



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102812361 A

(43) 申请公布日 2012. 12. 05

(21) 申请号 200980163137. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 12. 28

G01N 33/543(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 06. 25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2009/055967 2009. 12. 28

(87) PCT申请的公布数据

W02011/080537 EN 2011. 07. 07

(71) 申请人 阿茨拉实验室有限公司

地址 印度班加罗尔

(72) 发明人 D·登达克日 R·卡提亚

L·P·西梵库马兰

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限

公司 11314

代理人 程伟 韩文华

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 14 页

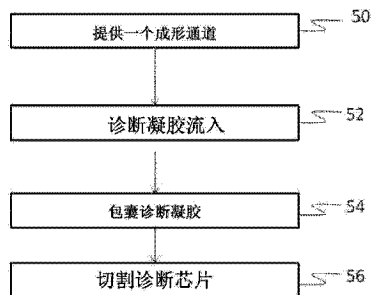
(54) 发明名称

诊断凝胶组合物、制造诊断凝胶组合物的方法

(57) 摘要

本发明涉及用作诊断装置中诊断元件的诊断凝胶组合物。诊断凝胶组合物源自具有式 D-Sp-Po 的化合物,其中 D 是诊断基团;Sp 是亲水间隔基团;以及 Po 是可聚合的基团。本发明的诊断凝胶组合物具有范围从大约 250 纳米至大约 1000 微米的尺寸,以及范围从大约 10 千帕至约 200 千帕的杨氏模量。本发明还提供制造诊断凝胶组合物的方法。该方法包括提供包括致孔剂、引发剂和具有式 D-Sp-Po 的化合物的组合物;使组合物聚合来形成聚合的组合物;以及冲洗聚合的组合物来形成诊断凝胶组合物。

48



1. 一种诊断凝胶组合物,其具有范围从大约 250 纳米到大约 1000 微米的尺寸,以及范围从大约 10 千帕至大约 200 千帕的杨氏模量,其中诊断凝胶组合物源自具有下式的化合物 D-Sp-Po ;  
其中 D 是诊断基团 ;  
Sp 是亲水间隔基团 ;以及  
Po 是可聚合的基团。
2. 根据权利要求 1 所述的诊断凝胶组合物,其中 D 是通过抗病毒表面抗原的体所生产的抗体。
3. 根据权利要求 1 所述的诊断凝胶组合物,其中 Sp 是基于聚乙二醇的基团。
4. 根据权利要求 1 所述的诊断凝胶组合物,其中 Po 是乙烯基团。
5. 根据权利要求 1 所述的诊断凝胶组合物,其中还包括具有范围从大约 5 纳米到大约 1000 纳米孔的尺寸的孔。
6. 根据权利要求 1 所述的诊断凝胶组合物,其中 Po 是乙烯基并且 Sp 是基于聚乙二醇的基团。
7. 一种包括 1 的诊断凝胶组合物的诊断元件。
8. 一种包括权利要求 6 的诊断元件的诊断装置。
9. 一种制造诊断凝胶组合物的方法,所述方法包括 :  
提供包括致孔剂、引发剂和具有下式的化合物的组合物 ;  
D-Sp-Po ;  
使组合物聚合来形成聚合的组合物 ;  
洗涤聚合的组合物来形成诊断凝胶组合物 ;  
其中 D 是诊断基团 ;Sp 是亲水间隔基团 ;以及 Po 是可聚合的基团。
10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中聚合是通过光聚合。
11. 根据权利要求 10 所述的方法,其中通过光罩发挥聚合作用。
12. 根据权利要求 9 所述的方法,其中致孔剂是碳酸氢钠。
13. 根据权利要求 9 所述的方法,其中引发剂是光引发剂。
14. 根据权利要求 9 所述的方法,其中 D 是特异于特定抗原的 HIV- 抗体。
15. 根据权利要求 9 所述的方法,其中 D 是适配子。
16. 根据权利要求 9 所述的方法,其中 D 是寡核苷酸。
17. 根据权利要求 9 所述的方法,其中 Sp 是基于聚乙二醇的基团。
18. 根据权利要求 9 所述的方法,其中 Po 是乙烯基。
19. 根据权利要求 9 所述的方法,其中还包括洗掉致孔剂。

## 诊断凝胶组合物、制造诊断凝胶组合物的方法

### 技术领域

[0001] 本发明通常涉及用于诊断元件(element)的诊断凝胶组合物,诊断元件在用于进行快速疾病检测和更特别地在芯片上进行免疫分析的基于微流体芯片的平台的发展和制造中是有用的。

### 背景技术

[0002] 分析物(包括蛋白质、DNA/RNA 以及来自体液和其它生物来源样本的代谢物)的检测对于各种应用(包括医学测试、毒素检测和法医学分析)是必不可少的。这种分析物的改进的现场即时测试是迫切的全球需求。为这种应用而设计的当前的系统受到一些缺点的困扰,如成本高,笨重和延迟的结果。因此对于系统的发展有大量未得到满足的需求:成本低、便携、方便操作和显示出检测的高效率。这些系统还应当能够迅速鉴别广泛的来自生物来源的样本的分析物。在过去十年中,微流体(芯片实验室方法)作为这种问题的解决已取得突出(的地位)。使用微流体免疫分析的蛋白质测量已经成为重点领域之一。而微流体技术作为这种问题的解决已取得突出(的进展),其中的很多受到缺乏可以使想法从学术实验室转换至工业的成熟制造能力的阻碍。它们典型地使用与标准工业方法不兼容的实验室规模的制造技术和材料,这也是不利于许多装置快速生产的规模放大(1)。装置的所有元件需要经发展和调整来制造满足此处描述的要求的装置。

### 发明内容

[0003] 一方面中,本发明提供一种诊断凝胶组合物。本发明的诊断凝胶组合物具有范围从大约 250 纳米至大约 1000 微米的尺寸,以及范围从大约 10 千帕至约 200 千帕的杨氏模量。诊断凝胶组合物源自具有式 D-Sp-Po 的化合物;其中 D 是诊断基团;Sp 是亲水间隔基团;以及 Po 是可聚合的基团。

[0004] 在另一方面中,本发明提供一种用于制造诊断凝胶组合物的方法。该方法包括提供包括致孔剂、引发剂和具有式 D-Sp-Po 的化合物的组合物;使组合物聚合来形成聚合的组合物;冲洗聚合的组合物来形成诊断凝胶组合物。

[0005] 在另一方面中,本发明提供一种包括本发明诊断凝胶组合物的诊断元件。

[0006] 在另一方面中,本发明提供一种包括诊断元件的诊断装置,其中诊断元件包括本发明的诊断凝胶组合物。

### 附图说明

[0007] 当参考附加的附图阅读如下详细说明时,本发明的这些和其它特征、方面和优点将变得更好理解,其中整个附图中相似的特征代表相似的部分,其中:

[0008] 图 1 是根据本发明的一方面的示例性诊断元件的图解示意图;

[0009] 图 2 是根据本发明的另一方面的示例性诊断装置的图解示意图;

[0010] 图 3 是根据本发明的一方面的具有一个以上支持口(holding port)的另一示例

性诊断装置的图解示意图；

[0011] 图 4 是另一示例性诊断装置的图解示意图,其中支持口顺序连接；

[0012] 图 5 是显示分析物附着至根据本发明一方面的诊断凝胶的诊断端的图解示意图；

[0013] 图 6 是显示支持根据本发明另一方面的分析物的两个诊断端的图解示意图；

[0014] 图 7 是用于制造诊断元件的方法的示例性步骤的流程示意图；

[0015] 图 8 是如图 7 中所解释的方法的结果的照片示意图,其显示在支持口中本发明的诊断凝胶的捕获(capture)；

[0016] 图 9 是用于提供用来制造诊断元件的成形通道的方法的示例性步骤的流程示意图；

[0017] 图 10 是用于使用诊断元件的方法的示例性步骤的流程示意图；

[0018] 图 11 是用于根据本发明一方面的多路(multiplex)免疫分析的诊断元件的图解示意图；

[0019] 图 12 是具有根据本发明一方面的多种分析物的图 10 的诊断元件的图解示意图；

[0020] 图 13 是具有根据本发明一方面的荧光标记的二抗的图 11 的诊断元件的图解示意图；

[0021] 图 14 是本发明的诊断凝胶的照片；

[0022] 图 15 是用含有荧光团的蛋白质溶液处理的本发明的诊断凝胶的荧光图像；以及

[0023] 图 16 是用含有荧光团的蛋白质溶液处理的水凝胶的荧光图像。

## 具体实施方式

[0024] 如此处和权利要求中所用,除非上下文另有明确表示,否则单数形式“一个”、“一”和“这个”包括了复数指代。

[0025] 应当注意,在如下详细描述中,相同成分具有相同的附图标记,无论它们是否显示在本发明不同的实施方式中。还应当注意,为了清楚和简明地披露本发明,图可能不一定成比例,并且本发明的具体特征可或多或少以示意性形式显示。

