



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 60 2004 011 198 T2** 2008.12.24

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 606 620 B1**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/543** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **60 2004 011 198.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/SE2004/000447**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **04 723 119.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2004/086046**

(86) PCT-Anmeldetag: **24.03.2004**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **07.10.2004**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.12.2005**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **09.01.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.12.2008**

(30) Unionspriorität:

0300805	25.03.2003	SE
457508 P	25.03.2003	US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Biacore AB, Uppsala, SE

(72) Erfinder:

**KARLSSON, Robert, S-754 40 Uppsala, SE;
SJÖDIN, Anders, S-741 96 Knivsta, SE**

(74) Vertreter:

**Hammonds LLP Rechtsanwälte Patentanwälte,
80539 München**

(54) Bezeichnung: **IMMOBILISIERUNGSVERFAHREN UND KIT DAFÜR**

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**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Herstellung von Oberflächen fester Träger und im Besonderen auf ein Verfahren zum Immobilisieren von Zielmolekülen an die Oberflächen fester Träger.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Es wird eine Vielzahl analytischer Verfahren verwendet, um Interaktionen zwischen Molekülen zu charakterisieren, insbesondere im Zusammenhang von Untersuchungen, die auf die Detektion und Interaktion von Biomolekülen gerichtet sind. Zum Beispiel sind Antikörper-Antigen-Interaktionen in vielen Gebieten, einschließlich Biologie, Immunologie und Pharmakologie, von grundlegender Bedeutung. In diesem Zusammenhang umfassen viele analytische Verfahren das Binden eines Liganden, wie z. B. eines Antikörpers, an einen festen Träger, gefolgt vom In-Kontakt-Bringen des Liganden mit einem Analyten, wie z. B. einem Antigen. Nach dem In-Kontakt-Bringen des Liganden und des Analyten werden einige Eigenschaften gemessen, die die Interaktion anzeigen, wie z. B. die Fähigkeit des Liganden, den Analyten zu binden. Oft wird gewünscht, dass es nach der Messung der Interaktion möglich sein sollte, das Ligand-Analyt-Paar zu dissoziieren, um einen freien Liganden zu regenerieren, und dadurch ein Wiederverwenden der Oberfläche des Liganden für eine weitere analytische Messung zu ermöglichen.

[0003] Die Bindung, oder Immobilisierung, des Liganden an den Träger kann entweder direkt oder indirekt erfolgen. Bei der direkten Immobilisierung wird der Ligand direkt an die Oberfläche gekoppelt, typischerweise kovalent, wohingegen bei der indirekten Immobilisierung der Ligand von einem Molekül, das typischerweise kovalent direkt an die Oberfläche gekoppelt ist, eingefangen wird (üblicherweise durch nicht-kovalente Bindung). Obwohl die indirekte Immobilisierung an Liganden, die eine geeignete Bindungsstelle oder Tag für das oberflächengekoppelte Molekül aufweisen, beschränkt ist, hat sie mehrere Vorteile. Zum Beispiel ist eine nicht-kovalente Immobilisierung des Liganden einfacher zu bewirken als eine kovalente Kopplung und der Ligand muss nicht rein zu sein, sondern kann von einer unverarbeiteten Probe eingefangen werden. Ferner werden alle Liganden in einer bekannten und konsistenten Ausrichtung an der Oberfläche immobilisiert. Normalerweise ist es auch möglich, die Oberfläche des Liganden durch allgemeine Regenerierungsbedingungen zu regenerieren, so dass ein wiederholtes Einfangen an der Oberfläche ausgeführt werden kann. Beispielhafte Einfangmoleküle umfassen das Protein A und das Protein G, die beide an den Fc-Teil der Immunglobuline (Antikörper) binden, NTA-Metallchelate, die an Histidin-Tags binden, und Oligonukleotide, die an ein komplementäres Oligonukleotid-Tag hybridisieren.

[0004] Die Verwendung von Oligonukleotiden als Einfangmoleküle, die ausführlich in z. B. US-A-5,648,213 offenbart sind, hat den zusätzlichen Vorteil, dass durch Variieren der Oligonukleotidsequenzen sehr spezifische Oligonukleotidpaare einfach gebildet werden können. Die Spezifität der Einfangoligonukleotide, die an die einzelnen Oberflächenbereiche oder Stellen fester Träger gebunden sind, kann dann verwendet werden, um verschiedene Liganden an unterschiedliche Stellen zu steuern. Ein anderer Vorteil liegt darin, dass im Vergleich zu zum Beispiel einer Proteinoberfläche, die für Denaturierung empfänglich ist, ziemlich raue Bedingungen verwendet werden können, um die Oligonukleotideinfangoberfläche zu regenerieren. Ein Problem beim Immobilisieren von Oligonukleotiden an einen festen Träger ist jedoch ihre relativ große negative Ladung, die es erschwert, sie an negativ geladene Oberflächen zu immobilisieren. Herkömmliche Herangehensweisen zur Überwindung dieses Problems, umfassend die Verwendung hoher Salzkonzentrationen zum Abschirmen der Ladungen oder niedrige pH-Bedingungen schlugen fehl oder führten zu geringen Immobilisierungsgraden, wie in den nachstehenden Vergleichsbeispielen dargestellt wird.

[0005] Im Bereich der Gentechnik ist bisher die Verwendung von Polykationen als nonvirale Mittel zum Liefern von DNA an die Zellen bekannt. Die Polykationen binden effektiv an negativ geladene DNA, was in einer wesentlichen DNA-Verdichtung resultiert. Wenn der gebildete Polyelektrolytkomplex eine positive Gesamtladung aufweist, erhöht er ebenfalls die Interaktion mit einer negativ geladenen Zellmembran. Der gebildete DNA/Polyelektrolytkomplex interagiert mit der Zelloberfläche und die DNA wird dann von der Zelle aufgenommen, wahrscheinlich durch Lysosome oder Endosome.

[0006] Positiv geladene, neutrale und negativ geladene Liposome sowie positiv geladene Mizellen wurden auch für die Lieferung von Nukleinsäuren an Zellen verwendet, wobei im Falle der Mizelle auf die positive Ladung der Mizellen vertraut wird, um eine „Kreuzbewegung“ zwischen den polyanionen Nukleinsäuren und den polyanionen Oberflächen der Zellen bereitzustellen. Zum Beispiel offenbart US-A-6,210,717 die Verwendung

einer gemischten polymeren Mizelle, die ein amphiphatisches Polyester-Polykation-Copolymer und ein amphiphatisches Polyester-Zucker-Copolymer enthält, um eine ausgewählte Nukleinsäure in eine Wirtszelle zu liefern.

[0007] WO 02/082078 offenbart die Detektion oder Quantifizierung von Analyten, die an immobilisierte Einfangmoleküle gebunden sind durch Affinitätsliposome, die eingekapselte Enzymaktivatoren und an der Oberfläche angebrachte Affinitätskomponenten enthalten, die fähig sind, spezifisch an Einfanganalyte zu binden. Die Enzymaktivatoren werden durch Temperatur- oder Detergens-vermittelte Mechanismen von den Liposomen freigegeben, um Festphasen-immobilisierte inaktive Enzymmoleküle zu kontaktieren und zu aktivieren. Bei Vorhandensein von zugefügtem Substrat erzeugen die aktivierten Enzyme elektrochemisch oder optisch detektierbare Reportermoleküle, die gemessen werden.

[0008] WO 02/072873 offenbart die Herstellung einer Substratoberfläche, die eine Lipiddoppelschichtmembran trägt, durch In-Kontakt-Bringen einer Substratoberfläche mit einer wässrigen Flüssigkeit, die gemischte Detergens/Lipid-Mizellen enthält, um gemischte Detergens/Lipid-Mizellen anzuhängen. Die Substratoberfläche wird dann mit einer wässrigen Flüssigkeit in Kontakt gebracht, die im Wesentlichen frei von Detergens ist, um die Detergensmoleküle aus den angehängten gemischten Mizellen herauszulösen und die übrigen Lipidmoleküle dazu zu bringen, sich in einer Lipiddoppelschichtmembran an der Substratoberfläche anzusammeln. Ein Biomolekül, wie z. B. ein Membranprotein, kann in die Doppelschichtmembran eingeschlossen werden, indem das Biomolekül in die gemischte Mizellenherstellung eingeschlossen oder das Biomolekül vor dem Ablagern der gemischten Mizellenherstellung an der Substratoberfläche angebracht wird.

[0009] Ein Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, das Problem des Immobilisierens von Oligonukleotiden an eine negativ geladene Oberfläche zu überwinden.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0010] Die vorstehenden und anderen Ziele und Vorteile werden durch ein neuartiges Verfahren zum Immobilisieren eines Zielmoleküls an die Oberfläche eines festen Trägers bereitgestellt, bei dem das Zielmolekül zuerst mit einer vesikularen Struktur in Form eines Liposoms oder einer Mizelle komplexiert wird, woraufhin der Komplex mit dem festen Träger in Kontakt gebracht wird, um zuzulassen, dass das Zielmolekül an die Oberfläche bindet.

[0011] Die vorliegende Erfindung stellt daher ein Verfahren zum Immobilisieren eines Zielmoleküls an die Oberfläche eines festen Trägers bereit, die fähig ist, Zielmoleküle zu binden, wobei das Zielmolekül und die Oberfläche des festen Trägers elektrische Ladungen derselben Art tragen und das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

Komplexieren des Zielmoleküls mit einem Liposom oder einer Mizelle, die fähig sind, einen dissoziierbaren Komplex mit dem Zielmolekül zu bilden und eine elektrische Ladung einer Art zu tragen, die der des Zielmoleküls entgegengesetzt ist,

In-Kontakt-Bringen des gebildeten Komplexes mit der Oberfläche des festen Trägers, um dadurch das Zielmolekül an die Oberfläche zu binden und den Komplex zu dissoziieren, und

Entfernen des Liposoms oder der Mizelle von der Oberfläche des festen Trägers, um das Zielmolekül auf der Oberfläche immobilisiert zu hinterlassen.

[0012] Ist der Komplex nicht dissoziiert, wenn das Binden an die Oberfläche des festen Trägers erfolgt, kann eine Nachbehandlung oder ein Waschen erforderlich sein.

[0013] Die vorstehenden und anderen Aspekte der Erfindung werden mit Bezug auf die beiliegende Zeichnung und die nachstehende ausführliche Beschreibung deutlich.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNG

[0014] [Fig. 1](#) ist eine schematische Darstellung eines Mizelle/Oligonukleotid-Komplexes.

DEFINITIONEN

[0015] In der Beschreibung und den Ansprüchen der vorliegenden Erfindung wird die nachstehende Terminologie gemäß den nachstehend dargestellten Definitionen verwendet.

[0016] „Fester Träger“ bezieht sich auf ein beliebiges festes (biegsames oder steifes) Substrat, an das ein oder mehrere Zielverbindungen immobilisiert werden sollen. Das Substrat kann biologisch, nicht-biologisch, organisch, anorganisch oder eine Kombination davon sein, und kann in Form von Teilchen, Strängen, Ausfällungen, Gelen, Platten, Rohren, Kugeln, Behältern, Kapillaren, Pads, Scheiben, Folien, Platten, Gleitstücken etc. mit einer beliebigen herkömmlichen Form, einschließlich Scheibe, Kugel, Kreis etc. vorliegen.

[0017] „Komplex“ bezieht sich auf eine chemische Verbindung von zwei (oder mehr) Arten, die normalerweise durch schwache elektrostatische Kräfte verbunden sind. Ein Komplex ist dissoziierbar, wenn er in die zwei den Komplex bildenden Arten dissoziiert werden kann.

[0018] „Vesikuläre Struktur“ bezieht sich auf eine organisierte Struktur aus amphiphatischen (oberflächenaktiven) Molekülen mit sowohl hydrophoben als auch hydrophilen Bereichen und beinhaltet zum Beispiel Liposome, Mizellen oder inverse Mizellen. Liposome sind kugelförmige Vesikel, die von einer Doppelschicht aus Lipiden, üblicherweise Phospholipiden gebildet sind, die ein wässriges Volumen einschließen, wohingegen Mizellen und inverse Mizellen kolloidale Anhäufungen aus amphiphatischen Molekülen sind, die an (und über) einer gut-definierten Konzentration auftreten, die als die kritische Mizellenkonzentration (CMC) bekannt ist. Die typische Anzahl angehäufter Moleküle in einer Mizelle liegt bei ungefähr 50 bis 100.

[0019] „Funktionale Gruppe“ bezieht sich auf einen reaktiven chemischen Stoff. Wenn an der Oberfläche eines festen Trägers vorhanden, dient die funktionale Gruppe dazu, ein Bindemittel, wie z. B. ein Einfangmittel oder ein Ligand, an die Oberfläche zu binden. Normalerweise müssen funktionale Gruppen aktiviert werden, um ein Bindemittel zu immobilisieren. Die funktionalen Gruppen können inhärent in dem Material vorhanden sein, das als fester Träger verwendet wird, oder sie können bereitgestellt werden, indem der Träger mit einem geeigneten die funktionale Gruppe enthaltenden Material behandelt oder beschichtet wird. Eine funktionale Gruppe kann auch eingeführt werden, indem die Oberfläche des festen Trägers mit einem entsprechenden chemischen Mittel reagiert.

[0020] „Aktivierung“ bezieht sich auf eine Modifikation einer funktionalen Gruppe zu einer reaktiven Gruppe, die ein Verbinden eines Bindemittels daran ermöglicht oder verbessert.

[0021] „Ligand“ bezieht sich auf ein Molekül, das eine bekannte oder unbekannte Affinität für einen gegebenen Analyten aufweist. Der Ligand kann ein natürlich auftretendes Molekül sein oder eins, das künstlich hergestellt wurde. Der Ligand kann an sich oder in Anhäufungen mit anderen Arten verwendet werden. Optional kann der Ligand auch eine Zelle sein.

[0022] „Analyt“ bezieht sich auf ein Molekül, das ein Makromolekül, wie z. B. ein Polypeptid oder ein Polynukleotid, oder sogar ein kleines Molekül sein kann, dessen Vorhandensein, Menge und/oder Identität zu bestimmen sind, oder das in anderer Hinsicht, wie z. B. seinen Bindeeigenschaften, zu charakterisieren ist. Der Analyt wird durch einen besonderen Liganden erkannt, der ein Analyt/Ligand-Paar bildet. Optional kann der Ligand auch eine Zelle sein. Wie hierin verwendet, beinhaltet der Begriff Analyt auch Nachbildungen.

[0023] „Einfangmittel“ bezieht sich auf ein Bindemittel, das an die Oberfläche eines festen Trägers immobilisiert werden und andere Arten wie z. B. einen Liganden oder ein zweites Einfangmittel binden kann.

[0024] „Spezifisches Bindepaar“ (abgekürzt „sbp“) bezieht sich auf ein Paar aus Molekülen (jedes ist ein Element eines spezifischen Bindepaares), die natürlich abgeleitet oder künstlich hergestellt sind. Eins der Molekülpaares weist eine Struktur (wie z. B. eine Fläche oder einen Hohlraum) an seiner Oberfläche auf, die spezifisch an (und ist daher definiert als komplementär zu) eine(r) besondere(n) Struktur (wie z. B. eine räumliche und polare Organisation) des anderen Moleküls bindet, so dass das Paar die Eigenschaft aufweist, spezifisch aneinander zu binden. Beispiele für Arten spezifischer Bindepaare sind Protein-Protein, Antigen-Antikörper, Antikörper-Hapten, Biotin-Avidin, Ligand-Rezeptor (z. B. Hormon-Rezeptor, Peptid-Rezeptor, Enzym-Rezeptor), Carbohydrat-Protein, Carbohydrat-Lipid, Lektin-Carbohydrat, Nukleinsäure-Nukleinsäure (einschließlich z. B. PNA-PNA; PNA = Peptidnukleinsäure), Histidinrest(e)-Metallchelate.

[0025] „Antikörper“ bezieht sich auf ein Immunoglobulin, das natürlich oder teilweise oder vollständig künstlich hergestellt sein kann und ebenfalls aktive Fragmente umfasst, einschließlich Fab-Antigen-bindende Fragmente, univalente Fragmente und bivalente Fragmente. Der Begriff deckt ebenfalls alle Proteine ab, die einen Bindebereich aufweisen, der homolog zu einem Immunoglobulinbereich ist. Solche Proteine können von natürlichen Quellen abgeleitet oder teilweise oder vollständig künstlich hergestellt sein. Beispielhafte Antikörper sind die Immunoglobulinisotypen und die Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Fv, dAb, und Fd Fragmente.

[0026] „Nukleinsäure“ bezieht sich auf ein Deoxyribonukleotidpolymer (DNA) oder Ribonukleotidpolymer (RNA) in entweder Einzel- oder Doppelstrangform, und umfasst ebenfalls künstlich hergestellte Nachbildungen, die in ähnlicher Weise wie die natürlich vorkommenden Nukleotidsäuren wirken. Während natürliche Nukleinsäuren eine Phosphathauptkette aufweisen, können künstliche Nukleinsäuren andere Arten von Hauptketten, Nukleotiden oder Basen enthalten. Diese beinhalten zum Beispiel Peptidnukleinsäuren (PNAs) wie z. B. in US-A-5,948,902 und den darin zitierten Referenzen beschrieben; Pyranosylnukleinsäuren (p-NAs) wie z. B. in WO 99/15540 (p-RNAs), WO 99/15539 (p-RNAs), und WO 00/11011 (p-DNAs) beschrieben; gesperrte Nukleinsäuren (LNAs) wie z. B. in US-A-6,316,198 beschrieben; und Phosphothionate und andere Varianten der Phosphathauptkette natürlicher Nukleinsäuren.

[0027] „Oligonukleotid“ bezieht sich auf Einzelstrangnukleotidmultimere von etwa 5 bis ungefähr 100 Nukleotiden (einschließlich künstlich hergestellter Nachbildungen, wie vorstehend bei „Nukleinsäure“ beschrieben).

[0028] „Polynukleotid“ bezieht sich auf Einzelstrangnukleotidmultimere von ungefähr 100 Nukleotiden (einschließlich künstlich hergestellter Nachbildungen, wie vorstehend bei „Nukleinsäure“ beschrieben).

[0029] „Organische Verbindung eines niedrigen Molekulargewichts“ bezieht sich auf eine organische Verbindung eines niedrigen Molekulargewichts in dem Bereich von ungefähr 100 bis ungefähr 1000, normalerweise von ungefähr 250 bis ungefähr 800. Verbindungen eines niedrigen Molekulargewichts werden manchmal auch als kleine Moleküle bezeichnet.

[0030] „Feld“ bezieht sich im Allgemeinen auf ein lineares oder zweidimensionales Feld aus separaten Bereichen, wobei jeder einen endlichen Bereich aufweist, der an einer kontinuierlichen Oberfläche eines festen Trägers gebildet ist und einen oder mehrere Bindemittel, wie z. B. Einfangmittel oder Liganden, unterstützt. Geordnete Felder aus Nukleinsäuren, Proteinen, kleinen Molekülen, Zellen oder anderen Substanzen an einem festen Träger ermöglichen die parallele Analyse komplexer biochemischer Proben. In einem Mikrofeld beträgt die Dichte der einzelnen Bereiche oder Stellen typischerweise mindestens 100/cm² und die separaten Bereiche weisen einen Durchmesser im Bereich von ungefähr 10–1000 µm, normalerweise ungefähr 10–500 µm auf und sind von anderen Bereichen in dem Feld um ungefähr denselben Abstand getrennt.

[0031] „Biosensor“ bezieht sich normalerweise auf ein Gerät, das eine Komponente für die Molekularerkennung (zum Beispiel eine Schicht mit immobilisierten Antikörpern) in Verbindung mit einem physiochemischen Festwandler verwendet.

[0032] In der Beschreibung und den angefügten Ansprüchen schließen die Einzahlformen „ein“, „eine“ und „der“ die Pluralformen mit ein, es sei denn, es ist was anderes angegeben. Wenn nicht anders angegeben, haben die hierin verwendeten technischen und wissenschaftlichen Begriffe dieselbe Bedeutung, wie einem Fachmann aus dem mit der Erfindung verwandten Gebiet allgemein bekannt.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0033] Wie vorstehend erwähnt, bezieht sich die vorliegende Erfindung im Allgemeinen auf die Immobilisierung eines Zielmoleküls an die Oberfläche eines festen Trägers. Feste Träger mit immobilisierten Zielmolekülen werden in verschiedenen Gebieten verwendet, einschließlich Analyse- und Trennverfahren. Die Immobilisierung eines Zielmoleküls an einen festen Träger umfasst oft das Binden, wie z. B. kovalentes Binden, des Moleküls an die Oberfläche des festen Trägers. Normalerweise weist der feste Träger eine reaktive chemische Gruppe auf, die mit dem Zielmolekül reagieren kann. Manchmal trägt das Zielmolekül eine elektrische Ladung und wenn die Oberfläche des festen Trägers eine entgegengesetzte Ladung trägt, wird das Zielmolekül an die Oberfläche des festen Trägers angezogen, was die molekulare Interaktion mit der Oberfläche erleichtert. Andererseits wird, wenn die Oberfläche des festen Trägers dieselbe Art Ladung trägt wie das Zielmolekül, deutlich, dass die Immobilisierung verringert oder sogar wesentlich verhindert werden kann. Ein Beispiel für den letzteren Fall ist die Immobilisierung von Oligonukleotiden (die im Allgemeinen eine negative Ladung tragen) an negativ geladene Oberflächen.

[0034] Gemäß der vorliegenden Erfindung wurde jetzt herausgefunden, dass ein geladenes Zielmolekül, insbesondere ein Makromolekül, wie z. B. ein Oligonukleotid, effizient an die Oberfläche eines festen Trägers immobilisiert werden kann, selbst dann, wenn die Oberfläche dieselbe Ladung trägt wie das Zielmolekül, wenn das Zielmolekül zuerst mit einer vesikulären Struktur komplexiert wird, die eine Ladung trägt, die der des Zielmoleküls entgegengesetzt ist, und der Komplex wird anschließend mit der Oberfläche des festen Trägers in Kontakt gebracht.

[0035] Ohne auf eine spezielle Theorie begrenzt zu sein, wird angenommen, dass die verbesserte Immobilisierungseffizienz auf dem Zielmolekül/vesikuläre Struktur-Komplex beruht, welcher dem Zielmolekül erlaubt, nah genug an die Oberfläche zu gelangen, um mit ihr zu interagieren. Das wiederum beruht vermutlich einerseits auf z. B. der positiv geladenen vesikulären Struktur, die die entgegengesetzte z. B. negative Ladung des Zielmoleküls mindestens teilweise neutralisiert, und andererseits z. B. im Falle eines Makromoleküls wie einem Oligonukleotid, auf dem Kompaktieren des Makromoleküls durch die vesikuläre Struktur. Das Kompaktieren kann auch in einer schnelleren Diffusion des Moleküls an die Oberfläche resultieren, im Vergleich zu der Diffusion des freien Moleküls. Im Hinblick auf die angenommene bevorzugte Kompaktierung eines Zielmoleküls kann die Bildung des Zielmolekül/vesikuläre Struktur-Komplexes auch die Immobilisierung davon an die neutrale Oberfläche eines festen Trägers verbessern. Das Verringern von Repulsionskräften zwischen den zu immobilisierenden Molekülen kann auch zu höheren Immobilisierungsdichten führen.

[0036] Das vorliegende Erfindungskonzept ist allgemein auf ein beliebiges Zielmolekül anwendbar, das einen dissoziierbaren Komplex mit einer geladenen oder ungeladenen vesikulären Struktur bilden kann. Das Zielmolekül ist jedoch vorzugsweise ein Biomolekül (einschließlich künstlich hergestellter Biomoleküle und Nachbildungen davon), wie z. B. Nukleinsäuren (einschließlich z. B. Plasmide), Proteine, Polypeptide, Lipide und Carbohydrate. Weitere spezifische Beispiele für Biomoleküle sind Oligonukleotide, Polynukleotide, Antikörper und Enzyme. Das Zielmolekül kann auch eine organische Verbindung eines niedrigen Molekulargewichts sein.

[0037] Die vesikuläre Struktur ist ein Liposom oder eine Mizelle, speziell eine Mizelle. Liposome oder Mizellen können gemischte Liposome oder gemischte Mizellen sein, d. h. zwei (oder mehr) Liposome- bzw. Mizellen-bildende Komponenten enthalten. **[0038]** In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird eine Nukleinsäure, insbesondere ein Nukleotid, unter Verwendung einer positiv geladenen Mizelle oder eines Liposoms an eine negativ geladene Oberfläche eines festen Trägers immobilisiert. Eine schematische Darstellung eines Komplexes zwischen einem Oligonukleotid (20-mer) und einer positiv geladenen Mizelle (CTAB) ist in [Fig. 1](#) dargestellt.

[0038] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird ein Protein, insbesondere ein Antikörper, der eine negative Ladung trägt, unter Verwendung einer positiv geladenen Mizelle oder eines Liposoms an eine negativ geladene Oberfläche eines festen Trägers immobilisiert.

[0039] In noch einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird eine organische Verbindung eines niedrigen Molekulargewichts, wie z. B. Adenosintriphosphat (ATP) oder Nitrilotriacetic Säure (NTA), die eine negative Ladung trägt, mithilfe einer positiv geladenen Mizelle oder eines positiv geladenen Liposoms an eine negativ geladene Oberfläche eines festen Trägers immobilisiert.

[0040] In noch einer anderen Ausführungsform wird ein positiv geladenes Zielmolekül unter Verwendung einer negativ geladenen Mizelle oder eines negativ geladenen Liposoms an eine positiv geladene Oberfläche eines festen Trägers immobilisiert. **[0042]** Die relativen Mengen der Zielmoleküle und zu verwendenden Mizellen oder Liposome hängt unter anderem von dem speziellen Zielmolekül und den Mizellen bzw. Liposomen ab, aber geeignete Verhältnisse können von einem Fachmann leicht ermittelt werden. Im Allgemeinen können Verhältnisse von Zielmolekül zu Mizelle bzw. Liposom (Anzahl der Zielmoleküle zu Anzahl der Mizellen) von ungefähr 1:3 bis ungefähr 3:1, vorzugsweise von ungefähr 1:2 bis ungefähr 2:1, speziell ungefähr 1:1 verwendet werden.

[0041] Die Herstellung der Mizellen und Liposome ist Fachleuten gut bekannt und muss hier nicht ausführlich beschrieben werden. Für allgemeine Beschreibungen der Verfahren dafür kann zum Beispiel Bezug genommen werden auf Szoka, F., Jr., und Papahadjopoulos, D., Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 9, 457 (1980); und Schwendener, R. A., Ansanger, M., und Weder, H. G., Biochem. Biophys. Res. Commun., 100, 1055 (1981).

[0042] Beispiele für amphipathische Moleküle oder oberflächenaktive Stoffe, aus denen positiv geladene Mizellen hergestellt werden können, umfassen Dodecyltrimethylammoniumbromid (DTAB), Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) (anderer Name: Hexadecyltrimethylammoniumbromid), Benzyltrimethylhexadecylammoniumchlorid, Dimethyldioctadecylammoniumbromid, Dodecylethyltrimethylammoniumbromid, Ethylhexadecyltrimethylammoniumbromid, Trimethyl(tetradecyl)ammoniumbromid und Thonzoniumbromid.

[0043] Negativ geladene Mizellen können zum Beispiel aus Natriumdodecylsulfat (SDS) hergestellt werden.

[0044] Beispiele für Moleküle, aus denen positiv oder negativ geladene Liposome hergestellt werden können, beinhalten Hexadecyltrimethylammoniumpropan-1-sulfonat.

[0045] Normalerweise wird bevorzugt, dass lediglich ein Teil der elektrischen Ladung der Mizelle oder des Liposoms durch das Zielmolekül neutralisiert wird, so dass nach der Bildung des Komplexes eine Restladung übrig bleibt, um dem Komplex zu erlauben, mit einer entgegengesetzt geladenen Oberfläche eines festen Trägers elektrostatisch zu interagieren.

[0046] Der Komplex zwischen dem Zielmolekül und der vesikularen Struktur wird normalerweise spontan gebildet. Wenn der Komplex anschließend mit dem festen Träger in Kontakt gebracht wird, interagiert das Zielmolekül mit der reaktiven funktionalen Gruppe oder einer anderen Bindungshälfte an der Oberfläche, so dass das Zielmolekül daran immobilisiert wird. Das kann eine gleichzeitige Dissoziation des Komplexes bewirken. Normalerweise wird jedoch eine Behandlung oder eine Waschung mit einer geeigneten Lösung erforderlich sein, um den Komplex zu dissoziieren und die vesikuläre Struktur oder die Reste davon von der Oberfläche zu entfernen. Die dafür notwendigen Lösungen/Bedingungen sind Fachleuten entweder gut bekannt oder können von ihnen leicht ermittelt werden.

[0047] Der feste Träger ist vorzugsweise eine steife Struktur und kann ein Substrat mit einer Oberflächenschicht aus einem anderen Material umfassen. Während der feste Träger ein Teilchen sein kann, ist es normalerweise eine Oberfläche einer größeren Einheit, wie z. B. eine Innenfläche eines Brunnens oder Behälters oder einer Platte oder eines Gleitstücks. Beispielhaft für die letztere Art sind feste Träger, die für Protein- oder DNA/RNA-Chips verwendet werden, sowie Mesostrukturen in Sensorgeräten, wie z. B. Biosensoren.

[0048] Die Oberfläche des festen Trägers kann aus einer Vielzahl Materialien bestehen, zum Beispiel Polymeren, Kunststoffen, Harzen, Polysacchariden, Silika oder silikatischen Materialien, Kohlenstoff, Metallen, anorganischen Gläsern, Membranen etc. Eine geeignete Oberfläche ist ein Metallfilm, z. B. Gold, Silber oder Aluminium, vorzugsweise Gold.

[0049] Um die Immobilisierung von Zielmolekülen zu erlauben, umfasst die Oberfläche des festen Trägers Gruppen oder Moleküle, die fähig sind, mit dem Zielmolekül zu interagieren. Solche Gruppen können funktionale Gruppen sein, z. B. Hydroxy, Carboxy, Amino, Formyl, Hydrazid, Carbonyl, Epoxy oder Vinyl, die eine kovalente Bindung mit einer funktionalen Gruppe an dem Zielmolekül bilden können. Normalerweise wird (werden) die funktionale(n) Gruppe(n) vor der Reaktion mit dem Zielmolekül an der Oberfläche oder an dem Zielmolekül zu einer reaktiveren Gruppe(n) aktiviert. Zum Beispiel kann ein Aminonukleotid an eine oberflächen-gebundene Carboxygruppe gekoppelt werden, die zu einer N-Hydroxysuccinimidestergruppe aktiviert ist. Es ist zu beachten, dass eine Oberfläche mit einer aktivierten funktionalen Gruppe, die z. B. vor der Aktivierung negativ, aber nach der Aktivierung neutral geladen ist, während des Immobilisierungsvorgangs aufgrund der Ausführung einer Hydrolyse der aktivierten Gruppe eine negative Ladung entwickeln kann.

[0050] Alternativ trägt die Oberfläche des festen Trägers ein Element eines spezifischen Bindepaares (sbp) und das andere Element des spezifischen Bindepaares befindet sich an dem Zielmolekül. Ein allgemein verwendetes sbp zum Immobilisieren von Oligonukleotiden ist Biotin-Avidin (oder Streptavidin).

[0051] Besonders im Zusammenhang mit Biosensoren kann die Oberfläche des festen Trägers ein Teil einer Fließzelle sein, und erlauben, dass die Verfahren der Erfindung vor Ort in der Fließzelle durchgeführt werden. Beispiele für Fließzellen, die auf dem Gebiet der Biosensoren verwendet werden, sind z. B. in US-A-5,492,840, 5,513,264 und WO 99/36766 beschrieben.

[0052] Wie vorstehend erwähnt, kann das Zielmolekül zum Beispiel ein Analyt-bindender Ligand sein oder ein Einfangmittel, das fähig ist, einen Liganden zu binden. Alternativ kann das Einfangmittel ein Bindemittel binden, das wiederum einen Liganden binden kann. Ein einzelnes Einfangmittel kann verwendet werden, um einen einzelnen Liganden an die Oberfläche zu binden, oder verschiedene Liganden an unterschiedliche einzelne Bereiche der Oberfläche zu binden, um ein Ligandenfeld bereitzustellen. Alternativ kann ein Ligandenfeld gebildet werden, indem unterschiedliche Liganden selektiv an spezifische Einfangelemente gebunden werden, die an den entsprechenden einzelnen Oberflächenbereichen bereitgestellt sind. Das Binden eines Liganden an die Oberfläche eines festen Trägers, wie z. B. eine Sensoroberfläche, wird oft als „Sensibilisieren“ der Oberfläche bezeichnet.

[0053] Beispiele für Liganden umfassen, ohne Begrenzung darauf, Agonisten und Antagonisten für Zellmembranen, Toxine und Venome, virale Epitope, Antigen determinanten, Hormone und Hormonrezeptoren, Steroide, Peptide, Enzyme, Substrate, Kofaktoren, Arzneistoffe, Lektine, Zucker, Oligonukleotide, Oligosaccharide, Proteine, Glykoproteine, Zellen, Zellmembranen, Organellen, Zellrezeptoren, Vitamine, virale Epitope und Immunglobuline, z. B. monoklonale und polyklonale Antikörper.

[0054] Beispielhafte Einfangmittel beinhalten Nukleinsäuren und Antikörper, speziell Oligonukleotide. Eine Oberfläche mit einem Einfangmittel in Form eines Oligonukleotids kann zum Beispiel verwendet werden, um einen Liganden zu binden, der mit einem komplementären Oligonukleotid-Tag gepaart ist. Auf diese Weise können verschiedene Liganden leicht an verschiedene einzelne Bereiche der Oberfläche immobilisiert werden. Wie vorstehend erwähnt, ist es ebenfalls möglich, verschiedene Oligonukleotide an unterschiedliche einzelne Bereiche zu immobilisieren, um z. B. verschiedenartig Oligonukleotid-getaggte Liganden daran einzufangen. Das wird verschiedenen Ligandenpaaren erlauben, unterschiedliche Bereiche anzusteuern, aber die Einfangoberfläche kann weiterhin durch allgemeine Regenerierungsbedingungen regeneriert werden.

[0055] Normalerweise weisen die Oligonukleotide eine Länge von mindestens sechs Basen auf. Es wird ferner bevorzugt, dass die Oligonukleotidpaare über mindestens einen Abschnitt ihrer jeweiligen Sequenzen vollständig komplementär sind. Vollständig komplementäre Sequenzen werden jedoch bevorzugt.

[0056] Hierfür sind bifunktionale Mittel, die verwendet werden können, um Ligand/Oligonukleotid-Paare herzustellen, wie z. B. Antikörper/Oligonukleotid-Paare, Fachleuten gut bekannt und können von ihnen leicht ausgewählt werden. Für Beispiele solcher heterobifunktionalen Mittel kann zum Beispiel auf das vorstehend erwähnte US-A-5,648,213 Bezug genommen werden.

[0057] Beispiele für Analyte, die als Probe genommen werden können, umfassen, ohne Begrenzung darauf, Agonisten und Antagonisten für Zellmembranrezeptoren, Toxine und Venome, virale Epitope, Hormone (z. B. Opiate, Steroide etc.), Hormonrezeptoren, Peptide, Enzyme, Enzymsubstrate, Kofaktoren, Arzneistoffe, Lektine, Zucker, Oligonukleotide, Oligosaccharide, Proteine und monoklonale Antikörper. Die Untersuchung eines Analyten ist nicht auf die qualitative oder quantitative Bestimmung des Analyten begrenzt, sondern beinhaltet zum Beispiel auch das Untersuchen seiner Interaktion mit einem Liganden für die weitere Charakterisierung des Analyten, wie dem Bestimmen der Bindeeigenschaften, z. B. die Affinität und kinetische Konstanten.

[0058] Verfahren zum Detektieren des Vorhandenseins von gebundenem(n) Analyt(en) an der Oberfläche können aus einer großen Vielzahl von Detektionsverfahren ausgewählt werden, einschließlich sowohl photometrischer und nicht-photometrischer Detektionsverfahren, zum Beispiel Markierungs-basierter Verfahren, bei denen der (die) Analyt(e) oder ein analytspezifisches Reagens, z. B. mit einem Radiolabel, einem Chromophor, einem Fluorophor, einer Chemilumineszenzhälfte oder einem Übergangsmetall markiert ist (sind), sowie labelfreien Verfahren.

[0059] Bei vielen Anwendungen werden die Untersuchungen mit einem Biosensor durchgeführt. Biosensoren können auf einer Vielzahl von Detektionsverfahren basieren. Typischerweise beinhalten solche Verfahren, sind aber nicht begrenzt auf, Massendetektionsverfahren, wie z. B. piezoelektrische, optische, thermooptische und Oberflächenwellengerät(SAW)-Verfahren und elektrochemische Verfahren, wie z. B. potentiometrische, konduktometrische, amperometrische und kapazitive Verfahren. Im Hinblick auf optische Detektionsverfahren beinhalten repräsentative Verfahren jene, welche die Oberflächenmassenkonzentration detektieren, wie z. B. Reflexionsoptikverfahren, einschließlich sowohl Innen- als auch Außenreflexionsverfahren, die winkel-, wellenlängen- oder phasenaufgelöst sind, zum Beispiel Ellipsometrie und Evaneszenzwellenspektroskopie (EWS), wobei die letztere Oberflächenplasmonresonanz (SPR) Spektroskopie, Brewsterwinkelrefraktometrie, Grenzwinkelrefraktometrie, verhinderte Totalreflexion (FTR), Evaneszenzwellenellipsometrie, gestreute Totalinnenreflexion (STIR), optische Wellenleitersensoren, evaneszenzwellenbasierte Bildgebung beinhaltet, wie z. B. grenzwinkelaufgelöste Bildgebung, brewsterwinkelaufgelöste Bildgebung, SPR-winkelaufgelöste Bildgebung und Ähnliches umfasst. Ferner können photometrische Verfahren, die zum Beispiel auf Evaneszenzfluoreszenz (TIRF) und Phosphoreszenz basieren, ebenfalls verwendet werden sowie Wellenleiterinterferometer. Auch Atomkraftmikroskopie(AFR)-basierte Detektionsverfahren sind zu erwähnen.

[0060] In den nachstehenden Beispielen wurde ein Biosensorinstrument verwendet, das auf Oberflächenplasmonresonanz(SPR)-Detektion an einer Goldoberfläche basiert, und durch Massenmessen an der Oberfläche eine Echtzeitbindeinteraktionsanalyse zwischen einem oberflächengebundenen Liganden und einem interessierenden Analyten ermöglicht. Eine ausführliche Erläuterung der technischen Aspekte dieser Art Biosensor sowie des Phänomens der SPR ist in dem vorstehend erwähnten US-A-5,313,264 zu finden. Ausführlichere Informationen über Felddbeschichtungen für Biosensoroberflächen sind zum Beispiel in US-A-5,242,828 und US-A-5,436,161 zu finden. Darüber hinaus ist eine ausführliche Erläuterung der technischen Aspekte der in dem Biosensorinstrument verwendeten Biosensorchips, in dem vorstehend erwähnten US-A-5,492,840 zu finden.

[0061] In den nachstehenden Beispielen werden verschiedene Aspekte der vorliegenden Erfindung speziell

zum Zweck der Darstellung und nicht zur Begrenzung dargestellt.

BEISPIELE

[0062] Es wurde ein BIACORE® 3000-Instrument (Biacore AB, Uppsala, Schweden) verwendet. Bei diesem Instrument übermittelt ein Mikrofluidsystem Proben und Laufpuffer mit sehr hoher Präzision und geringem erforderlichen Probenvolumen durch vier einzeln detektierte Fließzellen (eine nach der anderen oder reihenweise). Als Sensorchip wurde der Sensorchip CM5 (Biacore AB, Uppsala, Schweden) verwendet, der eine Goldoberfläche mit einem kovalent verbundenen Carboxymethyl-modifizierten Dextranpolymerhydrogel aufweist. Der Laufpuffer war HBS-N (10 mM HEPES pH 7,4 und 150 mM NaCl) (Biacore AB, Uppsala, Schweden). Aufgrund der Carboxylgruppen hat das Hydrogel einen anionischen Charakter. Die Ausgabe aus dem Instrument ist ein Sensorgramm, das eine Abbildung der Detektorantwort (gemessen in Resonanzeinheit RU) als eine Funktion der Zeit darstellt. Ein Anstieg von 1000 RU entspricht einem Anstieg der Masse an der Sensoroberfläche von ungefähr 1 ng/mm².

[0063] Die folgenden zwei (komplementären) Oligonukleotide wurden verwendet (an dem 5'-Ende mit einer Aminogruppe chemisch modifiziert):

5' TTT CCT CAG CAT CTT ATC CG3', als "BC1" bezeichnet

5' CGG ATA AGA TGC TGA GGA AA3', als "BC2" bezeichnet

[0064] Die Nukleotidsequenz BC1 ist in Persson, B., et al. (1997) Anal. Biochem. 246,34,44 offenbart.

Vergleichsbeispiel 1

Immobilisierung von aminomodifiziertem Oligonukleotid BC1 bei hohen Salzkonzentrationen

[0065] Der Sensorchip CM5 wurde aktiviert durch 0,2M N-Ethyl-N-Dimethylamino-Propylcarbodiimid (EDC) und 50 mM N-Hydroxysuccinimid (NHS) für 7 oder 20 Minuten bei einem Fluss von 5 µl/min (EDC und NHS waren von Biacore AB, Uppsala, Schweden), und konvertierte einen Teil der Carboxylgruppen an dem Dextran zu reaktiven N-Hydroxysuccinimidestergruppen. Anschließend wurden 100 µM aminomodifiziertes Oligonukleotid BC1 (SGS DNA, Köping, Schweden oder DNA-Technologie, Ålborg, Dänemark) in Borat 8,5 Immobilisierungspuffer (Biacore AB, Uppsala, Schweden) für 13 Minuten in 5 µl/min injiziert, um es an die Oberfläche zu immobilisieren. Unreagierte N-Hydroxysuccinimidestergruppen wurden deaktiviert, indem Ethanolamin für 3 Minuten bei 5 µl/min injiziert wurde (Ersetzen der aktivierten Gruppe durch Hydroxyethylamid). Der Immobilisierungsvorgang wurde bei hohen NaCl-Konzentrationen durchgeführt, die von 1 bis 3 variierten, um die negative Ladung des Oligonukleotids abzuschirmen, und bei ziemlich hohen pH-Werten zwischen 7,0 und 8,5, um ein schnelles Binden an die Oberfläche zu erhalten.

[0066] Im Anschluss an jede Immobilisierung wurde die Oberfläche mit drei Impulsen von 50 mM NaOH, 1 M NaCl für 1 min (Fluss 5 µl/min) gewaschen, um das locker gebundene Oligonukleotid zu entfernen. Das komplementäre aminomodifizierte Oligonukleotid BC2 sowie ein nicht-komplementäres Oligonukleotid (BC1) durften dann für 3 Minuten bei einem Fluss von 5 µl/min mit HBS-EP-Puffer (Biacore AB, Uppsala, Schweden) an das immobilisierte Aminonukleotid BC1 hybridisieren. Die Oligonukleotidkonzentrationen variierten zwischen 1 und 10 µM. Die Regeneration der Oberfläche zwischen den Hybridisierungen wurde mit 50 mM NaOH, 1 M NaCl für 1 Minute durchgeführt.

[0067] Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

pH	NaCl-Konz. (M)	NHS/EDC-Aktivierungszeit (min)	Immobilisierung (RU)	Hybridisierung von komplementärem Oligo (RU)	Hybridisierung von nicht-komplementärem Oligo (RU)
7,0	1	7	-26	9,7	4,8
7,0	3	7	-5,4	1,9	7,5
8,5	1	7	16,5	8,6	6,9
8,5	3	7	40,8	10,1	6,8
7,0	1	20	74,2	11,6	10,1
7,0	3	20	-28,9	3,2	8,4
8,5	1	20	-7,8	3,7	7,3
8,5	3	20	15,0	4,4	-

[0068] Wie aus der Tabelle ersichtlich wird, war die hohe Salzkonzentration nicht effektiv, um die Immobilisierung von dem Aminooligonukleotid an die Oberfläche zu erhöhen.

[0069] Die Immobilisierung wurde auch nicht durch Verändern des pH-Wertes oder Erhöhen der NHS/EDC-Aktivierungszeit beeinflusst.

Vergleichsbeispiel 2

Immobilisierung von aminomodifiziertem Oligonukleotid BC1 bei Vorhandensein von Tetramethylammoniumchlorid

[0070] Demselben Immobilisierungsprotokoll wie in Beispiel 1 folgend, wurde das Oligonukleotid BC1 an die Oberfläche eines CM5 Chips immobilisiert, mit der Ausnahme, dass HBS-EP (Biacore AB, Uppsala, Schweden) als Immobilisierungspuffer verwendet wurde, und 1M, 0,75M, 0,5M oder 0,25M Tetramethylammoniumchlorid (TMA-Cl) anstelle von NaCl verwendet wurde, um die negativen Ladungen des Oligonukleotids abzusichern. Nach dem Waschen mit 50 mM NaOH, 1M NaCl wurden Hybridisierungen mit komplementären und nicht-komplementären Oligonukleotiden wie in Beispiel 1 durchgeführt. Die Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

TMA-Cl-Konz. (M)	Immobilisierung (RU)	Hybridisierung von komplementärem Oligo (RU)	Hybridisierung von nicht-komplementärem Oligo (RU)
0,25	-0,9	6,7	4,5
0,50	-4,1	3,8	4,9
0,75	-1,7	3,5	4,8
1,00	3,5	3,3	4,3

[0071] Wie aus der Tabelle ersichtlich wird, hatte TMA-Cl keine Auswirkung auf die Immobilisierung des Oligonukleotids an die Oberfläche.

Beispiel 3

Immobilisierung von aminomodifiziertem Oligonukleotid BC1 durch Komplexieren mit Cetyltrimethylammoniumbromidmizellen

[0072] Der Sensorchip CM5 wurde aktiviert, wie oben im Beispiel 1 beschrieben.

[0073] Anschließend wurden 10–50 µM aminmodifiziertes Oligonukleotid BC1 (SGS DNA, Köping, Schweden oder DNA-Technologie, Ålborg, Dänemark) in 10 mM Hepes pH 7,4 (Biacore AB, Uppsala, Schweden) bei variierenden Konzentrationen an Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) für 10 min bei 5 µl/min injiziert, um es an die Oberfläche zu immobilisieren. Unreagierte N-Hydroxysuccinimidestergruppen wurden deaktiviert, indem Ethanolamin für 3 Minuten bei 5 µl/min injiziert wurde. Nach dem Waschen mit 50 mM NaOH, 1M NaCl wurden Hybridisierungen mit komplementären und nicht-komplementären Oligonukleotiden durchgeführt, wie in Beispiel 1 beschrieben. Die Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3

CTAB-Konz. (mM)	Amino-Oligo-Konz. (µM)	Immobilisierung (RU)	Verlust beim Waschen (RU)	Hybridisierung von komplementärem Oligo (RU)	Hybridisierung von nicht-komplementärem Oligo
0,40	10	3170	–690	2181	–0,6
0,60	10	3440	–649	2701	2,0
0,80	10	3322	–612	2390	1,8
1,00	10	2763	–527	1877	0,8
0,75	25	3075	–423	1569	–1,3
1,50	25	3175	–474	2375	2,1
2,25	25	3170	–500	2317	2,3
3,00	25	3046	–511	2258	2,2
2,25	50	3121	–511	2388	–1,5
3,00	50	3147	–471	2349	1,4
3,75	50	3103	–442	2312	2,5
4,50	50	2863	–446	2242	2,8

[0074] Wie aus der Tabelle ersichtlich wird, wurden hohe Immobilisierungs- und Hybridisierungsniveaus erreicht. Die am besten geeignete CTAB-Konzentration weicht deutlich von der Konzentration des Oligonukleotids BC1 ab. Die kritische Mizellenkonzentration (CMC) für CTAB in dem verwendeten Immobilisierungspuffer liegt wahrscheinlich bei ungefähr 0,29 mM. Da eine Durchschnittsmizelle von CTAB 61 Moleküle enthält, zeigt die Tabelle ein optimales Mizellen:Oligo-Verhältnis von ungefähr 1:1 an (0,60 mM CTAB/10 µM BC1; 1,50 mM CTAB/25 µM BC1; bzw. 3,00 mM CTAB/50 µM BC1).

Beispiel 4

Immobilisierung von aminomodifiziertem Oligonukleotid BC1 durch Komplexieren mit Dodecyltrimethylammoniumbromidmizellen

[0075] Es wurde dem in Beispiel 3 beschriebenen Vorgang gefolgt, mit der Ausnahme, dass Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) durch Dodecyltrimethylammoniumbromid (DTAB) ersetzt wurde. Es wurde keine Hybridisierung mit nicht-komplementärem Oligonukleotid durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4

DTAB-Konz. (mM)	Amino-Oligo-Konz. (µM)	Immobilisierung (RU)	Verlust beim Waschen (RU)	Hybridisierung von komplementärem Oligo (RU)
0	10	10,5	–116,6	15
5	10	3054,5	–625,8	1970,7
10	10	3372,7	–680,4	2054,1
15	10	3519,7	–625,4	2276,5

Patentansprüche

1. Verfahren zum Immobilisieren eines Zielmoleküls an einer Oberfläche eines festen Trägers, die zum Binden des Zielmoleküls fähig ist, wobei das Zielmolekül und die Oberfläche des festen Trägers elektrische Ladungen derselben Art tragen, wobei das Verfahren die Schritte umfasst:
Komplexieren des Zielmoleküls mit einem Liposom oder einer Mizelle, die fähig sind, einen dissoziierbaren Komplex mit dem Zielmolekül zu bilden und eine elektrische Ladung einer Art zu tragen, die zu jener des Zielmoleküls entgegengesetzt ist,
In-Kontakt-Bringen des gebildeten Komplexes mit der Oberfläche des festen Trägers, um dadurch das Zielmolekül an die Oberfläche zu binden, Dissoziieren des Komplexes, und
Entfernen des Liposoms oder der Mizelle von der Oberfläche des festen Trägers, um das Zielmolekül auf der Oberfläche immobilisiert zu hinterlassen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Zielmolekül mit einer Mizelle komplexiert wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Zielmolekül und die Oberfläche des festen Trägers jeweils eine negative Ladung tragen.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Zielmolekül ein Ligand ist, der fähig ist, einen Analyten zu binden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Zielmolekül ein Einfangmittel ist, das fähig ist, einen Liganden oder ein Liganden-bindendes Mittel zu binden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Zielmolekül eine Nukleinsäure oder ein Antikörper ist, bevorzugt ein Oligonukleotid.
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei das Zielmolekül eine künstliche Nukleinsäure ist, bevorzugt ein künstliches Oligonukleotid.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Zielmolekül eine organische Verbindung eines niedrigen Molekulargewichts ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Oberfläche des festen Trägers eine reaktive Gruppe umfasst, die fähig ist, mit einer funktionellen Gruppe des Zielmoleküls zu reagieren, um eine kovalente Bindung zu bilden.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Oberfläche des festen Trägers ein Element eines spezifischen Bindungspaares umfasst, und das andere Element des Bindungspaares an das Zielmolekül konjugiert ist oder ein Teil davon ist.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das an die Oberfläche gebundene Element Avidin oder Streptavidin ist, und das Zielmolekül mit einem Biotin-Tag versehen ist.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die Oberfläche des festen Trägers ein Hydrogel umfasst, bevorzugt ein Hydrogel basierend auf Dextran.
13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei das Dextran Carboxymethyl-Gruppen umfasst.
14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Carboxymethyl-Gruppen aktiviert werden zu reaktiven Gruppen.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei das Verhältnis des Zielmoleküls zur Mizelle oder zum Liposom ungefähr 1:1 beträgt.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei die Mizelle Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) umfasst.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei das Verfahren in einer Fließzelle ausgeführt wird.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei der feste Träger eine Sensoroberfläche ist.

19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei die Sensoroberfläche eine Detektion von Ereignissen an der Oberfläche ermöglicht durch Massendetektion, bevorzugt basierend auf einer evaneszenten Welle, z. B. SPR.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, wobei der feste Träger ein chromatographisches Teilchen ist.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 20, wobei das Zielmolekül ein Einfangmittel ist, das zum Binden eines Liganden fähig ist, und das Verfahren umfasst den zusätzlichen Schritt des In-Kontakt-Bringens der Oberfläche mit dem Liganden, um den Liganden an das immobilisierte Einfangmittel zu binden.

22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei das Einfangmittel ein Oligonukleotid ist, und der Ligand konjugiert wird an ein Oligonukleotid, das zum Einfang-Oligonukleotid komplementär ist.

23. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22, wobei verschiedene getrennte Gebiete der Oberfläche des festen Trägers, die ein allgemeines Einfangmittel trägt, selektiv in Kontakt gebracht werden mit verschiedenen Liganden, um eine Oberfläche eines festen Trägers mit einem Feld verschiedener Liganden bereitzustellen.

24. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22, wobei verschiedene getrennte Gebiete der Oberfläche des festen Trägers, die jeweils ein unterschiedliches Einfangmittel tragen, in Kontakt gebracht werden mit verschiedenen Liganden, um eine Oberfläche eines festen Trägers bereitzustellen mit einem Feld verschiedener Liganden.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

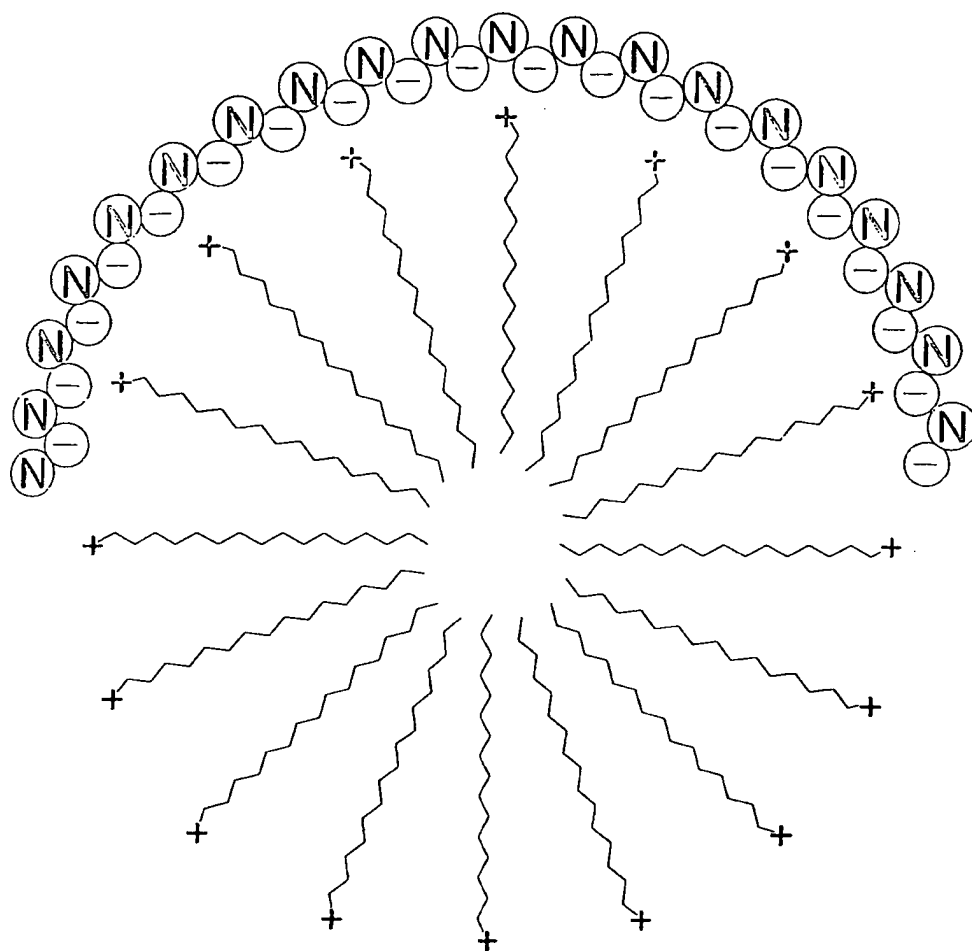


FIG. 1