



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 07 080 T2** 2006.08.03

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 404 631 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 07 080.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR02/02364**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 764 946.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/008360**

(86) PCT-Anmeldetag: **05.07.2002**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **30.01.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **07.04.2004**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **02.11.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **03.08.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C07B 47/00** (2006.01)

B01J 31/16 (2006.01)

G01N 33/547 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

0109082 09.07.2001 FR

(73) Patentinhaber:

**Centre National de la Recherche Scientifique
(CNRS), Paris, FR; Ecole Centrale de Lyon, Ecully,
FR**

(74) Vertreter:

**PAe Reinhard, Skuhra, Weise & Partner GbR,
80801 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR**

(72) Erfinder:

**DUGAS, Vincent, F-69330 Meyzieu, FR;
CHEVALIER, Yves, F-69540 Irigny, FR;
SOUTEYRAND, Eliane, F-69130 Ecully, FR**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR FUNKTIONALISIERUNG VON FESTEN TRÄGERN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Funktionalisierung von festen Trägern, die mittels Durchführung eines solchen Verfahrens erhaltenen funktionalisierten festen Träger, ihre Verwendungen, insbesondere zur Immobilisierung biologischer Moleküle, wie Nucleinsäuren, Polypeptide, Lipide, Kohlenhydrate und Hormone.

[0002] Träger, die immobilisierte biologische Moleküle tragen, werden vorteilhafterweise zum Nachweis und zur Erkennung biologischer Spezies verwendet, aber andere Anwendungen dieser Träger, wie chemische Synthese oder Modifikation auf Träger oder auch die Verstärkung biologischer Reaktionen auf Träger, sind ebenfalls möglich.

[0003] In dem besonderen Rahmen des Nachweises und der Erkennung biologischer Spezies ist es von größter Bedeutung, dass man über funktionalisierte feste Träger verfügen kann, die eine bestimmte Anzahl von Qualitäten besitzen.

[0004] Diese Träger müssen insbesondere die reproduzierbare Immobilisierung biologischer Moleküle von Interesse gestatten, weil eine reproduzierbare Immobilisierung Voraussetzung für einen ebenfalls reproduzierbaren Nachweis ist.

[0005] Diese Träger müssen ferner die Immobilisierung biologischer Moleküle von Interesse auf empfindliche Weise gestatten. Die Empfindlichkeit eines funktionalisierten festen Trägers hängt vom Immobilisierungsgrad und dem Verfahren zum Nachweis eines Signals ab, aber auch und vor allem von der Höhe des Hintergrunds (unspezifischen Signals). Eine Verringerung des Hintergrunds verbessert das Signal/Hintergrund-Verhältnis. Tatsächlich rührt in einer Vorrichtung, in der man das Vorliegen biologischer Spezies in Nachbarschaft zur Oberfläche nachweist, der Hintergrund im Wesentlichen von der unspezifischen Absorption anderer Moleküle als die biologischen Moleküle von Interesse, die man immobilisieren möchte, her, und man möchte diese folglich beschränken.

[0006] Andererseits ist es wichtig, dass man über wiederverwendbare funktionalisierte feste Träger verfügen kann. Tatsächlich wird der Großteil der zurzeit verfügbaren funktionalisierten Träger als Einwegartikel beschrieben, was natürlich als ein Vorteil für den Verwender betrachtet werden kann. Diese Träger sind jedoch Einwegartikel, weil es, insbesondere aufgrund der starken Abweichung des gemessenen Signals, ganz einfach nicht möglich ist, sie mehrmals zu verwenden. Die Qualifikation "Einwegartikel" wird somit zum Synonym mit "mittelmäßiger Qualität". Die Möglichkeit, über einen wiederverwendbaren Träger verfügen zu können, ist von großem Interesse, weil

sie die Analyse mehrerer biologischer Proben mit einer einzigen und gleichen Vorrichtung gestattet, was die Durchführung quantitativer Vergleiche ermöglicht. Außerdem können mit wiederverwendbaren Träger mehrere Messungen an einer einzigen Probe durchgeführt werden, so dass eine Verbesserung der Ergebnisse unter statistischem Gesichtspunkt möglich ist, was mit einem Einwegträger nicht vorgesehen werden kann, der aufgrund der schlechten Immobilisierung der biologischen Moleküle auf dem Träger zu schnell abweicht.

[0007] Schließlich muss auf einem funktionalisierten Träger, auf dem man die immobilisierten Spezies auf Plots genau lokalisieren möchte, der Immobilisierungsschritt auf der Oberfläche der Plots gut lokalisiert und homogen durchgeführt werden, um jedes Risiko von Auslaufen oder Höfen zu vermeiden.

[0008] Die Immobilisierung biologischer Moleküle auf festen Trägern erfolgt im Allgemeinen in zwei getrennten Schritten:

- einem ersten Schritt der Funktionalisierung der Träger, bestehend aus einer chemischen Modifikation ihrer Oberfläche durch Pfropfung von Synthesemolekülen (Kupplungsmitteln), welche die Befestigung der biologischen Moleküle auf dem Träger gewährleisten;
- einem zweiten Schritt der Immobilisierung, bestehend aus dem Herstellen einer kovalenten Bindung zwischen den biologischen Molekülen und diesen funktionalisierten Trägern.

[0009] Um solche kovalenten Bindungen herzustellen, können verschiedene Typen von Reaktionen in Abhängigkeit einerseits von der Art des Kupplungsmittels und andererseits von dem zu immobilisierenden biologischen Molekül eingesetzt werden.

[0010] Wenn es sich um die Befestigung von Proteinen oder Oligonucleotiden handelt (die einen aminierten Spacerarm tragen), sind somit an der Reaktion mit der Oberfläche Aminfunktionen beteiligt. Die Befestigung dieser Funktionen an der Oberfläche wird hauptsächlich durch Bindungen des Thioharnstoff- oder Amidtyps gewährleistet. Die Bildung von Thioharnstoffen ist insbesondere in dem Artikel von Guo Z. et al., Nucleic Acid Research, 1994, 22, 5456–5465 beschrieben und besteht aus der Aktivierung aminierter Oberflächen durch schwefelhaltige Moleküle, wie beispielsweise Phenylendiisothiocyanat und dem anschließenden Umsetzen der Moleküle an der so aktivierten Oberfläche. Die Bildung von Amidbindungen wird durch Reaktionen von Aminen mit Carbonsäuren erhalten, im Allgemeinen durch chemische Modifikation eines aminierten Trägers (beispielsweise durch Bernsteinsäureanhydrid oder eine Polymerisationsreaktion), wie es zum Beispiel in den amerikanischen Patenten Nr. 5 919 523, 5 667 976 und 6 043 353 beschrieben ist.

[0011] Die direkte Funktionalisierung auf festem Träger durch Carbonsäuren kann durch Bildung von selbstassemblierten Schichten saurer Alkanthiole auf Goldabscheidungen (BONCHEVA M. et al., *Langmuir*, 1999, 15, 4317–4320; HUANG et al., *Langmuir*, 2000, 16, 3272–3280) oder auch durch Hydrosilylierungsreaktionen auf Siliciumträgern (Strother T. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 1205–1209) durchgeführt werden; jedoch beinhaltet im letzten Fall die Befestigung von Biomolekülen Komplektierungsreaktionen.

[0012] Im besonderen Fall der Immobilisierung von Proteinen hat man bereits vorgeschlagen, Träger aus Quarz mit einem Silan zu funktionalisieren, das Estergruppen trägt, von denen anschließend die Schutzgruppen abgespalten werden (Brennan J. D. et al., *Can. J. Chem.*, 1994, 72, 721–728).

[0013] Auch durch die chemische Modifikation biologischer Moleküle war die Entwicklung weiterer Immobilisierungsverfahren möglich. So hat man ein elektrochemisches Immobilisierungsverfahren vorgeschlagen, das auf der Polymerisation von Pyrrol basiert (Livache T. et al., *Biosensors & Bioelectronics*, 1998, 13, 629–634 und Garnier F. et al., *Synthetic Metals*, 1999, 100, 89–94). Durch dieses Verfahren ist es möglich, Moleküle (Oligonucleotide, Peptide), die Pyrrolreste tragen, durch lokalisiertes Einfangen zu immobilisieren, es macht jedoch die Verwendung von leitenden Trägern erforderlich und erfordert ein Mehrfachzielsteuerungsverfahren.

[0014] Es wurde ebenfalls vorgeschlagen, Oligonucleotide durch eine Dialdehydgruppe zu modifizieren, so dass ihre Befestigung an Hydrazidfunktionen möglich ist. (Proudnikov D. et al., *Analytical Biochemistry*, 1998, 259, 34–41 und Dubiley S. et al., *Nucleic Acid Research*, 1997, 25, 2259–2265). Die funktionalisierten Träger sind in diesem Fall Polyacrylamid- oder Nitrocellulosegele, die dicke und somit dreidimensionale Netze bilden, die den Vorteil haben, dass die bei einer gleichen Oberfläche die Dichte der immobilisierten Stränge erhöhen. Diese Gele weisen jedoch im Hinblick auf die Größe der abgeschiedenen Plots und die Größe der DNA-Stränge, die hybridisiert werden können, bestimmte Beschränkungen auf (Yershov G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 4913–4918).

[0015] Ein mehr und mehr verwendeter Weg beinhaltet schließlich die Umsetzung von Oligonucleotiden, die einen Spacerarm mit einer endständigen Thiofunktion besitzen, an Oberflächen, die mit Halogenacetaten funktionalisiert sind (US 5 412 087 und Tang K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 10016–10020). Die Einführung von Dischwefelbrücken oder Thioetherbindungen nach Addition einer Pyridylsulfidgruppe an das Oligonucleotid (WO 99/20640) ist an Oberflächen möglich, die durch Thi-

ole funktionalisiert sind. Auch wenn die Thiole ausreichend reaktiv und unempfindlich gegenüber Feuchtigkeit erscheinen, sind diese Funktionen trotzdem schwierig einzusetzen, weil sie zur Oxidation zum Disulfid neigen. Eine vorherige Reduktion des Disulfids in situ ist somit oft erforderlich, damit man hoffen kann, reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

[0016] Somit besteht folglich ein großes Spektrum an Möglichkeiten, um zu funktionalisierten Trägern zu gelangen, die eine Immobilisierung biologischer Moleküle von Interesse gestatten. Bis heute konnten man jedoch die Gewinnung wiederverwendbarer funktionalisierter fester Träger, welche die Immobilisierung biologischer Moleküle von Interesse auf reproduzierbare und empfindliche Weise sowie den Nachweis eines Signals bei gleichzeitiger Beschränkung des Signal/Hintergrund-Verhältnisses gestatten, nicht auf völlig zufriedenstellende Weise durchführen.

[0017] Aus diesem Grund haben sich die Erfinder zum Ziel gesetzt, derartige Träger bereitzustellen, und sind zu dem Gegenstand der vorliegenden Erfindung gelangt.

[0018] Ein erster Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Funktionalisierung eines festen Trägers, der an der Oberfläche Hydroxyl- oder Hydridfunktionen trägt, umfassend die folgenden Schritte:

a) Pfropfen mindestens eines bifunktionellen Moleküls mittels kovalenter Bindung (Silylierung oder Hydrosilylierung), das eine geschützte Carbonsäurefunktion der folgenden Formel (I) trägt:



worin:

- A eine Gruppe darstellt, die eine kovalente Bindung des bifunktionellen Moleküls der Formel (I) an die Hydroxyl- oder Hydridfunktionen des Trägers gestattet,
 - R eine Schutzgruppe der Carbonsäurefunktion darstellt,
 - X eine gerade oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte C₂-C₁₈-Kohlenwasserstoffkette darstellt, die gegebenenfalls durch ein oder mehrere Heteroatome, die aus N, O und S ausgewählt sind, unterbrochen ist;
 - b) Entfernen der Schutzgruppen von den Carbonsäurefunktionen, von denen im Verlauf des Pfropfungsschrittes a) nicht die Schutzgruppe entfernt wurde;
- dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt a) bei einer Temperatur zwischen 50 und 200°C mit einer Verbindung der Formel (I) durchgeführt wird, in der A eine monofunktionelle Gruppe ist, und dadurch, dass das Verfahren ferner einen Schritt c) der Passivierung der restlichen Hydroxyl- oder

Hydridfunktionen des Trägers, die nicht mit dem oder den Molekül(en) der Formel (I) umgesetzt wurden, umfasst.

[0019] Erfindungsgemäß umfasst die Kohlenwasserstoffkette des bifunktionellen Moleküls der Formel (I) 2 bis 18 Kohlenstoffatome; bei einer derartigen Kettenlänge (weniger als 20 Kohlenstoffatome) kann man nicht zu einem festen Träger gelangen, der eine autoassemblierte organisierte Einzelschicht (SAM) trägt. Tatsächlich ist gemäß A. ULMAN, Chem. Rev., 1996, 96, 1533–1554, die SAM-Bildung auf festen Trägern mithilfe von Organosiliciumverbindungen, die ein trifunktionelles Ende (des Alkyltrichlorsilan-Typs) besitzen, möglich, wenn die Kohlenwasserstoffkette mindestens 20 Kohlenstoffatome enthält.

[0020] Erfindungsgemäß ist es im Gegensatz dazu durch Verwendung von Molekülen der Formel (I), in denen die Gruppe A, die deren Befestigung auf dem Träger gestattet, monofunktionell ist, möglich, dichte mono- oder submolekulare Schichten auf reproduzierbare Weise zu erhalten. Außerdem besitzen die Moleküle der Formel (I), die an der Oberfläche des Trägers befestigt sind, jeweils ihren Verankerungspunkt direkt auf der Oberfläche, im Gegensatz zu bi- oder trifunktionellen Molekülen, die oft zu dicken, rauen und schlecht definierten Pfropfschichten führen.

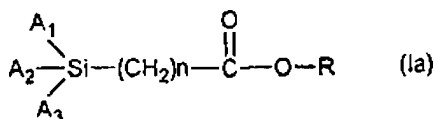
[0021] Die festen Träger, die gemäß diesem Verfahren funktionalisiert werden können, sind vorzugsweise poröse oder ebene, organische (Kunststoffmaterialien) oder anorganische Oberflächen der Typen Metalloxide, Siliciumdioxid und seiner Derivate (Glas, Quarz, ...), d.h. jede Oberfläche, die oberflächliche Hydroxylfunktionen aufweist, sowie Halbleiter des Siliciumtyps, die an der Oberfläche Hydride (Si-H) aufweisen.

[0022] Die monofunktionelle Gruppe A kann insbesondere aus Dialkyl(dialkylamino)silan-, Dialkylhalogensilan-, Diphenyl(dialkylamino)silan-, Diphenylhalogensilan-, [(Monoalkyl), (Monophenyl), (Dialkylamino)]silan-, [(Monoalkyl), (Monophenyl), (Halogen)]silan-, Alken-, Alkingruppen und metallorganischen Verbindungen, wie Organomagnesium- oder Organolithiumverbindungen, ausgewählt sein.

[0023] Die Schutzgruppe R der vorstehenden Moleküle der Formel (I) kann aus den in Protective groups in organic synthesis (T. W. GREENE et al., 2. Auflage, Wiley Interscience) ausgewählt sein, wie beispielsweise ein C₁-C₄-Alkylrest oder ein zyklischer Rest.

[0024] Nach einer vorteilhaften Ausführungsform dieses Verfahrens und, wenn die Oberfläche des festen Trägers oberflächliche Hydroxylfunktionen aufweist, sind die Moleküle der Formel (I) vorzugsweise

aus den Organosiliciumverbindungen der folgenden Formel (Ia) ausgewählt:



worin:

- A₁ und A₂ gleich oder verschieden sind und einen C₁-C₄-Alkyl- oder einen Phenylrest darstellen,
- A₃ einen C₁-C₄-Alkoxy-, Dialkyl- (C₁-C₄) amino-Rest oder ein Halogenatom, wie Chlor, darstellt,
- R eine Schutzgruppe darstellt, die aus C₁-C₄-Alkylresten und zyklischen Resten, wie dem Benzylrest, ausgewählt ist,
- n eine ganze Zahl zwischen 2 und 18 ist.

[0025] Unter den für A₁ und A₂ definierten C₁-C₄-Alkylresten kann man insbesondere Methyl-, Ethyl-, Propyl- und Butylreste nennen, wobei der Methylrest besonders bevorzugt ist.

[0026] Unter den für A₃ definierten Dialkyl-(C₁-C₄)amino-Resten kann man insbesondere den Dimethylaminorest nennen.

[0027] Unter den für die Gruppe R definierten C₁-C₄-Alkylresten kann man insbesondere Methyl-, Ethyl-, Isopropyl- und t-Butylreste nennen, wobei der t-Butylrest besonders bevorzugt ist.

[0028] Erfindungsgemäß sind die Verbindungen der Formel (Ia) ganz besonders aus denjenigen ausgewählt, in denen:

- A₁ und A₂ gleich sind und einen Methylrest darstellen,
- A₃ einen Dimethylaminorest oder ein Chloratom darstellt,
- n = 10 ist und
- R einen t-Butylrest darstellt.

[0029] In dem besonderen Fall, in dem A₃ einen Dimethylaminorest darstellt, kann das entsprechende Molekül ((CH₃)₂N-Si-(CH₃)₂-(CH₂)₁₀-C(O)-O-t-butyl), das nicht kommerziell erhältlich ist, gemäß herkömmlicher Verfahren zur Veresterung von Undecylensäure (Trost B. M. et al., "Comprehensive organic synthesis", 1991, 6, Pergamon Press; Staab H. A. et al., "Azolides in organic synthesis and biochemistry", 1998, Wiley Weinheim) und zur Hydrosilylierung (Fleming I., "Comprehensive organic synthesis", Band III, Kapitel 13) hergestellt werden.

[0030] Gemäß einer anderen vorteilhaften Ausführungsform des Verfahrens und, wenn die Oberfläche des festen Trägers oberflächliche Hydridfunktionen trägt, sind die Moleküle der Formel (I) vorzugsweise aus Alkenen, Alkinen, Aldehyden, Peroxiden oder aus metallorganischen Verbindungen ausgewählt.

Unter diesen Verbindungen sind Methyl- oder t-Butylester der Undecylensäure besonders bevorzugt.

[0031] Wenn der Schritt a) ein Silylierungsschritt ist, kann er gleich gut in organischer, katalysierter oder nicht katalysierter wässriger Phase oder in der Dampfphase durchgeführt werden.

[0032] Wenn er in organischer Phase erfolgt, umfasst der Schritt a) vorteilhafterweise die folgenden Schritte:

- i) Beseitigung von Verunreinigungen des festen Trägers und Hydroxylierung seiner Oberfläche,
- ii) Einbringen einer Organosiliciumverbindung der allgemeinen Formel (Ia), wie vorstehend definiert, in ein Lösungsmittel, das aus unpolaren Kohlenwasserstofflösungsmitteln, polaren Lösungsmitteln und ihren Gemischen ausgewählt ist, unter einer inerten Atmosphäre,
- iii) Silanisierung des im Schritt i) erhaltenen Trägers mittels Eintauchen in die im Schritt ii) hergestellte Lösung und
- iv) Härten des im Schritt iii) erhaltenen silanisierten Trägers nach Verdampfen des Lösungsmittels unter einer inerten Atmosphäre und bei einer Temperatur zwischen 50 und 200°C, vorzugsweise bei 140°C, für eine Dauer zwischen 2 und 72 Stunden und
- v) Waschen und Trocknen des im Schritt iv) erhaltenen modifizierten Trägers.

[0033] Unter "Verunreinigungen" des festen Trägers wird jede Verbindung verstanden, wie Fett, Staub oder andere, die an der Oberfläche des Trägers vorliegt und nicht Teil der chemischen Struktur des Trägers selbst ist.

[0034] Je nach der Art des festen Trägers kann der Schritt i) mithilfe von einem oder mehreren Lösungsmitteln und/oder Oxidationsmitteln und/oder Hydroxylierungsmitteln (zum Beispiel einem Sulfochrom-Gemisch), einem oberflächenaktiven Mittel (zum Beispiel Hellmanex®), einer photochemischen Behandlung durch Ozon oder jeder anderen geeigneten Behandlung durchgeführt werden.

[0035] Beim Schritt ii) beträgt die Konzentration der Organosiliciumverbindung der Formel (Ia) im Lösungsmittel vorzugsweise zwischen 10^{-5} und 1 mol/Liter.

[0036] Wenn Schritt a) ein Hydrosilylierungsschritt ist und der verwendete feste Träger aus Glas oder Siliciumdioxid ist, umfasst der Schritt a) vorzugsweise die folgenden Schritte:

- i) Beseitigung von Verunreinigungen des festen Trägers und Hydratisierung seiner Oberfläche,
- ii) Waschen des Trägers in einem wasserfreien Alkohol, wie wasserfreiem Methanol,
- iii) In-Kontakt-bringen des Trägers mit einem Al-

ken, das zuvor unter Argon desoxygeniert wurde, iv) Hydrosilylierung des Trägers durch Zugabe eines Katalysators (Speier- oder Karstedt-Katalysators, Ethyldichloraluminium) während 2 bis 24 Stunden bei einer Temperatur zwischen 90 und 200°C.

[0037] Erfindungsgemäß ist es durch den Pfropfungsschritt a) möglich, eine Menge von Molekülen der Formel (I) zwischen 1 und 8 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ des Substrats zu befestigen.

[0038] Vorzugsweise muss der Pfropfungsschritt den Schutz der Carbonsäure des bifunktionellen Moleküls der Formel (I) intakt lassen, damit eine bessere Organisation der gepfropften Schicht, die Pfropfungsdichte sowie die Reproduzierbarkeit der Reaktion gewährleistet sind. In bestimmten Fällen erfolgt jedoch eine Entfernung der Carbonsäure-Schutzfunktionen bei bestimmten Hydrosilylierungsreaktionen oder, wenn man ein Chlorsilan als Verbindung der Formel (Ia) einsetzt.

[0039] Wenn der Pfropfungsschritt a) beendet ist, ist es somit notwendig, von den Carbonsäurefunktionen die Schutzgruppen zu entfernen, die noch nicht während des Pfropfungsschritts entfernt worden sind.

[0040] Gemäß einer ersten Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens kann der Schritt der Entfernung der Schutzgruppen b) unter milden Bedingungen gemäß einem Verfahren durchgeführt werden, welches das Herstellen eines Silylesters, der in Wasser leicht hydrolysierbar ist, vorzugsweise durch Umsetzen des Trägers mit einem Silan der folgenden Formel (II) umfasst:



worin Y ein Halogenatom, wie Iod, Brom oder Chlor, darstellt.

[0041] Die Verwendung eines kleinen Silanmoleküls der Formel (II) bietet den Vorteil, dass die Bedeckung des Trägers (Passivierung) vervollständigt werden kann, weil dieses kleine Silanmolekül auch mit den restlichen Hydroxylfunktionen des Trägers reagiert, die nicht im Verlauf der Pfropfungsreaktion mit den bifunktionellen Molekülen der Formel (I) reagiert haben oder die sich durch Hydroxylierung von Hydriden an dem Silicium während des Hydrosilylierungsschritts gebildet haben.

[0042] Die Bildung dieser Ester kann folgendermaßen erhalten werden:

- entweder durch Umsetzung des Trägers und eines Iodtrialkylsilans, wie Iodtrimethylsilan, in einem wasserfreien organischen Lösungsmittel (wie Chloroform oder Dichlormethan) bei Umgebungstemperatur oder unter Erhitzen bis auf eine

Temperatur von etwa 60°C

– oder durch Umsetzung des Trägers mit Chlortrimethylsilan in Gegenwart von Natriumiodid in wasserfreiem Acetonitril oder Aceton bei Umgebungstemperatur oder etwa 40°C.

[0043] In diesem Fall wird der Passivierungsschritt c) also gleichzeitig mit Schritt b) durchgeführt.

[0044] Gemäß einer zweiten Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der Schritt b) eine thermische Schutzgruppenentfernung. Dieses Verfahren zur Schutzgruppenentfernung ist auf bestimmte Carbonsäureester, wie Isopropyl- und t-Butylester, anwendbar.

[0045] Diese thermische Schutzgruppenentfernung kann durch Behandlung des funktionalisierten Trägers bei einer Temperatur zwischen 250 und 280°C für 30 bis 60 Minuten in einer inerten Atmosphäre (beispielsweise Argon oder Stickstoff) durchgeführt werden.

[0046] Durch diesen thermischen Schutzgruppenentfernungsschritt, der nach dem Silylierungs- oder Hydrosilylierungsschritt durchgeführt wird, ist es möglich, in situ durch einfache Erhöhung der Temperatur die oberflächliche Carbonsäurefunktion herzustellen.

[0047] Vorteilhafterweise kann somit dieser thermische Schutzgruppenentfernungsschritt gleichzeitig mit Schritt a) durch einfache Erhöhung der Temperatur am Ende von Schritt a) durchgeführt werden.

[0048] Die thermische Schutzgruppenentfernung kann vorteilhafterweise auch lokalisiert durchgeführt werden, indem die Temperatur lokal erhöht wird, beispielsweise mithilfe eines Laserbündels oder jedem anderen geeigneten Mittel, um aktivierbare Zone festzulegen, die von Zonen umgeben sind, in denen die Carbonsäurefunktionen geschützt bleiben.

[0049] Erfindungsgemäß wird die Entfernung der Schutzgruppen von den Carbonsäurefunktionen vorzugsweise durch Bildung eines Silylesters durchgeführt, weil durch dieses Verfahren gleichzeitig Carbonsäurefunktionen unter milden Bedingungen hergestellt und die restlichen Hydroxylfunktionen des Trägers (Schritt der Trägerpassivierung) blockiert werden können, was es anschließend ermöglicht, die unspezifische Adsorption von Molekülen auf dem Träger zu beschränken. Dabei handelt es sich tatsächlich um die unspezifische Adsorption biologischer Moleküle, die für den Hintergrund beim Nachweis verantwortlich ist.

[0050] Wenn die Schutzgruppenentfernung von den Carbonsäurefunktionen thermisch durchgeführt wird, führt man folglich anschließend einen Passivierungs-

schritt der Hydroxyl- oder Hydridfunktionen des Trägers durch, indem diese zum Beispiel mit einem Silan der Formel (II), wie vorstehend beschrieben, umgesetzt werden, oder durch jedes andere, dem Fachmann herkömmlicherweise bekannte Verfahren, wie beispielsweise durch Umsetzung des Trägers mit Hexamethyldisilazan oder auch gemäß einem Verfahren, bei dem kleine Moleküle, wie Methanol, stark adsorbieren.

[0051] Wenn die Schritte zur Entfernung der Schutzgruppen von den Carbonsäurefunktionen und der Passivierung des Trägers beendet sind, werden die funktionalisierten Träger mit Wasser gewaschen und, zum Beispiel durch einen Druckluftstrahl, getrocknet.

[0052] Gegenstand der Erfindung ist auch der funktionalisierte feste Träger, der mittels Durchführung des erfindungsgemäßen Funktionalisierungsverfahrens erhalten wird, und wie vorstehend beschrieben.

[0053] Diese funktionalisierten Träger gestatten die reproduzierbare Immobilisierung biologischer Moleküle von Interesse, wobei gleichzeitig die unspezifische Adsorption von Molekülen verhindert und somit das Signal/Hintergrund-Verhältnis beim Nachweis erhöht wird. Sie gestatten ferner die Beschränkung von Auslaufen und Höfen bei lokalisierten Auftragungen, indem die Ausbreitung der Reagenzientropfen kontrolliert wird.

[0054] Diese funktionalisierten Träger können insbesondere zur Immobilisierung von biologischen Molekülen von Interesse, die funktionelle Amin- oder Hydroxylfunktionen tragen, wie Nucleinsäuren, Polypeptide (Proteine, Enzyme), Lipide, Kohlenhydrate oder Hormone, mittels kovalenter Bindung verwendet werden.

[0055] Im Sinne der vorliegenden Erfindung und im Folgenden werden unter "Nucleinsäuren" sowohl Oligonucleotide als auch DNA oder RNA oder auch Nucleinsäuren mit modifiziertem Grundgerüst oder modifizierten Basen verstanden, wie Peptid-Nucleinsäuren (PNA), die anstelle der Phosphodiesterbindungen Peptidbindungen umfassen.

