствор отфильтровывают, а фильтрат упаривают при $T=65^{\circ}\text{C}$ до объема (17 мл) и оставляют при $T=-15^{\circ}\text{C}$ на 12 часов. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают ацетонитрилом (2×10 мл) и высушивают на воздухе при комнатной температуре, защищая от прямых солнечных лучей. Продукт представляет собой белый аморфный порошок. Выход 1,86 г (61%), $T_{\text{пл.}}=205-206^{\circ}\text{C}$.

Спектр ^1H ЯМР (D_2O), δ : 1,76 (с, 3H, CH_3), 3,26-3,81 (м, 7H, H^2 , 2H^3 , H^4 , H^5 , 2H^6), 5,09 (д, $J=3,43$ Гц, 1H, H^1), 5,30 (с, 1H, $\text{CH}_2=$); 5,52 (с, 1H, $\text{CH}_2=$).

Рассчитано для $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{NO}_5$: C: 60,93%; H: 9,27%. Найдено: C: 60,85%; H: 9,32%.

Пример 2. Изготовление биочипов.

Способ 1. Изготовление олигонуклеотидных биочипов

Для изготовления биочипов используют различные по составу композиции (Таблица). В качестве примера приведена методика изготовления биочипов с использованием композиции К86.

К смеси 2-метакриламида-2-дезоксид-глюкозы ($29,85 \times 10^{-3}$ г, $9,46 \times 10^{-5}$ моль) и N,N' -метиленабисакриламида ($0,15 \times 10^{-3}$ г, $0,97 \times 10^{-6}$ моля) приливают раствор N,N,N',N' -тетраметилэтилендиамина в деионизованной воде (370 мкл, 13,5%), перемешивают до полного растворения сухих компонентов. Затем приливают глицерин (500 мкл) и раствор олигонуклеотида в воде (100 мкл, $C=2000$ пмоль/мкл). Смесь тщательно перемешивают до образования гомогенного раствора. Полученную композицию переносят на полимерные подложки (ПЕТФ) с помощью робота QAgua (Англия, фирма "Genetix") в виде массива капель. Подложки с массивами капель облучают УФ-светом ($\lambda=312$ нм, 45 мин, $T=40^{\circ}\text{C}$) в среде сухого аргона.

Биочипы отмывают первоначально в фосфатном буфере (0,005 М, pH 7,0), содержащем Tween 20 (0,1%) и хлористый натрий (0,15 М), а затем в воде.

После высушивания на воздухе биочипы пригодны для использования.

Полученные биочипы фотографировали в видимом проходящем свете. Как видно из Фиг. 1, использование композиций на основе N-замещенного аминасахара позволяет получать гидрогели (А) в которых $0 < M + C \leq 3\%$ (при $0 \leq C / (C + M) \leq 50\%$) и $0 < M + C \leq 50\%$ (при $0 \leq C / (C + M) \leq 3\%$). В то время как использование известного в литературе мономера метакриламида для изготовления гидрогелей такого же состава не приводит к желаемому результату (Б).

Способ 2. Изготовление белковых биочипов.

Для изготовления биочипов используют различные по составу композиции (Таблица). В качестве примера приведена методика изготовления биочипов с использованием композиции К88.

К смеси 2-метакриламидо-2-дезоксид-Д-глюкозы ($29,25 \times 10^{-3}$ г, $9,27 \times 10^{-5}$ моль), N,N'-метиленабисакриламида ($0,525 \times 10^{-3}$ г, $3,395 \times 10^{-6}$ моля) и 2-акрилоксэтилметакрилата ($0,225 \times 10^{-3}$ г, $1,223 \times 10^{-6}$ моля) приливают раствор N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина в деионизованной воде (370 мкл, 3,24%), перемешивают до полного растворения сухих компонентов. Затем приливают глицерин (500 мкл) и раствор белка в воде (100 мкл, C=1 мг/мл). Смесь тщательно перемешивают до образования гомогенного раствора.

Полученную композицию переносят в виде массива капель на стеклянные подложки, обработанные 3-триметоксисилилпропилметакрилатом, с помощью робота QAgar (Англия, фирма "Genetix").

Подложки с массивами капель облучают УФ-светом с длиной волны 350 нм и интенсивностью $0,06 \text{ мВт/см}^2$ (GTE лампы F1T8/350 BL, Sylvania, Danvers, MA) в течение 50 мин при 22°C. Перед проведением иммуноанализа биочипы отмывают в буферном растворе (фосфатно-солевой буфер 0,01 М содержащий 0,15 М NaCl, pH 7,2 и 0,1% Tween 20) и затем водой. После высушивания на воздухе биочипы пригодны для использования.

Пример 3. Проведение гибридизации на олигонуклеотидных биочипах.

Флуоресцентно меченный по 5'-концу красителем Cy5 одноцепочечный фрагмент ДНК гена *rpoB* *M. tuberculosis* длиной 126 нуклеотидов, полученный методом двухстадийной ПЦР (Mikhailovich V. и др., *J. Clin. Microbiol.*, 2001, 39(7): 2531-40), гибридизовали на олигонуклеотидном биочипе, изготовленном с использованием композиций К85 и К86 и олигонуклеотидов: 5'-TTC TGG TCC ATG AAT TGG-OCH₂CH(CH₂OH)(CH₂)₄-NH₂ (А), 5'-GTT CTG GTC TAT GAA TTG G-OCH₂CH(CH₂OH)(CH₂)₄-NH₂ (Б) (пример 2 (способ 1)). Гибридизацию проводили с

использованием буфера (1,5 М гуанидинтиоцианат, 0,075 М HEPES (pH 7,5), 7,5 М ЭДТА) при 37°C в течение трех часов. Флуоресцентные сигналы с ячеек биочипа регистрировали непосредственно в гибридизационной камере под раствором (Фиг. 2), используя флуоресцентный микроскоп, оснащенный ПЗС-камерой.