[0026] 一方面中,本发明提供诊断元件和包括诊断元件的诊断装置。本发明的诊断装置也可能被本领域普通技术人员称为诊断芯片或简称芯片。本发明的诊断元件显示于图 1 中并由数字 10 表示。诊断元件包括成形通道,其在图 1 中通常由数字 12 表示。成形通道包括至少一个支持口 14。支持口以长方形的二维示意图显示,但它可能是任何形状,比如,但不仅限于梯形、正方形、圆柱、立方体等以及这些形状的组合。成形通道还包括入口通路(inlet passage) 16 和出口通路 18。入口通路允许针对本发明的流体和其它材料的流进入支持口以及出口通路允许流体的流出来进入合适的容器或收集器。出口和入口通路的宽度的比可以不同以便将诊断凝胶安全地支持在支持口中。本发明的成形通道通常是由适于预期目的的材料制成的,如将在此后描述的。

[0027] 本发明的诊断元件还包括诊断凝胶 20。用于本发明的典型诊断凝胶可源自包括具有如下式的化合物的组合物：

[0028] D-Sp-Po；

[0029] 其中, D 是诊断基团；

[0030] Sp 是亲水间隔基团；以及

[0031] Po 是可聚合的基团。

[0032] 用于制造本发明诊断凝胶的化合物包括可聚合的基团。可聚合的基团,如此处所用,表示能够和互补化学实体反应形成连接的链(本领域称为重复单位)的任何化学实体。可聚合的基团的实例是乙烯基,由两个碳原子之间的双键表示。这种基团可以和另一乙烯基反应形成碳-碳链。另一个示例性可聚合的基团是环氧基,其可以和另一环氧基反应形成烷氧基链。如此处所用可聚合的基团还意味着包括一个以上的化学实体。因此,一种化合物可能具有一个以上乙烯基。当出现多个这样的化学实体时,那么当聚合时产生交联的网。这在本发明中是特别有利的。在一个示例性实施方式中,用于制造本发明诊断凝胶的组合物可分别以 90:10 的重量比包括仅具有一个可聚合的基团的第一化合物以及具有一个以上可聚合的基团的第二化合物。在另一个示例性实施方式中,第一和第二化合物的重量比是 50:50,而在另一个示例性实施方式中,重量比可能分别是 0:100。在一些其它示例性实施方式中,可聚合的基团可能是二羧基。这种基团可能与例如二醇基反应形成聚酯。在这种情况下,考虑的化学实体是羧基,而互补化学实体是醇。同样,二羧酸和二胺可用于形成二胺。其它示例性聚合部分包括聚氨酯、聚缩醛、聚醚等。在例如二羧酸和二醇的情况下,这可能用于包括具有三羧酸或三醇或两者的混合物的化合物,来形成诊断凝胶所源自的化合物。在这种情况下,可能存在约 10 重量百分比(相对于二羧酸)的三羧酸。

[0033] 本发明中有用的化合物还包括亲水间隔基团,在式中表示为 Sp。典型的在本发明中有用的亲水基团包括但不限于醚、醇、二羟基醇、胺、酯、酰胺、醇、羧酸等。这些基团必须存在于最终的诊断凝胶组合物中,因而在诊断凝胶形成步骤期间必然不能经历任何化学转化,或者如果它们经历化学转化,它们必须转化成另一个亲水基团。亲水基团,如此处所用,是指能够吸水的任何基团。描述亲水基团的另一种方法是那些基团,当暴露于一滴水时,水和材料表面之间的接触角往往是锐角。一个特别有用的间隔基团是醚基团。

[0034] 化合物还包括至少一个诊断端。诊断端,如此处所用,是指可用于某些其它部分的检测的任何化学部分。例如,诊断端可意味着用来检测特定类型的细胞或抗原的抗体。

[0035] 诊断凝胶是由此处所述的组合物形成的。在一个示例性实施方式中,诊断凝胶是通过暴露于光来固化本发明的组合物而形成一个其中尺寸在约 100nm 至约 1000 微米的范围内的具有三维架构的结构,其中组合物具有 90 重量百分比的化合物(具有单个可聚合基团、间隔基团和诊断端)以及 10 重量百分比的具有两个可聚合基团的化合物。尺寸可能包括长、宽、高、体积、面积、周长(circumference)、周长(perimeter)等,尺寸的选择取决于构架的形状。形成诊断凝胶的一个这种方法在 US2007/0105972A1 中给出。

[0036] 本发明中可用于制造诊断凝胶的组合物还包括致孔剂。致孔剂是添加至组合物来在组合物中诱导具有确切特征(比如孔的尺寸、孔密度等及其组合)的孔的外来化合物。有用的致孔剂是一种有能力产生具有范围从 5 纳米到约 1000 纳米确切尺寸的孔的化合物。在一个实施方式中,致孔剂是碳酸氢钠,而在另一个实施方式中,致孔剂是氯化钠,而在另一个实施方式中,它是柠檬酸。在一些实施方式中,致孔剂是一种分散于整个用于制造诊断凝胶的组合物中的液体组合物。一些实例包括但不限于乙酸、聚乙二醇-200、乙二醇、甘油等。在另一些实施方式中,致孔剂是气态流体比如二氧化碳,这种气态流体可能使用适当的化合物(比如碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸钙等)在原位产生。在其它一些实施方式中,可通过适当的手段比如吸附将气态流体限制在组合物中。

[0037] 只要知道致孔剂不会影响诊断凝胶的性能,就可允许致孔剂留在本发明的组合物中。在这种情况下,诊断凝胶还包括致孔剂。或者,可在一个步骤中洗掉致孔剂来提供诊断凝胶。致孔剂和化合物的选择、诊断凝胶生产中涉及的步骤将确定是否致孔剂被允许保留或被除去或在独立的步骤中被洗掉来形成本发明的诊断凝胶。

[0038] 本发明的组合物可进一步包括引发聚合反应的引发剂、催化剂、链转移剂、缓凝剂、抑制剂、添加剂来提供强度或改善胶凝能力,例如,以及其它有用的成分。

[0039] 本发明的诊断凝胶通过固化此处所述的组合物而形成。如此处所用,固化意味着至少一个可聚合基团的聚合。本领域技术人员将理解根据本发明的组合物的性质,组合物的聚合可能产生线性聚合物、或分支聚合物、或交联聚合物网。在一个实施方式中,本发明组合物的固化产生交联的聚合物网,当聚合物网暴露于合适的溶剂时将形成交联的凝胶。光解方法可有利地发挥固化作用,其涉及将组合物暴露于合适波长的光。在一个示例性实施方式中,组合物以液态形式存在,并流入到合适的容器中。在一个具体实施方式中,容器是诊断元件的支持口。在另一个具体实施方式中,容器是诊断装置的独立部分,比如此处所述的制备口。在另一个具体实施方式中,容器是可独立于本发明的诊断装置而获得的不同的凝胶形成装置,从此处形成的诊断凝胶分别收集并用于诊断元件中。固化通常通过组合物的暴露发挥作用,即以预先确定的一段时间通过成形罩(shaped mask)以便仅固化组合物暴露的部分。用于起到固化作用的光通常是紫外线辐射,通常具有特定波长、幅和强度,但其它辐射比如 gamma 辐射也可用于固化化合物来形成诊断凝胶。起到固化作用所需的时间取决于化合物的性质、光引发剂的量等,并且范围可从约 0.5 秒到约 30 秒。随后用合适的溶剂或溶剂混合物洗涤诊断凝胶来从诊断凝胶中洗掉未固化的组合物部分。

[0040] 在另一个实施方式中,具有至少一个可聚合基团的单体通过部分暴露于光被部分固化。可通过单体在光源下暴露比完全固化所必需的时间更短的时间(例如 3 秒以下)来起到部分固化作用。或者,也可通过单体暴露于具有与完全固化所用光的强度不同的强度的光来起到部分固化作用。此外,也可通过使用相对于单体浓度更低浓度的光引发剂来起到不完全固化作用。随后,本发明的化合物随着包含有诊断端和可聚合端的化合物一起流入。可通过将本发明组合物进一步暴露于光源任选地以预先确定的一段时间通过成形罩来起到混合物完全固化的作用。这导致诊断端添加到诊断凝胶的表面。必要时最终固化产物可然后进行洗涤步骤。

[0041] 或者,含有可聚合端和第一反应基团的组合物可经固化形成包括反应基团的可聚合材料。这种可聚合材料可然后与包含能够与可聚合材料上的反应基团反应的诊断端和共反应基团的诊断分子反应。可聚合材料上的反应基团和诊断分子之间的反应将产生在本发明的诊断凝胶中。在一个示例性实施方式中,可聚合材料上的反应基团是马来酰亚胺基团,诊断分子上的 c- 反应基团是巯基。

[0042] 本发明的组合物可能在其中已经包含孔。这些孔本领域技术人员也称为孔隙体积(void volume)或空洞。这些孔通常采取两个交联点之间的平均距离。洗涤步骤也可从诊断凝胶中洗掉致孔剂而留下诊断凝胶中的孔。孔的尺寸将直接对应冲洗步骤之前存在的致孔剂的尺寸。或者,致孔剂可被允许留在本发明的诊断凝胶内,而仍然形成诊断凝胶内的孔。在另一个实施方式中,来自不同光源的干扰模式可用于在本发明的诊断组合物中诱导孔,如 Jang 等人 *Angew Chem.* 2007 中描述的。这种技术省去了在组合物中对致孔剂的需要。

[0043] 形成的诊断凝胶具有范围从大约 250 纳米到约 1000 微米的尺寸。如此处所用,尺寸意味着给定的几何形状的任何标准测量特征,并可能包括,但不仅限于长、宽、高、对角线长度、周长、直径、半径、或其组合。诊断凝胶的特征还在于孔的尺寸。本发明中最有用的孔的尺寸通常范围从约 5 纳米到约 1000 纳米。本发明的诊断凝胶的特征还在于杨氏模量。杨氏模量的测量方法是本领域众所周知的,用于测量杨氏模量的一个示例性装置是万能测试机(Universal Testing Machine),它采用应力-应变(Stress-Strain)之间的测绘来估计杨氏模量。

[0044] 如前所述,诊断凝胶可在前面的步骤中形成,其然后分别收集和纯化、化学修饰并然后通过用合适的流动流体流动引入成形通道。在另一个替代实施方式中,可在成形通道单独的区段(section)中形成诊断凝胶并随后流入支持口。在另一个实施方式中,组合物流入支持口,使用此处所述方法在支持口中形成诊断凝胶。可通过本领域技术人员已知的合适的流动方法实现本发明组合物的流动。或者,通过使组合物流入已经流动的不互溶的第二流体中形成本发明组合物的液滴,其中组合物以相对于第二流体流向呈直角地流入第二流体。不受任何理论的约束,液滴的尺寸和形状通常被认为取决于组合物的粘度、第二流体造成的剪切速率(shear rate)、通道几何以及其它因素。这些液滴可然后在支持口或成形通道单独的区段中被固化。考虑几个因素以确保本发明的诊断凝胶或组合物包囊于支持口中。不受任何理论的约束,本发明的诊断凝胶或组合物流入或包囊于支持口中的能力正比于:诊断凝胶的尺寸;诊断凝胶或组合物的杨氏模量;流体流动的粘度;流体流动的流动速度;形成成形通道的材料的杨氏模量;温度;入口通路的尺寸;出口通路的尺寸;诊断凝胶或组合物的压缩因子(compressibility factor);压力,比如在给定表面区域的真空度等。可能有其它因素影响诊断凝胶或组合物流入其支持口和包囊的能力。

[0045] 因此,在一个实施方式中,成形通道由具有低杨氏模量的软材料制成,并且诊断凝胶很硬。可用于制造成形通道的软材料的一个实例是 PDMS。在这种情况下,软的成形通道变形来允许诊断凝胶的流进入支持口。在另一个实施方式中,成形通道由刚性硬材料制成。硬的刚性材料的一个实例可能是聚(甲基丙烯酸甲酯),其为各种在商业上可获得的商品名称为,比如 Plexiglass®、Gavrieli®、Vitroflex®、Limacryl®、R-Cast®、Per-Clax®、Perspex®、Plazcryl®、Acrylex®、Acrylite®、Acryplast®、Altuglas®、Polycast®、Oroglass®、Optix® 和 Lucite®。对于这种应用另一个有用的材料是环烯烃共聚物,商业上可获得,例如,来自 Polyplastics 的 Topas®。在这种情况下,正压或负压可用于推或拉诊断凝胶使其通过包含支持口的通道。通过在所需的位置施加真空可实现负压。此外,在这种情况下,诊断凝胶要足够软以便它可以变形而通过入口通路进入至支持口中并在其中进行包囊(图 8)。通过使用适当的收缩几何结构阻止凝胶沿着流动的方向流出支持口,其中入口通路宽度大于出口通路宽度。

[0046] 在一个实施方式中,对于本发明诊断凝胶有用的杨氏模量的值范围从约 1kPa 至约 200kPa。一个示例性的诊断凝胶可能源自附着有胰岛素抗体的聚乙二醇-二丙烯酸酯。在另一个示例性实施方式中,诊断凝胶可能是具有针对抗体的抗原的聚乙二醇二丙烯酸酯衍生凝胶,其中抗体是暴露于 HIV 病毒所产生。

[0047] 在一些实施方式中,通过适当使用正和负压将诊断凝胶保持在特定位置中。正压

可用于迫使流通过通道,而负压可用于延缓流通过通道。通过在所需的位置施加真空可实现负压。因此,诊断凝胶可流经通道,然后通过在经过通道壁的位置施加真空来留在特定位置中。这还将意味着通道壁由适于向其中施加真空的材料制成,而同时对流经它的流体是不通透的。

[0048] 回至图 1,本发明的诊断元件还包括入口通路上的第一凹槽(recess)22 和位于出口通路的第二个凹槽 24。第一和第二个凹槽以这种方式定位从而支持口位于两个凹槽之间。提供凹槽从而有助于仅去除支持口而留下入口通路和出口通路不动。含有诊断凝胶并已经在凹槽处被去除的支持口可然后用于各种诊断目的。在一个示例性的实施方式中,诊断凝胶经受显微观察以确定存在或缺乏某些显微镜下可见的颗粒。在其它示例性实施方式中,诊断凝胶经受预先确定的提取方法步骤来提取附着至诊断端的任何外来的颗粒。在一个示例性的实施方式中,诊断凝胶经受合适波长和已知强度和幅度的辐射用于定量的目的。

[0049] 在一个实施方式中,本发明诊断元件可包括一个以上的诊断凝胶。每个诊断凝胶具有用于鉴别一个特定部分的特异性目的的不同诊断端。每个诊断凝胶可具有组合物的其它方面,比如相同或不同的间隔基团和可聚合基团。本领域技术人员将能够选择适当的参与组合物的成分组合,来制造诊断凝胶而不产生非常不适当的实验。多个诊断凝胶的存在将允许多路检查并使用单个芯片进行诊断,从而大大减少了涉及的时间和精力。在另一个实施方式中,本发明的诊断元件可包括含有空间上隔离的诊断端的诊断凝胶,其中每个诊断端可能是相同或不同的。制造这样的诊断凝胶的技术在本领域是已知的,例如(图 4, [2] 中)Dendukuri, D., Pregibon, D. C., Collins, J., Hatton, T. A. 和 Doyle, P. S. "Continuous Flow Lithography for High-Throughput Microparticle Synthesis", *Nat. Mater.*, 5, 365-369, May 2006。

[0050] 图 2 显示本发明的诊断装置 26。诊断装置包括至少一个支持口 12,入口通路 16 和出口通路 18。为方便起见,视觉目的此处只显示支持口而诊断凝胶 14 此处未显示。相似地,第一凹槽 22 和第二凹槽 24 此处未显示,然而它们可能还出现在本发明的诊断装置中。诊断装置还包括至少一个进入口 28。进入口可能是用于向装置中引入合适的流体的容器。适用于装置的流体可能包括用于分离和鉴别的任何溶剂。流体有时本领域中也称为流动相。在一个实施方式中,引入装置的流体可能是磷酸盐缓冲液。装置还包括样本引入口,通过引入口待分析的样本引入到装置中。进入口可用作样本引入口,或者分开的口可用于基于诊断装置的预期应用的目的。含有兴趣实体的样本,本领域也作分析物,典型地作为流动相中的溶液引入至装置中,通常其中样本的浓度未知。在一些实施方式中,一个或多个进入口也可作为样本引入口用于样本向诊断装置中的合适引入。用于样本引入的典型方法包括样本溶液的注射。如图 2 中所示,一个以上的进入口可出现在给定的装置中。装置可能仅利用对于给定应用必须数目的进入口而封闭装置其余部分的进入口以确保装置的运作顺利进行。