[0056] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit auch ein Verfahren zur Immobilisierung biologischer Moleküle auf einem funktionalisierten festen Träger, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgenden Schritte umfasst:

- a) Herstellung eines funktionalisierten festen Trägers, der endständige Carbonsäurefunktionen in Esterform trägt, gemäß dem Verfahren, wie vorstehend definiert,
- b) Entfernen der Schutzgruppen und Aktivierung der endständigen Carbonsäurefunktionen,
- c) In-Kontakt-bringen des im Schritt a) oder b) er-

haltenen modifizierten festen Trägers mit einer oder mehreren lokal aufgetragenen Lösungen in einem oder mehreren Lösungsmitteln, dem (den) zu immobilisierenden biologischen Molekül(en), wobei diese biologischen Moleküle an einem ihrer Enden eine Aminfunktion oder eine Hydroxylfunktion oder einen durch eine primäre Aminfunktion funktionalisierten Spacerarm tragen,
 d) Verdampfen des Lösungsmittels, um die kovalente Bindung des (der) biologischen Molekül(s/e) an den Carbonsäurefunktionen zu bewirken,
 e) Inaktivierung der aktivierten Carbonsäurefunktionen, die nicht mit den biologischen Molekülen umgesetzt wurden, mithilfe eines Amins in der Gasphase oder in Lösung und
 f) Waschen des festen Trägers, an dem die biologischen Moleküle immobilisiert sind.

[0057] Der Schritt b) der Aktivierung der Carbonsäurefunktionen kann beispielsweise mithilfe einer Lösung von N-Hydroxysuccinimid, Carbonyldiimidazol oder Carbodiimid oder auch mit jedem anderen geeigneten und dem Fachmann bekannten Aktivierungsreagenz durchgeführt werden.

[0058] Beispielsweise kann dieser Aktivierungsschritt in Gegenwart von Carbonyldiimidazol (0,1 M) in wasserfreiem Tetrahydrofuran (THF) in zwei Stunden bei etwa Umgebungstemperatur durchgeführt werden. Dieser Typ der Aktivierung gestattet es insbesondere, aktivierte Oberflächen zu erhalten, die mit nucleophilen Reagenzien (Aminen, Alkoholen, Wasser) sehr reaktiv sind. In diesem Fall lässt man die biologischen Moleküle in wasserfreien Lösungsmitteln in Gegenwart eines tertiären Amins, wie Triethylamin, reagieren, um das Vorliegen der Aminoform der funktionellen Gruppe der biologischen Moleküle zu gewährleisten.

[0059] Im Verlauf von Schritt c) beträgt die Konzentration der Lösung oder Lösungen von biologischen Molekülen vorzugsweise zwischen 10^{-6} bis 10^{-3} mol/l.

[0060] Es ist selbstverständlich, dass im Verlauf von Schritt c) zur Solubilisierung der biologischen Moleküle jedes wässrige oder wasserfreie Lösungsmittel verwendet werden kann, das ein gutes Lösen der Ersteren und eine abschließende Kontrolle des Verdampfens der Lösung gestattet. Die Art des Lösungsmittels muss selbstverständlich in Abhängigkeit von der Art des zu isolierenden biologischen Moleküls gewählt werden. Als Beispiel und nicht als Beschränkung lassen sich Phosphatpuffer, Dimethylsulfoxid (DMSO), wasserfreies Acetonitril oder auch ein Acetonitril/Wasser-Gemisch nennen.

[0061] Jede Lösung von zu immobilisierenden biologischen Molekülen kann an einer bestimmten Stelle des Trägers mithilfe eines geeigneten Mikroauftragsverfahrens abgelagert werden.

[0062] Wenn die Immobilisierungsreaktion, zum Beispiel zur Immobilisierung von Oligonucleotiden, unter wasserfreien Bedingungen durchgeführt wird, ist es somit beispielsweise möglich, wasserfreies DMSO zu verwenden. Selbstverständlich wird die Reaktion unter wasserfreier Atmosphäre durchgeführt. In diesem Fall liegen die Oligonucleotide vorzugsweise in der Lösung in einer Konzentration zwischen 10^{-5} und 10^{-3} mol/l vor.

[0063] DNA-Stränge und Oligonucleotide sind in wässriger Lösung in allen Anteilen löslich. Wenn man diesen Typ des biologischen Moleküls immobilisieren möchte, wird der Immobilisierungsschritt also vorzugsweise unter wässrigen Bedingungen durchgeführt. Die Aktivierung der Carbonsäurefunktionen durch N-Hydroxysuccinimid gestattet es, unter wässrigen Bedingungen zu arbeiten.

[0064] Erfindungsgemäß ist der Schritt d) der Immobilisierung biologischer Moleküle durch Verdampfen des Lösungsmittels für das gute Abfließen des Immobilisierungsverfahrens entscheidend, weil er die kovalente Pfropfung der biologischen Moleküle von Interesse auf den funktionalisierten Träger gestattet. Tatsächlich verwendet das erfindungsgemäße Immobilisierungsverfahren vorzugsweise sehr verdünnte Lösungen biologischer Moleküle (in der Größenordnung von 10^{-6} bis 10^{-3} mol/l), deren Nachweis anschließend unmöglich ist, wenn die Pfropfung durch kovalente Bindung nicht durchgeführt wurde. Vorzugsweise wird dieser Verdampfungsschritt langsam durchgeführt, d.h. für einen Zeitraum zwischen etwa 1 bis 10 Stunden.

[0065] Wenn der Immobilisierungsschritt beendet ist, wird anschließend zur Inaktivierung der aktivierten Carbonsäurefunktionen, die nicht mit den biologischen Molekülen reagiert haben, mithilfe eines Amins in der Gasphase oder in Lösung übergegangen (Schritt e).

[0066] Dieser Inaktivierungsschritt gestattet es, Probleme mit dem Auslaufen der Tropfen, der Verunreinigung oder Verschmutzung im Verlauf der folgenden Schritte zu vermeiden, er kann auch als "Capping" bezeichnet werden.

[0067] Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsform des erfindungsgemäßen Immobilisierungsverfahrens wird dieser Inaktivierungsschritt durchgeführt, indem man Methylamin oder Dimethylamin, vorzugsweise Dimethylamin, für 15 bis 45 Minuten in der Gasphase reagieren lässt.

[0068] Durch diesen Inaktivierungsschritt ist es leicht möglich, mehrere Träger gleichzeitig zu behandeln.

[0069] Gemäß einer anderen vorteilhaften Ausführungsform

rungsform dieses Verfahrens wird der Inaktivierungsschritt nur auf zuvor festgelegten Zonen eines gleichen Trägers durchgeführt, wobei die Zonen, die nicht inaktiviert werden sollen, zuvor beispielsweise durch Tropfen von Wasser, organischen Lösungsmitteln oder Mineralöl geschützt werden.

[0070] Die Desaktivierung der nicht geschützten Zonen gestattet es somit, ein Netz von aktivierten oder reaktivierbaren Zonen und chemisch inerten Zonen herzustellen.

[0071] Durch diese Ausführungsform des Verfahrens ist es möglich, zu räumlich aufgetrennten Trägern zu gelangen, die zum Beispiel durch Auftragung von Wassertropfen auf einer Oberfläche, die (zum Beispiel durch Carbonyldiimidazol) aktivierte Carbonsäurefunktionen trägt, gefolgt von dem Schritt der Inaktivierung der zugänglichen Oberflächen durch ein Amin in der Gasphase und anschließendes Spülen des Trägers erhalten werden können. Die durch die Wassertropfen inaktivierten Zonen können anschließend vor dem Schritt der kovalenten Bindung der biologischen Moleküle reaktiviert werden.

[0072] Der abschließende Waschschrift f) soll die Moleküle desorbieren, die nicht kovalent an den erfindungsgemäß funktionalisierten Träger gebunden sind, um eine reproduzierbare Dichte von an der Oberfläche befestigten biologischen Molekülen zu erhalten.

[0073] Dieser Waschschrift wird vorzugsweise durchgeführt, indem man den Träger aufeinanderfolgenden, nach und nach immer stringenteren Waschschriften unterzieht, die zum Beispiel von einem Waschen mit Wasser bei einer Temperatur von etwa 80°C für etwa eine Stunde bis zu Waschen in einer konzentrierten, zum Beispiel 10%igen, wässrigen Natriumdodecylsulfat-(SDS-)Lösung bei einer Temperatur von etwa 80°C für 1 Stunde, gegebenenfalls gefolgt von Ultraschallbehandlung für einige Minuten, reichen können.

[0074] Die Wiederverwendung der Träger wird durch den Erhalt reproduzierbarer Signale bestimmt. Diesem Waschschrift kommt eine Funktion im Hinblick auf die Wiederverwendung dieser Träger zu, weil durch ihn gewährleistet werden kann, dass die Träger im Verlauf der folgenden optionalen Nachweisschritte keine Moleküle freisetzen.

[0075] Dieser Waschschrift hat zwar zur Folge, dass eine bestimmte Anzahl nicht kovalent gebundener biologischer Moleküle beseitigt werden und folglich der Immobilisierungsgrad und somit das Nachweissignal verringert wird, aber er gestattet es auch, den unspezifischen Adsorptionsgrad und somit den Hintergrund beim Nachweis zu verringern. Das Endergebnis dieses Waschschrifts ist somit eine Verbesserung des

Signal/Hintergrund-Verhältnisses sowie der Reproduzierbarkeit der Messung.

[0076] Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind außerdem feste Träger, die mittels Durchführung des erfindungsgemäßen Immobilisierungsverfahrens erhalten werden, d.h. feste Träger, auf denen biologische Moleküle von Interesse durch kovalente Bindung immobilisiert sind.

[0077] Diese festen Träger können gleich gut als Werkzeuge zur Analyse (Diagnostik, Sequenzierung usw.) wie als Werkzeuge zur Präparation (Isolation, Trennung komplexer Moleküle) oder zur Beschichtung von Oberflächen mit spezifischen Eigenschaften (Beschichtungen für Chromatographie, "aktive" Beschichtungen, wie antistatische, antibakterielle usw. Beschichtungen ...) verwendet werden.

[0078] Somit finden sie Anwendung auf zahlreichen Gebieten, wie:

- der Synthese auf festen Trägern,
- der Trennung und Reinigung von Molekülen (Elektrophorese, Chromatographie),
- in der Molekularbiologie, insbesondere wenn die immobilisierten biologischen Moleküle Enzyme sind,
- als biologische Fänger ("Immunoassays", Technik zur DNA-Analyse auf Basis von Mikroarrays, zum Beispiel Sequenzierung durch SBH-Hybridisierung, Einzelnucleotidpolymorphismus (single nucleotide polymorphism, SNP) und biomedizinische Diagnostik).

[0079] Die Verwendung erfindungsgemäßer funktionalisierter fester Träger gestattet es, verschiedene Typen biologischer Moleküle zu immobilisieren und somit verschiedene Typen von Chips, wie Nucleinsäure-Chips, wie DNA-Chips, Polypeptid-Chips, wie Protein-Chips usw., herzustellen.

[0080] Die Verwendung erfindungsgemäß modifizierter fester Träger ist besonders vorteilhaft zur Herstellung von DNA-Chips, nämlich von Trägern, auf denen eine Gruppe von DNAs mit bekannten Sequenzen in einer ganz genauen Anordnung kovalent gebunden ist, wobei diese Chips viele Male wiederverwendet werden können. Solche DNA-Chips ermöglichen es, durch Hybridisierung der auf dem Träger immobilisierten DNAs mit Ziel-Nucleinsäuren oder -Oligonucleotiden die Sequenz dieser Zielmoleküle zu bestimmen oder die Expression von Genen zu verfolgen. Die Anwendungen sind zahlreich: Entdeckung neuer Gene, neuer Medikamente, Durchführung von Diagnostik, Toxizitätsstudien usw.

[0081] Somit ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung außerdem ein Nucleinsäure- oder Polypeptid-Chip, dadurch gekennzeichnet, dass er durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Immobilisie-

rung biologischer Moleküle erhalten wird, wobei diese biologischen Moleküle Nucleinsäuren oder Polypeptide sind.

[0082] Die erfindungsgemäßen Nucleinsäure- oder Polypeptid-Chips bieten den Vorteil, dass sie stabil sind und deshalb viele Male wiederverwendet werden können, insbesondere die DNA-Chips können in zahlreichen Hybridisierungs- und Denaturierungszyklen wiederverwendet werden.

[0083] Neben den vorstehenden Vorrichtungen umfasst die Erfindung auch andere Vorrichtungen, die sich aus der nachstehenden Beschreibung ergeben, sie sich auf ein Beispiel der Funktionalisierung eines festen Trägers, auf ein Beispiel der Immobilisierung von Oligonucleotiden sowie auf ein Beispiel, das die Reproduzierbarkeit des erfindungsgemäßen Immobilisierungsverfahrens demonstriert, bezieht.

[0084] Es sollte in jedem Fall selbstverständlich sein, dass die Beispiele nur zur Veranschaulichung des Gegenstands der Erfindung gegeben werden und für diesen in keiner Weise eine Beschränkung darstellen.

Beispiel 1: Herstellung eines funktionalisierten festen Trägers

1) Waschen und Hydroxylierung der Proben

[0085] Glasplatten (76 × 26 mm) werden in eine Lösung von Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid (7/3 Vol./Vol.) für eine Stunde bei 80°C eingetaucht. Die Platten werden anschließend gründlich mit ultra-reinem Wasser gespült und dann mit einem Gasgebläse getrocknet. Sie werden schließlich in einem Glasreaktor eingebracht.

2) Silanisierung

[0086] Der Reaktor, der die Glasplatten enthält, wird für eine Stunde unter Vakuum auf 140°C und dann für eine Stunde unter Spülen mit Inertgas (Argon, Stickstoff) erhitzt. Der Reaktor wird anschließend in einem Eiswasserbad abgekühlt, und 150 ml Pentan werden injiziert, um die Oberfläche der Proben zu bedecken. Dann werden 300 ml Silan injiziert.

[0087] Das Pentan wird anschließend unter Vakuum verdampft, und dann wird der Reaktor auf 140°C erhitzt und mit einem Strom von Inertgas (Argon oder Stickstoff) für 12 Stunden gespült.

3) Spülen der Proben

[0088] Am Ende der Silanisierung werden die Glasplatten in Tetrahydrofuran (THF) unter Ultraschall gewaschen, bevor sie gelagert oder den anderen Funktionalisierungsschritten unterzogen werden.

Beispiel 2: Immobilisierung von Oligonucleotiden auf einem erfindungsgemäßen funktionalisierten Träger

1) Entfernung der Schutzgruppen von den Carbonsäurefunktionen

[0089] Die vorstehend im Beispiel 1 erhaltenen funktionalisierten Glasplatten werden unter einer inerten Atmosphäre bei 140°C für 2 Stunden getrocknet. Nach dem Abkühlen werden sie in eine zuvor über Aluminium getrocknete Dichlormethan-(DCM-)Lösung getaucht, dann wird Iodtrimethylsilan in einer Menge injiziert, die ausreicht, um eine Konzentration von 0,1 M zu erzielen. Die Hydrolyse erfolgt für eine Nacht bei Umgebungstemperatur. Am Ende der Umsetzung werden die Platten mit deionisiertem Wasser gewaschen und durch einen Druckluftstrahl getrocknet.

2) Aktivierung der Proben mit N-Hydroxysuccinimid

[0090] Die Platten werden bei 140°C unter Argon für zwei Stunden getrocknet. Nach Abkühlen werden sie in eine Lösung von wasserfreiem THF, die N-Hydroxysuccinimid (0,1 M) und Diisopropylcarbodiimid (0,1 M) enthält, eingetaucht. Die Aktivierung wird für 5 Stunden bei Umgebungstemperatur durchgeführt. Die Platten werden anschließend mit wasserfreiem THF gespült und dann unter inerter Atmosphäre im Dunkeln gelagert.

3) Immobilisierung der Oligonucleotide

[0091] Die Oligonucleotide (25mere, die einen durch eine Aminfunktion (C_6-NH_2) funktionalisierten Spacerarm trugen) werden in PBS-Phosphatpuffer (phosphatgepufferter Salzlösung) mit pH 8,5 gelöst. Oberflächen von 1 cm² werden mit 50 µl Oligonucleotidlösung bedeckt. Nach langsamem Verdampfen des PBS-Puffers bei einer Temperatur von 50°C werden die Platten durch Blockierung (Capping) der Säurefunktionen, die nicht mit den Aminfunktionen der Spacerarme der Oligonucleotide reagiert haben, inaktiviert. Dazu werden die Platten mit Methylamin in der Gasphase für 30 Minuten behandelt.

4) Waschen der Platten

[0092] Schließlich werden die Oberflächen in aufeinanderfolgenden, immer stringenteren Bädern gewaschen: ultrareines Wasser bei 100°C für 45 Minuten, dann 10% SDS bei 80°C für 45 Minuten und schließlich 10% SDS unter Ultraschall für 5 Minuten.

Beispiel 3: Nachweis der Reproduzierbarkeit des erfindungsgemäßen Immobilisierungsverfahrens

[0093] Verschiedene Glasplatten, die gemäß dem vorstehend im Beispiel 1 beschriebenen Verfahren funktionalisiert und mit N-Hydroxysuccinimid gemäß

dem vorstehend im Beispiel 2 beschriebenen Verfahren aktiviert wurde, wurden zur Immobilisierung von 1 µl von Lösungen von Oligonucleotiden in einer Konzentration von 12 µmol/l (25mere mit einem Spacerarm, der eine primäre Aminfunktion trägt, in 3'-Position) verwendet.

[0094] Nach Waschen und Hybridisieren der komplementären Sequenz wurden nach einmaligem Waschen in 1X SSC-Puffer (Standard-Natriumcitrat), entsprechend einer 1/20-Verdünnung eines 20X SSC-Puffers, der ein Gemisch aus NaCl (3 M) und Natriumcitrat (3 M) enthält, bei einer Temperatur von 47°C für 45 Minuten die folgenden Ergebnisse in Bezug auf die Anzahl der pro cm² auf drei verschiedenen Platten hybridisierten Stränge erhalten (quantitative Daten wurden durch radioaktive Markierung mit ³²P erhalten):

- Platte Nr. 1: 2,20 10¹⁰
- Platte Nr. 2: 2,26 10¹⁰
- Platte Nr. 3: 2,23 10¹⁰

[0095] Diese Ergebnisse zeigen die große Reproduzierbarkeit der erfindungsgemäßen Immobilisierungsverfahrens.

[0096] Auf einer anderen Glasplatte ergibt eine erste Hybridisierung mit einer Doppelstrang-PCR von 60 Basenpaaren eine Hybridisierung in der Größenordnung von 3,95 10⁸ Strängen/cm². Nach Denaturieren und Rehybridisieren unter identischen Bedingungen, wie bei den drei vorstehenden Platten, wurden eine Dichte von 2,6 10¹⁰ Oligonucleotidsträngen/cm² erhalten.

[0097] Die Gesamtheit dieser Ergebnisse zeigt folglich die große Reproduzierbarkeit der Platten zwischen den Chargen sowie die Möglichkeit, die Träger ohne Signalverlust wiederzuverwenden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Funktionalisierung eines festen Trägers, der an der Oberfläche Hydroxyl- oder Hydridfunktionen trägt, umfassend die folgenden Schritte:

a) Pfropfen mindestens eines bifunktionellen Moleküls mittels kovalenter Bindung, das eine geschützte Carbonsäurefunktion der folgenden Formel (I) trägt:



worin:

- A eine Gruppe darstellt, die eine kovalente Bindung des bifunktionellen Moleküls der Formel (I) an die Hydroxyl- oder Hydridfunktionen des Trägers gestattet,
- R eine Schutzgruppe der Carbonsäurefunktion darstellt,
- X eine gerade oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte C₂-C₁₈-Kohlenwasserstoffkette darstellt,

die gegebenenfalls durch ein oder mehrere Heteroatome, die aus N, O und S ausgewählt sind, unterbrochen ist;

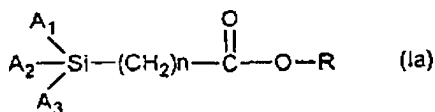
b) Entfernen der Schutzgruppen von den Carbonsäurefunktionen, von denen im Verlauf des Pfropfschrittes a) nicht die Schutzgruppe entfernt wurde; **dadurch gekennzeichnet**, dass der Schritt a) bei einer Temperatur zwischen 50 und 200°C mit einer Verbindung der Formel (I) durchgeführt wird, in der A eine monofunktionelle Gruppe ist, und dadurch, dass das Verfahren ferner einen Schritt c) der Passivierung der restlichen Hydroxyl- oder Hydridfunktionen des Trägers, die nicht mit dem oder den Molekülen der Formel (I) umgesetzt wurden, umfasst.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die festen Träger aus Kunststoffmaterialien, Metalloxiden, Siliciumoxid und seinen Derivaten und Halbleitern ausgewählt sind.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die monofunktionelle Gruppe A aus Dialkyl(dialkylamino)silan-, Dialkylhalogensilan-, Diphenyl(dialkylamino)silan-, Diphenylhalogensilan-, [(Monoalkyl), (Monophenyl), (Dialkylamino)]silan-, [(Monoalkyl), (Monophenyl), (Halogen)]silan-, Alken-, Alkylgruppen und metallorganischen Verbindungen ausgewählt ist.

4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Schutzgruppe R ein C₁-C₄-Alkylrest oder ein zyklischer Rest ist.

5. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche des festen Trägers oberflächenständige Hydroxylfunktionen besitzt und dass die Moleküle der Formel (I) aus den Organosiliciumverbindungen der folgenden Formel (Ia) ausgewählt sind:



worin:

- A₁ und A₂ gleich oder verschieden sind und einen C₁-C₄-Alkyl- oder einen Phenylrest darstellen,
- A₃ einen C₁-C₄-Alkoxy-, Dialkyl-(C₁-C₄) amino-Rest oder ein Halogenatom, wie Chlor, darstellt,
- R eine Schutzgruppe darstellt, die aus C₁-C₄-Alkylresten und zyklischen Resten ausgewählt ist,
- n eine ganze Zahl zwischen 2 und 18 ist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindungen der Formel (Ia) aus denjenigen ausgewählt sind, in denen:

- A₁ und A₂ gleich sind und einen Methylrest darstellen,
- A₃ einen Dimethylaminorest oder ein Chloratom

darstellt,
 – n = 10 ist und
 – R einen t-Butylrest darstellt.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche des festen Trägers oberflächenständige Hydridfunktionen besitzt und dass die Moleküle der Formel (I) aus Alkenen, Alkinen, Aldehyden, Peroxiden oder aus metallorganischen Verbindungen ausgewählt sind.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindungen der Formel (I) aus Methyl- oder t-Butylestern der Undecylensäure ausgewählt sind.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt a) ein Schritt der Silanisierung in organischer Phase ist, der die folgenden Schritte umfasst:

- i) Beseitigung von Verunreinigungen des festen Trägers und Hydroxylierung seiner Oberfläche,
- ii) Einbringen einer Organosiliciumverbindung der allgemeinen Formel (Ia), wie vorstehend definiert, in ein Lösungsmittel, das aus unpolaren Kohlenwasserstofflösungsmitteln, polaren Lösungsmitteln und ihren Gemischen ausgewählt ist, unter einer inerten Atmosphäre,
- iii) Silanisierung des im Schritt i) erhaltenen Trägers mittels Eintauchen in die im Schritt ii) hergestellte Lösung und
- iv) Härten des im Schritt iii) erhaltenen silanisierten Trägers nach Verdampfen des Lösungsmittels unter einer inerten Atmosphäre und bei einer Temperatur zwischen 50 und 200°C, vorzugsweise bei 140°C, für eine Dauer zwischen 2 und 72 Stunden und
- v) Waschen und Trocknen des im Schritt iv) erhaltenen modifizierten Trägers.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass der feste Träger ein Träger aus Glas oder Siliciumoxid ist und dass der Schritt a) ein Hydroxysilylierungsschritt ist, der die folgenden Schritte umfasst:

- i) Beseitigung von Verunreinigungen des festen Trägers und Hydratisierung seiner Oberfläche,
- ii) Waschen des Trägers in einem wasserfreien Alkohol, wie wasserfreiem Methanol,
- iii) In-Kontakt-bringen des Trägers mit einem Alkohol, der zuvor unter Argon desoxygeniert wurde,
- iv) Hydroxysilylierung des Trägers durch Zugabe eines Katalysators während 2 bis 24 Stunden bei einer Temperatur zwischen 90 und 200°C.

11. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt der Entfernung der Schutzgruppe b) mittels Bildung eines Silylesters durchgeführt wird, indem der Träger mit einem Silan der folgenden Formel (II) umgesetzt wird:



worin Y ein Halogenatom, wie Iod, Brom oder Chlor, darstellt.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Bildung des Silylesters
 – entweder durch Umsetzung des Trägers und eines Iodtrialkylsilans in einem wasserfreien organischen Lösungsmitteln bei Umgebungstemperatur oder unter Erhitzen bis auf eine Temperatur von etwa 60°C
 – oder durch Umsetzung des Trägers mit Chlortrimethylsilan in Gegenwart von Natriumiodid in wasserfreiem Acetonitril oder Aceton bei Umgebungstemperatur oder etwa 40°C erhalten wird.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt c) gleichzeitig mit Schritt b) durchgeführt wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt b) ein thermischer Schutzgruppenentfernungsschritt ist.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass der thermische Schutzgruppenentfernungsschritt gleichzeitig mit Schritt a) durch einfache Erhöhung der Temperatur am Ende von Schritt a) durchgeführt wird.

16. Funktionalisierter fester Träger, der gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 erhalten wird.

17. Verwendung mindestens eines funktionalisierten festen Trägers, wie im Anspruch 16 definiert, zur Immobilisierung biologischer Moleküle von Interesse, die aminierte oder hydroxylierte funktionelle Gruppen tragen, durch kovalente Bindung.

18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die biologischen Moleküle aus Nucleinsäuren, Polypeptiden, Lipiden, Kohlenhydraten und Hormonen ausgewählt sind.

19. Verfahren zur Immobilisierung biologischer Moleküle auf einem funktionalisierten festen Träger, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgenden Schritte umfasst:

- a) Herstellung eines funktionalisierten festen Trägers, der endständige Carbonsäurefunktionen in Esterform trägt, gemäß dem Verfahren, wie in einem der Ansprüche 1 bis 15 definiert,
- b) Entfernen der Schutzgruppen und Aktivierung der endständigen Carbonsäurefunktionen,
- c) In-Kontakt-bringen des im Schritt b) oder c) erhaltenen modifizierten festen Trägers mit einer oder mehreren lokal aufgetragenen Lösungen in einem oder mehreren Lösungsmitteln, dem (den) zu immobilisierenden biologischen Molekül(en), wobei die biologischen Moleküle an einem ihrer Enden eine

Aminfunktion oder eine Hydroxylfunktion oder einen durch eine primäre Aminfunktion funktionalisierten Spacerarm tragen,
 d) Verdampfen des Lösungsmittels, um die kovalente Bindung des (der) biologischen Molekül(s/e) an den Carbonsäurefunktionen zu bewirken,
 e) Inaktivierung der aktivierten Carbonsäurefunktionen, die nicht mit den biologischen Molekülen umgesetzt wurden, mithilfe eines Amins in der Gasphase oder in Lösung und
 f) Waschen des festen Trägers, an dem die biologischen Moleküle immobilisiert sind.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass das im Schritt e) verwendete Amin aus Methyamin und Dimethylamin ausgewählt ist.

21. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt e) nur in vorbestimmten Zonen eines gleichen Trägers durchgeführt wird, wobei die Zonen, die nicht inaktiviert werden sollen, zuvor geschützt werden.

22. Fester Träger, der gemäß dem Verfahren zur Immobilisierung, wie in einem der Ansprüche 19 bis 21 definiert, erhalten wird.

23. Fester Träger nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass die immobilisierten biologischen Moleküle Nucleinsäuren oder Polypeptide sind, und dadurch, dass er einen Nucleinsäurechip oder einen Polypeptidchip bildet.

24. Verwendung eines festen Trägers, wie im Anspruch 22 oder 23 definiert, zur

- Synthese auf festen Trägern,
- Trennung und Reinigung von Molekülen,
- in der Molekularbiologie, insbesondere wenn die immobilisierten biologischen Moleküle Enzyme sind, oder auch
- als biologische Fänger.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen