



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 29 561 T2** 2007.07.19

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 144 677 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 29 561.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP00/00554**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 909 103.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/043539**

(86) PCT-Anmeldetag: **25.01.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **27.07.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.10.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **26.07.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.07.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/68** (2006.01)

B01J 19/00 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

99101340 **25.01.1999** **EP**

99104278 **03.03.1999** **EP**

(73) Patentinhaber:

Micronas Holding GmbH, 79108 Freiburg, DE

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**KLAPPROTH, Holger, D-79108 Freiburg, DE;
PRUCKER, Oswald, D-55126 Mainz, DE; RÜHE,
Jürgen, D-55128 Mainz, DE**

(54) Bezeichnung: **IMMOBILISIERUNG VON MOLEKÜLEN AUF OBERFLÄCHEN ÜBER POLYMERBÜRSTEN**

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] Aufgrund der stetig wachsenden Bedeutung von Mikrotechniken in einer großen Vielzahl von wissenschaftlichen Anwendungen bleibt die Entwicklung von Systemen, welche die Wechselwirkung von Molekülen mit Oberflächen ermöglichen, ein entscheidendes Thema. Derartige Wechselwirkungen schließen die Möglichkeit des Entfernens von spezifischen Molekülen aus einer Probe, z. B. um ihre Analyse/ihren Nachweis zu erleichtern, ein, jedoch auch die Möglichkeit des Präsentierens von Molekülen auf einer Oberfläche, um auf diese Weise zu ermöglichen, dass anschließende Umsetzungen stattfinden können. Diese Prinzipien zur Immobilisierung von Molekülen können in Sensor- oder chromatographischen Systemen oder zur Bereitstellung von modifizierten Oberflächen im Allgemeinen angewendet werden.

[0002] In den letzten Jahren hat es viele Ansätze gegeben, um Sensorchips herzustellen, die auf selbstorganisierenden Monoschichten (SAMs) oder bifunktionellen Molekülen basieren, welche direkt oder indirekt Probenmoleküle an der Sensoroberfläche koppeln. Typischerweise tragen diese bifunktionellen Moleküle eine Silan- oder Thiol-/Disulfideinheit, um eine Bindung mit der anorganischen Oberfläche zu erreichen, und eine zusätzliche funktionelle Gruppe (z. B. Amino- oder Epoxidgruppen), welche mit den Probenmolekülen interagiert, die häufig in biologischen Proben in Form eines Oligonukleotids, eines Proteins oder eines Polysaccharids etc. enthalten sind.

[0003] Während die Bildung einer direkten Bindung zwischen der bifunktionellen Verbindung und dem Probenmolekül möglich ist, interagieren die Probenmoleküle nicht notwendigerweise direkt mit den Kupplern, welche die Monoschicht bilden. In einer anderen Ausführungsform können geeignete immobilisierte Biomoleküle an sich als Sonden zum Nachweis von Probenmolekülen wirken. Derartige Sondenmoleküle können über eine Umsetzung mit den freien funktionellen Gruppen der Monoschicht gleichermaßen immobilisiert werden. Insbesondere kann, wenn Biomoleküle als Sondenmoleküle verwendet werden, ihr Vorhandensein die Spezifität der Wechselwirkung der Probenmoleküle mit der modifizierten Oberfläche verstärken. Zum Beispiel können in den Fällen, in denen die schnelle Analyse einer Probe aus DNA-Fragmenten oder -Molekülen erforderlich ist, die Monoschichten aus bifunktionellen Molekülen zuerst mit synthetischen Oligonukleotiden in Kontakt gebracht werden, welche auf diese Weise immobilisiert werden. Anschließend wird die Hybridisierung von spezifischen Molekülen wie kompatiblen Strängen aus einer Probe nachgewiesen, z. B. über Fluoreszenz-Mikroskopie, wenn Farbstoff-markierte Probenmoleküle verwendet werden.

[0004] [Fig. 1](#) zeigt eine schematische Beschreibung (nicht maßstabsgetreu) des Designs eines herkömmlichen DNA-Sensors. Die Monoschichten aus üblicherweise synthetischen Oligonukleotid-Einzelsträngen als Sonden werden an der Oberfläche immobilisiert und dienen als Sondenmoleküle für komplementäre Proben-Oligonukleotide, welche über Hybridisierung gebunden werden. Die Hybridisierungsreaktion wird zum Beispiel über die Fluoreszenz, welche aus geeigneten Farbstoffmarkierungen, die an die Probenmoleküle gebunden sind, herrührt, nachgewiesen.

[0005] Obwohl die Techniken für diesen Zweck gut eingeführt sind, ist die Anwendung von Standard-Nachweisverfahren problematisch, insbesondere in Fällen, in denen der Oberflächenbereich, der für den Nachweis eines spezifischen Typs von Probenmolekül verfügbar ist, beschränkt ist, z. B. wenn eine Vielzahl von Molekülen in einem parallelen Verfahren analysiert werden soll, da die Monoschichten hinsichtlich ihrer Pflöpfungsdichte beschränkt sind. Zum Beispiel müssen, da die Anzahl der hybridisierten Doppelstränge pro Flächeneinheit eines Sensors nicht einfach erhöht werden kann, geeignete Detektoren sehr hohe Anforderungen hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit erfüllen. Deshalb kann der minimale Oberflächenbereich auf einem Sensor, der für den Nachweis eines Oligonukleotidtyps notwendig ist, nicht einfach verringert werden. Darüber hinaus kann die maximale Dichte, d. h. ein Proben- oder Sondenmolekül pro funktionelle Gruppe des Kupplers, kaum erreicht werden, da aufgrund der sterischen Behinderung auf der sich zweidimensional erstreckenden Monoschicht nur ein Bruchteil der funktionellen Gruppen fähig sein wird, mit Proben- oder Sondenmolekülen zu reagieren. Deshalb ist die Gesamtpflöpfungsdichte gering und normalerweise nicht gut definiert.

[0006] Ähnliche Probleme können im Hinblick auf die begrenzte Anzahl von Reaktionsstellen pro Flächeneinheit in anderen Anwendungen entstehen, in denen es erwünscht ist, eine erhöhte Anzahl von Molekülen auf einer Oberfläche zu immobilisieren.

[0007] Es sind verschiedene Versuche unternommen worden, um die vorstehend umrissenen Probleme zu überwinden. Im Hinblick auf die Analyse von Oligonukleotiden hat man versucht, die Pflöpfungsdichte auf der Oberfläche durch das Verwenden von Oligomeren oder Polymeren zu erhöhen, welche einen Oligonukleotidstrang (oder eine funktionelle Gruppe zu seiner Befestigung) zusammen mit einer geeigneten Gruppe tragen, welche

das Binden dieser Oligomere oder Polymere an der Oberfläche des Sensorchips ermöglicht. Aufgrund der erhöhten Flexibilität der Oligomer- oder Polymerketten ist ein größerer Anteil der bifunktionellen Oligomer- oder Polymermoleküle, die an die Oberfläche gekuppelt sind, in der Lage, Oligonukleotid-Sondenmoleküle zu immobilisieren.

[0008] Jedoch wird die gesamte Oligonukleotid-Pfropfdichte nicht signifikant erhöht, da die Pfropfdichte der bifunktionellen Oligomer- oder Polymermoleküle auf der Oberfläche begrenzt ist. Dies ist eine Konsequenz aus der Tatsache, dass die Selbstorganisation der Oligomere oder Polymere aus kinetischen Gründen behindert ist, da, sobald die Sensoroberfläche mit derartigen Molekülen bedeckt ist, weitere Polymere gegen einen Konzentrationsgradienten diffundieren müssen, um die Oberfläche zu erreichen.

[0009] Dementsprechend ist es ein Ziel der vorliegenden Erfindung, eine Oberfläche bereitzustellen, welche mit einer Polymermonoschicht modifiziert ist, die funktionelle Gruppen zur Interaktion mit Proben- oder Sondenmolekülen umfasst, wobei die Anzahl der Moleküle, welche pro Oberflächeneinheit interagieren, deutlich erhöht ist, verglichen mit herkömmlichen (kurzkettigen) Monoschichten aus bifunktionellen Molekülen. Zudem sollte die Dichte der vorhandenen Wechselwirkungsstellen höher sein als die, welche aus der Umsetzung von bifunktionellen Polymeren oder Oligomeren mit der Oberfläche erhalten wird.

[0010] In dem besonderen Fall des Nachweises von DNA-Molekülen wie Oligonukleotiden kann das Ziel ausgedrückt werden als Bereitstellung einer Oberfläche mit einer Pfropfdichte von synthetischen Oligonukleotidsträngen, welche höher ist als die, welche durch Kuppeln der einzelnen Oligonukleotide an eine funktionalisierte Monoschicht aus Kupplern mit niederem Molekulargewicht erzeugt wird. Auch sollte die Pfropfdichte höher sein als die, welche aus der Umsetzung von Polymeren oder Oligomeren, die mit einem synthetischen Oligonukleotid-Einzelstrang modifiziert wurden, mit der Oberfläche herrührt.

[0011] Dieses Ziel ist erreicht worden durch eine Oberfläche, an die eine Anordnung von Polymerketten gebunden ist, die jeweils eine Vielzahl von funktionellen Gruppen umfassen, welche die Wechselwirkung des Polymers mit Proben- oder Sondenmolekülen ermöglichen. Wenn zum Beispiel eine derartige polyfunktionelle Polymerkette verwendet wird, um eine oder mehrere synthetische Oligonukleotidsonden zu immobilisieren, können anschließend komplementäre Nukleinsäuren aus einem Gemisch von Probenmolekülen nachgewiesen werden, nachdem eine Hybridisierungsreaktion stattgefunden hat. Überraschenderweise ist festgestellt worden, dass solch eine Anordnung von polyfunktionellen Polymerketten, auch als Polymerbürste bezeichnet, nicht unter den Problemen von herkömmlichen Nachweisverfahren leidet, in denen eine hohe Pfropfdichte nicht erreicht werden konnte. Darüber hinaus können, da die Flexibilität der Polymerketten eine vollständige Bedeckung der Sensoroberfläche ermöglicht, Oberflächeneffekte, z. B. während des Laser-Scannens, vermieden werden.

[0012] Der Begriff "Wechselwirkung" schließt wie in dieser Beschreibung verwendet die Bildung von kovalenten Bindungen, ebenso wie anziehende ionische und Van-der-Waals-Kräften und Wasserstoffbrückenbindungen ein. Die jeweilige funktionelle Einheit innerhalb der Polymerkette oder der Sondenmoleküle, welche den Typus der Wechselwirkung definiert, wird gemäß der gewünschten Anwendung der erfindungsgemäßen Oberfläche ausgewählt werden.

[0013] Der Ausdruck "immobilisieren" wird hier nachstehend für eine Wechselwirkung von Molekülen mit den Polymerbürsten verwendet, die zur Bildung einer Bindung führt, welche unter den gewählten Bedingungen permanent ist. Zum Beispiel werden Sondenmoleküle durch die Polymerbürsten während ihrer Anwendung auf einer Sensoroberfläche immobilisiert. Jedoch kann eine Immobilisierung durch Verändern der Bedingungen (z. B. pH-Wert, Ionenstärke) manchmal aufgehoben werden.

[0014] Der Begriff "Probenmolekül" soll hier für Moleküle verwendet werden, welche in einer Probe vorhanden sind und welche zeitweilig oder permanent an die erfindungsgemäßen Polymerketten koppeln. Die vorliegende Erfindung schließt zwei allgemeine Prinzipien für eine Wechselwirkung der beanspruchten Polymerbürsten mit den Probenmolekülen ein. In einer ersten Ausführungsform werden die funktionellen Gruppen, die innerhalb der Polymerketten enthalten sind, ausgewählt, um eine direkte Wechselwirkung der Ketten mit den Probenmolekülen zu ermöglichen. In einer zweiten Ausführungsform werden Sondenmoleküle an den funktionellen Gruppen der Polymerbürste immobilisiert, und es kann eine Wechselwirkung zwischen diesen Sondenmolekülen und den Probenmolekülen stattfinden.

[0015] Geeignete Sondenmoleküle sind Moleküle, die mindestens bifunktional sind, so dass nach ihrer Kuppelung an die multifunktionalen Polymerketten neue Wechselwirkungsstellen in der erfindungsgemäßen Poly-

mermonoschicht vorhanden sind, welche eine Wechselwirkung mit Probenmolekülen ermöglichen. Bevorzugt stellen diese Sondenmoleküle hoch spezifische Wechselwirkungsstellen für die Probenmoleküle bereit. Sie können aus natürlichen oder nicht natürlichen Quellen stammen. Besonders bevorzugte Sondenmoleküle sind Biomoleküle wie Nukleinsäuren einschließlich DNA, RNA oder PNA (Peptidnukleinsäure), am meisten bevorzugt Oligonukleotide oder Aptamere, Polysaccharide, Proteine einschließlich glykosidisch modifizierter Proteine oder Antikörper, Enzyme, Zytokine, Chemokine, Peptidhormone oder Antibiotika und Peptide. Um ausreichende Stabilität sicher zu stellen, z. B. während einer Sensoranwendung, werden die Sondenmoleküle an die Polymerbürste bevorzugt kovalent gebunden.

[0016] In Abhängigkeit von der Verwendung kann eine Vielzahl von identischen Sondenmolekülen oder ein Gemisch aus zwei oder mehr verschiedenen Sonden immobilisiert werden. Zum Beispiel ist ein Satz von identischen Sondenmolekülen zur Anwendung der Polymerbürsten als Affinitätsmatrix bevorzugt.

