



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 99 920 342 T1** 2005.01.20

(12)

Veröffentlichung der Patentansprüche

der europäischen Patentanmeldung mit der
(97) Veröffentlichungsnummer: **1 075 544**
in deutscher Übersetzung (Art. II § 2 Abs. 1 IntPatÜG)
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/09810**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 920 342.5**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/57323**
(86) PCT-Anmeldetag: **04.05.1999**
(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **11.11.1999**
(97) Veröffentlichungstag
der europäischen Anmeldung: **14.02.2001**
(46) Veröffentlichungstag der Patentansprüche
in deutscher Übersetzung: **20.01.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C12Q 1/68**
C07H 21/04, C07H 21/00, B01J 19/00

(30) Unionspriorität:
71876 04.05.1998 US

(71) Anmelder:
Baylor College of Medicine, Houston, Tex., US

(74) Vertreter:
**Rechts- und Patentanwälte Lorenz Seidler Gossel,
80538 München**

(72) Erfinder:
**BRADLEY, Allan, Houston, US; CAI, Wen, Wei,
Houston, US**

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Chemisch modifizierte Nukleinsäuren und Methode zur Kopplung von Nukleinsäuren an einen festen Träger**

(57) Hauptanspruch: Modifizierte Nukleinsäure, umfassend eine Nukleinsäure, kovalent gebunden an eine Verbindung mit der Formel: R_1-X-R_2 ,
worin R_1 eine Epoxidgruppe ist;
worin R_2 eine Alkoxysilangruppe ist; und
worin X eine Einheit ist, welche für die Verknüpfung der Epoxidgruppe und der Alkoxysilangruppe chemisch geeignet ist.

Patentansprüche

1. Modifizierte Nukleinsäure, umfassend eine Nukleinsäure, kovalent gebunden an eine Verbindung mit der Formel: R_1-X-R_2 , worin R_1 eine Epoxidgruppe ist; worin R_2 eine Alkoxysilangruppe ist; und worin X eine Einheit ist, welche für die Verknüpfung der Epoxidgruppe und der Alkoxysilangruppe chemisch geeignet ist.

2. Modifizierte Nukleinsäure von Anspruch 1, worin die Epoxidgruppe Ethylenoxid ist.

3. Modifizierte Nukleinsäure von Anspruch 1, worin das Alkoxysilan gewählt wird aus der Gruppe, bestehend aus $-Si(OCH_3)_3$, $-Si(OC_2H_5)_3$, $-Si(OCH_3)_2H$, $-Si(OCH_3)(CH_3)_2$, und $-Si(OCH_3)_2CH_3$.

4. Modifizierte Nukleinsäure von Anspruch 1, worin es sich bei der Verbindung um 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan handelt.

5. Modifizierte Nukleinsäure von Anspruch 1, wobei die Nukleinsäure DNA ist.

6. Modifizierte Nukleinsäure von Anspruch 1, wobei die Nukleinsäure RNA ist.

7. Verfahren zum Immobilisieren von Nukleinsäure an einem festen Träger, umfassend: das Umsetzen von 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan mit einer Nukleinsäure unter Bildung einer derivatisierten Nukleinsäure; danach das Umsetzen der derivatisierten Nukleinsäure mit dem festen Träger.

8. Verfahren von Anspruch 7, wobei die Nukleinsäure DNA ist.

9. Verfahren von Anspruch 7, wobei die Nukleinsäure RNA ist.

10. Verfahren von Anspruch 7, wobei der erste Umsetzungsschritt bei basischem pH-Wert stattfindet.

11. Verfahren von Anspruch 8, wobei der erste Umsetzungsschritt bei einem pH-Wert von etwa 6 bis etwa 12 stattfindet.

12. Verfahren von Anspruch 9, wobei der erste Umsetzungsschritt bei einem pH-Wert von etwa 6 bis etwa 8,5 stattfindet.

13. Verfahren von Anspruch 10, wobei der pH-Wert größer als 9,5 ist.

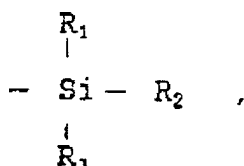
14. Verfahren von Anspruch 7, wobei der feste Träger Glas ist.

15. Verfahren von Anspruch 7, wobei der zweite Umsetzungsschritt bei ungefähr neutralem pH-Wert stattfindet.

16. Modifizierte Nukleinsäure, umfassend eine Nukleinsäure, kovalent gebunden an eine Verbindung mit der Formel: R_1-X-R_2 , worin R_1 eine Aminogruppe ist; worin R_2 eine Alkoxysilangruppe ist; und worin X eine Einheit ist, welche für die Verknüpfung der Epoxidgruppe und der Alkoxysilangruppe chemisch geeignet ist.