Из приведенного рисунка видно, что даже для небольшого по величине фрагмента ДНК (126 н.о.) биочипы на основе одного из заявляемых гидрогелей К86 в 2 раза превышают по гибридизационному сигналу известный в литературе гидрогель с минимальным содержанием мономеров и минимальным содержанием сшивающего агента - К85 (патент RU 2216547). При этом дискриминантные отношения между совершенным и несовершенным дуплексами существенно не изменяются.

Пример 4. Проведение мультиплексной аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) на гелевых элементах биочипа.

Асимметричная мультиплексная ПЦР с ДНК *M. tuberculosis* проводилась в гелевых элементах биочипа в соответствии с данными ранее опубликованной работы (Mikhailovich V. и др., *J Clin Microbiol.*, 2001, 39(7): 2531-40). Для изготовления биочипов использовались композиции К86 и К87(см. Таб. 1). С помощью трех пар праймеров амплифицировались участки трех генов: *IS6110* (ген, специфичный для *M. tuberculosis*); *katG* (ген, кодирующий каталазу, участвующую в метаболизме изониазида); *rpoB* (ген бета-субъединицы РНК-полимеразы, мутации в котором обуславливают устойчивость к изониазиду). Длины амплифицируемых участков составили 210 п.о., 130 п.о. и 170 п.о., соответственно.

Прямые праймеры с последовательностями дикого типа, или содержащие на 3' конце однонуклеотидную замену, характеризующую мутантный вариант, иммобилизовались в ячейках биочипа. Обратные праймеры содержали флуоресцентную метку на 5'-конце и находились в реакционной смеси.

Для проведения ПЦР использовался буфер (2,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1 мг/мл BSA, 0,2 mM каждого дНТФ) с добавлением 5U Stoffel-фрагмента *Taq* ДНК-полимеразы (PE Corporation). В качестве матрицы использовали 10⁵ копий геномной ДНК *Mycobacterium tuberculosis*. Параметры термоциклирования: начальный прогрев - 2 мин при 95°C, далее - 35 циклов по 30 с при 95°C; 60 с при 63°C; 40 с при 72°C. Регистрацию результатов после завершения ПЦР производили с помощью флуоресцентного микроскопа, оснащенного ПЗС-камерой.

Наибольший флуоресцентный сигнал наблюдался в ячейках, в которых происходила достройка иммобилизованного праймера до стабильного совершенного

дууплекса с наработанным в ходе ПЦР флуоресцентно меченным одноцепочечным фрагментом ДНК каждого из генов (Фиг. 3). Кроме того, из рисунка видно, что величина флуоресцентного сигнала на гидрогелях, получаемых из композиции K86, более чем в 4 раза превышает величину сигнала на гидрогелях из композиции K87, что свидетельствует о большей эффективности прохождения ПЦР.

Пример 5. Проведение прямого анализа онкомаркеров и кинетические измерения на гелевых элементах биочипа.

Для проведения прямого анализа онкомаркеров и кинетических измерений были изготовлены биочипы, гелевые элементы которых изготавливались на основе композиций K88-K91, в которых иммобилизовали моноклональные антитела к простата-специфическому антигену (ПСА), серологическому онкомаркеру рака предстательной железы (пример 2 (способ 2)). Для контроля воспроизводимости результатов на биочипе формировались по четыре одинаковых гелевых элемента для каждой композиции гидрогеля, содержащей иммобилизованные антитела в равных концентрациях.

Прямой анализ и кинетические измерения проводили в фосфатно-солевом буфере ($C=0,01$ М, $0,15$ М NaCl, pH 7,2), содержащем $0,15\%$ поливинилового спирта, $0,15\%$ и 100 нг/мл онкомаркера. Флуоресцентные сигналы от гелевых элементов регистрировали непосредственно в гибридизационной камере под раствором, используя флуоресцентный микроскоп, оснащенный ПЗС-камерой. Кинетические измерения проводили с интервалом в 15 мин в течение 20 ч при температуре 20°C .

Как видно из рисунка (Фиг. 4), максимального флуоресцентного сигнала удастся достичь при использовании композиции K88, минимальный сигнал был получен от ячеек с гелем K91. Эффективность иммобилизации антител во всех гелях была примерно одинакова и составляла $35\text{--}40\%$.

Все патентные документы, публикации, научные статьи, и другие документы и материалы, цитируемые или упоминаемые здесь, включены в настоящее описание путем отсылки в такой степени, как если бы каждый из этих документов был включен путем отсылки индивидуально или приведен здесь в его полном виде.

Несмотря на то, что настоящее изобретение было подробно описано со ссылкой на конкретные воплощения, специалисту в данной области будет понятно, что могут быть произведены различные изменения и модификации без отклонения от сущности и

объема данного изобретения, которые определяются прилагаемой формулой изобретения.

Таблица. Состав композиций, используемых для изготовления биочипов.