[0051] 装置然后包括入口臂(inlet arm) 30,其将进入口连接至装置的其余部分。每个进入口连接一个入口臂。然后装置包括制备口 32。制备口可具有很多功能,这取决于最终的应用。在一个示例性的实施方式中,制备口搅动流动流体为了更好地混合来自各种进入口的流体。在另一个示例性实施方式中,制备口用于流动相脱气。在另一个示例性实施方式中,制备口可用于从样本中滤出超过 1 微米阈值尺寸的细胞或其它颗粒。装置然后包括



排出口 34(outlet port),其连接至出口通路。排出口可以是废物处置的槽,或它是一个容器以收集所有通过装置的流体。

[0052] 流体通常通过本领域已知的方法流入装置。在一个典型的实施方式中,使用流速可控的计量泵将流体泵入装置。在另一个实施方式中,在装置的排出口侧施加吸入压力,其允许流体的流动。在其它一些实施方式中,在装置特定点上施加电磁力,其使得流动成为可能。用于发挥流体流动作用的其它方法包括但不限于毛细管流、声学驱动的流、离心驱动的流、压电泵等。在一个示例性的实施方式中,本发明的诊断凝胶是在高的压力下被迫使进入支持口,并然后使用比它流入的压力更低的压力保持在支持口内。这使得诊断凝胶在操作期间能够牢固地安置在支持口内。

[0053] 在一个说明性的实施方式中,当装置处于其功能状态时,它包括一个进入口,通过进入口样本以预先确定的流速泵入装置。样本通过入口臂,并随后在制备口被过滤。样本然后通过含有诊断凝胶或其它吸收材料(比如在其中含有生理包囊的、荧光标记的检测抗体的基于多糖的材料)的第一支持口。这些抗体结合特异的分析物,比如样本中存在的 HIV 病毒诱导的抗体,形成复合物,其然后滤出诊断凝胶,并而后向下游转运至第二诊断凝胶。第二诊断凝胶含有在其表面上化学结合的一抗种类,一抗种类对兴趣分析物也是特异性的。然后在第二诊断凝胶的位置形成一抗-分析物-二抗的三重复合物。分析物的剩余部分然后通过出口通路流出进入排出口。通过检查从三重复合物发出的荧光信号可推断感兴趣分析物的存在和浓度。在一个示例性的实施方式中,诊断元件包括具有分析物吸附部分的诊断凝胶,其然后在第一和第二凹槽处切断。这种切断的诊断元件然后进行分析来确定例如疾病传播的性质和程度。在另一个示例性实施方式中,诊断工具,如显微镜,用来分析作为诊断装置的一部分而存在的诊断元件,其中将诊断工具带到距离诊断元件合适的距离以便发挥适当诊断的作用。

[0054] 在对上述说明性实施方式的变化中,现在吸附至分析物的本发明的诊断凝胶的诊断部分现在通过使用合适的溶剂混合物使其流出而从原始诊断凝胶中分离出来,然后流入随后的包括不同诊断凝胶的支持口,该不同诊断凝胶具有可以吸附含有分析物的第一诊断端的不同诊断端,来形成第二诊断元件。第二诊断元件然后用于诊断。

[0055] 图 3 显示本发明的一个示例性诊断装置,其包括一个以上支持口,其中的每个由数字 12 表示,每个支持口与其自己的入口通路 16 和出口通路 18 连接。在这个具体的实施方式中,支持口彼此平行连接。流动相利用适当的手段流入每个支持口,比如通过在特定的点使用吸入或施加真空以确保流入所需的支持口。图 4 显示本本发明的另一个示例性诊断装置,其中装置包括一个以上支持口,以及其中支持口中的每个与其它串连。方便起见,图 3 和图 4 都不显示支持口内所载的诊断凝胶。

[0056] 图 5 显示诊断凝胶发挥功能的方式的简单可视化,由数字 40 表示。诊断凝胶包括诊断端 42,合适的分析物 44 附着于此诊断端。这样选择诊断端从而它对一种类型分析物是选择性且特异性的。因此,包括除分析物以外任何物质的流动相通过并环绕诊断端,而特异性分析物由诊断凝胶支持。图 6 显示另一方式的可视化 46,其中两个不同诊断凝胶 42 用于在位置上支持分析物 44。利用这种可视化的一个典型示例性情况是夹心 ELISA,其中分析物在两个不同互补诊断端之间被支持在位置上。可使用包括一个以上支持口的本发明的诊断装置有利地进行这种分析形式,其中支持口串行方式排列。可使用本发明的诊断装置进

行的其它已知技术,如以 ELISA 技术为例,包括竞争性 ELISA、夹心 ELISA、化学发光免疫分析、PCR 扩增的 ELISA、ELONA (酶联寡核苷酸分析)、DNA 微阵列等。

[0057] 可通过本领域已知的适当技术实现有分析物连接至其上的诊断凝胶的检测。标准技术包括但不仅限于光学显微镜、荧光、化学发光、电致磷光、电位法、比色法、吸收、表面等离子体共振等及其组合。

[0058] 在另一方面中,本发明提供制造诊断元件的方法。方法步骤涉及图 7 中显示的诊断元件的制造并通常由数字 48 表示。方法包括提供成形通道 50 的步骤。方法还包括诊断凝胶 52 通过入口通路进入支持口流入的步骤。可通过以预先确定的流速泵送流体(比如流动相)起到流动的作用,为的是在诊断凝胶上采用合适的压力从而其可以挤过入口通路并进入支持口,但是不通过出口通路。因此,如在步骤 54 中所示,诊断凝胶被包裹在支持口中。在替代的实施方式中,诊断凝胶在支持口内形成,并随后流体流入支持口来洗掉与诊断凝胶无关的所有外来成分。洗涤步骤还可诱导诊断凝胶膨胀至其最大容量来使得诊断凝胶能够发挥更好的功能。在替代的实施方式中,诊断凝胶流入支持口,并随后通过适当的使用对支持口壁所施加的真空使它在位置上被支持在支持口内。包括诊断凝胶的诊断元件被施加分析物之后,诊断元件可被切出,如在步骤 56 中所示。可在第一和第二凹槽发生切割。或者,只在第一凹槽处切割诊断元件,因此诊断元件连同出口通路被移除,并且适用时,连同排出口和其它部分。

[0059] 图 8 显示使用本发明方法将本发明诊断凝胶捕获在支持口中的过程中拍摄的图像。图 8 (a)显示通过入口通路 16 进入支持口 12 之前,在制备口 32 中的诊断凝胶 14。图 8 (b) 显示通过入口通路 16 被挤入支持口 12 的诊断凝胶 14。在这种具体的例子中,通过使用合适流速的流动相的流迫使诊断凝胶进入支持口。图 8 (c) 显示诊断凝胶 14 现在被困于支持口 12 中。不允许诊断凝胶穿入出口通路 18,因为出口通路的尺寸是这样的,其不利于诊断凝胶的通过。

[0060] 一个用于提供成形通道的示例性方法,由图 7 中数字 50 表示,还显示于图 9 中并由数字 50 表示,其中方法包括提供包括图式的通道的硅晶片 58。包括图式的通道的硅晶片可就如此购自商业来源,或可能通过使用本领域已知的标准精细加工(microfabrication)技术通过蚀刻或光刻的适当使用以容易的方式产生。一个示例性光刻方法涉及光阻材料 SU-8 的使用。

[0061] 然后,该方法包括将第一可固化材料 60 倾注到含有阳性(positive)特征的硅晶片上来形成阴刻(negative relief)中的可固化通道。典型的可固化材料包括当暴露于高温或具有合适波长的合适辐射时固化的那些。可用于选择可固化材料的特征中的一些可包括可固化材料的流动性、当暴露于固化条件时的固化时间、固化材料的性质比如透明度、强度等。一些示例性材料包括但不仅限于 PDMS、聚氨酯等。在一些实施方式中,材料的组合可用作第一可固化材料。

[0062] 用于形成成形通道的方法然后涉及固化可固化的材料,如图 9 中由数字 62 表示。可通过本领域已知的任何合适方法起到固化的作用。示例性方法包括加热、暴露于 UV 辐射等。固化导致图式材料从可固化材料的形成。随后图式材料从硅晶片上剥离,如图 9 中由数字 64 表示。从硅晶片上剥离的图式材料封闭到至少一个表面上,如图 9 中由数字 72 表示。在一个示例性实施方式中,当可固化材料是 PDMS 时,可能通过对其进行加热约 60 分钟

来起到固化作用,而后将其从硅晶片上剥离,通过按压至玻片上进行可逆地封闭或通过血浆激活的粘附(plasma-activated adhesion)不可逆地封闭至玻片上。