17. Modifizierte Nukleinsäure von Anspruch 16, wobei die Aminogruppe ein primäres Amin ist.

18. Modifizierte Nukleinsäure von Anspruch 16, wobei das Alkoxysilan gewählt wird aus der Gruppe, bestehend aus $-Si(OCH_3)_3$, $-Si(OC_2H_5)_3$, und



worin R_1 , R_2 und R_3 gewählt werden aus der Gruppe, bestehend aus $-H$, $-CH_3$, $-OCH_3$ und $-OC_2H_5$, und mit der Maßgabe, daß mindestens eines von R_1 , R_2 oder R_3 entweder $-OCH_3$ oder $-OC_2H_5$ ist.

19. Modifizierte Nukleinsäure von Anspruch 16, wobei es bei der Verbindung um 3-Aminopropyltriethoxysilan handelt.

20. Modifizierte Nukleinsäure von Anspruch 16, wobei die Nukleinsäure DNA ist.

21. Modifizierte Nukleinsäure von Anspruch 16, wobei die Nukleinsäure RNA ist.

22. Modifizierte Nukleinsäure von Anspruch 16, wobei die Nukleinsäure einen Cytosinrest enthält.

23. Verfahren zum Immobilisieren von Nukleinsäure an einem festen Träger, umfassend: das Umsetzen von 3-Aminopropyltriethoxysilan mit einer Nukleinsäure unter Bildung einer derivatisierten Nukleinsäure; danach das Umsetzen der derivatisierten Nukleinsäure mit dem festen Träger.

24. Verfahren von Anspruch 23, wobei die Nukleinsäure DNA ist.

25. Verfahren von Anspruch 23, wobei die Nukleinsäure RNA ist.

26. Verfahren von Anspruch 23, wobei die Nukleinsäure einen Cytosinrest enthält.

27. Verfahren von Anspruch 23, wobei der erste

Umsetzungsschritt bei im wesentlichen neutralem pH-Wert stattfindet.

28. Verfahren von Anspruch 25, wobei der erste Umsetzungsschritt bei etwa pH = 6,0–7,0 stattfindet.

29. Verfahren von Anspruch 23, wobei der erste Umsetzungsschritt in Gegenwart von Natriumbisulfid stattfindet.

30. Verfahren von Anspruch 23, wobei der feste Träger Glas ist.

31. Vorrichtung zur Herstellung von Hochdichte-Mikroarrays, umfassend eine Vielzahl von Kapillaren-Mikropipetten mit einem distalen und einem verjüngten proximalen Ende, wobei die Mikropipetten: äquatorial in einer im wesentlichen dichtgepackten Anordnung ausgerichtet sind; und an jedem proximalen Ende verjüngt sind, und wobei die Enden im wesentlichen planar sind.

32. Vorrichtung von Anspruch 31, wobei die Mikropipetten in einer quadratischen dichtgepackten Anordnung ausgerichtet sind.

33. Vorrichtung von Anspruch 31, wobei die Mikropipetten von einem Rahmen begrenzt sind.

34. Vorrichtung von Anspruch 33, wobei die Mikropipetten an einer Basis befestigt sind.

35. Hochdichte-Mikroarray, umfassend:
einen festen Träger;
modifizierte Nukleinsäure, hergestellt durch Umsetzen der Nukleinsäure mit einem Epoxid, gewählt aus der Gruppe, umfassend
3-Glycidopropyltrimethoxysilan und
3-Aminopropyltriethoxysilan, und immobilisiert über dem festen Träger an geordneten diskreten Stellen.

36. Hochdichte-Mikroarray von Anspruch 35, wobei der feste Träger Glas ist.

37. Hochdichte-Mikroarray von Anspruch 35, wobei die diskreten Stellen einen Durchmesser von etwa 50 Mikrometer aufweisen.

38. Hochdichte-Mikroarray, umfassend:
die modifizierte Nukleinsäure von Anspruch 35;
einen festen Träger, auf dem die Vielzahl von in engem Abstand befindlichen Proben der modifizierten Nukleinsäureproben platziert sind.