№ композиции	Компоненты композиции						Содержание и соотношения компонентов композиции, %						
	М	С	Б	Р	Иниц	Инг	М+С	С/ (М+С)	Б	Р	Иниц	Инг	
К1	2-метакрил-амидо-2-дезоксид-глюкоза (МАОДГ)	N,N'-метилтен-бисакрил-амид (МБАА)	нет	Глице-рин/Вода	N,N,N',N'-Тетраметилэтилен-диамин (ТМЭДА)	нет	8	5	0	Глице-рин/вода	N,N,N',N'-Тетраметилэтилен-диамин	0	
				50/37						87	5		
К2		МАОДГ	МБАА	нет	50/37	ТМЭДА	нет	8	4	0	87	5	0
К3		МАОДГ	МБАА	нет	50/37	ТМЭДА	нет	8	3	0	87	5	0
К4		МАОДГ	МБАА	нет	50/37	ТМЭДА	нет	8	2	0	87	5	0
К5	МАОДГ	МБАА	нет	50/37	ТМЭДА	нет	8	1,5	0	87	5	0	
К6	МАОДГ	МБАА	нет	50/37	ТМЭДА	нет	8	1	0	87	5	0	
К7	МАОДГ	МБАА	нет	50/39	ТМЭДА	нет	6	5	0	89	5	0	
К8	МАОДГ	МБАА	нет	50/39	ТМЭДА	нет	6	4	0	89	5	0	
К9	МАОДГ	МБАА	нет	50/39	ТМЭДА	нет	6	3	0	89	5	0	

K10	МААДГ	МБАА	нет	50/39	ТМЭДА	нет	6	2	0	89	5	0
K11	МААДГ	МБАА	нет	50/39	ТМЭДА	нет	6	1,5	0	89	5	0
K12	МААДГ	МБАА	нет	50/39	ТМЭДА	нет	6	1	0	89	5	0
K13	МААДГ	МБАА	нет	50/40	ТМЭДА	нет	5	5	0	90	5	0
K14	МААДГ	МБАА	нет	50/40	ТМЭДА	нет	5	4	0	90	5	0
K15	МААДГ	МБАА	нет	50/40	ТМЭДА	нет	5	3	0	90	5	0
K16	МААДГ	МБАА	нет	50/40	ТМЭДА	нет	5	2	0	90	5	0
K17	МААДГ	МБАА	нет	50/40	ТМЭДА	нет	5	1,5	0	90	5	0
K18	МААДГ	МБАА	нет	50/40	ТМЭДА	нет	5	1	0	90	5	0
K19	МААДГ	МБАА	нет	50/41	ТМЭДА	нет	4	5	0	91	5	0
K20	МААДГ	МБАА	нет	50/41	ТМЭДА	нет	4	4	0	91	5	0
K21	МААДГ	МБАА	нет	50/41	ТМЭДА	нет	4	3	0	91	5	0
K22	МААДГ	МБАА	нет	50/41	ТМЭДА	нет	4	2	0	91	5	0
K23	МААДГ	МБАА	нет	50/41	ТМЭДА	нет	4	1,5	0	91	5	0
K24	МААДГ	МБАА	нет	50/41	ТМЭДА	нет	4	1	0	91	5	0
K25	МААДГ	МБАА	нет	50/42	ТМЭДА	нет	3	5	0	92	5	0
K26	МААДГ	МБАА	нет	50/42	ТМЭДА	нет	3	4	0	92	5	0
K27	МААДГ	МБАА	нет	50/42	ТМЭДА	нет	3	3	0	92	5	0
K28	МААДГ	МБАА	нет	50/42	ТМЭДА	нет	3	2	0	92	5	0
K29	МААДГ	МБАА	нет	50/42	ТМЭДА	нет	3	1,5	0	92	5	0

К30	М _{АА} ДГ	М _{БАА}	нет	50/42	ТМЭДА	нет	3	1	0	92	5	0
К31	М _{АА} ДГ	М _{БАА}	нет	50/43	ТМЭДА	нет	2	5	0	93	5	0
К32	М _{АА} ДГ	М _{БАА}	нет	50/43	ТМЭДА	нет	2	4	0	93	5	0
К33	М _{АА} ДГ	М _{БАА}	нет	50/43	ТМЭДА	нет	2	3	0	93	5	0
К34	М _{АА} ДГ	М _{БАА}	нет	50/43	ТМЭДА	нет	2	2	0	93	5	0
К35	М _{АА} ДГ	М _{БАА}	нет	50/43	ТМЭДА	нет	2	1,5	0	93	5	0
К36	М _{АА} ДГ	М _{БАА}	нет	50/43	ТМЭДА	нет	2	1	0	93	5	0
К37	М _{АА} ДГ	М _{БАА}	нет	50/44	ТМЭДА	нет	1	5	0	94	5	0
К38	М _{АА} ДГ	М _{БАА}	нет	50/44	ТМЭДА	нет	1	4	0	94	5	0
К39	М _{АА} ДГ	М _{БАА}	нет	50/44	ТМЭДА	нет	1	3	0	94	5	0
К40	М _{АА} ДГ	М _{БАА}	нет	50/44	ТМЭДА	нет	1	2	0	94	5	0
К41	М _{АА} ДГ	М _{БАА}	нет	50/44	ТМЭДА	нет	1	1,5	0	94	5	0
К42	М _{АА} ДГ	М _{БАА}	нет	50/44	ТМЭДА	нет	1	1	0	94	5	0
К43	Метакрил-амид (М _{АА})	М _{БАА}	нет	50/37	ТМЭДА	нет	8	5	0	87	5	0
К44	М _{АА}	М _{БАА}	нет	50/37	ТМЭДА	нет	8	4	0	87	5	0
К45	М _{АА}	М _{БАА}	нет	50/37	ТМЭДА	нет	8	3	0	87	5	0
К46	М _{АА}	М _{БАА}	нет	50/37	ТМЭДА	нет	8	2	0	87	5	0
К47	М _{АА}	М _{БАА}	нет	50/37	ТМЭДА	нет	8	1,5	0	87	5	0
К48	М _{АА}	М _{БАА}	нет	50/37	ТМЭДА	нет	8	1	0	87	5	0

K49	МБАА	нет	50/39	ТМЭДА	нет	6	5	0	89	5	0
K50	МБАА	нет	50/39	ТМЭДА	нет	6	4	0	89	5	0
K51	МБАА	нет	50/39	ТМЭДА	нет	6	3	0	89	5	0
K52	МБАА	нет	50/39	ТМЭДА	нет	6	2	0	89	5	0
K53	МБАА	нет	50/39	ТМЭДА	нет	6	1,5	0	89	5	0
K54	МБАА	нет	50/39	ТМЭДА	нет	6	1	0	89	5	0
K55	МБАА	нет	50/40	ТМЭДА	нет	5	5	0	90	5	0
K56	МБАА	нет	50/40	ТМЭДА	нет	5	4	0	90	5	0
K57	МБАА	нет	50/40	ТМЭДА	нет	5	3	0	90	5	0
K58	МБАА	нет	50/40	ТМЭДА	нет	5	2	0	90	5	0
K59	МБАА	нет	50/40	ТМЭДА	нет	5	1,5	0	90	5	0
K60	МБАА	нет	50/40	ТМЭДА	нет	5	1	0	90	5	0
K61	МБАА	нет	50/41	ТМЭДА	нет	4	5	0	91	5	0
K62	МБАА	нет	50/41	ТМЭДА	нет	4	4	0	91	5	0
K63	МБАА	нет	50/41	ТМЭДА	нет	4	3	0	91	5	0
K64	МБАА	нет	50/41	ТМЭДА	нет	4	2	0	91	5	0
K65	МБАА	нет	50/41	ТМЭДА	нет	4	1,5	0	91	5	0
K66	МБАА	нет	50/41	ТМЭДА	нет	4	1	0	91	5	0
K67	МБАА	нет	50/42	ТМЭДА	нет	3	5	0	92	5	0
K68	МБАА	нет	50/42	ТМЭДА	нет	3	4	0	92	5	0

K69	МБАА	МБАА	нет	50/42	ТМЭДА	нет	3	3	0	92	5	0
K70	МБАА	МБАА	нет	50/42	ТМЭДА	нет	3	2	0	92	5	0
K71	МБАА	МБАА	нет	50/42	ТМЭДА	нет	3	1,5	0	92	5	0
K72	МБАА	МБАА	нет	50/42	ТМЭДА	нет	3	1	0	92	5	0
K73	МБАА	МБАА	нет	50/43	ТМЭДА	нет	2	5	0	93	5	0
K74	МБАА	МБАА	нет	50/43	ТМЭДА	нет	2	4	0	93	5	0
K75	МБАА	МБАА	нет	50/43	ТМЭДА	нет	2	3	0	93	5	0
K76	МБАА	МБАА	нет	50/43	ТМЭДА	нет	2	2	0	93	5	0
K77	МБАА	МБАА	нет	50/43	ТМЭДА	нет	2	1,5	0	93	5	0
K78	МБАА	МБАА	нет	50/43	ТМЭДА	нет	2	1	0	93	5	0
K79	МБАА	МБАА	нет	50/44	ТМЭДА	нет	1	5	0	94	5	0
K80	МБАА	МБАА	нет	50/44	ТМЭДА	нет	1	4	0	94	5	0
K81	МБАА	МБАА	нет	50/44	ТМЭДА	нет	1	3	0	94	5	0
K82	МБАА	МБАА	нет	50/44	ТМЭДА	нет	1	2	0	94	5	0
K83	МБАА	МБАА	нет	50/44	ТМЭДА	нет	1	1,5	0	94	5	0
K84	МБАА	МБАА	нет	50/44	ТМЭДА	нет	1	1	0	94	5	0
K85	МБАА	МБАА	Олиго- нуклео- тид	50/ 41,999 989	ТМЭДА	нет	3	3	0,00 0011	91,9 9998 9	5	0

K86	МБАДГ	МБАА	Олиго- нуклео- тид	50/ 41,999 989	ТМЭДА	нет	3	0,5	0,00 0011	91,9 9998 9	5	0
K87	МБА	МБАА	Олиго- нуклео- тид	50/ 41,999 989	ТМЭДА	нет	3	3	0,00 0018	91,9 9998 9	5	0
K88	МБАДГ	МБАА+ 2-акрил- оксо- этилме- такрилат (АМ)	белок	50/ 45,79	ТМЭДА	нет	3	2,5	0,01	95,7 9	1,2	0
K89	МБАДГ	МБАА+ АМ	белок	50/44, 79	ТМЭДА	нет	4	2,5	0,01	94,7 9	1,2	0
K90	МБАДГ	МБАА+ АМ	белок	50/ 43,79	ТМЭДА	нет	5	4	0,01	93,7 9	1,2	0
K91	МБАДГ	МБАА+ АМ	белок	50/ 42,79	ТМЭДА	нет	6	5	0,01	92,7 9	1,2	0

Формула изобретения

1. Мономер для получения низкопроцентного гидрогеля и/или гидрогеля с низким содержанием поперечных “сшивок”, представляющий собой производное на основе О-замещенного сахара и/или N-замещенного аминосахара, содержащее при гидроксильной или аминогруппе, соответственно, неопределенный остаток.
2. Мономер по 1, характеризующийся тем, что сахар представляет собой низкомолекулярное соединение класса углеводов, выбранное из группы, состоящей из моносахаридов и олигосахаридов.
3. Мономер по п. 2, характеризующийся тем, что сахар представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из сахарозы, D-глюкозы, D-аллозы, D-альтрозы, D-маннозы, D-гулозы, D-идозы, D-талозы, D-фруктозы, D-рибозы, D-арабинозы, D-ксилозы, D-лихтозы, D-эритролозы, D-рибулозы, D-ксилулозы, D-психозы, D-сорбозы, D-магатозы или их дезоксианалога, или их аналога с L конфигурацией, или смеси изомеров с L и D конфигурациями.
4. Мономер по п. 1, характеризующийся тем, что аминосахар представляет собой природный или синтетический сахар, в котором одна или несколько гидроксильных групп заменены на аминогруппу.
5. Мономер по п. 4, характеризующийся тем, что аминосахар представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из 2-амино-2-дезоксид-глюкозы, 2-амино-2-дезоксид-аллозы, 2-амино-2-дезоксид-альтрозы, 2-амино-2-дезоксид-маннозы, 2-амино-2-дезоксид-гулозы, 2-амино-2-дезоксид-идозы, 2-амино-2-дезоксид-талозы, 2-амино-2-дезоксид-галактозы, или их аналога с L-конфигурацией, или смеси изомеров с D и L конфигурацией.
6. Мономер по п. 1, характеризующийся тем, что в качестве неопределенного остатка используют группу, содержащую кратную связь, способную вступать в реакцию фото- или химически инициируемой полимеризации.
7. Мономер по 6, характеризующийся тем, что в качестве неопределенного остатка используют метакрильную, акрильную, винильную, аллильную, 4-винилбензоильную, или метилен-4-фениленвинильную группу.
8. Композиция (К) для получения низкопроцентного гидрогеля и/или гидрогеля с низким содержанием поперечных “сшивок”, содержащая:

М-мономер по любому из пп. 1-7, составляющий основу формируемого геля;

С-сшивающий агент;

Р-растворитель.

9. Композиция по п. 8, характеризующаяся тем, что в качестве мономера (М) дополнительно используют, по меньшей мере, один другой непредельный мономер.

10. Композиция по п. 9, характеризующаяся тем, что в качестве указанного, по меньшей мере, одного другого непредельного мономера используют соединение, выбранное из группы, включающей метакриламид, акриламид, 2-гидроксиэтилметакрилат и 2-гидроксиэтилметакриламид.

11. Композиция по п. 8, характеризующаяся тем, что в качестве сшивающего агента (С) используют, по меньшей мере, одно непредельное соединение, содержащее две и более кратных связи.

12. Композиция по п. 11, характеризующаяся тем, что в качестве указанного, по меньшей мере, одного непредельного соединения используют соединение, выбранное из группы, включающей *N,N'*-метиленбисакриламид, *N,N'*-(1,2-дигидроксиэтилен)бисакриламид, полиэтиленгликольдиакрилат.

13. Композиция по п. 8, характеризующаяся тем, что растворитель (Р) представляет собой раствор органического и/или неорганического соединения.

14. Композиция по п. 13, характеризующаяся тем, что растворитель выбирают из группы, состоящей из водного раствора глицерина, сахара, бетаина, полиспирта; раствора глицерина, сахара, бетаина или полиспирта в диметилсульфоксиде (ДМСО); раствора глицерина, сахара, бетаина или полиспирта в диметилформамиде (ДМФА).

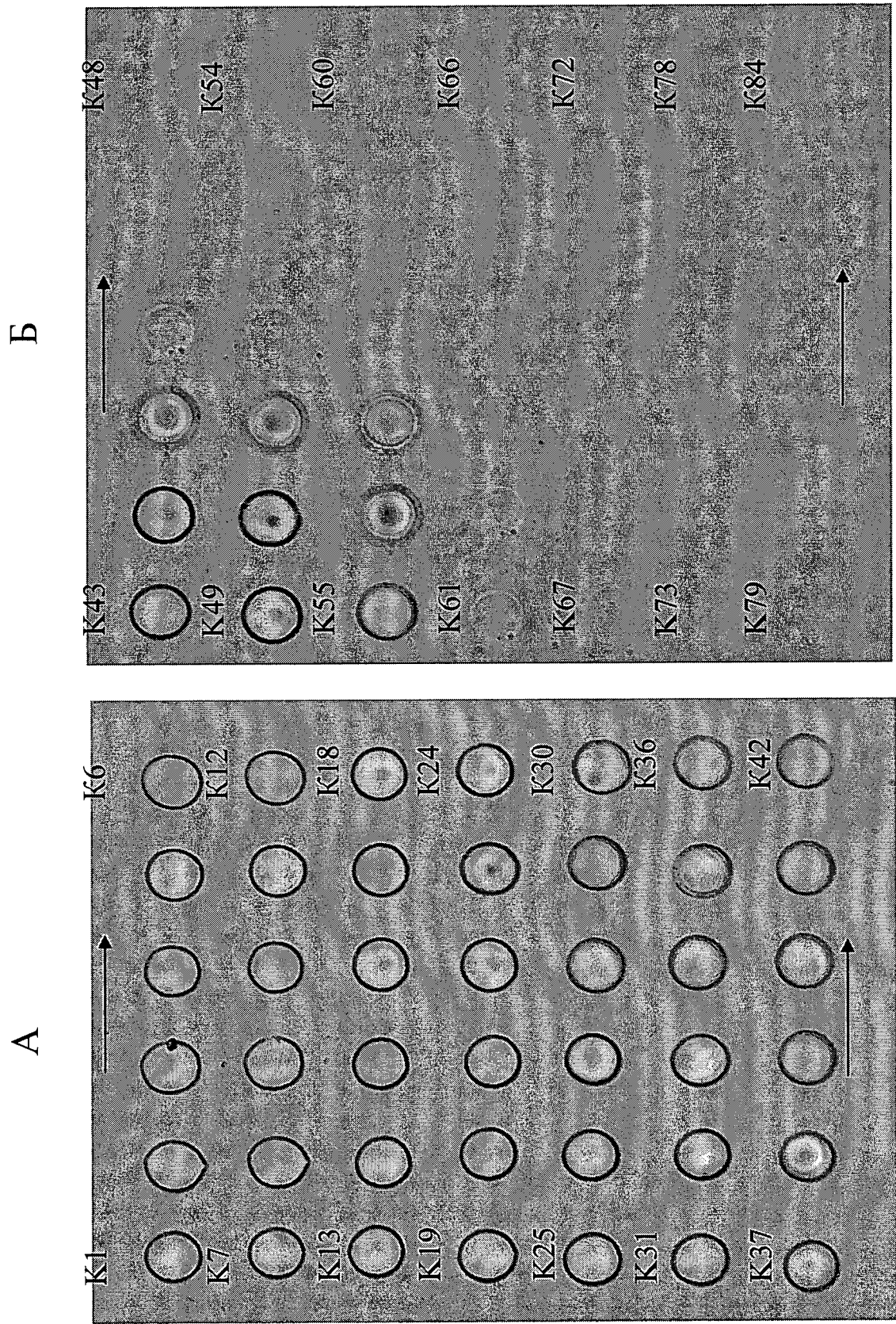
15. Композиция по п. 8, характеризующаяся тем, что она дополнительно содержит, по меньшей мере, один инициатор и/или промотор полимеризации (Иници).