[0063] 在另一个实施方式中,通过将可注射成型的或热压纹(embossable)的材料注射成型来提供封闭的通道,比如热塑材料。典型的可注塑成型的塑料包括聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚氯乙烯、聚甲基丙烯酸酯、聚碳酸酯、聚酯、聚酰亚胺、环烯烃共聚物(COC)等。这种塑料典型地从各种商业来源可获得。在一个具体实施方式中,本发明有用的塑料是聚(甲基丙烯酸甲酯)。然后使用适当的粘合方法比如热粘合或粘合剂活化的粘合来提供完全封闭的装置将复制的塑料装置封闭至相似塑料的平板。

[0064] 在另一方面中,本发明提供一种用于使用本发明的诊断元件的方法。这种方法在图 10 中以图解方式表示,并由数字 76 表示。方法包括使样本 78 流经入口通路进入包括至少一个诊断凝胶的诊断元件来提供分析物诊断元件。然后分析分析物诊断元件来检测和分析物有关的属性 80。包含在具有分析物的本发明诊断装置中的诊断凝胶的诊断端之间的相互作用的确切性质形象地显示于图 3 和 4 中。

[0065] 在一个说明针对多路免疫分析的诊断元件形成的示例性实施方式中,其中诊断元件包含如下特征:如 US2007/105972A1 中所述,使用独特的微流体方法学形成含有三条水凝胶 84 的诊断元件,其在图 11 中显示并指定为数字 82。简言之,该方法涉及使用层流来形成空间上分隔的水凝胶 84 的条,然后通过成形光罩使用 UV 光聚合来形成具有形状定义的固体水凝胶。水凝胶 84 的每个条包括特异性的捕获抗体 86、88 和 90。在这个示例性的实施方式中,水凝胶的每个条约  $100\ \mu\text{m}$  宽且  $200\text{--}330\ \mu\text{m}$  长。

[0066] 图 12 显示诊断元件用于多路免疫分析的用途,由数字 92 表示。自动化流体控制然后用于将特定的体液提供到含有这些水凝胶条 84 (水凝胶条包括特异性的捕获抗体 86、88 和 90) 的芯片上,芯片然后被允许孵育一段预先确定的时间。孵育所需的时间将取决于抗体和抗原性质、物理特征如温度、压力等,并且可以由本领域技术人员很容易地确定。孵育几分钟后,抗体 86、88 和 90 将自身结合至特异性抗体,其中特异性抗体在图 12 中由数字 92、94 和 96 表示。随后,进行洗涤步骤以允许任何未结合的抗原被洗掉。图 13 显示针对分析步骤的诊断元件的制备,由数字 98 表示。在这一步中,在图 13 中由数字 100 表示的荧光标记的二抗然后流经芯片,并在未结合的荧光标记的抗体被洗掉之前孵育几分钟。通常荧光标记的二抗的附着是非特异性的,并能够结合给定系统中的任何抗原或抗体。或者,荧光标记的二抗仅能够结合至特异性抗原或抗体的特异性基团。然后从每个道读取荧光信号,使用荧光信号推导出样本中存在的各抗原的量。

[0067] 这种分析系统提供的巨大优势是仅仅小体积的血清( $\sim 1\ \mu\text{l}$ )就是进行分析所全部需要的。荧光信号灵敏度将取决于所用的检测器,并可以潜在地读至皮摩尔( $10\text{--}12\text{M}$ )水平。该方法此处仅显示了 3 条的情况,但可以很容易地扩展直至 10 种蛋白质,并且通过使用蛋白质阵列而不是它们的条可甚至扩展至更大的数目。本发明还解决了给定的兴趣颗粒包裹和定位在特定区域内的普遍问题,所述问题已由 Becker 等人 Anal. Bioanal. Chem. (2008) 390:89-111 中描述。本发明的方法可进一步被用作一种用于在阀、电极中流动以及用于控制合适的对象(比如细胞)在特定给定区域定位的技术。

[0068] 实施例

[0069] 水凝胶形成

[0070] 包括以下成分的组合用于形成本发明的诊断凝胶:12.3 微升( $\mu\text{l}$ ) 聚乙二醇二丙烯酸酯-700 (PEG-DA-700) 来自(Sigma Aldrich)、0.4 $\mu\text{l}$  光引发剂DAROCUR® 1173、5 毫克(mg)  $\text{NaHCO}_3$  (0.62M) 和 87  $\mu\text{l}$  磷酸盐缓冲液(PBS)。暴露条件:-10 秒。光强度 25-100 $\text{mW}/\text{cm}^2$  的光。H=75 微米( $\mu\text{m}$ )。W=200-400  $\mu\text{m}$ 。暴露期间使用矩形罩。本发明诊断凝胶的尺寸如下:300  $\mu\text{m}$  长、200  $\mu\text{m}$  宽和 75  $\mu\text{m}$  厚。图 14 显示本发明诊断凝胶的照片,由数字 102 表示。致孔剂引起的孔此处清晰可见。

[0071] 在一个比较实施例中,包含如下成分的组合用于形成水凝胶:12.3  $\mu\text{l}$  PEG-DA-700 Sigma Aldrich、0.4  $\mu\text{l}$  DAROCUR® 1173 光引发剂和 87  $\mu\text{l}$  PBS 用于制造水凝胶。比较实施例制造的水凝胶的尺寸与本发明的诊断凝胶的相似。

[0072] 此处描述的来自实施例的诊断凝胶和来自比较实施例的水凝胶然后用 FITC 标记的胰岛素抗体(是一种含有荧光团的 150 千道尔顿的蛋白质)的 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  水溶液进行处理。图 15 显示用含有荧光团的蛋白质溶液处理的诊断凝胶的荧光图像,由数字 104 表示。可以看出,含有荧光团的蛋白质能够渗透有孔的本发明的诊断凝胶,因此掩蔽了诊断凝胶的轮廓。图 16 显示用含有荧光团的蛋白质溶液处理的比较实施例的水凝胶。由数字 106 表示的水凝胶显示蛋白质不能渗透水凝胶,正如凝胶的深色所证实的。

[0073] 实施例的有孔的水凝胶还显示能够以适当的压力/真空值“挤”入支持口的性质。如在比较实施例中所述的未使用  $\text{NaHCO}_3$  制备的水凝胶,是刚性的且不能随意挤入支持口。

[0074] 装置的制造

[0075] 通过将聚二甲基硅氧烷(PDMS, Sylgard® 184, Dow Corning)倾至含有在 SU-8 光阻(Microchem)中的图式的阳刻(positive relief)通道的硅晶片上制造装置。PDMS 装置的厚度始终保持在 5mm 或更大。通过使用手术刀切下 PDMS 通道、使用活检钳(biopsy punch)在一端打孔来制取入口来制造装置。将 PDMS 的薄层单独放置在通道上和放置在刚好位于通道下方的玻片区域上之后,PDMS 装置而后用血浆封闭至旋涂有 PDMS 的玻片上。这是为了确保低聚物仅暴露于非-血浆处理的 PDMS 表面,同时确保该装置仍然是有效的封闭。

[0076] 在 AUTOCAD 2007 中设计并使用来自 Fineline Imaging (Boulder, CO) 的高分辨率打印机打印含有阀形(valve shapes)的光罩。每个罩插入至待用于投影光刻法的显微镜场阑中。100W HBO 汞灯用作 UV 光源。提供宽的 UV 激发的滤镜组(11000v2:UV, Chroma)用于选择所需波长的光,并且由计算机控制的 VCM-D1 快门驱动器所驱动的 VS25 快门系统(Uniblitz)提供 UV 光的特定脉冲。所用的典型暴露时间是 100-1000 毫秒(ms)以及压力为 0.1 和 1 磅每平方英寸(psi)之间。装置被安装在倒置显微镜上(Ti-S, Nikon),使用 CCD 相机(Micropublisher 3.3RTV, Qimaging)观察凝胶结构的形成。

[0077] 微流体装置的设计和制造:

[0078] 微流体装置的设计显示于图 2 中。微流体装置具有组合而形成通道的三个入口(用于蛋白质的多路化)以及在另一端有单个出口。通道尺寸为 5000  $\mu\text{m}$  长度、300  $\mu\text{m}$  宽度和 75  $\mu\text{m}$  高度。在一端被收缩的通道宽度称为收缩区或挤压凝胶的入口通路。收缩(区)的左侧被称为凝胶形成区或制备口,在其中抗体使用层流理论以多路的方式被聚合来形成有孔的水凝胶。凝胶挤过收缩(区)并困在称为捕获(trap)区或支持口的收缩(区)的另一侧。三种具有不同宽度收缩的不同装置被指定为 200  $\mu\text{m}$ 、150  $\mu\text{m}$  和 100  $\mu\text{m}$ 。出口通道的宽度是收缩区通道宽度的一半,即分别为 100  $\mu\text{m}$ 、75  $\mu\text{m}$  和 50  $\mu\text{m}$ 。