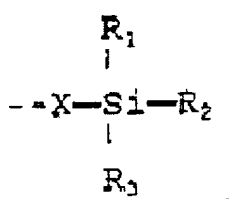
39. Hochdichte-Mikroarray von Anspruch 35, wobei die Proben auf dem festen Träger unter Anwendung einer Vorrichtung zur Herstellung von Hochdichte-Mikroarrays platziert sind.

40. Kit zur Durchführung eines Hybridisie-

rungs-Assays an Nukleinsäureproben, umfassend:
einen festen Träger;
eine Vorrichtung zum Aufdrucken eines Arrays von DNA-Chips auf den festen Träger.

41. Modifizierte Nukleinsäure, umfassend eine Nukleinsäure, kovalent gebunden an eine Verbindung mit der Formel: R_1-X-R_2 , worin R_1 ein cyclischer Ether ist;
worin R_2 -NR₄ ist, worin jede R₃-Gruppe gleiche oder verschiedene Alkylgruppen sind,
und R₄ -H oder eine Alkylgruppe ist; und
worin X eine Einheit ist, welche für die Verknüpfung der Epoxidgruppe und der Alkoxysilangruppe chemisch geeignet ist.

42. Modifizierte Nukleinsäure, umfassend eine Nukleinsäure, kovalent gebunden an eine



Verbindung mit der Formel, worin R₁, R₂ und R₃ gleich oder verschieden sind und gewählt werden aus der Gruppe, bestehend aus --OCH₃, --OC₂H₅, --OC₃H₇, und -Cl; und
worin X eine Einheit ist, welche für die Verknüpfung der Nukleinsäure an die Verbindung chemisch geeignet ist.

43. Modifizierte Nukleinsäure von Anspruch 42, wobei die Verbindung gewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus -(CH₂)₈SiCl₃, -(CH₂)₈Si(OCH₃)₃, --(Cl)₂SiCl₂CH₃ und -CH₂CH₂CH₂Si(OCH₃)₃.

44. Hochdichte-Mikroarray, umfassend einen festen Träger, aufweisend eine Vielzahl von angehefteten modifizierten Silan-Einheiten, wobei die Silan-Einheiten gewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus -Si-(CH₂)_n-, wobei n = 3, 4, 5, 6, 7, 8 oder 9; und -Si-CH₂-CH₂-C₆H₄-CH₂-CH₂-Si--.

45. Verfahren zum Modulieren der elektrostatischen Eigenschaften eines festen Glaträgers, umfassend die selektive Reaktion des festen Trägers mit Silanen, gewählt aus der Gruppe, bestehend aus: 1,6-Bis-trichlorsilylhexan, 1,8-Bis-trichlorsilyloctan, 1,6-Bis-trimethoxysilylhexan und 1,4-Bis-trimethylsilylphenylbenzen.

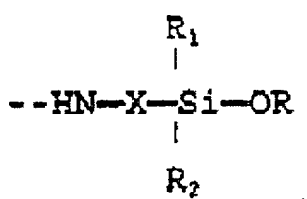
46. Modifizierte Nukleinsäure, hergestellt durch:
das Umsetzen einer Guanin- oder Cytosinbase der Nukleinsäure mit N-Bromsuccinimid bei einem pH-Wert von etwa 8,0 unter Bildung einer bromierten Nukleinsäure; das Umsetzen der bromierten Nukleinsäure mit einem Silan mit der Formel H₂N-(CH₂)_n-Si(OC₂H₅)₃, worin n = 3, 4, 5, 6, 7, 8 oder

9 ist.

47. Modifizierte Nukleinsäure, umfassend eine Nukleinsäure, kovalent gebunden an eine Verbindung mit der Formel $--HN-(CH_2)_n Si(OR)_3$, worin $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8$ oder 9 ist.

48. Modifizierte Nukleinsäure von Anspruch 47, worin R gewählt wird aus der Gruppe, bestehend aus $--OCH_3$, $--OC_2H_5$ und $--OC_3H_7$.

49. Modifizierte Nukleinsäure, umfassend eine Nukleinsäure, kovalent gebunden an eine Verbindung mit der Formel:



worin R gewählt wird aus der Gruppe, bestehend aus $--CH_3$, $--C_2H_5$ und $--C_3H_7$;

worin R_1 und R_2 gleich oder verschieden sind und gewählt werden aus der Gruppe, bestehend aus $-H$, $--CH_3$, $--C_2H_5$, $--OCH_3$, $--OC_2H_5$, $--C_3H_7$ und $--OC_3H_7$; und

worin X eine Verknüpfungsgruppe ist, umfassend eine wenigstens partiell aliphatische Kette.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen