

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. Mai 2003 (08.05.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/038122 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68**,
B01J 19/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/11911

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. Oktober 2002 (24.10.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 52 925.2 26. Oktober 2001 (26.10.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **FEBIT AG** [DE/DE]; Käfertalerstrasse 190, 68167
Mannheim (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **STÄHLER, Peer, F.**
[DE/DE]; Obere Clignetstrasse 14, 68167 Mannheim (DE).

(74) Anwälte: **WEICKMANN, Franz, Albert** usw.; Weick-
mann & Weickmann, Postfach 860 820, 81635 München
(DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: ASYMMETRICAL PROBES

(54) Bezeichnung: ASYMMETRISCHE SONDEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for the production of a support for the determination of nucleic acid analytes by hybridisation, comprising the in-situ synthesis of receptors on the support which hybridise with the nucleic acid analytes under test. Polymeric probes are the result which have binding properties thermodynamically favouring such probes, representing full-length products, more than just through the fact of being full-length products.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Trägers für die Bestimmung von Nukleinsäureanalyten durch Hybridisierung, umfassend die in situ Synthese von Rezeptoren auf dem Träger, die mit dem zu bestimmenden Nukleinsäureanalyten hybridisieren. Das Ergebnis sind Polymersonden mit einem Bindungsverhalten, bei dem solche Sonden thermodynamisch bevorzugt sind, die Volllängenprodukte darstellen, mehr als nur alleine durch die Tatsache, dass sie Volllängenprodukte sind.



WO 03/038122 A2

Asymmetrische Sonden

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Trägers für die Bestimmung von Nukleinsäureanalyten durch Hybridisierung, umfassend die in situ Synthese von Rezeptoren auf dem Träger, die mit dem zu bestimmenden Nukleinsäureanalyten hybridisieren. Das Ergebnis sind
10 Polymersonden mit einem Bindungsverhalten, bei dem solche Sonden thermodynamisch bevorzugt sind, die Vollängenprodukte darstellen, mehr als nur alleine durch die Tatsache, dass sie Vollängenprodukte sind.

Biochemische und biologische Analyseverfahren lassen sich durch
15 Miniaturisierung und Parallelisierung in ihrer Effizienz und Aussagekraft enorm steigern. Solche Miniaturisierungen betreffen z.B. die Analyse von genetischem Material mit Hilfe von Hybridisierungsexperimenten. Durch Entwicklung von Mikroarrays aus geeigneten Hybridisierungssonden lassen sich ganze Genome und Transkriptome untersuchen. Mikroreaktionstechnik
20 kann mit solchen Mikroarrays gekoppelt werden, um auch bei Probenvorbereitung oder Herstellung des Arrays zu schnellen und effizienten Systemen zu kommen. Dies schließt auch die Verwendung von mikrofluidischen Verfahren mit ein. Neben den recht weit verbreiteten DNA-Mikroarrays sind auch Verfahren miniaturisiert und parallelisiert
25 worden, die dem Screening nach besonderen Moleküleigenschaften dienen, z.B. Ribozyme. Weitere Polymersonden sind Proteine und solche Moleküle, die in der Natur nicht vorkommen, wie z.B. Peptidnukleinsäuren (PNA).

Solche Mikroarrays werden auch als Biochips bezeichnet, d.h. Träger, auf
30 denen eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptorsonden immobilisiert ist. Eine besondere Klasse von Mikroarrays wird durch in situ Synthese der benötigten Polymersonden direkt auf dem Träger hergestellt.

- 2 -

Diese Reaktionsträger können z.B. zum Einsatz kommen in der akademischen Forschung, der Grundlagenforschung, der industriellen Forschung, in der Qualitätskontrolle, in der Pharmaforschung, in der Biotechnologie, in der klinischen Forschung, in Screening-Verfahren, in der
5 patientenindividuellen Diagnostik, in klinischen Studien, in der Forensik, für genetische Tests, wie Elternschaftsbestimmungen, in der Tier- und Pflanzenzucht oder im Umweltmonitoring.

Für die in situ Synthese von Polymersonden-Arrays auf einem Träger
10 stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Sie haben das gemeinsame Ziel, einen eleganten Weg zur Herstellung dieser Arrays zu eröffnen, der ressourcenschonend und ökonomisch ist und meist ein besonders gut definiertes Substrat für die nachfolgenden Analysen liefert. Außerdem können durch in situ Verfahren Arrays mit einer besonders hohen Zahl an
15 unterschiedlichen Rezeptorsonden auf einem Reaktionsträger erzeugt werden.

Ein wesentlicher Nachteil solcher Verfahren ist aber, dass bei einem in situ Synthese-Prozess das Produkt der Synthese nicht anschließend aufgereinigt
20 werden kann. Zur Vermeidung dieses Nachteils werden bei sogenannten "off chip" Synthesen der Polymersonden die entsprechenden DNA-Moleküle mit konventionellen Methoden hergestellt und anschließend dergestalt gereinigt, dass nahezu ausschließlich das Volllängenprodukt der Synthese vorliegt. Nur diese Molekülpopulation wird anschließend auf dem
25 Substrat als Array angeordnet. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist jedoch, dass die Anordnung der fertigen Polymersonden auf dem Array sehr aufwendig ist.

Die mangelnde Aufreinigung kann im Zusammenspiel mit der spezifischen
30 Ausbeute der in situ Synthese zu deutlichen Einbußen bei der Analysequalität führen, wenn der Anteil an Volllängenprodukt vergleichsweise niedrig ist. Dies spielt insbesondere bei DNA-Mikroarrays

- 3 -

eine wesentliche Rolle, da die Länge eines immobilisierten DNA-Sondenmoleküls über die Spezifität der potentiellen Hybridisierungsreaktion mit einem Probenmolekül entscheidet. Diese Spezifität ist wiederum ein entscheidender Parameter für das analytische Potential eines DNA-Mikroarrays.

Bisher bekannte Verfahren zur in situ Herstellung von Polymersonden-Arrays beinhalten, dass alle aufeinanderfolgenden Additionsschritte mit einzelnen Bausteinen dieser Sonden durchgeführt werden. Keiner dieser Schritte weist eine Kopplungsrate von 100 % auf. Für den Fachmann ist klar, dass eine chemische serielle Kondensation wie im Fall einer in situ Synthese von Polymersonden nicht zu 100 % Vollängenprodukt führen kann. In der DNA-Synthese sind die Kopplungsraten für die konventionelle Säulenmethodik nach vielen Jahren der Optimierung und unter Verwendung der effizientesten bekannten chemischen Methode (Phosphitamid-Methode nach Caruthers) immer noch unter 100 %.

Mit vergleichsweise niedrigen Ausbeuten bei der seriellen Ankopplung von Synthesebausteinen kann der Anteil des Vollängenproduktes nach X Syntheszyklen unter einen kritischen Wert fallen, so dass das Analyseergebnis gar nicht von diesem Vollängenprodukt geprägt wird. Bei der photolithographischen in situ Synthese von DNA mit MeNPOC-Schutzgruppen ist z.B. beschrieben, dass die Kopplungsrate der einzelnen Additionsschritte unter 95 % liegt (Beier, M., Hoheisel, J.D., Production by quantitative photolithographic synthesis of individually quality checked DNA microarrays, Vol. 28, No. 4, P. 1-6, 2000). Mit solchen Verfahren lassen sich sinnvollerweise nur DNA-Polymersonden bis zu einer Länge von 25 Basen erzeugen. Auf solch einem Array stehen nur noch ca. 27 % Vollängenprodukte, sofern die Rate tatsächlich 95 % beträgt. Mit einer Kopplungsrate von 90 % je Additionsschritt ergibt sich nur noch ein Wert von 7 %.

- 4 -

Bislang kann nur die Synthese von Polymersonden vor der Anordnung auf dem Array unter Verwendung eines geeigneten Reinigungsschrittes für nahezu 100 % Vollängen-Sonden sorgen. Diese Vorgehensweise ist jedoch - wie bereits ausgeführt - mit anderen Nachteilen behaftet.

5

Vor diesem Hintergrund ist es wünschenswert, die geschilderten Nachteile zu vermeiden, die sich aus einer Population von unterschiedlich langen Molekülen auf den einzelnen Positionen eines Mikroarrays ergeben können, ohne die Nachteile einer "off chip" Synthese in Kauf nehmen zu müssen.

10

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Verbesserung der Nutzung von in situ Syntheseverfahren in der Herstellung von Polymersonden-Arrays, indem der Beitrag von Vollängenprodukten aus dem Syntheseprozess zum Analyseergebnis erhöht wird. Dies wird erreicht durch eine asymmetrische Konfiguration der Polymersonden. Insbesondere in den letzten Syntheseschritten werden hierzu modifizierte Bausteine verwendet, die sich in bestimmten thermodynamischen Eigenschaften, wie z.B. der Bindungsstabilität, von den vorher verwendeten Bausteinen unterscheiden. Alternativ oder zusätzlich kann der gleiche Effekt erzielt werden durch eine geeignete Modifikation des distalen Endes der Polymersonden, z.B. mit einem Hybridisierungsverstärker. Ein solches Molekül ist z.B. ein sogenannter "Minor Groove Binder" (Epoch Biosciences 2000 Annual Report, Seiten 4-5), der die Stabilität der Bindung an die letzten 4-5 Basen der Polymersonde deutlich erhöht. Beispiele für solche "Minor Groove Binders" sind einige natürliche Antibiotika mit einer Gestalt, die eine Faltung in die "Minor Groove" einer DNA-Helix erlaubt. Damit wird die bei in situ Synthesen fehlende Aufreinigung der Polymersonden vor der Aufbringung in einem Polymersonden-Array substituiert. Der Qualitätsnachteil von in situ Syntheseverfahren wird auf diese Weise teilweise oder ganz ausgeglichen.

15
20
25
30

- 5 -

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird die Nutzbarkeit von in situ synthetisierten Polymersonden-Arrays in Bezug auf die Qualität und Aussagekraft der Analyse im Vergleich zum Stand der Technik verbessert. Insbesondere für die Anwendung von Analysen, die mit sehr genauem Analyseergebnis arbeiten müssen, wie z.B. die Bestimmung von Punktmutationen in der klinischen molekularen Diagnostik, wird damit ein Zugang zu breiterer Anwendung und die Grundlage für bessere Einsetzbarkeit der in situ synthetisierten Polymersonden-Arrays geschaffen.

Verfahren und Moleküle für die Synthese von Polymersonden mit modifizierten thermodynamischen Eigenschaften unter Verwendung von modifizierten Nukleotidbausteinen sind aus der Patentschrift US 6,156,501 A bekannt. Auf die dort offenbarten Bausteine wird ausdrücklich Bezug genommen. Darüber hinaus sind in der Literatur Modifikationen an der fertigen Polymersonde bekannt, die die Bindungseigenschaften der Polymersonden verändern, z.B. eine Einlagerung von "Minor Groove Binders" (MGB). Modifizierte Synthesebausteine sind beispielsweise Ribonukleosidanaloga, wie LNA's (locked nucleic acids), modifizierte Purin- bzw. Pyrimidinbasen, wie superstabilisierende Adenosinanaloga (z.B. 2,4-Diaminoadenosin), Pyrazolopyrimidine (z.B. PPG) sowie Phosphatrückgratanaloga, wie z.B. Methylphosphonate, Phosphorthionate, Phosphoramidate etc.

Weitere verwendbare Duplexstabilisatoren sind Bausteine, die zu einer Tripelhelixbildung durch einen dritten Nukleinsäure- oder Peptidstrang führen können, sowie stabilisierende Moleküle, wie z.B. Interkalatoren, die sich zwischen die Basenstapelung eines DNA-Doppelstranges einlagern.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Kombination des asymmetrischen Sondendesigns mit in situ Reinigungsmethoden, bei denen die Abbruchprodukte der Sondensynthese in situ entfernt werden. Die

- 6 -

postsynthetische Array-Optimierung wird in dieser Ausführungsform durch die modifizierten Bausteine am Ende der bis zuletzt verlängerten Polymersonden ermöglicht. Kürzere Sonden tragen überwiegend keine solchen modifizierten Bausteine und lassen sich mit geeigneten Verfahren, wie z.B. einem chemischen oder/und enzymatischen Verdau, entfernen.

Ein Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Herstellung eines Trägers für die Bestimmung von Nukleinsäure-Analyten durch Hybridisierung, umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen eines Trägerkörpers und
- (b) schrittweises Aufbauen eines Arrays von mehreren verschiedenen Rezeptoren ausgewählt aus Nukleinsäuren und Nukleinsäureanaloga auf dem Träger durch orts- oder/und zeitspezifisches Immobilisieren von Rezeptorbausteinen an jeweils vorbestimmten Positionen auf dem oder im Trägerkörper,

wobei man für die Synthese der Rezeptoren mehrere unterschiedliche Sätze von Synthesebausteinen verwendet, um asymmetrische, d.h. aus mehreren unterschiedlichen Arten von Rezeptorbausteinen bestehende Rezeptoren zu erhalten.

20

Die unterschiedlichen Sätze von Bausteinen werden dabei so ausgewählt, dass die einzelnen Bausteine in Bezug auf die Spezifität für komplementäre Nukleinsäurebausteine aus dem Analyten gleich sind, aber eine unterschiedliche Affinität für komplementäre Nukleinsäurebausteine aus dem Analyten aufweisen, so dass die Bevorzugung von Vollängenprodukten eines in situ synthetisierten Polymersonden-Arrays durch eine gezielte Verteilung unterschiedlicher Arten von Bausteinen entlang der Polymersonden während der Synthese erreicht wird.

30

Vorzugsweise wird die Bevorzugung von Vollängenprodukten eines in situ synthetisierten Polymersonden-Arrays durch eine gezielte Verteilung unterschiedlicher Arten von Bausteinen entlang der Polymersonden

- 7 -

während der Synthese erreicht. Dazu werden für das erfindungsgemäße Verfahren Sätze von Synthesebausteinen verwendet, die sich in Bezug auf bestimmte Parameter gleich verhalten, aber in bestimmten, z.B. thermodynamischen, Eigenschaften voneinander abweichen. Die Verteilung der Bausteine entlang des wachsenden Polymers während der in situ
5 Synthese wird dabei so gewählt, dass die Volllängenprodukte mit der Bausteinzahl n oder aber zumindest die Syntheseprodukte aus den letzten Additionsschritten der Polymerverlängerung modifizierte Bausteine enthalten.

10

In einer bevorzugten Ausführungsform wird zumindest für den letzten Schritt oder die letzten Schritte, z.B. die letzten zwei, drei oder vier Schritte, beim Aufbau der Rezeptoren ein Satz von Synthesebausteinen verwendet, der eine höhere Affinität für komplementäre
15 Nukleinsäurebausteine aus dem Analyten aufweist als die vorher verwendeten.

20

Weiterhin ist es bevorzugt, dass der einen, z.B. für den oder die letzten Schritte beim Aufbau der Rezeptoren verwendete Satz von Synthesebausteinen zusätzlich eine höhere Beständigkeit gegenüber Abbaureagenzien, z.B. Enzymen, wie Nukleasen oder/und chemischen Reagenzien, wie Säuren oder Basen, im Vergleich zu dem für die ersten Schritte des Aufbaus der Rezeptoren verwendeten Satz von Synthesebausteinen aufweist. In diesem Fall kann z.B. nach Beendigung
25 der Rezeptorsynthese ein gezielter Abbauschritt durchgeführt werden, mit dem der Anteil von Nicht-Volllängenprodukten gegenüber dem Anteil der Volllängenprodukte verringert wird. Der Einbau von "abbaubeständigen" Bausteinen und ein nachfolgender Abbauschritt können im Übrigen auch ein- oder mehrmals während früherer Schritte der Rezeptorsynthese
30 erfolgen.

- 8 -

Eine alternative oder ergänzende Vorgehensweise sieht die Erzeugung unterschiedlicher Hybridisierungsaffinitäten für einzelne Sätze von Bausteinen durch Verwendung von Modifikationen der Rezeptoren, z.B. mittels Hybridisierungsverstärkern, vor, wodurch ihre Eigenschaften in der gewünschten Art zugunsten der Volllängenprodukte verändert werden. Der Einbau von Hybridisierungsverstärkern erfolgt ortsspezifisch, d.h. es wird eine erhöhte Hybridisierungsaffinität für komplementäre Nukleotidbausteine aus dem Analyten für eine vorbestimmte Anzahl (d.h. einen Satz) einzelner Bausteine aus dem Rezeptor vorgesehen. Vorzugsweise wird der Hybridisierungsverstärker an das distale Ende des Rezeptors angefügt, wobei z.B. die letzten 3-5 Basen des Rezeptors bezüglich der Hybridisierungsaffinität modifiziert werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein Nukleinsäure-Array, ausgewählt aus DNA- oder RNA-Arrays, insbesondere ein DNA-Array, aufgebaut, wobei ein erster Satz von Synthesebausteinen, bestehend aus unmodifizierte DNA- oder RNA-Synthesebausteinen, die zweckmäßigerweise in Form geeigneter Derivate mit Phosphoramidite, H-Phosphonate etc. vorliegen, verwendet wird. Als zweiter Satz für den oder die letzten Schritte des Rezeptoraufbaus wird dann ein Satz von Synthesebausteinen, ausgewählt aus N3'-P5'-Phosphoramidat (NP) Bausteinen, Locked Nukleinsäure (LNA) Bausteinen, Morpholinophosphordiamidat (MF) Bausteinen, 2'-O-Methoxyethyl (MOE) Bausteinen, 2'-Fluoro,arabino-Nukleinsäure (FANA) Bausteinen oder Peptidnukleinsäure (PNA) Bausteinen verwendet wird. Selbstverständlich ist das erfindungsgemäße Verfahren jedoch auch für den Aufbau von modifizierten Nukleinsäure-Arrays geeignet, wobei als erster Satz von Bausteinen ein erster modifizierter Bausteinsatz und als zweiter Satz ein zweiter modifizierter Bausteinsatz verwendet wird, wobei sich die beiden Bausteinsätze - wie zuvor beschrieben - hinsichtlich der Affinität für komplementäre Nukleinsäurebausteine des Analyten und gegebenenfalls

zusätzlich hinsichtlich der Beständigkeit gegenüber Abbaureagenzien unterscheiden.

Das erfindungsgemäße Verfahren umgeht die Reinigungsproblematik für in situ Polymersonden durch eine asymmetrische Konfiguration der Sonden, die zu einem erhöhten Beitrag der Vollängenprodukte zur Bindungsenergie im Doppelstrang bei einer späteren Anwendung auf dem Biochip führt. Damit kann die Analysequalität eines in situ hergestellten Polymersonden-Arrays in denselben Bereich gebracht werden wie bei Verwendung von gereinigten Sonden aus der "off chip" Synthese, während gleichzeitig die Vorteile der in situ Synthese zum Tragen kommen. Darüber hinaus ist das erfindungsgemäße Verfahren auch zur Herstellung von RNA-Arrays, z.B. Ribozym-Arrays geeignet.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich zum Nachweis oder/und zur Isolierung von Nukleinsäuren, z.B. zur Durchführung von De-novo-Sequenzierungen, Re-Sequenzierungen und Punktmutationsanalysen, z.B. SNP-Analysen und den Nachweis neuer SNPs. Weiterhin kann das Verfahren für die Analyse von Genomen, Genomvariationen, Genominstabilitäten und Chromosomen sowie zur Genexpressions- bzw. Transkriptomanalyse oder zur Analyse von cDNA-Bibliotheken eingesetzt werden. Das Verfahren eignet sich auch für die Herstellung von substratgebundenen cDNA-Bibliotheken oder cRNA-Bibliotheken. Außerdem können Arrays für die Herstellung synthetischer Nukleinsäuren, Nukleinsäuredoppelstränge und synthetischer Gene erzeugt werden. Desweiteren können auch Arrays von PCR-Primern, Sonden für homogene Assays, Molecular Beacons und Haarnadel-Sonden hergestellt werden. Schließlich können auch Arrays für die Herstellung, Optimierung oder Entwicklung von Antisense-Molekülen erzeugt werden.

30

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich besonders für die Herstellung von Trägerkörpern mit Kanälen, z.B. mit geschlossenen Kanälen. Die

- 10 -

Kanäle sind vorzugsweise Mikrokanäle mit einem Querschnitt von z.B. 10-1000 μm . Beispiele für geeignete Trägerkörper mit Kanälen sind in WO00/13018 beschrieben. Vorzugsweise wird ein Trägerkörper verwendet, der zumindest teilweise im Bereich der mit Rezeptoren zu bestückenden Positionen optisch transparent oder/und elektrisch leitfähig ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich weiterhin besonders als integriertes Synthese-Analyse-Verfahren, d.h. der fertige Träger wird in situ für die Analytbestimmung und anschließend gegebenenfalls für weitere Synthese-Analyse-Zyklen eingesetzt wie in WO00/13018 beschrieben.

Weiterhin betrifft die Erfindung auch einen Träger für die Bestimmung von Analyten, der eine Vielzahl, vorzugsweise mindestens 100 und besonders bevorzugt mindestens 500, von unterschiedlichen immobilisierten Rezeptoren enthält, wobei die Rezeptoren aus jeweils mehreren unterschiedlichen, z.B. zwei oder noch mehreren Sätzen von Synthesebausteinen aufgebaut sind, und wobei die einzelnen Synthesebausteine in Bezug auf die Spezifität für komplementäre Nukleinsäurebausteine aus dem Analyten gleich sind, aber eine unterschiedliche Affinität für komplementäre Nukleinsäurebausteine aus dem Analyten aufweisen.

Weiterhin betrifft die Erfindung einen Reagenzienkit, umfassend einen Trägerkörper und mindestens zwei unterschiedliche Sätze von Bausteinen für die Synthese von Rezeptoren auf dem Träger. Weiterhin kann der Reagenzienkit auch Reaktionsflüssigkeiten enthalten.

Gegenstand der Erfindung ist auch eine Vorrichtung zur integrierten Synthese- und Analytbestimmung an einem Träger, umfassend eine programmierbare Lichtquellenmatrix, eine Detektormatrix, einen vorzugsweise zwischen Lichtquellen- und Detektormatrix angeordneten

- 11 -

Träger sowie Mittel zur Zufuhr von Fluids in den Träger und zur Ableitung von Fluids aus dem Träger und gegebenenfalls Reservoirs für Synthesereagenzien und Proben. Die programmierbare Lichtquellen- bzw. Belichtungsmatrix kann eine Reflexionsmatrix, eine Lichtventilmatrix, z.B. eine LCD-Matrix, oder eine selbstemittierende Belichtungsmatrix sein.
5 Derartige Lichtmatrices sind in WO00/13018 offenbart. Die Detektormatrix, z.B. eine elektronische CCD-Matrix, kann gegebenenfalls im Trägerkörper integriert sein.

10 Der Aufbau der Rezeptoren auf dem Träger kann fluidchemische Syntheseschritte, photochemische Syntheseschritte, elektrochemische Syntheseschritte oder Kombinationen von zwei oder mehreren dieser Schritte umfassen. Ein Beispiel für die elektrochemische Synthese von Rezeptoren auf einen Träger ist in DE 101 20 663.1 beschrieben. Ein
15 Beispiel für ein Hybridverfahren, umfassend die Kombination von fluidchemischen Schritten und photochemischen Schritten, ist in DE 101 22 357.9 beschrieben.

Weiterhin soll die Erfindung durch das nachfolgende Beispiel erläutert werden.
20

Beispiel

Es wird ein DNA-Mikroarray zu einer Länge der DNA-Sonden von 25 Bausteinen synthetisiert. Für den letzten Baustein wird statt einem natürlichen Nukleotid ein Analogon mit geeigneten Eigenschaften an die Sonde kondensiert. Dies kann ein LNA (locked nucleic acid) Baustein sein, von dem bekannt ist, dass er zum einen für alle vier Basen der DNA hergestellt werden kann (und damit ein Satz passender Bausteine
30 vorhanden ist), zum anderen für alle vier Basen mit deutlich höherer Schmelztemperatur an sein komplementäres Zielmolekül hybridisiert. Die Diskriminierung zwischen einer Hybridisierung oder Bindung an das

- 12 -

Volllängenprodukt mit 25 Bausteinen Länge im Vergleich zu den Abbruchprodukten mit 24 oder weniger Nukleotiden wird dadurch verbessert. Das wirkt sich positiv auf das Analyseergebnis aus.

Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Trägers für die Bestimmung von Nukleinsäure-Analyten durch Hybridisierung, umfassend die Schritte:
- (a) Bereitstellen eines Trägerkörpers und
- (b) schrittweises Aufbauen eines Arrays von mehreren unterschiedlichen Rezeptoren ausgewählt aus Nukleinsäuren und Nukleinsäureanaloge auf dem Träger durch orts- oder/und zeitspezifisches Immobilisieren von Rezeptorbausteinen an jeweils vorbestimmten Positionen auf dem oder im Träger, **dadurch gekennzeichnet,**
- dass man für die Synthese der Rezeptoren mehrere unterschiedliche Sätze von Synthesebausteinen verwendet, wobei die einzelnen Bausteine aus unterschiedlichen Sätzen in Bezug auf die Spezifität für komplementäre Nukleinsäurebausteine aus dem Analyten gleich sind, aber eine unterschiedliche Affinität für komplementäre Nukleinsäurebausteine aus dem Analyten aufweisen, so dass der Beitrag von Volllänge-Rezeptoren bezüglich der Bindung an Nukleinsäure-Analyten gegenüber dem Beitrag von Abbruchprodukt-Rezeptoren erhöht wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,**
- dass zumindest für den letzten Schritt beim Aufbau der Rezeptoren ein Satz von Synthesebausteinen verwendet wird, der eine höhere Affinität für komplementäre Nukleinsäurebausteine aus dem Analyten aufweist.

- 14 -

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass zumindest für einen Schritt beim Aufbau der Rezeptoren ein Satz von Synthesebausteinen verwendet wird, der eine höhere Beständigkeit gegenüber Abbaureagenzien aufweist.
5
4. Verfahren nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass nach einem Aufbauschnitt unter Verwendung eines Satzes von beständigen Synthesebausteinen ein Abbauschnitt durchgeführt wird.
10
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass der erste Satz von Bausteinen aus unmodifizierten DNA- oder RNA-Synthesebausteinen und der zweite Satz aus N3'-P5'-Phosphoramidat (NP) Bausteinen, Locked Nukleinsäure (LNA) Bausteinen, Morpholinophosphordiamidat (MF) Bausteinen, 2'-O-Methoxyethyl (MOE) Bausteinen, 2'-Fluoro,arabino-Nukleinsäure (FANA) Bausteinen oder Peptidnukleinsäure (PNA) Bausteinen ausgewählt wird.
15
20
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass ein Hybridisierungsverstärker derart an den Rezeptor angefügt wird, dass die Affinität für komplementäre Nukleotidbausteine aus dem Analyten für eine vorbestimmte Anzahl einzelner Bausteine aus dem Rezeptor erhöht wird.
25
7. Verfahren nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Hybridisierungsverstärker an das distale Ende des Rezeptors angefügt wird.
30

- 15 -

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass man einen Trägerkörper mit Kanälen bereitstellt, Flüssigkeit mit
Rezeptorbausteinen durch die Kanäle geleitet wird und die
5 unterschiedlichen Rezeptoren an jeweils vorbestimmten Positionen in
den Kanälen aufgebaut werden.
9. Verfahren nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
10 dass der Trägerkörper Mikrokanäle mit einem Durchmesser von 10
bis 1000 μm aufweist.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
15 dass man einen mindestens im Bereich der vorbestimmten Positionen
für den Rezeptoraufbau optisch transparenten oder/und elektrisch
leitfähigen Träger verwendet.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
20 **dadurch gekennzeichnet,**
dass der Aufbau der Rezeptoren fluidchemische Syntheseschritte,
elektrochemische Syntheseschritte oder/und photochemische
Syntheseschritte umfasst.
- 25 12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Rezeptorarray mindestens 100 unterschiedliche Rezeptoren
umfasst.

- 16 -

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass man den Träger für einen oder mehrere integrierte Synthese-
Analyse-Zyklen einsetzt.
- 5
14. Träger zur Bestimmung von Nukleinsäure-Analyten durch
Hybridisierung, umfassend
(a) einen Trägerkörper und
(b) eine Vielzahl auf dem oder/und im Trägerkörper immobilisierte
10 Rezeptoren ausgewählt aus Nukleinsäuren und
Nukleinsäureanaloga,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Rezeptoren aus mehreren unterschiedlichen Sätzen von
Synthesebausteinen aufgebaut sind, wobei die einzelnen Bausteine
15 aus unterschiedlichen Sätzen in Bezug auf die Spezifität für
komplementäre Nukleinsäurebausteine aus dem Analyten gleich sind,
aber eine unterschiedliche Affinität für komplementäre
Nukleinsäurebausteine aus dem Analyten aufweisen.
- 20
15. Reagenzienkit zur Herstellung eines Trägers, umfassend
(a) einen Trägerkörper und
(b) mindestens zwei unterschiedliche Sätze von
Synthesebausteinen zum Aufbau polymerer Rezeptoren
ausgewählt aus Nukleinsäuren und Nukleinsäureanaloga auf
25 dem Trägerkörper, wobei die einzelnen Bausteine aus
unterschiedlichen Sätzen in Bezug auf die Spezifität für
komplementäre Nukleinsäurebausteine aus dem Analyten
gleich sind, aber eine unterschiedliche Affinität für
komplementäre Nukleinsäurebausteine aus dem Analyten
30 aufweisen.

- 17 -

16. Vorrichtung zur integrierten Synthese und Analytbestimmung an einem Träger, umfassend
- (a) einen Träger nach Anspruch 14 oder einen Reagenzienkit nach Anspruch 15,
 - 5 (b) eine programmierbare Lichtquellenmatrix,
 - (c) eine Detektionsmatrix,
 - (d) Mittel zur Zufuhr von Fluids in den Träger und zur Ableitung von Fluids aus dem Träger und
 - (e) gegebenenfalls Reservoirs für Synthesereagenzien und
 - 10 Proben.
17. Vorrichtung nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Träger bzw. der Trägerkörper des Reagenzienkits zwischen
- 15 Lichtquellenmatrix und Detektormatrix angeordnet ist.