[0017] Die erfindungsgemäße Polymermonoschicht umfasst eine Vielzahl von einzelnen Polymerketten, welche an eine Oberfläche gebunden sind. Bevorzugt ist die Bindung zwischen den Polymerketten und der Oberfläche kovalent. Es ist auch bevorzugt, dass die Polymerketten an einem ihrer Enden an der Oberfläche gebunden sind. Die Einführung von verzweigten Polymeren ist möglich, falls gewünscht.

[0018] [Fig. 2](#) zeigt eine schematische Darstellung (nicht maßstabsgetreu) des Designs eines DNA-Sensors, der auf funktionellen Polymerbürsten basiert. Die einzelsträngigen Oligonukleotide, welche als Sondenmoleküle dienen, werden an die auf der Oberfläche verankerten Polymerketten gebunden. Die Probenoligonukleotide werden über Hybridisierung nachgewiesen. Diese Umsetzung kann durch Messen des signifikanten Anstiegs der Schichtdicke nachgewiesen werden, der durch die Inkorporation von zusätzlichem Material in die Schicht verursacht wird.

[0019] Die Polymerketten der vorliegenden Erfindung können Homo- oder Copolymere sein, in Abhängigkeit von der gewünschten Anwendung. Ein Homopolymer würde durch ein Polymer dargestellt werden, in dem jede der bei der Polymerisation verwendeten monomeren Einheiten mindestens eine der funktionellen Gruppen trägt, die mit den Proben- oder Sondenmolekülen interagieren können. Jedoch kann, um der Polymermonoschicht bestimmte vorteilhafte Eigenschaften zu verleihen, ein Copolymer, das aus diesen Monomeren mit bestimmten funktionellen Gruppen zur Wechselwirkung mit den Proben- oder Sondenmolekülen gebildet wird (hierin nachstehend als "funktionalisierte Monomere" bezeichnet), zusammen mit anderen Comonomeren verwendet werden.

[0020] Zum Beispiel wird die Umsetzung der Proben- oder Sondenmoleküle mit dem Polymer signifikant erleichtert, wenn das Polymer in dem Lösungsmittel, welches diese Moleküle enthält, quellbar ist, so dass bevorzugt Comonomere verwendet werden sollten, welche eine starke Wechselwirkung mit dem besagten Lösungsmittel zeigen. Da in einer am meisten bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung Biomoleküle, die normalerweise in wässrigen Lösungen vorhanden sind, mit den Polymerketten interagieren, sind die Polymerketten bevorzugt in Wasser quellbar.

[0021] Deshalb können zum Beispiel ein oder mehrere Comonomere verwendet werden, die polar oder sogar in Wasser löslich sind, wenn ein Homopolymer aus funktionalisierten Monomeren keine ausreichende Wechselwirkung mit Wasser zeigt, um eine schnelle Umsetzung der Moleküle mit den funktionellen Gruppen zu ermöglichen, die nachgewiesen werden sollen. Beide Monomertypen, funktionalisierte ebenso wie Comonomere, enthalten bevorzugt eine C-C-Doppelbindung, welche in einer radikalischen Polymerisationsreaktion reagieren kann. Beispiele für geeignete Comonomere, welche ein wasserquellfähiges Polymer ergeben, sind Acrylsäure, Methacrylsäure und Derivate davon wie z. B. Ester und Amide dieser Säuren, wobei die Alkohole oder Amine bevorzugt 1 bis 12 Kohlenstoffatome umfassen.

[0022] Bekannte Beispiele für diese Gruppe von Monomeren sind Hydroxyethylmethacrylat, Acrylamid und Dimethylacrylamid. Ein anderes geeignetes Monomer ist Vinylpyrrolidon. Es ist auch möglich, Monomere zu verwenden, die zuerst wasserunlösliche Polymere ergeben, welche dann in wasserlösliche Derivate überführt werden können. Ein geeignetes Beispiel für diese Gruppe von Polymeren ist Polyvinylalkohol, der zum Beispiel durch Verseifung von Polyvinylacetat erhalten werden kann.

[0023] Wenn ein Copolymer verwendet wird, wird das Verhältnis der Comonomere zu funktionalisierten Monomeren vor dem Polymerisationsprozess bestimmt, um die Zusammensetzung der so erhaltenen Polymerkette zu definieren. Bevorzugt liegt das Verhältnis der Comonomere zu den funktionalisierten Monomeren im Bereich von 50/1 bis 1/1, stärker bevorzugt von 20/1 bis 2/1. Die funktionellen Gruppen, die notwendig sind,

um eine Wechselwirkung der Polymerschicht mit den Proben- oder Sondenmolekülen zu ermöglichen, sind bevorzugt in den Seitenketten der Polymerketten vorhanden. Eine "Vielzahl" von funktionellen Gruppen, die in den Polymerketten der erfindungsgemäßen Monoschicht enthalten sind, bedeutet mindestens zwei, bevorzugt jedoch mehr als zwei Gruppen pro Polymerkette. Da die betreffenden funktionellen Gruppen bevorzugt in den Monomeren enthalten sind, welche die Polymerbürsten bilden, kann ihre Anzahl bis zu mehreren Tausend betragen, z. B. bis zu 10.000 dieser Gruppen, welche in einer einzelnen Kette vorhanden sind, in Abhängigkeit von der Größe des Sonden- oder Probenmoleküls, das immobilisiert werden soll. Bevorzugt umfasst jede Kette 20 bis 1000 dieser funktionellen Gruppen.

[0024] Geeignete funktionalisierte Monomere, welche in den Polymerbürsten vorhanden sind, sind solche Monomere, die eine polymerisierbare C-C-Doppelbindung umfassen, ebenso wie eine weitere funktionelle Einheit, die am Polymerisationsprozess nicht beteiligt ist. Bevorzugt ist diese funktionelle Gruppe an die Polymerhauptkette über eine C₂-C₁₀-, stärker bevorzugt über eine C₃-C₇-Alkylkette als Spacer gebunden. Die Spacermoleküle können Teil des funktionalisierten Monomers sein. Für diese Herangehensweise geeignete Monomere schließen Acryl- und Methacrylester oder Amide von C₂-C₁₀-Alkoholen oder C₂-C₁₀-Aminen ein. Um als Spacer zu dienen, tragen diese Alkohole oder Amine eine zusätzliche funktionelle Gruppe am Ende entgegengesetzt zu dem, welches die Ester- oder Amidbindung bildet. Diese funktionelle Gruppe steht entweder für eine Gruppe, die für die Wechselwirkung mit den Proben- oder Sondenmolekülen notwendig ist, oder kann in einem weiteren Schritt zu einer derartigen funktionellen Gruppe umgewandelt werden.

[0025] In einer anderen Ausführungsform ist es auch möglich, diese Spacermoleküle an geeignete reaktive Segmente innerhalb der Polymermonoschicht nach ihrer Bildung zu binden. In diesem Fall müssen reaktive Monomere während der Polymerisation vorhanden sein, wie Acryl- oder Methacrylsäurechloride oder reaktive Ester davon wie N-Hydroxysuccinimide oder andere Monomere, z. B. Maleinsäureanhydrid. Diese bevorzugten reaktiven Monomere können kovalente Bindungen an den bifunktionellen Alkoholen oder Aminen bilden, welche als Spacer verwendet werden können.

[0026] Die Monomere, welche die Spacereinheit tragen, können leicht aus dem jeweiligen Acryl- oder Methacrylsäurechlorid oder -anhydrid und der ω -Amino- oder Hydroxycarbonsäure synthetisiert werden. Das so erhaltene Produkt kann in das aktive Esterderivat unter Verwendung von z. B. N-Hydroxysuccinimid überführt werden. Ein detailliertes Verfahren zur Synthese verschiedener Beispiele für derartige Monomere kann in der Literatur gefunden werden, z. B. in H.-G. Batz, J. Koldehoff, *Macromol. Chem.* 177 (1976) 683.

[0027] Wie vorstehend umrissen ist es möglich, reaktive Monomere zu verwenden, welche direkt eine erfindungsgemäße polyfunktionelle Polymermonoschicht ergeben. In einer anderen Ausführungsform können Monomere ausgewählt werden, welche einen Vorläufer der funktionellen Gruppe, die auf der finalen Oberfläche verwendet werden soll, tragen, z. B. ein Säurechlorid oder ein Säureanhydrid. Diese können anschließend in reaktive Gruppen umgewandelt werden, z. B. NHS-Ester- oder Glycidylesterreste, welche eine Wechselwirkung des Polymers mit den Proben- oder Sondenmolekülen unter den gewünschten Bedingungen ermöglichen.

[0028] Deshalb sind alle polymerisierbaren Monomere für die Zwecke der vorliegenden Erfindung geeignet, solange sie mit funktionellen Gruppen vereinigt werden oder diese enthalten können, welche notwendig sind, um eine Wechselwirkung des Polymers mit den Probenmolekülen oder Sondenmolekülen zu ermöglichen.

[0029] Die funktionellen Gruppen, welche für die Zwecke der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, werden bevorzugt den Molekülen entsprechend ausgewählt, mit denen eine Wechselwirkung erreicht werden soll. Die Wechselwirkung kann auf einen einzigen Typ von Probenmolekül oder auf eine Vielzahl von Probenmolekülen gerichtet sein. Da eine wichtige Anwendung der vorliegenden Erfindung im Nachweis von spezifischen Molekülen in biologischen Proben besteht, werden die innerhalb der Polymerbürste vorhandenen funktionellen Gruppen bevorzugt mit natürlichen oder synthetischen Biomolekülen interagieren, welche dazu fähig sind, mit den Molekülen in biologischen Proben spezifisch zu interagieren, was zu ihrem Nachweis führt. Geeignete funktionelle Einheiten werden bevorzugt fähig sein, mit Nukleinsäuren und Derivaten davon wie DNA, RNA oder PNA, z. B. Oligonukleotiden oder Aptameren, Polysacchariden, Proteinen einschließlich glykosidisch modifizierten Proteinen oder Antikörpern, Enzymen, Zytokinen, Chemokinen, Peptidhormonen oder Antibiotika oder Peptiden oder markierten Derivaten davon, zu reagieren.

[0030] Darüber hinaus wird es möglich sein, die Kupplungsreaktion zwischen den nachzuweisenden Molekülen oder den synthetischen Oligonukleotiden und den Polymerketten unter Bedingungen durchzuführen, welche für die Proben- oder Sondenmoleküle nicht schädlich sind. Folglich sollte die Umsetzung in einer Nuklein-

säuresensor-Anwendung in einer wässrigen Lösung durchgeführt werden und die Temperatur sollte nicht über 95°C erhöht werden.

[0031] Auch sollte die Kupplungsreaktion in einer angemessenen Geschwindigkeit voranschreiten, so dass der Nachweis bevorzugt innerhalb von weniger als 24 Stunden erbracht werden kann, ohne dass extreme pH-Werte in der Lösung erforderlich sind. Zur Immobilisierung von synthetischen Oligonukleotid-Einzelsträngen sollte der pH-Wert im Bereich zwischen 7 und 11 liegen, bevorzugt 7 und 10. Während der Hybridisierungsreaktion der Nukleinsäure-Probenmoleküle mit den Sondenmolekülen sollte die Bindung zwischen der funktionellen Gruppe und dem synthetischen Oligonukleotid-Einzelstrang ebenso wie die Bindung der Polymerkette an das Substrat fähig sein, Temperaturen von mehr als 65°C und einem pH-Wert von 6 bis 9 zu widerstehen. In den Fällen, in denen DNA als ein Probenmolekül verwendet wird, können die Temperaturen auf bis etwa 95°C angehoben werden, um eine Trennung der DNA-Stränge zu bewirken, welche für die Hybridisierung notwendig ist.

[0032] Da die meisten der Sondenmoleküle insbesondere in biologischen oder medizinischen Anwendungen sterisch ungehinderte nukleophile Einheiten umfassen, umfassen bevorzugte Wechselwirkungen mit den Polymerbürsten nukleophile Substitutions- oder Additionsreaktionen, welche zu einer kovalenten Bindung zwischen den Polymerketten und den Proben- oder Sondenmolekülen führen. Zum Beispiel werden synthetische Oligonukleotide üblicherweise mit einer freien Aminogruppe an einem Ende (5' oder 3') bereitgestellt. Deshalb stellen beispielhafte funktionelle Gruppen zum Beispiel eine reaktive Doppelbindung, ein Äquivalent für eine Doppelbindung (wie z. B. eine Epoxygruppe) oder eine reaktive Abgangsgruppe bereit. Jedoch können auch ionische oder Van-der-Waals-Kräfte ebenso wie Wasserstoffbrückenbindungen verwendet werden, um Probenmoleküle an die Polymerbürste zu koppeln, wenn ihre funktionellen Gruppen dementsprechend ausgewählt sind. Mit den entsprechenden funktionellen Gruppen, die in der Polymerbürste vorhanden sind, können die erfindungsgemäßen Polymermonoschichten auch in Trennverfahren, z. B. als eine stationäre Phase in Chromatographie-Anwendungen verwendet werden.

[0033] Bevorzugte funktionelle Gruppen können aus der Fachliteratur im Hinblick auf die Molekülklassen, welche immobilisiert werden sollen, und gemäß den anderen Anforderungen (Reaktionszeit, Temperatur, pH-Wert) wie vorstehend beschrieben ausgewählt werden. Eine allgemeine Liste kann zum Beispiel in dem Fachbuch "Bioconjugate Techniques" von G. T. Hermanson, Academic Press, 1996, gefunden werden. Im Falle des Bindens von Amino-terminierten Oligonukleotiden sind Beispiele für geeignete Gruppen sogenannte aktive oder reaktive Ester wie N-Hydroxysuccinimide (NHS-Ester), Epoxide, bevorzugt Glycidyl-derivate, Isothiocyanate, Isocyanate, Azide, Carbonsäuregruppen oder Maleinimide.

[0034] Als bevorzugte funktionelle Monomere, welche direkt eine polyfunktionelle Polymermonoschicht ergeben, können für die Zwecke der vorliegenden Erfindung die folgenden Verbindungen verwendet werden:

- Acryl- oder Methacrylsäure-N-hydroxysuccinimide
- N-Methacryloyl-6-aminopropansäurehydroxysuccinimidester,
- N-Methacryloyl-6-aminocaprinsäurehydroxysuccinimidester oder
- Acryl- oder Methacrylsäureglycidylester

[0035] In Abhängigkeit von der Anwendung besteht die Möglichkeit des Bereitstellens einer Polymerbürste mit einer Kombination von zwei oder mehr unterschiedlichen funktionellen Gruppen, z. B. indem die Polymerisation, welche zu den Polymerketten führt, in Gegenwart unterschiedlicher Typen von funktionalisierten Monomeren durchgeführt wird. In einer anderen Ausführungsform können die funktionellen Gruppen identisch sein.

[0036] Das bevorzugte Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen polyfunktionellen Polymermonoschicht wird im Folgenden beschrieben:

In einem ersten Schritt wird die Oberfläche mit einer Monoschicht von Polymerisationsinitiatoren oder Startermolekülen bedeckt. Die Gruppen in diesen Initiatoren, welche die Initiierung der Polymerisation ermöglichen, werden üblicherweise z. B. aus Peroxogruppen oder Azogruppen ausgewählt, wenn ein thermisch initiiertes radikalischer Mechanismus verwendet werden soll. Aromatische Ketone wie Benzoin-, Benzil- oder Benzophenonderivate werden bevorzugt verwendet, wenn die Polymere durch photochemische Initiierung erzeugt werden. Aromatische Ketone, welche Schwefel beinhalten, können gleichermaßen verwendet werden, um, falls gewünscht, die zur Photoinitiierung geeignete Wellenlänge in einen längeren Wellenlängenbereich zu verschieben. Zusätzlich zu diesen labilen Gruppen tragen die geeigneten Initiatoren für das bevorzugte erfindungsgemäße Verfahren eine oder mehrere Gruppen, die für ihre Bindung an der Oberfläche, welche mit den Polymerketten bedeckt werden soll, geeignet sind.

[0037] Man lässt die erfindungsgemäßen Polymerketten üblicherweise von der Oberfläche aus über eine Kettenreaktion wachsen. Während radikalische Mechanismen aus praktischen Gründen bevorzugt sind, ist die Anwendung von ionischen Polymerisationstechniken ebenfalls möglich.

[0038] Die funktionellen Gruppen zur Bindung an der Oberfläche, welche in den Initiator-molekülen enthalten sind, müssen an die verwendete Sensoroberfläche angepasst sein. Zur Herstellung der Initiator-Monoschicht auf Metalloxiden, insbesondere Siliciumoxid-Oberflächen (aufgedampfte oder gesputterte SiO_x -Schichten, SiO_2 -Oberflächen von Siliciumwafern, Glas, Quarz) werden Chlorsilaneinheiten oder Alkoxysilane verwendet. Thiol- oder Disulfidgruppen können zur Modifikation von Goldoberflächen verwendet werden. Jedoch werden Silane üblicherweise aufgrund ihrer erhöhten Stabilität auf Oberflächen bevorzugt. Darüber hinaus ist die vorliegende Erfindung nicht auf anorganische Oberflächen beschränkt. Organische Polymeroberflächen können ebenfalls als Substrate, um die Polymermonoschichten zu tragen, verwendet werden, und es besteht auch die Möglichkeit, die Starter für die Polymerisationsreaktion direkt in ein derartiges, eine Oberfläche bildendes Polymer einzuschließen.

[0039] Bevorzugte Beispiele für Initiatoren, welche für die Zwecke der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, sind nachstehend aufgelistet, zusammen mit ihren Strukturformeln:

- 4,4'-Azobis-(4-cyanopentansäure-(3'-chlordimethylsilyl)propylester), Verbindung 1, oder die jeweiligen Di- und Trichlor- oder Mono-, Di- und Trialkoxysilananaloga;
- 2,4'-Azo-(4-cyanopentansäure-(3"-chlordimethylsilyl)propylester), Verbindung 2, oder die jeweiligen Di- und Trichlor- oder Mono-, Di- und Trialkoxysilananaloga; oder die jeweiligen Verbindungen mit einem Undecyl-Spacer, statt eines Propyl-Spacers; oder Disulfid- oder Thiolderivate dieses allgemeinen Typs von Azoverbindungen;
- 4-(3'-Chlordimethylsilyl)propyloxy)benzophenon, 3, oder die jeweiligen Di- und Trichlor- oder Mono-, Di- und Trialkoxysilananaloga;
- Silan- und Disulfid-/Thiolderivate von Arylazomalodinitrilen, wie Verbindung 4.

Verbindung Nr.	Struktur
1	
2	
3	
4	

[0040] Nach der Initiierung der Polymerisationsreaktion, bevorzugt durch einen Erwärmungsschritt (thermische Initiierung) oder dem Aussetzen an Strahlung (Photoinitiierung) in Gegenwart von polymerisierbaren Monomeren, kann man Polymerketten von der Oberfläche aus wachsen lassen. Die Polymerisation kann unter Standardreaktionsbedingungen, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, durchgeführt werden. Wenn diese Technik angewendet wird, können die Pfordichten der so erhaltenen Polymermonoschicht über einen breiten Bereich gesteuert werden, zum Beispiel durch Variation der Polymerisationszeit. Darüber hinaus können

Pfropfdichten erreicht werden, die durch andere Verfahren unerreichbar sind. So können Polymere derart befestigt werden, dass der durchschnittliche Abstand zwischen den Verankerungsorten auf der Oberfläche 5 nm oder weniger beträgt, z. B. 2 bis 5 nm.

[0041] Vorteilhafterweise können derartige Pfropfdichten unabhängig vom Molekulargewicht der befestigten Ketten erreicht werden, z. B. sogar für Molekulargewichte von 100.000 g/mol oder mehr.

