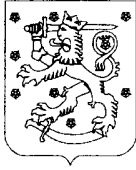




F | 000109556B



SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 109556 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats 30.08.2002

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

G01N 33/543, 33/53, B01L 3/00

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 942360

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 20.05.1994

(24) Alkuperä - Löpdag 20.11.1992

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 20.07.1994

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan PCT/NL92/00213

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

21.11.1991 NL 9101953 P

(73) Haltija - Innehavare

1 •Pepscan Systems B.V., Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, ALANKOMAAT, (NL)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Puijk,Wouter Cornelis, Schoener 43-40, 8243 VZ Lelystad, ALANKOMAAT, (NL)

2 •Ligtvoet, Gerard Johannes, Van 's-Gravensandestraat 37, 2331 EP Leiden, ALANKOMAAT, (NL)

3 •Meloen, Robert Hans, Karveel 10-04, 8231 AP Lelystad, ALANKOMAAT, (NL)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab
Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Testilaitte, joka käsittää levyn sisältäen useita syvennyksiä asianomaisine annostelulaitteineen ja nämä laitteet sisältävä sarja ja laitteiden käyttö

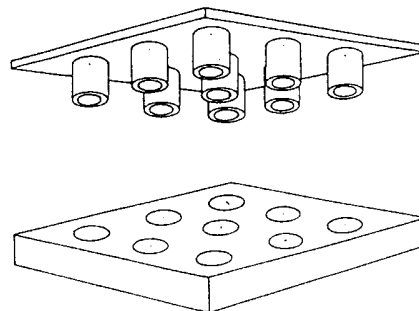
Testanordning som innefattar en platta innehållande ett antal fördjupningar med en tillhörande doseringsanordning och en dessa anordningar innehållande sats och användning av anordningarna

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

US A 4162896 (B01L 3/00), WO A 91/06859 (G01N 33/51)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee koelaitetta, joka käsittää useita syvennyksiä sisältävän levyn. Keksintö koskee myös mittalaitetta, joka soveltuu viemään samanaikaisesti yhtä suuret reagenssitilavuudet koelaitteen eri syvennyksiin. Koelaitte käsittää syvennyksiä, joiden tilavuus on 0,1 - 20 µl, ja joiden halkaisija on 1,0 - 4,0 mm. Syvennysten syvyyden ja halkaisijan suhde on edullisesti pienempi kuin 1:1. Keksinnön mukaista koelaitetta voidaan käyttää bio- ja immunokemiallisten kokeiden, kuten pepscan tai ELISA, suoritukseen.



Uppfinningen avser en testanordning som omfattar en skiva med en mångfald brunnar. Uppfinningen avser även en mätanordning som lämpar sig för samtidig införing av lika stora volymer reagens i olika brunnar på testanordningen. Testanordningen omfattar brunnar med en volym i området 0,1 - 20 μ l och en diameter av 1,0 - 4,0 mm. Förhållandet mellan djupet av brunnarna och diametern är företrädesvis lägre än 1:1. Testanordningen enligt uppfinningen kan användas för utförande av bio- eller immunokemiska test, såsom pepscan eller ELISA.

Testilaitte, joka käsittää levyn sisältäen useita syvennyksiä asianomaisine annostelulaitteineen ja nämä laitteet sisältävä sarja ja laitteiden käyttö

5 Keksintö koskee koelaitetta, joka käsittää useita syvennyksiä sisältävän levyn. Keksintö koskee myös annostelulaitetta, joka sopii yhtäsuuren reagenssitilavuuden samanaikaiseen viemiseen koelaitteen eri syvennyksiin. Lisäksi keksintö koskee menetelmää (bio- ja/tai immuno-) kemiallisen kokeen suorittamiseksi käyttäen koelaitetta ja/tai annostelulaitetta ja keksintö koskee
10 välineistöä, joka käsittää koelaitteen ja annostelulaitteen.

 Koelaitte, joka käsittää useita syvennyksiä sisältävän levyn, on tunnettu jo vuosia niin kutsuttuna mikrotitrauslevynä. Tunnettu mikrotitrauslevy on kooltaan noin 12,5 cm x 8,0 cm luokkaa ja se käsittää 96 syvennystä. Kunkin syvennyksen halkaisija on noin 0,6 cm ja kunkin syvennyksen syvyys on noin
15 1,0 cm niin, että kukin syvennys voi sisältää enimmillään 250 µl:n näytteen. Syvennykset on erotettu materiaalisuluilla, joiden leveydet ovat noin 2,0 mm.

 Tunnettua mikrotitrauslevyä käytetään erilaisten bio- ja/tai immuno-kemiallisten kokeiden suorittamiseen. Tämän tyyppisissä kokeissa käytetään usein fotometristä detektiota. Erittäin hyvin tunnettu esimerkki tällaisesta
20 kokeesta on ELISA. Fotometristen määritysten tapauksessa syvennyksen pohjan täytyy olla tasaisesti peittynyt analysoitavalla näyte-kerroksella luotettavien tulosten saamiseksi. Edelleen tämän kerroksen paksuuden täytyy olla vähintään sellainen, että esiintyy havaittava absorptio. Käytännössä siitä seuraa yleensä, että käytetään näytteitä, joiden tilavuus on vähintään 50 µl.

25 Julkaisu WO-91/06 859 koskee analyysimenetelmää solujen, kuten lymfosyyttien, vasteen tai aktivoitumisen määrittämiseksi. Siinä kuvataan menetelmää immunologisen herkistymisen määrittämiseksi kohteessa, jolloin lisätään soluja aktivoivaa ainetta, joka tekee solujen entsyymien reaktiokykyiseksi, ja entsyymaattinen reaktio mitataan käyttäen substraattia, joka tuottaa havaittavan tuotteen, sekä välineistöä tällaisten analyysien suorittamiseksi.
30 Näyte, jonka tilavuus on 30 µl, mainitaan suositeltavana näytteenä käytettäväksi mikrotitrauslevyn syvennyksessä, jonka halkaisija on 6 mm. Patenttivaatimuksen kohteena on reaktioastia, jonka halkaisija on 6 mm ja korkeus on 0,5 - 6 mm, edullisesti 1 - 2 mm. Astia on suunniteltu optimoimaan reaktion fysiologinen
35 säättely mahdollistaen kaasujen, kuten hapen ja CO₂:n, sopiva vaihto, riittävän nopea pH:n tasapainotus, sopiva molekyylien diffuusio ja lämmön pois-

johtaminen. Julkaisun mukainen reaktioastia liittyy reaktionäytteen reaktiotilavuuden ja pinta-alan väliseen suhteeseen. Julkaisussa ei mainita ongelmia, jotka voivat esiintyä, kun pieniä reaktioastioita huuhdotaan menetelmissä, kuten ELISA:ssa ja PEPSCAN:ssa.

5 Koska bio- ja/tai immunokemiallisiin kokeisiin sisältyy tavallisesti suuri määrä kokeita sellaisilla näytteillä (esimerkiksi veri tai seerumi), jotka on otettava koehenkilöistä ja/tai -eläimistä, on tarpeen käyttää mahdollisimman vähän näytettä koetta kohden.

10 Näytettä voidaan kuitenkin laimentaa vain rajoitetussa määrin, koska analysoitavilla komponenteilla on oltava syvennyksessä tietty minimikonsentraatio mitattavan absorption saamiseksi. Tämä johtuu siitä, että Lambert-Beerin lain mukaan valon intensiteetti riippuu konsentraatiosta ja analysoitavan komponentin absorptiotekijästä ja myös matkasta, joka valon on kuljettava mitattavan näytteen läpi. Käytännössä siitä seuraa noin 12,5 ml:n reagenssi-
15 määrän käyttö mikrotitrauslevyä kohden. Tällaisessa tapauksessa on oleellinen tarve pienentää käytettävää näytemäärää.

Toinen tavallinen käyttö nykyisillä mikrotitrauslevyillä on peptidisynteesissä. Näissä synteesissä voidaan syntetisoida peptidejä, jotka sisältävät erilaisia aminohappojärjestyksiä. Se voidaan suorittaa esimerkiksi tietyn vasta-aineen proteiiniepitoin sijainnin määrittämiseksi. Siksi peptidit, jotka sisältävät tutkittavaa proteiini-
20 fragmenttia vastaavan aminohappojärjestyksen, syntetisoidaan erikseen. Synteesi voidaan suorittaa sillä tavoin, että kukin peptidi sisältää osaltaan toisen peptidin aminohappojärjestyksen. On jopa mahdollista suorittaa synteesi sillä tavoin, että vain yksi aminohappo ei ole päällekkäinen. On myös mahdollista tuottaa sarja lyhyitä pätkiä, esimerkiksi heksapeptidejä, jotka ovat päällekkäiset yhtä aminohappoa lukuun ottamatta. Sitten suoritetaan määrittäminen, minkä peptidin kanssa vasta-ainesitoutuminen tapahtuu. Peptidit, joiden kanssa vasta-ainesitoutuminen tapahtuu, sisältää epitoin.
25

30 Ensimmäisessä tapauksessa peptidisynteesi tapahtui lisäämällä kytkettävä aminohappo tunnetun mikrotitrauslevyn syvennykseen, jossa peptidi oli määrätty syntetisoida, kytkemällä sitten haluttu aminohappo kasvavaan peptidiketjuun, pesemällä syvennys sen jälkeen kaiken reagoimattoman aminohapon poistamiseksi ja toistamalla menettely seuraavalla aminohapolla.

35 Tässä menetelmässä koettiin kuitenkin ongelmia syvennyksen huuhtomisessa ja sen vuoksi otettiin käyttöön peptidisynteesimenetelmä, jossa käytettiin pieniä polyeteenisauvoja kantajina kasvaville peptidiketjuille. Tämä

menetelmä on esitetty artikkelissa Geysen, H.M., Meloen, R.H. ja Barteling, S.J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 81 (heinäkuu 1984) ss. 3998 - 4002. Artikkelissa esitetään menetelmä satojen peptidien syntetisoimiseksi samanaikaisesti kiinteällä kantajalla riittävällä puhtaudella ELISAn suorittamiseksi. Peptidien ja vasta-aineiden vuorovaikutus voidaan määrittää yksinkertaisesti poistamalla peptidejä kantajalta. Siten on mahdollista määrittää immunogeeninen epitooppi hyvällä tuloksella. Tätä menetelmää kutsutaan nimellä PEPSCAN.

Menetelmässä kasvavien peptidiketjujen annetaan tarttua polyeteenisauvoihin (joiden halkaisija on 4 mm ja pituus 40 mm) ja peptidisynteesiin tarvittavat reaktiot suoritetaan sitten käyttäen kantajasauvojen päitä. Tätä varten polyeteenisauvat upotetaan ensin akryylihapon 6 % vesiliuokseen ja altistetaan gamma-säteilylle. Myöhempiä reaktioita varten sauvojen päät tuodaan sitten kosketuksiin Teflon-levyn kanssa, joka sisältää syvennysmatriisin, joka vastaa sauvojen sijaintia (tunnettu mikrotitrauslevy). Tavallisia kiinteän faasin peptidikemian menetelmiä voidaan käyttää, esimerkiksi N^α-t-butyloksikarbonyyli-L-lysiinimetyyliesterin kytkemiseksi polyeteeni/polyakryylihappoon sivuketjun N^α-aminoryhmän välityksellä. [(Erickson, B.W. ja Merrifield, B.B. (1976), The Proteins, Eds. Neurath, H & Hill, R.L. (Academic New York), vol. 2 ss. 255 - 527) ja (Meienhofer, J. (1973), Hormonal Proteins and Peptides, Ed. Li, C.H., (Academic, New York), vol. 2, ss. 45 - 267)]. t-butyloksikarbonyyli-ryhmän poistamisen jälkeen t-butyloksikarbonyyli-L-alaniini voidaan kytkeä, jolloin muodostuu peptidin kaltainen erottaja. Halutut aminohapot voidaan kytkeä peräkkäin ja lopullisen halutun kytkentäreaktion jälkeen ja suojaavan t-butyloksikarbonyyli-ryhmän poiston jälkeen terminaalinen aminohappo voidaan asetyloidä käyttäen etikkahappoanhydridiä dimetyyliformamidi/trietyyliamiinissa. Kaikki N,N-disykloheksyylikarbodiimidillä suoritettavat kytkentäreaktiot voidaan suorittaa dimetyyliformamidissa N-hydroksibentsotriatsolin läsnä ollessa.

Kaikki peptidisynteesissä käytetyt aminohappojen sivuketjuissa olevat suojaavat ryhmät voidaan myös poistaa. Ennen kuin syntetisoidaan peptidejä tutkitaan edelleen, esimerkiksi ELISAn avulla, sauvat voidaan pestä fosfaattipuskuroidulla suolaliuksella.

Toinen käyttö peptidisynteesille tapahtuu, jos tunnetun epitoopin yksi tai useampi aminohappo vaihdetaan, jotta määritettäisiin, mitkä muut järjestykset pystyvät toimimaan epitooppina ja/tai jotta määritettäisiin, mitkä aminohapot ovat oleellisia epitoopin toiminnalle. Tämän tyyppinen menetelmä on esitetty artikkelissa Geysen, H.M., Meloen R.H. ja Barteling S.J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 82 (tammikuu 1985) ss. 178 - 182.

Koska tällaiset menetelmät käsittävät usein suuren lukumäärän synteesejä ja siten myös suuren reagenssimäärän käytön, jotka reagenssit ovat usein lisäksi kalliita, on olemassa myös tarve kustannusten alentamisen kannalta käyttää näytemääriä, jotka ovat mahdollisimman pieniä. On sen vuoksi etsitty mahdollisuuksia peptidisynteesin pienentämiselle.

Peptidisynteesin pienennysmenetelmä on äskettäin esitetty artikkelissa Fodor, S.P.A et al. (Science, (15. helmikuuta 1991) ss. 767 - 773). Tässä menetelmässä käytetään valoa kontrolloimaan samanaikaista synteisiä lukuisalle määrälle erilaisia kemiallisia yhdisteitä. Synteesi tapahtuu kiinteällä kantajalla, esimerkiksi lasilevyllä. Kantaja aminoidaan käsittelemällä 0,1 % aminopropyylitrietoksisilaanilla 95 % etanolissa. Sitten viedään valoherkkä suojaava ryhmä, joka häviää valosäteilytyksen jälkeen ja antaa reaktiivisen paikan, johon rakennuspalikka, esimerkiksi aminohappo, voidaan kytkeä. Kuvio, jossa altistus valoille tai muulle energiamuodolle tapahtuu (esimerkiksi maskin kautta) määrittää, mitkä kohdat kantajasta aktivoituvat kemiallista kytkentää varten. Koko pinta tuodaan kosketuksiin kytkettävän rakennuspalikan kanssa (jossa rakennuspalikassa on myös valoherkkä suojaava ryhmä). Kytkentäreaktio tapahtuu vain paikoissa, joissa edellisessä vaiheessa valo on antanut aiheutta aktivoitumiselle. Alusta altistetaan sitten toisen maskin läpi niin, että haluttuun paikkaan voidaan tuoda seuraava rakennuspalikka. Maskin kuvio ja reagenssi-järjestys määräävät muodostuneen peptidin järjestyksen. Tällä tavoin voidaan päästä suureen pienennysasteeseen. Esimerkiksi on mahdollista syntetisoida 40 000 erilaista peptidiä 1 cm²:llä.

Tällä menetelmällä on kuitenkin lukuisia haittapuolia. Suojaavan valoherkän ryhmän (nitroveratryylioksidikarbonyyli on nimetty artikkelissa) poisto tapahtuu säteilyttämällä 20 minuuttia elohopealampulla, jonka teho on 12 mW/cm³. Siitä on tuloksena hyvin pitkä synteesiaika pitempien peptidien synteisien tapauksessa. Edelleen on käytettävä erilaista maskia kullekin lisäsvaiheelle ja erilaista maskisarjaa on käytettävä kullekin peptidisarjalle.

Lisäksi kussakin lisäsvaiheessa voidaan lisätä vain yksi rakennuspalikka, koska erilaiset syntetisoitavat peptidit eivät ole avaruus-erotettuja. On ilmeistä, että reagenssien sekoittuminen tapahtuisi muutoin ja siten muodostuisi myös ei-toivottuja tuotteita. Tämä menetelmä on sen vuoksi hyvin työläs, erityisesti syntetisoitaessa peptidejä, jotka eroavat paitsi pituuden suhteen myös järjestyksen suhteen.

Itse artikkelin kirjoittajat koskettelevat myös synteessin luotettavuuden ongelmaa. Pyyhkiytymistä voi esiintyä seurauksena suojaryhmien epätäy-

dellisestä poistosta, mitä seuraa säteilytys valolla. Nettokytöntäprosentti on 85 - 95 %. Edelleen maskeja vaihdettaessa tapahtuu tiettyä päällekkäin menoa erilaisten synteesia-alueiden välillä valodiffraktion, sisäisen heijastuksen ja sironnan vaikutuksesta. Sen johdosta tummina pidetyillä alueilla muodostuu yhdisteitä, minkä tuloksena voi tapahtua ei-toivottua tietyn aminohapon korvautumista.

Julkaisussa FR-A-2 383 442 (Institut Pasteur) esitetään ratkaisu pienennysongelmaan. Ratkaisun mukaan pienennysreaktiot suoritetaan käyttäen lisätoimenpiteitä, kuten sentrifugointia, ja lisäastiaa kyseistä reaktiota varten. Julkaisussa kuvatun mikrokyvetin tilavuus voi olla muutaman mikrolitran luokkaa, mutta mikrokyvetti on vain tarkoitettu sellaisen näytteen mittaamiseen, jolle on jo suoritettu vaadittavat reaktiovaiheet toisessa paljon suuremmassa astiassa. Mainitun ranskalaisen julkaisun perusteella on ilmeistä, että mikrokyvetti ei sovellu reaktion suorittamiseen. Julkaisussa kuvataan melko yksityiskohtaista konstruktiota, joka edellyttää väliastian yhdessä sentrifugointivaiheen kanssa reaktion suorittamiseksi, minkä jälkeen reaktioseos siirretään mikrokyvettiin. Koska reaktio, kuten PEPSCAN, käsittää useita reaktiovaiheita, joihin liittyy lukuisia huuhteluvaiheita, julkaisussa kuvattu menetelmä ei ole käyttökelpoinen pienennetyin PEPSCAN:n suorittamiseen.

Keksintö koskee koelaitetta, joka ratkaisee edellä esitetyt pienennysongelmat ja sopii käytettäväksi bio- ja/tai immunokemiallisissa kokeissa kuten ELISassa ja kokeissa, joissa käytetään peptidisynteesiä, esimerkkinä edellä esitetty PEPSCAN.

Keksintö koskee koelaitetta, joka käsittää useita syvennyksiä sisältävän levyn ja jolle on tunnusomaista, että syvennyksien tilavuus on alueella 0,1 - 20 µl, ja että syvennyksien halkaisija on 1,0 - 4,0 mm. Syvennyksien mitat valitaan hinnan ja näytteiden saatavuuden ja käytettävien reagenssien mukaan. Yleensä syvennykset, jotka ovat mahdollisimman pieniä, ovat edullisia ja sen vuoksi keksintö koskee edullisesti koelaitetta, jossa syvennyksien tilavuus on alueella 0,1 - 5 µl.

Täysin vastoin odotuksia on nyt todettu, että syvennyksien tekeminen pienemmiksi ei vaikuta haitallisesti niiden tehokkaaseen huuhteluun. On todettu, että huuhteluaika, joka vaaditaan hyvän huuhtelun saamiseksi, on lyhyin, jos syvennyksien syvyyden suhde niiden halkaisijaan on vähemmän kuin 1:1. Sen vuoksi erittäin sopiva on koelaitte, joka käsittää useita syvennyksiä sisältävän levyn, ja jolle on tunnusomaista, että syvennyksien tilavuus on alueella 0,1 - 20 µl ja että syvennyksien halkaisija on 1,0 - 4,0 mm, jolloin lisäksi syvennyksien

syvyyden suhde niiden halkaisijaan on pienempi kuin 1:1. Keksinnön mukainen koelaitte, jossa syvennysten syvyyden suhde niiden halkaisijaan on pienempi kuin 2:3, on edullinen.

5 Kuviot 1 ja 2 esittävät tuloksia kokeista, joissa tutkittiin erilaisten koelaitteiden huuhdottavuutta. Koelaitteiden syvennysten halkaisija oli yhtä suuri (2 mm), mutta syvyys erilainen. Huuhdottavuutta tutkittiin ravistuskoneessa nopeuksilla 47 ja 40 vastaavasti. Syvennysten syvyys yksiköissä mm piirrettiin sen ajan, minuutteina, funktiona, joka tarvittiin syvennyksen kunnolliseen huuhtomiseen.

10 Keksintö koskee edullisesti koelaitetta, jossa syvennysten halkaisija on 1,0 - 2,0 mm. Syvennysten mittojen valinta riippuu halutusta spesifisestä kokeesta, jossa koelaitetta on määrä käyttää. Mitä pienempi halkaisija on, sitä pienempi on vaadittava näytetilavuus.

15 Halutun hyvän huuhdeltavuuden yhteydessä on edullista myös, että syvennyksillä on sellainen muoto, että syvennysten pystysuora poikkileikkaus on oleellisesti U-muotoinen, U:n sivujen ja pohjan välisen siirtymän ollessa vähittäinen. Edullisesti syvennyksessä ei ole teräviä kulmia.

Lukuisia sopivia syvennysten muotoja on esitetty kuviossa 3.

20 U-muoto, jossa pohjan ja sivujen välinen kulma on kohtisuora, on edullinen fotometrisiin määrittäksiin, joissa mittaus tapahtuu levyn alta ja sen läpi.

25 Keksinnön mukainen koelaitte on edullisesti levy, jonka sisältämät syvennykset on erotettu materiaalisuluilla, joiden leveydet ovat 1,0 - 5,0 mm, edullisesti materiaalisuluilla, joiden leveydet ovat 1,0 - 2,0 mm. Materiaalisulkujen tulee olla riittävän leveitä estämään reagenssien ylivirtauksen yhdestä syvennyksestä toiseen. Erityisesti materiaalisulkujen tulee olla riittävän leveitä, kun käytetään liuottimena DMF:a, kuten usein on laita peptidisynteesissä. Näin sen vuoksi, koska DMF:llä tiedetään olevan korkea virumiskapasiteetti.

30 Keksinnön mukainen koelaitte käsittää levyn, joka sisältää 5 - 20 syvennystä per cm^2 , edullisesti 10 - 15 syvennystä per cm^2 .

35 Edelleen koelaitte käsittää materiaalin, johon peptidit, proteiinit ja muut biokemialliset molekyylit, kuten hormonit ja polysakkaridit pystyvät tarttumaan. Koelaitteita varten, jotka sopivat kokeisiin peptidisynteesin kanssa, materiaali on edullisesti sellainen, johon peptidit ja proteiinit pystyvät tarttumaan, esimerkiksi polyeteeni tai polystyreeni.

Muita sopivia esimerkkejä materiaaleista, joita voidaan käyttää keksinnön mukaisissa koelaitteissa, ovat polypropeeni ja polykarbonaatti.

Koelaitteen materiaalivalinta riippuu myös koelaitteessa käytettävistä reagensseista ja määritysmenetelmästä. Koelaitteen pohjan läpi tapahtuvan fotometrisen analyysin tapauksessa esimerkiksi ainakin syvennyksien pohjien on koostuttava läpinäkyvästä materiaalista. Kokeissa, joissa liuottimena käytetään DMF:a, ei ole mahdollista käyttää polystyreenikoelaitetta, koska DMF on liian aggressiivista.

Edullinen toteutus koelaitteesta on varustettu tiedontallennusvälineillä, esimerkiksi viivakoodilla tai magneettinauhalla. Koelaitteeseen, joka on tarkoitettu suorittamaan tai joka on suoritettu, liittyvillä tiedoilla, jotka koskevat esimerkiksi käytettyjä reagensseja tai näytteitä. Koelaitteessa voi olla myös merkinnät, jotka osoittavat syvennyksien koordinaatit koelaitteessa.

Kuvio 4 esittää yläkuvaa keksinnön mukaisen koelaitteen yhdestä toteutus-esimerkistä.

Poikkileikkaus on esitetty kuviossa 5.

Kuten jo johdannossa mainittiin, keksintö koskee myös koemenetelmää (bio- ja/tai immuno-) kemiallisten kokeiden suorittamiseksi, joissa käytetään keksinnön mukaista koelaitetta. Yleensä keksinnön mukaista koelaitetta voidaan käyttää samoissa kokeissa kuin tunnettuja mikrotitrauslevyjä. Nyt on mahdollista suorittaa olemassa olevia menetelmiä käyttäen pienempiä näyte- ja reagenssimääriä; niin kutsutut minikokeet ovat nyt mahdollisia. On mahdollista vähentää käytetyn näytteen määrää tekijällä 100. Nyt on mahdollista käyttää 2,5 µl näytettä 250 µl:n näytteen sijasta syvennystä kohden. Keksinnön mukaisen koelaitteen käyttö tekee nyt populaatioryhmien joukkoseulonnan houkuttelevammaksi, koska luovuttajan verta tarvitaan paljon vähemmän ja tarvitaan paljon pienemmät reagenssimäärät.

Toinen suuri etu menetelmien pienentämisessä käyttäen keksinnön mukaista koelaitetta johtuu seikasta, että olemassa olevaa kemialla ei tarvitse muuntaa. Tässä yhteydessä huomaa esimerkiksi suuri etu automatisoitujen prosessien tapauksessa, esimerkkinä PEPSCAN. Koelaitteeseen sopii erityisen hyvin käytettäväksi menetelmissä, joissa täytyy käyttää suurta näytemäärää. Mini-ELISA ja mini-PEPSCAN, joissa käytetään keksinnön mukaista koelaitetta, ovat sopivia esimerkkejä keksinnön mukaisesta menetelmästä. Keksinnön mukaisella minimenetelmällä on se etu, että koe voidaan suorittaa pienemmällä kuin 20 µl:n näytemäärällä. On hyvin mahdollista käyttää alle 5 µl:n näytemäärää keksinnön mukaisessa minimenetelmässä.

Keksintö koskee myös annostelulaitetta, joka sopii yhtä suurien reagenssilavuuksien tuomiseen samanaikaisesti keksinnön mukaisen koe-

laitteen eri syvennyksiin. Keksinnön mukaista annostelulaitetta voidaan käyttää suorittaessa mahdollisimman tehokkaasti immuno- ja/tai biokemiallisia kokeita, joissa käytetään keksinnön mukaista koelaitetta. Tässä yhteydessä huomio kiinnitetään tiettyjen keksinnön mukaisten menetelmien mahdolliseen auto-

5

maatioon.

Jos ennalta määrätty yhtä suuri reagenssimäärä on tuotava samanaikaisesti useisiin syvennyksiin, on mahdollista käyttää keksinnön mukaista annostelulaitetta, jossa laitteessa on ulokkeet, joiden mitat ja keskinäiset välit ovat sellaiset, että yksittäiset ulokkeet voidaan sijoittaa samanaikaisesti

10

keksinnön mukaisen koelaitteen syvennyksen sisään tai sen yläpuolelle. Tämän tyyppisellä annostelulaitteella kaikkiin syvennyksiin voidaan samanaikaisesti panna yhtä suuri reagenssitilavuus, jos ulokkeiden sijainti on sellainen, että se vastaa oleellisesti syvennyksien sijaintia keksinnön mukaisessa koelaitteessa.

Eräs toteutus annostelulaitteesta ja koelaitteesta on esitetty kuviossa

15

6.

Jos koelaitteen syvennyksistä on täytettävä vain tietty määrä, muttei kaikkia, voidaan käyttää annostelulaitetta, jonka ulokkeet voidaan sijoittaa samanaikaisesti valittujen syvennyksien sisään tai niiden yläpuolelle.

Kuviossa 7 tummemmat syvennykset ovat valittuja syvennyksiä.

20

Annostelulaitteen ulokkeet sijaitsevat annostelulaitteessa sillä tavoin, että ne voidaan sijoittaa samanaikaisesti tummempien syvennyksien sisään tai niiden yläpuolelle.

Tähän pääsemiseksi on edullista käyttää annostelulaitetta, jossa ulokkeet on kiinnitetty kantajaan tai ne voidaan kiinnittää kuvioksi, joka vastaa niiden syvennyksien kuviota, joihin reagenssi on määrä viedä.

25

Kuvio 8 esittää esimerkin annostelulaitetoteutuksesta, jossa ulokkeet voidaan kiinnittää kantajaan.

Annostelulaite voi käsittää ulokkeita, jotka on kiinnitetty tai jotka voidaan kiinnittää kantajaan samalla tavoin kuin harjan harjakset (kuviot 6, 7 ja

30

8).

Annostelulaite, jossa ulokkeet kuten kamman piikit ovat yhdensuuntaiset toistensa kanssa ja jotka on kiinnitetty (kuvio 9) tai voidaan kiinnittää (kuvio 10) huipuistaan kantajaan, on myös erittäin sopiva toteutus keksinnön mukaisesta annostelulaitteesta. Ulokkeiden lukumäärä voi olla pienempi tai yhtä suuri kuin niiden syvennyksien lukumäärä, jotka muodostavat rivin laitteen leveyssuunnassa. Ulokkeiden lukumäärä riippuu koelaitteen niiden syvennyksien kuviosta, joihin reagenssi on määrä viedä.

35

Keksinnön mukaisen annostelulaitteen ulokkeet voivat olla yhtenäiset kantajan kanssa tai ne voivat olla irrotettavat. Ulokkeet voi olla sovitettu kantajaan sillä tavoin, että ulokkeet muodostavat kuvion, joka vastaa niiden syvennyksien kuviota, joka testilaitteen on määrä täyttää (katso kuvio 7).

5 On mahdollista käyttää myös annostelulaitetta, jossa yksi tai useampi uloke voi sijaita syvennyksen yläpuolella tai sen sisällä samanaikaisesti, jos syvennykseen halutaan samanaikaisesti viedä useampi kuin yksi yksikkö reagenssia, joka on ulokkeessa mukana.

10 Kuvio 11 esittää annostelulaitetta, jossa kunkin syvennyksen yläpuolelle tai niiden sisään voidaan samanaikaisesti sijoittaa kaksi uloketta.

Siten reagenssimäärä, joka ulokkeessa on mukana, voidaan katsoa vakioksi ja voidaan käyttää annostelulaitteita, joissa syvennyksen yläpuolella tai sen sisällä on ryhmä ulokkeita riippuen suhteesta, jossa reagensseja halutaan tuoda syvennykseen. Ryhmä käsittää sen määrän ulokkeita, joka vastaa
15 haluttujen reagenssiyksiköiden lukumäärää.

Keksinnön mukaisen annostelulaitteen tapauksessa ulokkeet voivat olla onttoja, mutta ne voivat olla myös umpinaisia tai pohjasta suljettuja. Kaksi viimeainittua mahdollisuutta ovat edullisia toimittaessa hyvin pienillä näyte- ja reagenssimäärillä, koska silloin on mahdollista toimia reagenssitipoilla.

20 Keksintö koskee myös menetelmää (bio- ja/tai immuno-) kemiallisen kokeen suorittamiseksi käyttäen keksinnön mukaista annostelulaitetta, jossa menetelmässä

25 a) annostelulaitteen ulokkeet varustetaan reagenssilla sillä tavoin, että annostelulaitteen yksittäisillä ulokkeilla tai yksittäisissä ulokkeissa on oleellisesti yhtä suuret reagenssitilavuudet, ja

b) annostelulaite sijoitetaan sitten keksinnön mukaisen koelaitteen syvennyksen sisään tai niiden yläpuolelle, joihin syvennyksiin on määrä saattaa reagenssia, kunkin yksittäisen ulokkeen sijaitessa syvennyksen sisällä tai sen yläpuolella samanaikaisesti, ja

30 c) oleellisesti samat reagenssitilavuudet viedään koelaitteen yksittäisiin syvennyksiin, joihin syvennyksiin reagenssia on määrä viedä.

Keksintö koskee myös tämän tyyppistä menetelmää, jossa annostelulaitteen ulokkeisiin tuodaan samanaikaisesti reagenssi upottamalla ulokkeet reagenssiin.

35 Keksintö koskee myös välineistöä, joka käsittää ainakin keksinnön mukaisen koelaitteen ja annostelulaitteen. Välineistö voi käsittää useita annostelulaitteita erilaisina edellä esitettyinä toteutuksina ja se voi käsittää myös

vaihdettavia ulokkeita annostelulaitteita varten.

Esimerkki 1

Pienennetty peptidisynteesi

Täyden tripeptidiverkon (8 000 erilaista peptidiä) pienennetty synteesi
 5 suoritettiin käyttäen keksinnön mukaisia koelaitteita. Esimerkissä käytetty
 koelaitte muistutti kooltaan luottokorttia ja se oli konstruoitu siten, että se käsitti
 455 syvennystä, joiden kunkin halkaisija oli 2 mm ja maksimitilavuus 5 µl.
 Koelaitte oli valmistettu polyeteenistä. Jotta tämä kiinteä kantaja tehtäisiin
 sopivaksi peptidisynteesille, syvennykset käsiteltiin menetelmällä, jonka esittää
 10 edellä mainittu Geysen et al. (1984). Polyakryylihapon karboksyyli-ryhmät
 varustettiin NH₂-ryhmällä kytkentäreaktiolla t-butyloksikarbonyyliheksamety-
 leenidiamiini (BOC-HMDA) -kytkijällä N,N-disykloheksyylikarbodi-imidin ja N-
 hydroksibentsotriatsolin (DDC/HOBt) läsnä ollessa. Kaikki nämä kytkentäreaktiot
 suoritettiin dimetyyliformamidissa (DMF).

15 Kun t-butyloksikarbonyyli-ryhmä oli poistettu trifluoretikkahapolla
 (TFA), kytkettiin seos kaikista 20:stä L-aminohaposta käyttäen samaa mene-
 telmää kuin käytettiin kytkijän kytkemiseen.

Kytkentäreaktiossa käytetty kokonaistilavuus oli määrältään 3 µl
 kullekin syvennykselle. Tarvittavien pienten määrien pipetointi tapahtui täysin
 20 automaattisesti käyttäen tietokoneohjattua robottikättä, jossa oli pipettiasennus
 (Hamilton MicroLab 2200). Erityinen ohjelmisto kirjoitettiin tähän tarkoitukseen,
 mikä teki mahdolliseksi kahden tässä esimerkissä käytettävän keksinnön
 mukaisen koelaitteen täyttämisen tunnissa.

25 Kytkentäaika kullekin aminohapolle kesti noin 2 - 3 tuntia. Erot
 kytkentäajassa johtuvat reaktion keskeytymisestä kun reaktioseos oli kokonaan
 haihtunut.

BOC-ryhmän poistamisen jälkeen TFA:lla seuraava aminohappo
 kytkettiin samalla tavalla sen jälkeen, kun sykli oli toistettu vielä kahdesti.

30 Viimeisen kytkentäreaktion jälkeen ja BOC-ryhmän poistamisen
 jälkeen NH₂-ryhmä asetyloitiin seoksella, jossa oli etikkahappoanhydridiä
 DMF:ssä ja trietyyliamiinissa suhteessa 2/5/1. Sivuryhmiä suojaavat ryhmät
 poistettiin vahvassa happoympäristössä. Tarkoitukseen käytettiin booristri-
 fluorietikkahappoa (BTT) TFA:ssa (30 mg/ml) kahden tunnin ajan huoneen
 lämpötilassa.

35 Peptidin kokonaisrakenne oli seuraava:

Ac-A₃-A₂-A₁-X-sulku,

jossa Ac on asettyliryhmä, A_x on yksittäinen aminohappo ja X on aminohappojen seos.

Esimerkki 2

5 **Elisa**

Keksinnön mukaiset koelaitteet huuhdottiin fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (PBS, 3 x 10 min) ennen peptidien viljelyä seerumilla, minkä jälkeen keksinnön mukaiset koelaitteet esipäälystettiin 1 tunnin ajan 37 °C:ssa 10 % hevosen seerumilla/10 % ovalbumiinilla/1 % Tween 80 PBS:ssä (SuperQ) tiettyjen vasta-aineiden absorption ehkäisemiseksi. Keksinnön mukaiset koelaitteet upotettiin kokonaan nesteeseen.

Koelaitteen syvennysten täytyttyä seerumilaimennus voi tapahtua kahdella tapaa. Jos seerumia on vain vähän, koelaitte voidaan täyttää käyttäen edellisessä esimerkissä mainittua robottikättä ja kun seerumia on riittävästi koelaitteet voidaan upottaa seerumiin ja sen jälkeen pyyhkäistä niin, että kaikki syvennykset täyttyvät samanaikaisesti.

Koelaitteviljely tapahtui yön aikana 4 °C:ssa vedellä kyllästetyssä ilmassa, minkä jälkeen koelaitteet pestiin kolme kertaa 0,05 % Tween 80/PES:lla sitoutumattomien vasta-aineiden poistamiseksi. Keksinnön mukaiset annostelu-laitteet, jotka oli viljelty seerumilla, viljeltiin sen jälkeen 1 tunnin ajan 37 °C:ssa vasta-aine konjugoidulla peroksidaasientsyymillä (1/1 000 SuperQ-liuos) upottamalla koelaitteet kyseistä entsyymiä sisältävään liuokseen. Tämän jälkeen testilaitteita huuhdottiin PBS:llä 3 x 10 min. Toisen vasta-aineen läsnäolo osoitettiin substraattinesteellä ABTS (2,2'-atsiinidi[3-etylibentstiatsoliini-sulfonaatti (6)]. Tässä kohden on mahdollista käyttää kahta edellä mainittua menetelmää syvennysten täyttämiseen, joko käyttää robottikättä tai upottaa laitteet substraattiin.

Patenttivaatimukset

1. Koelaite, joka käsittää levyn, joka sisältää useita syvennyksiä, t u n n e t t u siitä, että syvennysten tilavuus on 0,1 - 20 μl ja että syvennysten halkaisija on 1,0 - 4,0 mm, edullisesti 1,0 - 2,0 mm.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koelaite, t u n n e t t u siitä, että syvennysten tilavuus on 0,1 - 5 μl .

3. Jonkin edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen koelaite, t u n n e t t u siitä, että syvennysten syvyyden ja halkaisijan välinen suhde on pienempi kuin 1:1, edullisesti pienempi kuin 2:3.

4. Jonkin edeltävän patenttivaatimuksen mukainen koelaite, t u n n e t t u siitä, että syvennysten pystysuora poikkileikkaus on oleellisesti U-muotoinen U:n sivujen ja pohjan välisen siirtymän ollessa vähittäinen.

5. Jonkin edeltävän patenttivaatimuksen mukainen koelaite, t u n n e t t u siitä, että syvennykset erotetaan materiaalisuluilla, joiden leveys on 1,0 - 5,0 mm ja edullisesti 1,0 - 2,0 mm.

6. Jonkin edeltävän patenttivaatimuksen mukainen koelaite, t u n n e t t u siitä, että levy sisältää 5 - 20 syvennystä per cm^2 , edullisesti 10 - 15 syvennystä per cm^2 .

7. Jonkin edeltävän patenttivaatimuksen mukainen koelaite, t u n n e t t u siitä, että levyn syvennykset koostuvat materiaalista, johon biokemialliset molekyylit, kuten hormonit ja polysakkaridit, ja edullisesti peptidit ja proteiinit pystyvät tarttumaan.

8. Jonkin edeltävän patenttivaatimuksen mukainen koelaite, t u n n e t t u siitä, että syvennysten pohja on riittävän läpinäkyvä fotometrisen analyysin suorittamiseksi.

9. Menetelmä (bio- ja/tai immuno-) kemiallisen kokeen suorittamiseksi, erityisesti menetelmä, joka käsittää huuhteluvaiheen, kuten ELISA tai PEPSCAN, t u n n e t t u siitä, että käytetään jonkin patenttivaatimuksista 1 - 8 mukaista koelaitetta.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että koe suoritetaan käyttäen näytemääriä, jotka ovat 0,1 - 5 μl .

11. Annostelulaite, t u n n e t t u siitä, että se sopii viemään samanaikaisesti yhtä suuret reagenssitilavuudet jonkin patenttivaatimuksen 1 - 8 mukaisen koelaitteen eri syvennyksiin, ja

että laitteessa on ulokkeita, joiden mitat ja keskinäiset tilat ovat sellaiset, että yksittäiset ulokkeet voidaan sijoittaa samanaikaisesti jonkin

patenttivaatimuksen 1 - 8 mukaisen koelaitteen syvennyksiin tai niiden yläpuolelle, joihin reagenssia on määrä viedä, jolloin ulokkeet voivat olla irrotettavia.

5 12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen annostelulaite, t u n n e t t u siitä, että ulokkeiden sijainti on sellainen, että sijainti vastaa oleellisesti jonkin patenttivaatimuksen 1 - 8 mukaisen koelaitteen syvennyksen sijaintia.

13. Jonkin patenttivaatimuksista 11 - 12 mukainen annostelulaite, t u n n e t t u siitä, että ulokkeet ovat pohjasta suljetut.

10 14. Menetelmä (bio- ja/tai immuno-) kemiallisen kokeen suorittamiseksi käyttäen jonkin patenttivaatimuksen 11 - 13 mukaista annostelulaitetta, t u n n e t t u siitä, että

a) annostelulaitteen ulokkeet varustetaan reagenssilla sillä tavoin, että annostelulaitteen yksittäisillä ulokkeilla tai yksittäisissä ulokkeissa on oleellisesti yhtä suuret reagenssitilavuudet, ja

15 b) annostelulaite sijoitetaan sitten jonkin patenttivaatimuksen 1 - 8 mukaisen koelaitteen syvennyksen sisään tai niiden yläpuolelle, joihin syvennyksiin on määrä saattaa reagenssia, kunkin yksittäisen ulokkeen tai kunkin ulokeryhmän sijaitessa syvennyksen sisällä tai sen yläpuolella samanaikaisesti, ja

20 c) oleellisesti samat reagenssitilavuudet viedään koelaitteen yksittäisiin syvennyksiin, joihin syvennyksiin on määrä viedä reagenssia.

25 15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä (bio-ja/tai immuno-) kemiallisen kokeen suorittamiseksi, t u n n e t t u siitä, että menetelmän vaiheessa a) annostelulaitteen ulokkeet varustetaan samanaikaisesti reagenssilla upottamalla ulokkeet reagenssiin.

16. Välineistö, t u n n e t t u siitä, että se käsittää ainakin jonkin patenttivaatimuksen 1 - 8 mukaisen koelaitteen ja ainakin jonkin patenttivaatimuksen 11 -13 mukaisen annostelulaitteen.

Patentkrav:

1. Testanordning i form av en skiva som innehåller ett flertal brunnar, k ä n n e t e c k n a d av, att brunnarna har en volym i området 0,1 - 20 µl och
5 att brunnarnas diameter är 1,0 - 4,0 mm, företrädesvis 1,0 - 2,0 mm.

2. Testanordning enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d av, att brunnarna har en volym i området 0,1 - 5 µl.

3. Testanordning enligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a d av, att förhållandet mellan brunnarnas djup och diameter
10 är lägre än 1:1, företrädesvis lägre än 2:3.

4. Testanordning enligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a d av, att ett vertikalt tvärsnitt av brunnarna är väsentligen U-format, och att övergången mellan benen och basen i U:et är graduell.

5. Testanordning enligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a d av, att brunnarna är separerade genom materialbarriärer
15 med en bredd mellan 1,0 och 5,0 mm, företrädesvis mellan 1,0 och 2,0 mm.

6. Testanordning enligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a d av, att skivan innehåller 5 - 20 brunnar per cm²,
företrädesvis 10 - 15 brunnar per cm².

20 7. Testanordning enligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a d av, att brunnarna i skivan består av ett material, vid vilket biokemiska molekyler, såsom hormoner och polysackarider och företrädesvis peptider och proteiner, kan häfta sig.

25 8. Testanordning enligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a d av, att botten av brunnarna är tillräckligt transparent för utförande av fotometrisk analys.

30 9. Förfarande för utförande av ett (bio- och/eller immuno)kemiskt test, speciellt ett förfarande som omfattar ett sköljningssteg, såsom ELISA eller PEPSCAN, k ä n n e t e c k n a t av, att en testanordning enligt något av patentkraven 1 - 8 används.

10. Förfarande enligt patentkrav 9, k ä n n e t e c k n a t av, att testet utföres under användning av provmängder mellan 0,1 och 5 µl.

35 11. Doseranordning, k ä n n e t e c k n a d av, att den lämpar sig för samtidig införing av lika stor mängder reagenser i olika brunnar av en testanordning enligt något av patentkraven 1 - 8, och

att anordningen försetts med utsprång, vilka har sådana dimensioner och inbördes avstånd att individuella utsprång samtidigt kan placeras i eller

ovanför brunnarna i en testanordning enligt patentkraven 1 - 8, vilken är avsedd att försees med reagens, varvid nämnda utsprång eventuellt är lösgörbara.

12. Doseranordning enligt patentkrav 11 k ä n n e t e c k n a d av, att läget för utsprången är sådant av nämnda läge väsentligen motsvarar läget
5 för brunnarna i testanordningen enligt något av patentkraven 1 - 8.

13. Doseranordning enligt något av patentkraven 11 - 12, k ä n n e t e c k n a d av, att utsprången är tillslutna vid botten.

14. Förfarande för utförande av ett (bio- och/eller immuno)kemiskt test under användning av en doseranordning enligt något av patentkraven 11 -
10 13, k ä n n e t e c k n a t av, att

(a) utsprången i doseranordningen försetts med reagens på sådant sätt, att väsentligen lika stora volymer reagens är närvarande på eller i de individuella utsprången i doseranordningen, och

(b) doseranordningen placeras sedan i eller ovanför brunnarna i
15 testanordningen enligt något av patentkraven 1 - 8, varvid varje individuellt utsprång eller varje grubb av utsprång då brunnarna skall försees med reagens, ligger i eller ovanför en brunn samtidigt, och

(c) att väsentligen lika stora volymer reagens införs i testanordningens individuella brunnar då brunnarna skall försees med reagens.

20 15. Förfarande för utförande av ett (bio- och/eller immuno)kemiskt test enligt patentkrav 14, k ä n n e t e c k n a t av, att i steget (a) försees utsprången i doseranordningen samtidigt med reagens genom neddoppning av utsprången i reagensen.

25 16. Testförpackning, k ä n n e t e c k n a d av, att den omfattar åtminstone en testanordning enligt patentkraven 1 - 8 och åtminstone en doseranordning enligt något av patentkraven 11 - 13.

fig-1

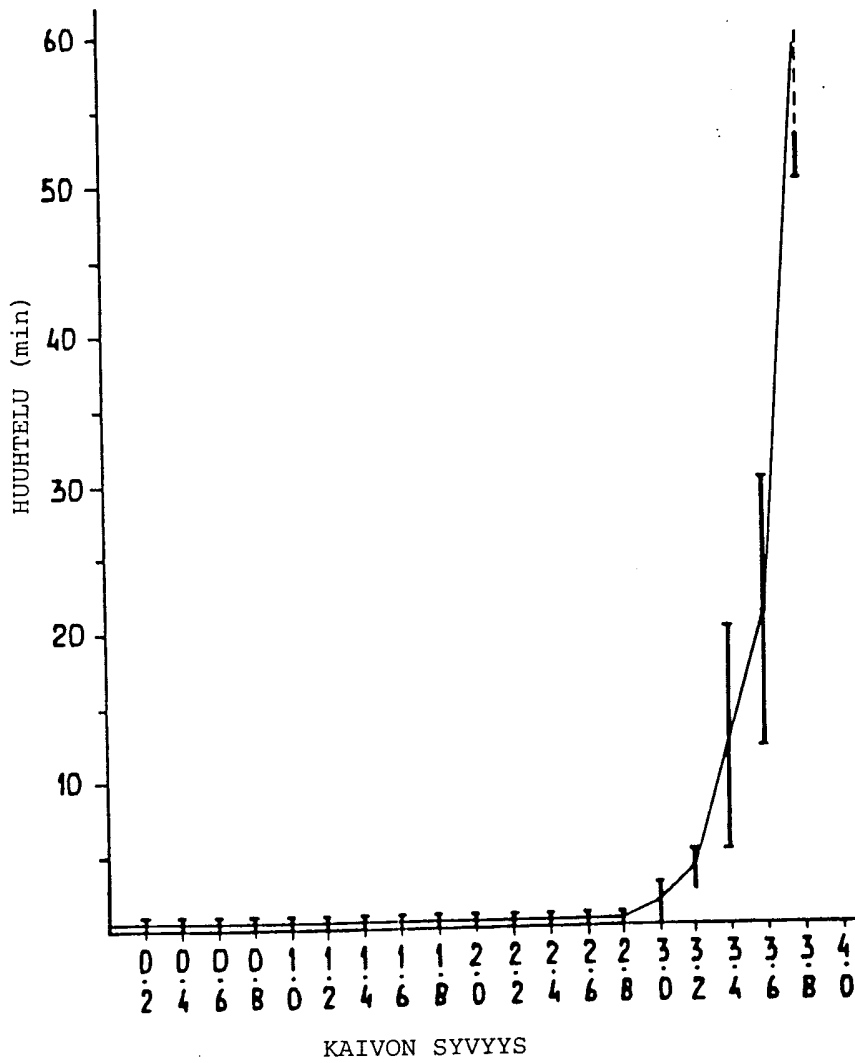
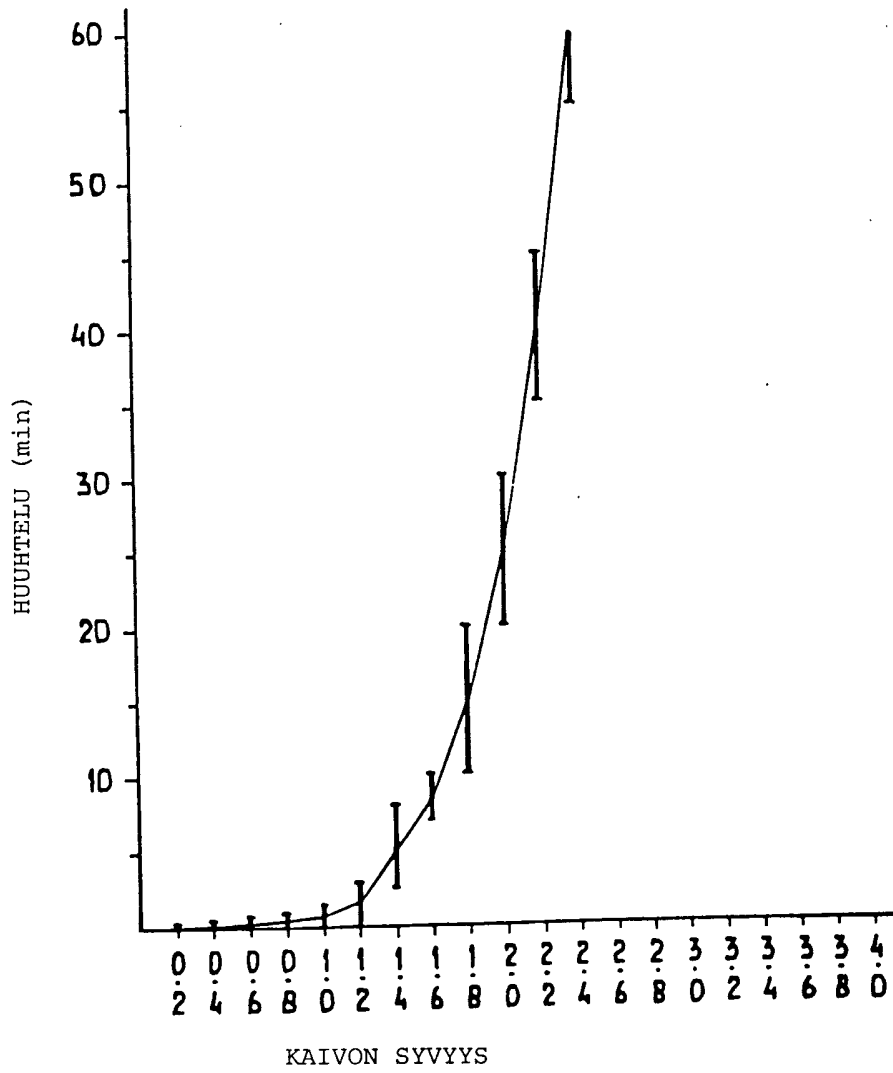


fig-2



0
0
0
0
1
1
1
1
1
2
2
2
2
2
3
3
3
3
3
4

3/5

fig-3

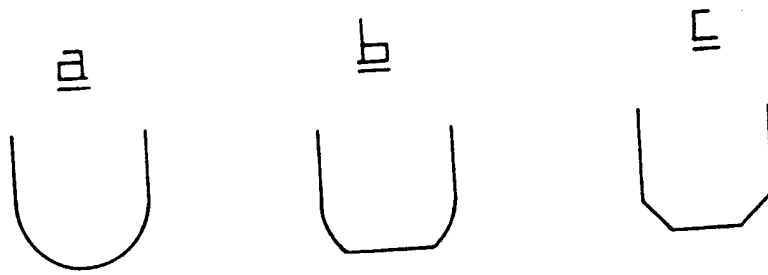


fig-4

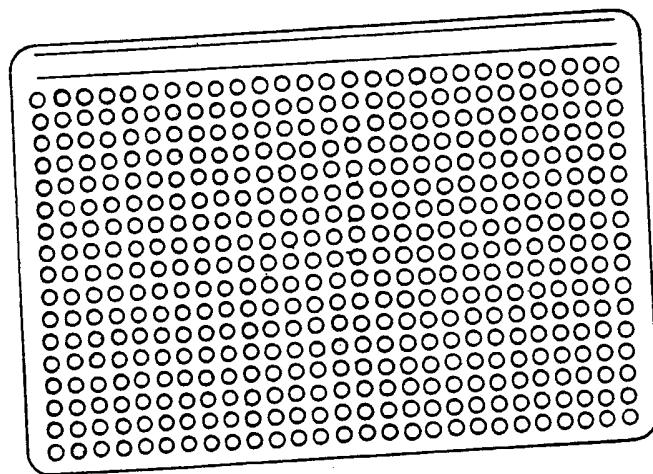
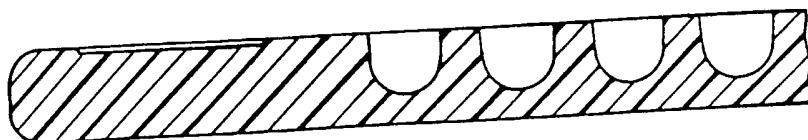


fig-5



109556

4/5

fig - 6

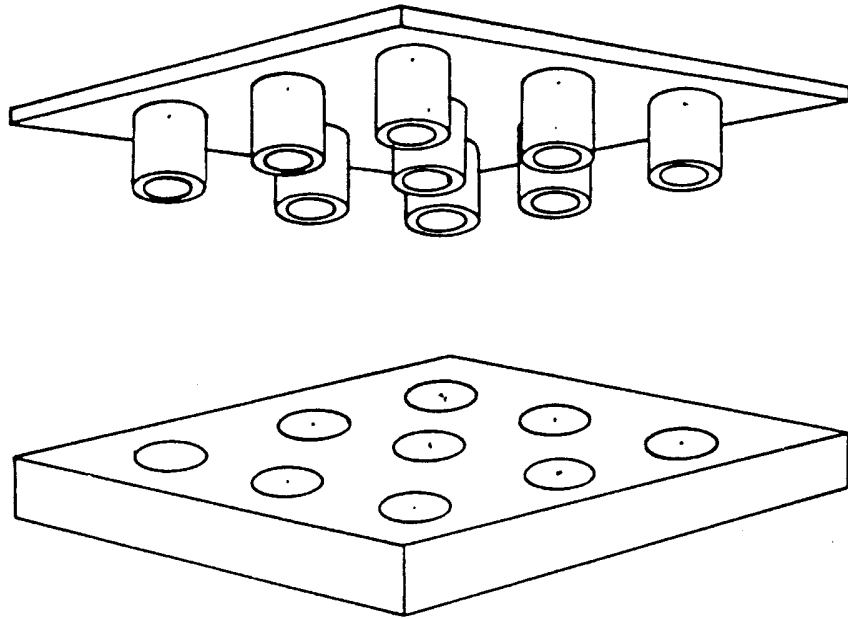
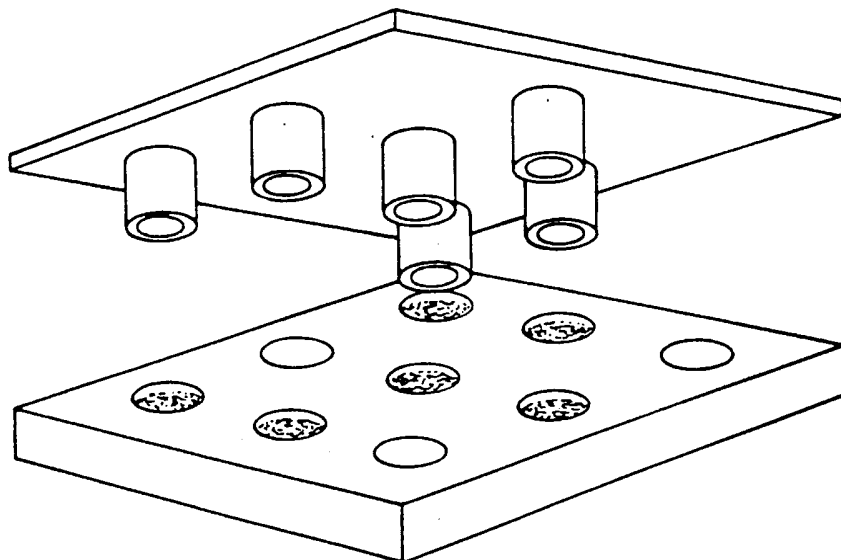


fig - 7



109556

fig - 8

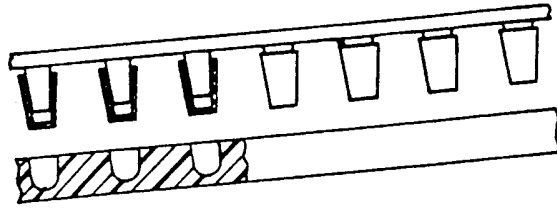


fig - 9

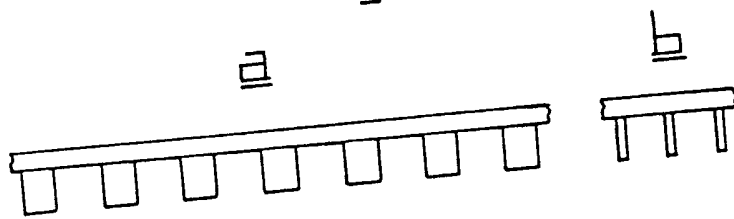


fig - 10

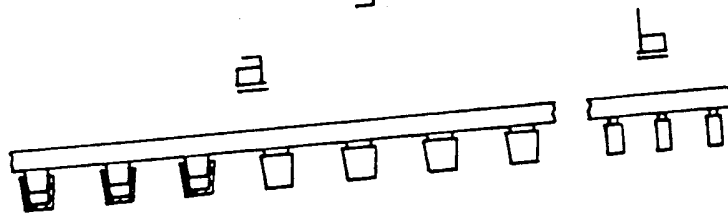
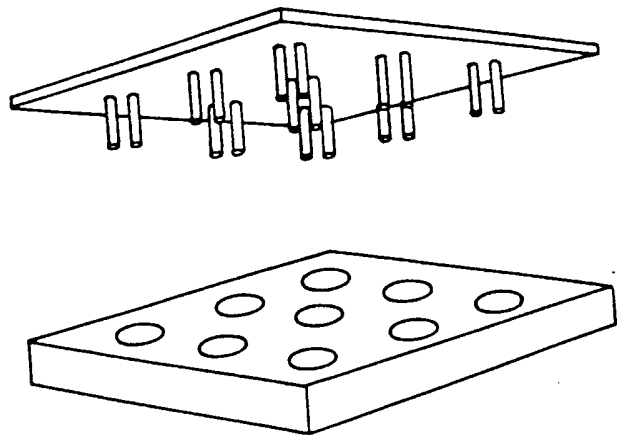


fig - 11



SECRET