[0079] 试剂包囊过程需要两个步骤 - 首先是水凝胶的制造, 且第二个是水凝胶捕获 (trapping)。使用之前设计的停流光刻技术制备水凝胶结构。对于水凝胶捕获一个重要的要求是制造的结构足够柔软以便能够挤过收缩(区)。为了实现这一目标, 使用此前所述技术制造大孔水凝胶结构。这些结构显示出必要的机械性能, 以允许它们流经比它们未受限的尺寸小的通道收缩。装置交界

[0080] 使用 D771-11 BTC-IIS 系列微型泵 (Hargraves, USA) 产生的真空和压力源来控制流经微流体通道的流体。源通过 Tvgon 管连接至微流体装置, 并且使用 Labview 软件控制的微型化“Ten Millimeter”螺线管阀 (Pneumadyne, USA) 自动化流体运行。

[0081] 检测

[0082] 使用通过 Coolsnap EZ CCD 相机 (Photometries, Singapore) 捕获的图像测量从水凝胶发出的荧光信号的检测。定量前使用 ImageJ 软件对来自每个条的信号强度取平均。通过减去来自对照条 (不含一抗) 的信号进行噪音过滤。

[0083] 压力对水凝胶捕获的作用

[0084] 水凝胶捕获依赖这样的前提, 即需要特定的最小阈值压力 ( $P_{min}$ ) 来挤压结构通过比它宽度更小的通道。此外, 一旦捕获, 颗粒在其向相反方向挤出之前可以承受特定的最大压力 ( $P_{max}$ )。因此, 在生产过程中, 使用压力  $P_{man}$  其中 ( $P_{min} < P_{man} < P_{max}$ )。分析期间, 所用压力 ( $P_{eli}$ ) 必须是这样的从而颗粒不按照其进入的方向挤出, 所以我们令  $P_{eli} < P_{min}$ 。所述的阈值压力是水凝胶机械性质和通道结构几何的函数。描述阈值压力对这些参数的定量依赖性的等式可基于常识和用户技能、经验和装置的历史数据而产生。

[0085] 在我们的实验中, 向用于试剂的流 (其构成水凝胶的结构) 的口施加正压, 并向拉进 (draw in) 制造的水凝胶结构所需的口施加真空。使用计算机控制的螺线管阀交替施加压力和真空。

[0086] 通道数目的作用

[0087] 所述的包囊方案可扩展到制造含有包囊的水凝胶的大量通道。在一个实施例中使用 PDMS 垫片并通过单独的通道进行控制, 根据需要向通道施加压力和真空来分别关闭和打开垫片。通过微型 3-路螺线管阀 (Pneumadyne) 施加压力或真空, 并使用 Labview™ 编写的程序进行控制。

[0088] 虽然此处仅说明和描述了本发明的具体特征, 但是本领域技术人员仍将想到很多改造和变化。因此, 应当理解随附的权利要求意图涵盖落入本发明真正精神内的所有这些改造和变化。

[0089] 参考文献

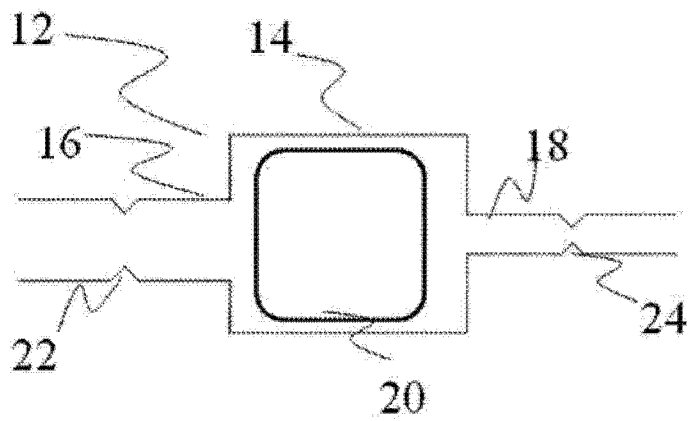
[0090] 1. Becker, H. and C. Gärtner, Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. 390(1) : p. 89-111.

[0091] 2. Dendukuri, D., et al., Continuous-flow lithography for high-throughput microparticle synthesis. Nat Mater, 2006. 5(5) : p. 365-369.

阿茨拉实验室有限公司

页数：15

页：1



10

图 1

阿茨拉实验室有限公司

15

页数:

页: 2

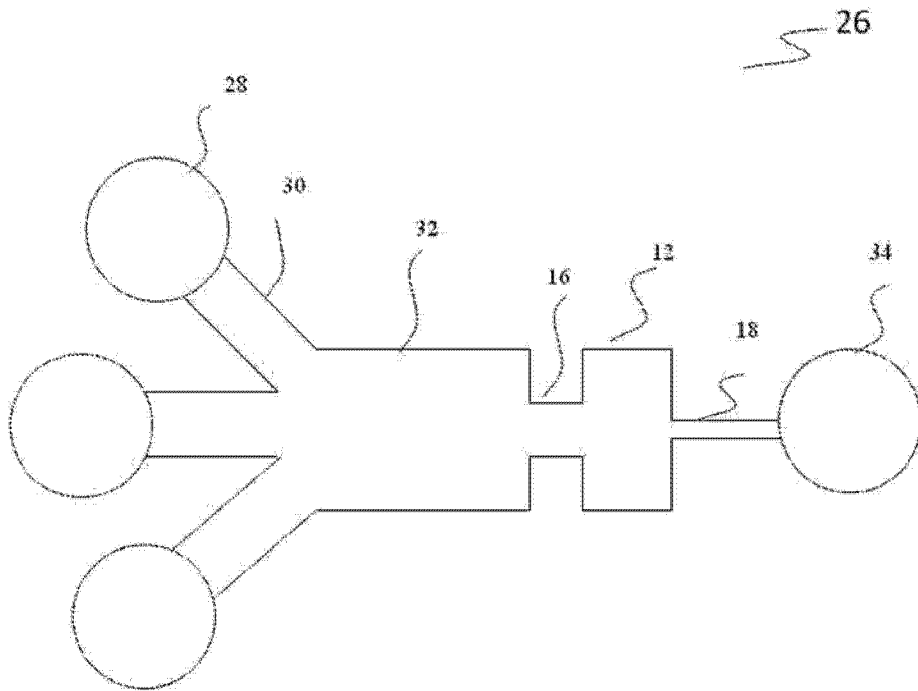


图 2

阿茨拉实验室有限公司

页数：  
页：3

15

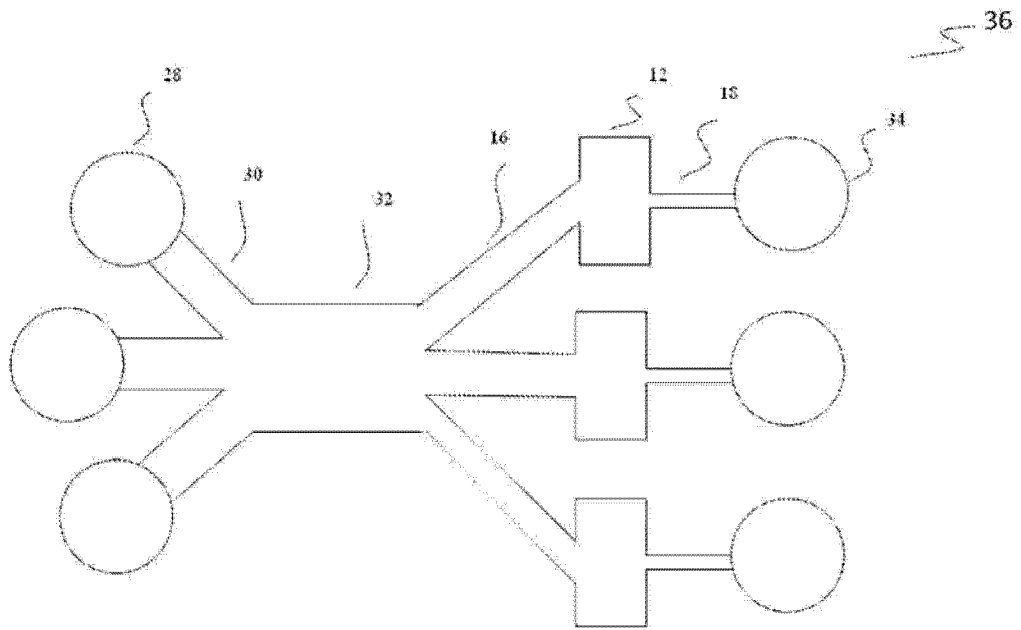


图 3



阿茨拉实验室有限公司

15

页数:

页: 4

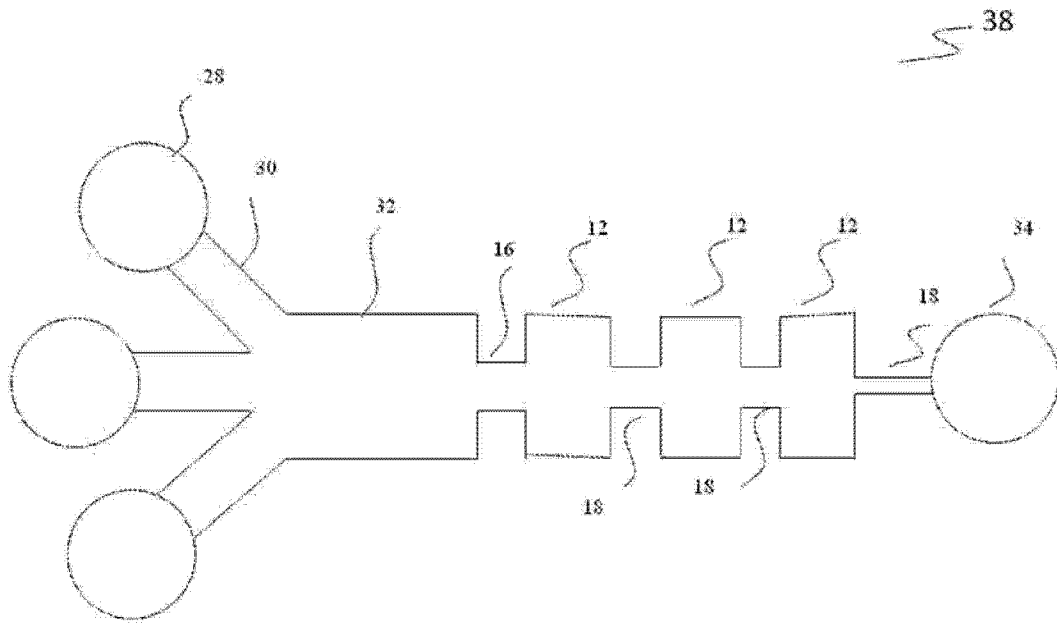


图 4

阿茨拉实验室有限公司

15

页数：

页：5

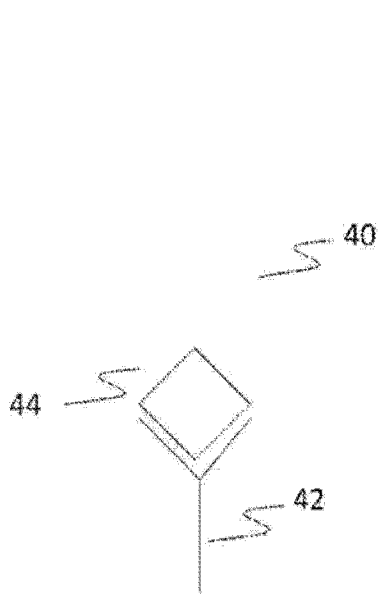


图 5

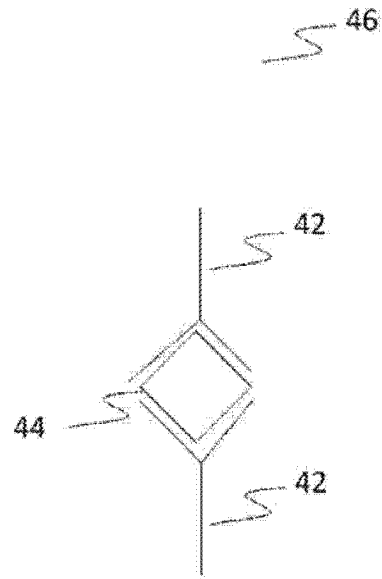


图 6

阿茨拉实验室有限公司

15

页数:

页: 6

48

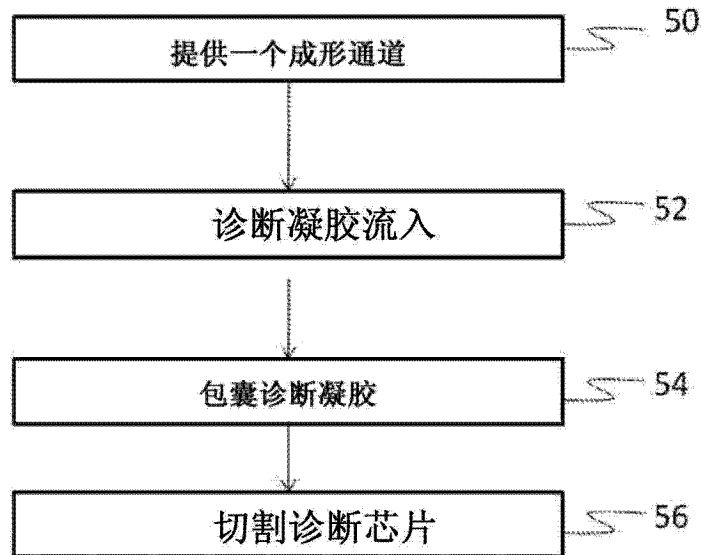


图 7

阿茨拉实验室有限公司

15

页数:

页: 7

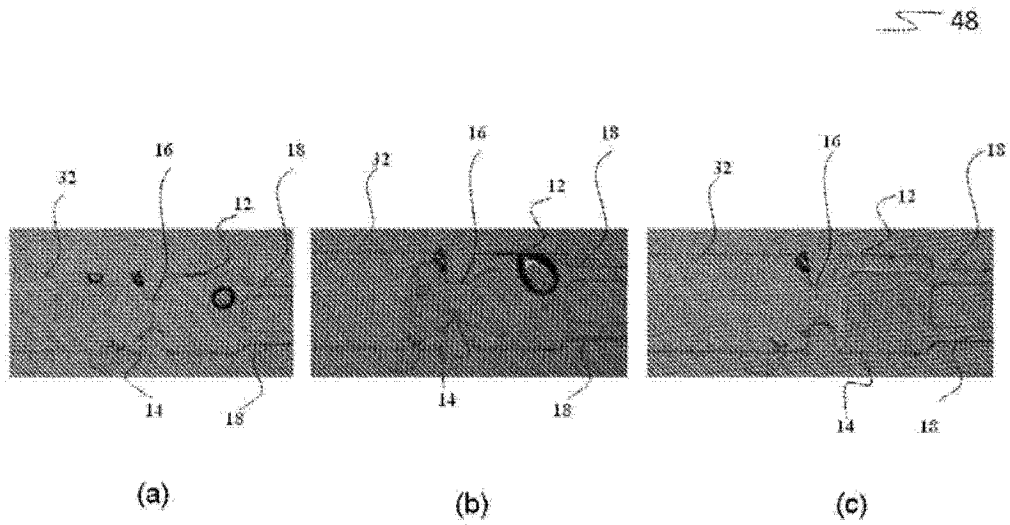


图 8

阿茨拉实验室有限公司

15

页数:

页: 8

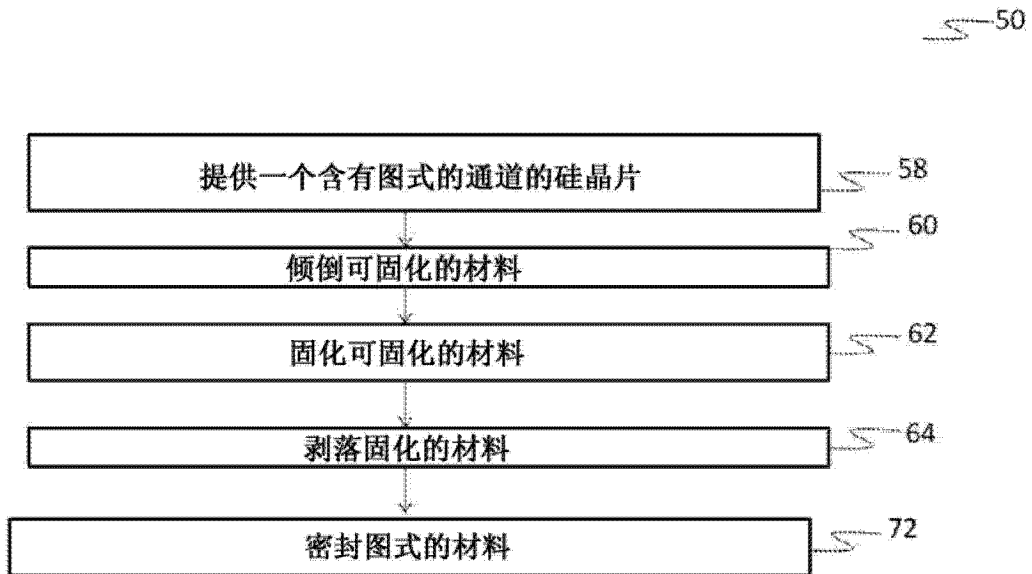


图 9

阿茨拉实验室有限公司

15

页数:

页: 9

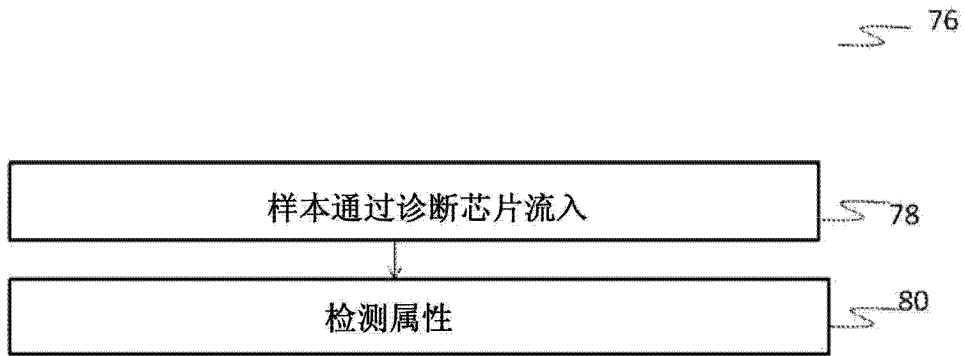


图 10

阿茨拉实验室有限公司

页数:

15

页: 10

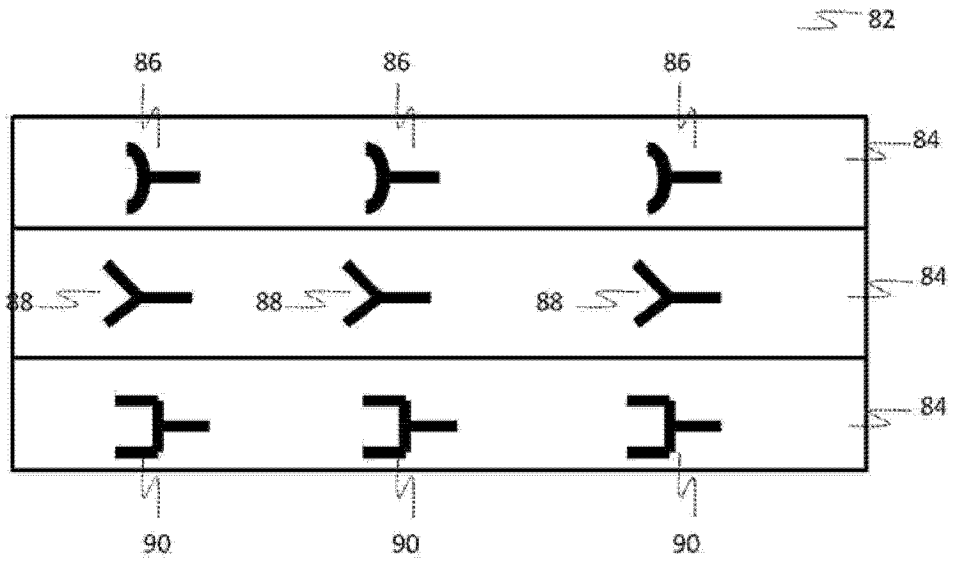


图 11

阿茨拉实验室有限公司

15

页数:

页: 11

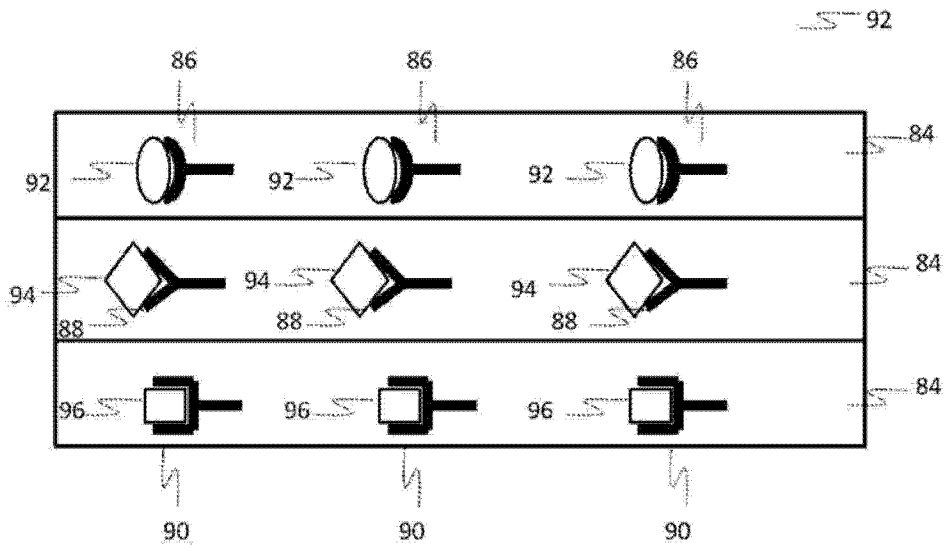


图 12



阿茨拉实验室有限公司

页数:

15

页: 12

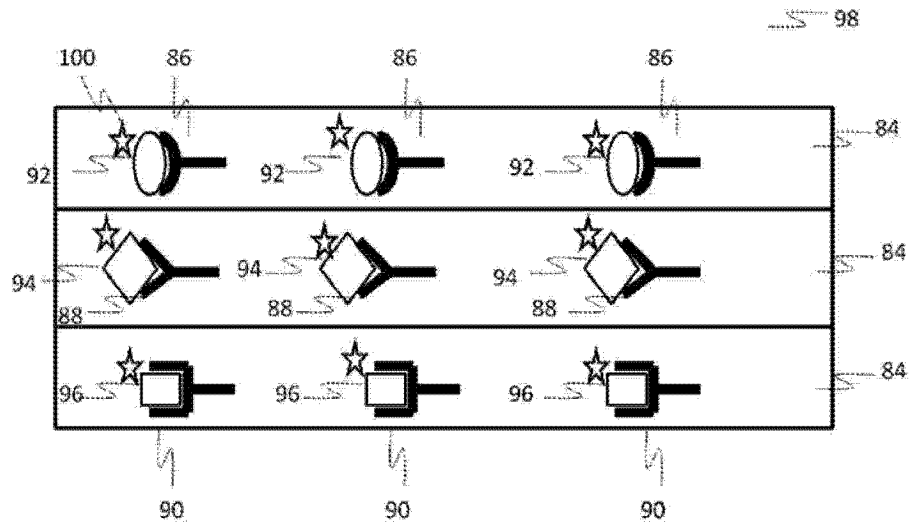


图 13

阿茨拉实验室有限公司

15

页数:

; 页: 13

102

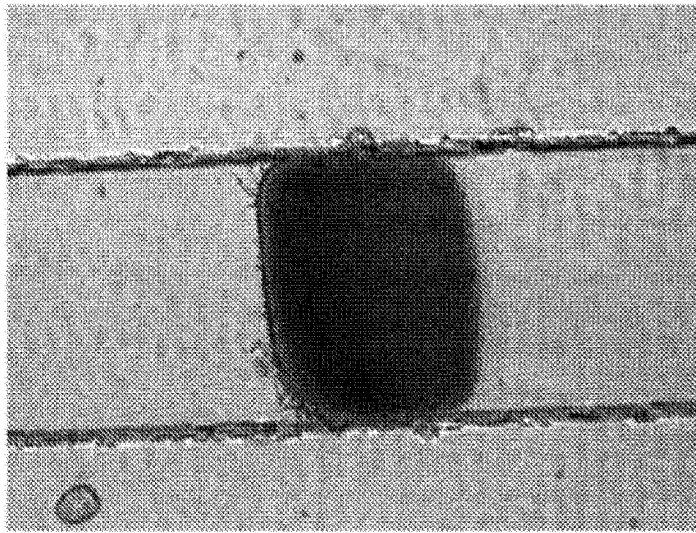


图 14

阿茨拉实验室有限公司

15

页数:

页: 14

104

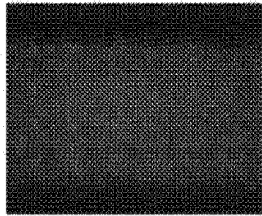


图 15

106

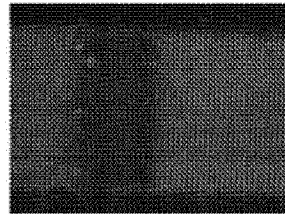


图 16