16. Композиция по п. 15, характеризующаяся тем, что инициатор и/или промотор полимеризации представляет собой инициатор для химически инициируемой полимеризации и/или промотор для фотоинициированной полимеризации.

17. Композиция по п. 16, характеризующаяся тем, что, по меньшей мере, один инициатор и/или промотор полимеризации выбирают из группы, состоящей из персульфата аммония, персульфата калия, пероксида водорода, бензоилпероксида, азоизобутиронитрила (AIBN), метиленового синего, флуоресцеина, *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамина, 4-(*N,N*-диметиламино)пиридина, триэтиламина и ацетона.

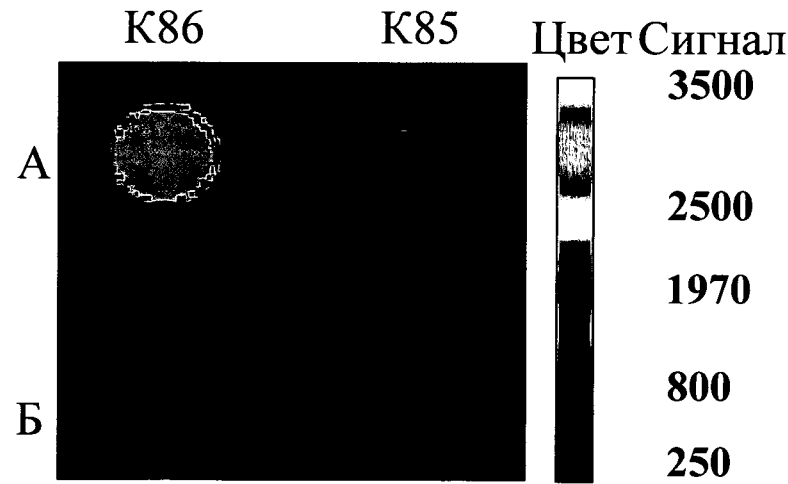
18. Композиция по п. 8, характеризующаяся тем, что она дополнительно содержит, по меньшей мере, один ингибитор полимеризации (**Инг**).
19. Композиция по п. 18, характеризующаяся тем, что указанный, по меньшей мере, один ингибитор полимеризации (**Инг**) представляет собой соединение, предотвращающее спонтанную полимеризацию.
20. Композиция по п. 19, характеризующаяся тем, что указанное, по меньшей мере, одно соединение, предотвращающее спонтанную полимеризацию, представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из *n*-бензохинона, *o*-нитрофенола, *p*-нитрофенола, нитробензола, *o*-динитробензола, *m*-динитробензола и *p*-динитробензола.
21. Композиция по п. 8, характеризующаяся тем, что она дополнительно содержит, по меньшей мере, один флуоресцентный краситель (**Кр**).
22. Композиция по п. 21, характеризующаяся тем, что в качестве указанного, по меньшей мере, одного красителя используют краситель, выбранный из группы, состоящей из Texas Red, флуоресцеина, Cy 5, Cy 3, BODIPY..
23. Композиция по любому из пп. 8-22, характеризующаяся тем, что она дополнительно содержит биологически значимое соединение (**Б**).
24. Композиция по п. 23, характеризующаяся тем, что биологически значимое соединение (**Б**) способно к иммобилизации в гидрогеле в момент его формирования.
25. Композиция по любому из пп. 23 и 24, характеризующаяся тем, что в качестве биологически значимого соединения композиция содержит, по меньшей мере, одно соединение, выбранное из группы, состоящей из олигонуклеотида, нуклеиновой кислоты, белка, олигосахарида, антитела или низкомолекулярного лиганда.
26. Гидрогель, представляющий собой низкопроцентный гидрогель и/или гидрогель с низким содержанием поперечных “сшивок”, полученный путем фото- или химически индуцированной полимеризации композиции по любому из пп. 8-25.
27. Биочип, представляющий собой подложку с иммобилизованным на нем слоем гидрогеля по п. 26.
28. Биочип по п. 27, характеризующийся тем, что слой гидрогеля представляет собой сплошной слой.
29. Биочип по п. 27, характеризующийся тем, что слой гидрогеля разделен пустыми промежутками на ячейки.

30. Биочип по п. 29, характеризующийся тем, что ячейки образуют регулярную одномерную или двумерную структуру (массив).
31. Биочип по п. 27, характеризующийся тем, что слой геля содержит по меньшей мере одно иммобилизованное биологически значимое соединение.
32. Биочип по п. 31, характеризующийся тем, что иммобилизация по меньшей мере одного биологически значимого соединения в слое гидрогеля осуществляется в момент формирования гидрогеля при химически- и фотохимически инициированной полимеризации.
33. Биочип по п. 31, характеризующийся тем, что иммобилизация по меньшей мере одного биологически значимого соединения в слое гидрогеля осуществляется после того, как гидрогель сформирован.
34. Биочип по любому из пп. 29-33, характеризующийся тем, что каждая гидрогелевая ячейка биочипа содержит иммобилизованный флуоресцентный краситель.

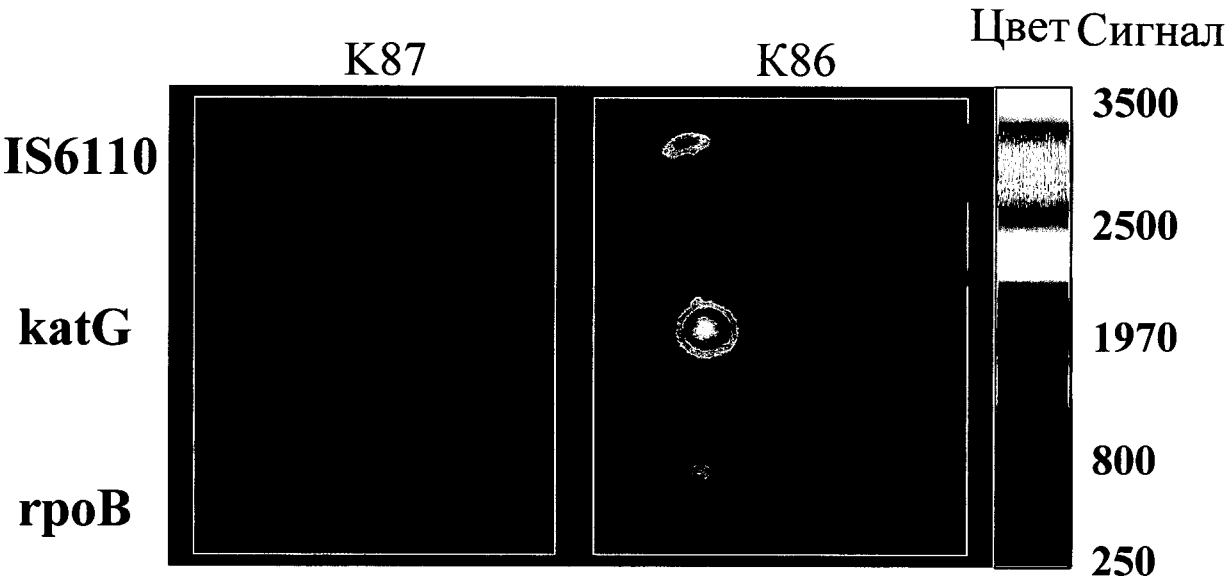


Фиг. 1

2/3

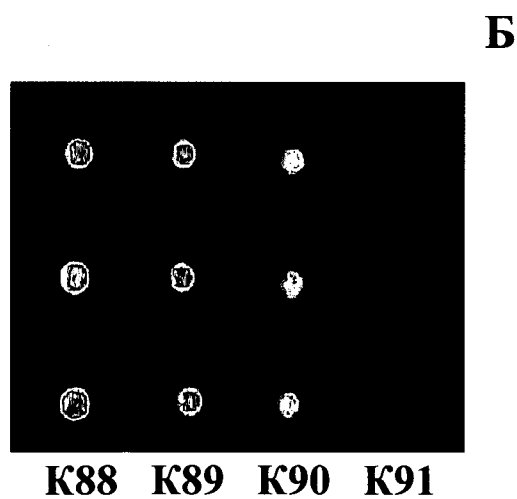
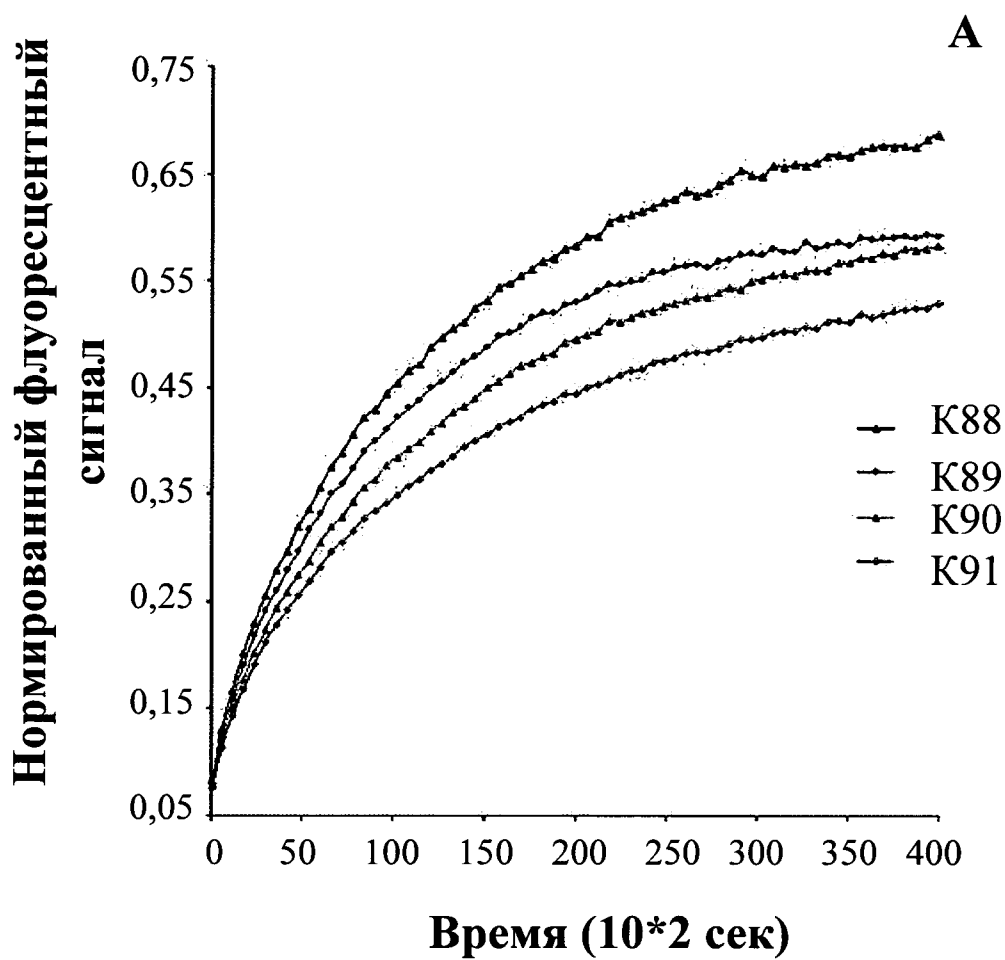


Фиг. 2



Фиг. 3

3/3



Фиг. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU2007/000196

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H 15/10 (2006.01) **C08L 5/00** (2006.01) **C08J 3/00** (2006.01) **C12N 11/00** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) **G01N 33/531** (2006.01)

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)

C07H 15/10 C08L 5/00 C08J 3/00 C12 1/68 C12N 1 1/00 A61L 15/28

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)

Esp@cenet, RUPAT, EAPATIS, PAJ, USPTO, WIPO, EAPO

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/017180 A2 (THE GOVERNMENT OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE NAVY), 24.02.2005, the claims, pages 4-7 of the description	1-26
X	WO 1990/01 1306 AI (CIBA-GEIGY AG) 04.10.1990, the abstract, the claims	1-7, 9-10, 23-34
X	US 2798053 A (THE B. F. GOODRICH COMPANY) 02.07.1957, the claims	1-7, 9-10, 23-34
A	RU 2198686 C2 (ORGANOGELO CANADA LTEE) 20.02.2003, the abstract, the claims, page 7, lines 44-56 on the left	1-7, 9-10, 23-26
A	RU 2206575 C2 (INSTITUT MOLEKULARNOI BIOLOGII V.A. ENGELGARDTA RAN) 20 06 2003, the abstract, the claims	1-7, 9-10, 23-34



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 application or patent 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

01 November 2007

Date of mailing of the international search report

22 November 2007

Name and mailing address of the ISA/
RU

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU2007/000196

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RU 2216547 C2 (INSTITUT MOLEKULYARNOI BIOLOGII V.A. ENGELGARDTA RAN) 20.11.2003, the abstract, the claims, page 6, lines 6-10 on the left, 60-66 on the right	1-8, 11-34

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/RU 2007/000196

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ: C07H 15/10 (2006.01)
C08L 5/00 (2006.01)
C08J 3/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 11/00 (2006.01)
Согласно Международной патентной классификации МПК G01N 33/531 (2006.01)

В. ОБЛАСТИ ПОИСКА:

Проверенный минимум документации (система классификации и индексы) МПК:
C07H 15/10, C08L 5/00, C08J 3/00, C12Q 1/68, C12N 11/00, A61L 15/28

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):
Esp@cenet, RUPAT, EAPATIS, PAJ, USPTO, WIPO, EAPO

С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	WO 2005/017180 A2 (THE GOVERNMENT OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE NAVY) 24.02.2005, формула, с.4-7 описания	1-26
X	WO 1990/011306 A1 (CIBA-GEIGY AG) 04.10.1990, реферат, формула	1-7, 9-10, 23-34
X	US 2798053 A (THE B.F. GOODRICH COMPANY) 02.07.1957, формула	1-7, 9-10, 23-34
	RU 2198686 C2 (ОРГАНОГЕЛЬ КАНАДА ЛТЕЕ) 20.02.2003, реферат, формула, стр. 7, строки 44-56 слева	1-7, 9-10, 23-26
A	RU 2206575 C2 (ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ ИМ. В.А. ЭНГЕЛЬГАРДТА РАН) 20.06.2003, реферат, формула	1-7, 9-10, 23-34

☒ последующие документы указаны в продолжении графы С. ☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов:

- А документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным
- Е более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее
- Л документ, подвергающий сомнению притязание (я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)
- О документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.
- Р документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета

- Т более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение
- Х документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности
- У документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста
- & документ, являющийся патентом-аналогом

Дата действительного завершения международного поиска: 01 ноября 2007 (01.11.2007)

Дата отправки настоящего отчета о международном поиске:
22 ноября 2007 (22.11.2007)

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:

Ю. Сафина

Телефон № (499) 240-25-91

Форма PCT/ISA/210 (второй лист)(апрель 2007)

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/RU 2007/000196

С. (продолжение) ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
А	RU 2216547 C2 (ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ ИМ. В.А. ЭНГЕЛЬГАРДТА РАН) 20.11.2003, реферат, формула, стр. 6, строки 6-10 слева, 60-66 справа	1-8, 11-34