[0042] Darüber hinaus ermöglicht die bevorzugte in-situ-Bildung von Polymerketten auf einer Oberfläche gemäß der vorliegenden Erfindung die Steuerung des mittleren Molekulargewichts der befestigten Polymerketten, insbesondere ihrer Länge, unabhängig von der Pfropfdichte. Wenn z. B. die Polymerisation in einem Lösungsmittel durchgeführt wird, in dem die Monomerkonzentration gesteuert werden kann, wird eine höhere Monomerkonzentration direkt zu einem höheren Molekulargewicht der so erhaltenen Polymere führen.

[0043] Entsprechend dieser präzisen Steuerung der Parameter Pfropfdichte und Molekulargewicht ist es möglich, die Eigenschaften der jeweiligen Polymerschichten einer Vielzahl von Anwendungen anzupassen. Zum Beispiel können Schichten unterschiedlicher Dicke über einen breiten Bereich von einigen Nanometern bis zu einigen Mikrometern erzeugt werden. Es ist auch möglich, die Eigenschaften der so erhaltenen Schicht fein abzustimmen, z. B. im Hinblick auf die Erreichbarkeit der funktionellen Gruppen für die anschließend gekoppelten Sonden- und Probenmoleküle, die sich in ihrer Größe und Struktur beträchtlich unterscheiden können.

[0044] Die Polymerketten, die über das vorstehende, bevorzugte Verfahren erhalten wurden, behalten ein Fragment des Initiators in ihrer Struktur zurück, welche diese an der Oberfläche immobilisiert, nämlich den Abschnitt, der mit dem Verankerungsort beginnt und zu dem vorbestimmten Initiierungspunkt führt, wie er auf dem Fachgebiet für alle Initiator Typen, insbesondere solche, die in dieser Anmeldung erwähnt werden, bekannt ist.

[0045] Detaillierte Informationen über die Synthese von Initiatormolekülen, ihre Reaktion mit der Oberfläche und die bevorzugten Polymerisationsbedingungen sind beschrieben in:

- O. Prucker, J. Rühle, *Macromolecules*, 1998, 31, 592;
- O. Prucker, J. Rühle, *Macromolecules*, 1998, 31, 602 und
- O. Prucker, J. Rühle, *Langmuir*, 1998, 24 (14), 6893.

[0046] Es sollte darauf geachtet werden, nicht umgesetzte Monomere ebenso wie nicht gebundene Polymerketten mit geeigneten Lösungsmitteln nach der Polymerisation zu entfernen.

[0047] Die nach diesem Verfahren hergestellten Polymerschichten können auf einer breiten Vielzahl von Oberflächen angewendet werden, unabhängig von ihrer Form. Sogar Oberflächen, die für übliche Oberflächen-Modifikationsverfahren unzugänglich sind (z. B. innere Oberflächen) können mit den erfindungsgemäßen Polymermonoschichten bereitgestellt werden, da keine sperrigen Polymermoleküle zur Oberfläche diffundieren müssen.

[0048] Es ist auch möglich, Anordnungen der Polymermonoschichten in Form von Mustern durch verschiedene Mittel zu erzeugen. Ein Weg sind photolithographische Standardverfahren, die entweder nach der Polymerisation (Photoablation der Polymere durch Masken), vor diesem Schritt (Photoabbau oder Photoablation der Initiator-Monoschichtmasken) oder während der Polymerisation mittels Photopolymerisation durch Masken angewendet werden können. Andere mögliche Verfahren zur Erzeugung von Polymermonoschichten in Form von Mustern sind das Mikrokontakt-Drucken oder verwandte Verfahren, welche während der Bildung der Initiatorschicht oder während der Polymerisation angewendet werden können. Schließlich können Tintenstrahl-Techniken oder andere Mikroplotting-Verfahren verwendet werden, um Initiator-Monoschichten in Form von Mustern zu erzeugen, welche anschließend in Polymermonoschichten in Form von Mustern überführt werden. Unter Verwendung von einer dieser Techniken können Oberflächenstrukturen in Größenordnungen im Mikrometerbereich erzeugt werden. Der hoch parallele Modus der Signalerzeugung und eine signifikante Verbesserung bei der Integration von analytischen Daten ist das vielversprechendste Merkmal derartiger Techniken, welche dementsprechend die Optimierung von automatischen analytischen Verfahren ermöglichen.

[0049] Zum Nachweis einer erfolgreichen Immobilisierung von Proben- oder Sondenmolekülen auf einer Polymermonoschicht kann eine Vielzahl von Techniken angewendet werden. Insbesondere wurde festgestellt, dass die erfindungsgemäßen Polymerschichten einen signifikanten Zuwachs in ihrer Dicke durchlaufen, der mit geeigneten Verfahren, z. B. Ellipsometrie, nachgewiesen werden kann. Massensensitive Verfahren können ebenfalls angewendet werden.

[0050] Wenn Nukleinsäuren, zum Beispiel Oligonukleotide mit einer gewünschten Nukleotidsequenz oder DNA-Moleküle in einer biologischen Probe, analysiert werden sollen, können synthetische Oligonukleotid-Einzelstränge mit der Polymermonoschicht umgesetzt werden. Die Reaktion wird unter hoher Luftfeuchte durchgeführt, bevorzugt in einer gepufferten wässrigen Lösung. Die Umsetzungstemperatur kann über Raumtemperatur erhöht werden, solange sie für die Oligonukleotide nicht schädlich ist. Bevorzugte Temperaturen liegen im Bereich von 40–60°C. In dieser Anwendung kann eine Vielzahl von identischen synthetischen Oligonukleotidsträngen oder ein Gemisch aus verschiedenen Strängen verwendet werden. Wenn verschiedene Stränge verwendet werden, sollten ihre Sequenzen bevorzugt bekannt sein.

[0051] Bevor die so hergestellte Oberfläche in einer Hybridisierungsreaktion verwendet wird, werden die nicht umgesetzten funktionellen Gruppen über die Zugabe von geeigneten Nukleophilen, bevorzugt C₁-C₄-Amine wie einfache primäre Alkylamine (z. B. Propyl- oder Butylamin), sekundäre Amine (Diethylamin) oder Aminosäuren (Glycin), deaktiviert.

[0052] Wenn sie einem Gemisch aus Oligonukleotid-Einzelsträngen, z. B. wie durch PCR erhalten, welche markiert sind, ausgesetzt werden, werden nur die Oberflächenbereiche, welche synthetische Stränge als Sonden bereitstellen, die zu dem PCR-Produkt komplementär sind, aufgrund der Hybridisierung ein nachweisbares Signal beim Scannen zeigen. Um den parallelen Nachweis von unterschiedlichen Oligonukleotidsequenzen zu erleichtern, können Druck-Techniken verwendet werden, welche die Trennung der Sensoroberfläche in Bereiche ermöglichen, in denen unterschiedliche Typen von synthetischen Oligonukleotidsonden der Testlösung präsentiert werden.

[0053] Der Begriff "Hybridisierung" kann sich, wie gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet, auf stringente oder nicht-stringente Bedingungen beziehen. Wenn nicht näher ausgeführt, sind die Bedingungen bevorzugt nicht-stringent. Die Hybridisierungsbedingungen können gemäß üblicher Protokolle eingerichtet werden, welche zum Beispiel in Sambrook, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. (1989), Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y. (1989) oder Higgins und Hames (Hrsg.), "Nucleic acid hybridization, a practical approach", IRL Press Oxford, Washington DC (1985) beschrieben sind. Das Einstellen der Bedingungen liegt im Umfang des Wissens des Fachmannes und soll gemäß den auf dem Fachgebiet beschriebenen Protokollen bestimmt werden. So wird der Nachweis von nur spezifisch hybridisierenden Sequenzen üblicherweise stringente Hybridisierungs- und Waschungs-Bedingungen wie zum Beispiel 0,1 × SSC, 0,1% SDS bei 65°C erfordern. Beispielhafte nicht-stringente Hybridisierungsbedingungen für den Nachweis von homologen oder nicht exakt komplementären Sequenzen können auf 6 × SSC, 1% SDS bei 65°C eingestellt sein. Wie bekannt ist, stellen die Länge der Sonde und die Zusammensetzung der Nukleinsäure, die bestimmt werden soll, weitere Parameter der Hybridisierungsbedingungen dar.

[0054] Die Nukleinsäuren, die analysiert werden sollen, können aus einer DNA-Bibliothek oder einer Genombank, einschließlich synthetischen und semisynthetischen Nukleinsäurebibliotheken, stammen. Bevorzugt umfasst die Nukleinsäurebibliothek Oligonukleotide.

[0055] Um ihren Nachweis in einem immobilisierten Zustand zu erleichtern, sollten die Nukleinsäuremoleküle bevorzugt markiert sein. Geeignete Marker schließen radioaktive, fluoreszierende, phosphorisierende, biolumineszente oder chemolumineszente Marker, ein Enzym, einen Antikörper oder ein funktionelles Fragment oder funktionelle Derivate davon, Biotin, Avidin oder Streptavidin ein.

[0056] Antikörper können polyklonale, monoklonale, chimäre oder einzelkettige Antikörper oder funktionelle Fragmente oder Derivate von derartigen Antikörpern einschließen, sind jedoch nicht auf diese beschränkt.

[0057] Die allgemeine Methodologie zur Herstellung von Antikörpern ist bekannt und ist zum Beispiel in Köhler und Milstein, Nature 256 (1975), 494, beschrieben worden und in J. G. R. Hurrel, Hrsg., "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications", CRC Press Inc., Boca Raton, FL (1982), rezensiert worden, und wurde auch von L. T. Mimms et al., Virology 176 (1990), 604–619, gelehrt. Wie vorstehend angegeben, bezieht sich der Begriff "Antikörper" in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung auf monoklonale oder polyklonale Antikörper. Funktionelle Antikörperfragmente oder -derivate stellen die gleiche Spezifität bereit wie die ursprünglichen Antikörper und umfassen F(ab')₂-, Fab-, Fv- oder scFv-Fragmente; siehe zum Beispiel Harlow und Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH-Press 1988, Cold Spring Harbor, NY. Bevorzugt ist der erfindungsgemäße Antikörper ein monoklonaler Antikörper. Darüber hinaus können die Derivate in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung durch Peptidomimetika hergestellt werden. Derartige Herstellungsverfahren sind auf dem Fachgebiet bekannt und können von einem Fachmann ohne weiteres angewendet wer-

den.

[0058] In Abhängigkeit von dem verwendeten Markierungsverfahren kann der Nachweis durch auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren durchgeführt werden, z. B. über Laser-Scannen oder die Verwendung von CCD-Kameras. Die vorliegende Erfindung umfasst auch Verfahren, in denen der Nachweis indirekt bewirkt wird. Ein Beispiel für einen derartigen indirekten Nachweis ist die Verwendung eines sekundären markierten Antikörpers, der auf eine erste Verbindung wie einen Antikörper gerichtet ist, welcher an das biologische Molekül (Probenmolekül) von Interesse bindet.

[0059] Eine weitere Anwendung der erfindungsgemäßen Polymermonoschichten liegt auf dem Feld der Affinitätschromatographie, z. B. zur Reinigung von Stoffen. Zu diesem Zweck werden Polymerbürsten mit identischen funktionellen Gruppen oder Sondenmolekülen bevorzugt verwendet, welche mit einer Probe in Kontakt gebracht werden. Nachdem der gewünschte Stoff durch die Polymerbürste immobilisiert wurde, kann das nicht gebundene Material entfernt werden, z. B. in einem Waschschrift. Mit geeigneten Elutionsmitteln kann der gereinigte Stoff dann von der Affinitätsmatrix getrennt werden.

[0060] Bevorzugte Stoffe, welche auf einer derartigen Matrix immobilisiert werden können, sind Nukleinsäuremoleküle, Peptide oder Polypeptide (oder Komplexe davon, wie Antikörper, funktionelle Fragmente oder Derivate davon), Saccharide oder Polysaccharide.

[0061] Eine Regeneration der Oberflächen, nachdem die Immobilisierung stattgefunden hat, ist möglich, jedoch sind einmalige Anwendungen bevorzugt, um die Qualität der Ergebnisse sicherzustellen.

[0062] Mit der vorliegenden Erfindung können verschiedene Typen von Proben mit erhöhter Präzision und/oder verringertem Raumbedarf in seriellen ebenso wie in parallelen Nachweisverfahren analysiert werden. Die erfindungsgemäßen Sensoroberflächen können deshalb in diagnostischen Instrumenten oder anderen medizinischen Anwendungen, z. B. zum Nachweis von Komponenten in physiologischen Flüssigkeiten wie Blut, Serum, Sputum etc., dienen.

[0063] Die erfindungsgemäßen Oberflächen können auch Startermoleküle für synthetische Anwendungen, insbesondere in der Festphasensynthese, z. B. während der in-situ-Bildung von Oligo- oder Polymeren immobilisieren. Bevorzugt sind die Oligo- oder Polymere Biomoleküle und umfassen Peptide, Proteine, Oligo- oder Polysaccharide oder Oligo- oder Polynukleinsäuren. Als immobilisierte Initiatoren kann ein Monomer dieser Makromoleküle verwendet werden.

[0064] Darüber hinaus können die erfindungsgemäßen Polymerschichten als Gele bei der Trennung von Molekülen, bevorzugt von Biomolekülen in einem elektrischen Feld verwendet werden.

[0065] Im Allgemeinen ermöglicht die vorliegende Erfindung die Bereitstellung von homogen modifizierten Oberflächen mit überlegener Pfropfdichte. Indem die passenden Polymerisationsbedingungen ausgewählt werden, können die Pfropfdichte und die Kettenlänge und so die Dicke der Polymerschicht gesteuert werden. Darüber hinaus können strukturierte Oberflächen bereitgestellt werden, z. B. durch Starten der Polymerisation von Anordnungen von Initiatormolekülen in Form von Mustern. Als Konsequenz können die Polymermonoschichten auf die jeweiligen Anwendungen optimal eingestellt werden.

[0066] Die Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden in den folgenden Punkten weiter veranschaulicht:

Ein bevorzugtes Verfahren zum Nachweis der Probennukleinsäuremoleküle, bevorzugt der einzelsträngigen Nukleinsäuremoleküle, unter Verwendung einer erfindungsgemäßen Polymerschicht umfasst die Schritte:

- a) Bereitstellen einer Oberfläche, welche mit einer erfindungsgemäßen polyfunktionellen Polymermonoschicht bedeckt ist
- b) Immobilisieren geeigneter Sondenmoleküle, bevorzugt Oligonukleotid-Einzelsträngen, auf der Polymermonoschicht über eine Umsetzung mit den funktionellen Gruppen, welche in den Polymerketten vorhanden sind
- c) Ermöglichen, dass eine Hybridisierungsreaktion zwischen den Oligonukleotid-Einzelsträngen und den Probennukleinsäuremolekülen stattfindet,
- d) Entfernen der nicht-hybridisierten Nukleinsäuremoleküle in einem Waschschrift und
- e) Nachweis der hybridisierten Nukleinsäuremoleküle, bevorzugt fluorometrisch.

[0067] Ein bevorzugtes Verfahren zur Reinigung einer Verbindung aus einer Probe unter Verwendung einer

erfindungsgemäßen Polymerschicht umfasst die Schritte:

- Bereitstellen einer Oberfläche, welche mit einer erfindungsgemäßen Polymermonoschicht modifiziert wurde
- Immobilisieren einer Vielzahl von identischen Sondenmolekülen auf der Polymerschicht
- In-Kontakt-Bringen der Probe mit der so erhaltenen Polymerschicht unter Bedingungen, welche ein Binden der Verbindung an das Sondenmolekül ermöglichen;
- und Entfernen des Materials, welches nicht an das Sondenmolekül gebunden hat, aus der Probe.

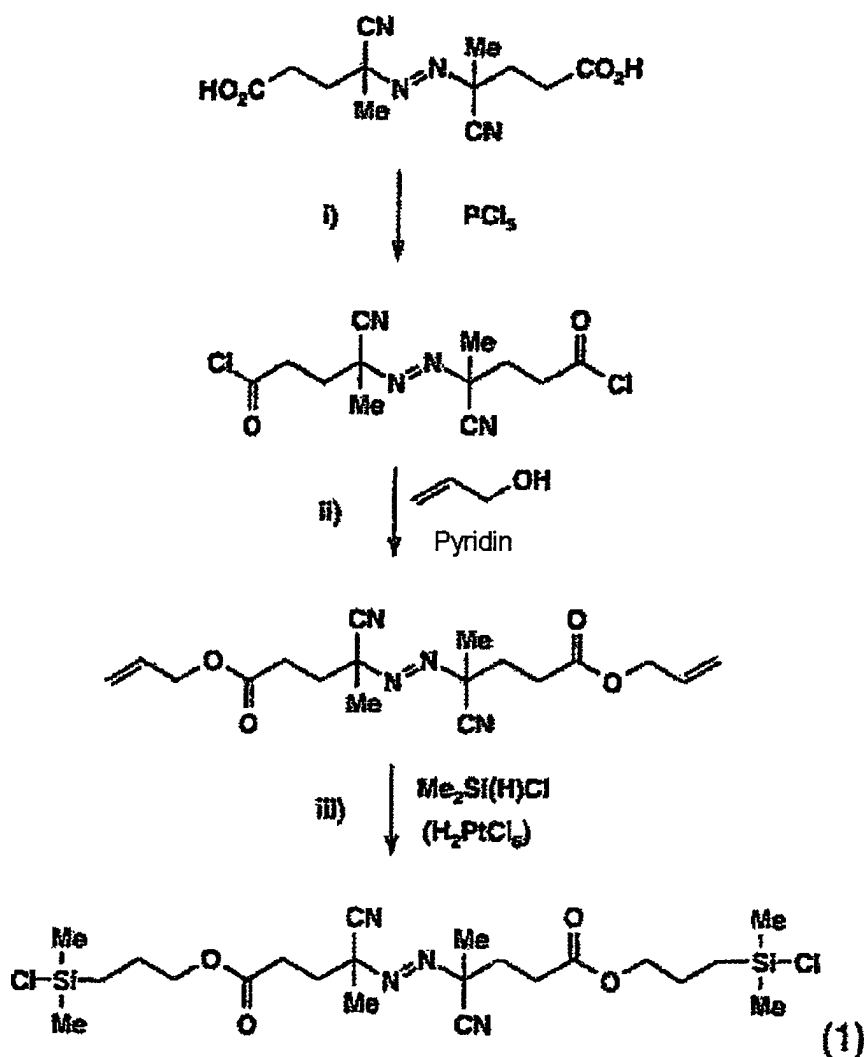
[0068] Dieses Verfahren kann ferner den Schritte einschließen:

- Trennen der Verbindung von dem Sondenmolekül durch Verwendung eines geeigneten Elutionsmittels.

[0069] Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Erfindung:

(1) Synthese des Initiators

[0070] Als ein Beispiel wird die Herstellung der Verbindung 1 beschrieben. Der Reaktionsweg wird nachstehend veranschaulicht. Die Indices i-iii in der Figur beziehen sich auf die Beschreibung der verschiedenen Schritte im Text.



i) Zu einer Suspension aus 40 g Phosphorpentachlorid (PCl_5) in 50 ml Methylenchlorid, welche mit einem Eisbad gekühlt wurde, wurde eine Suspension aus 10 g 4,4'-Azobis-(4-cyanopentansäure) in 50 ml Methylenchlorid tropfenweise zugegeben. Man ließ das Gemisch auf Raumtemperatur aufwärmen und rührte über Nacht. Das überschüssige PCl_5 wurde abgefiltert und die verbleibende Lösung wurde eingeeengt, bis sich kein weiteres PCl_5 abtrennte. Das Gemisch wurde nochmals filtriert und das Filtrat wurde zu 300 ml kaltem Hexan zugegeben, was die Abtrennung des Säurechlorids als einen weißen Feststoff (Ausbeute: 90%) verursachte.

ii) Zu einer Lösung aus 2,7 ml Allylalkohol und 6,5 ml Pyridin in 50 ml Methylenchlorid bei 0°C wurde eine

Lösung aus 10 g des Säurechlorids in 50 ml Methylenchlorid tropfenweise zugegeben. Man ließ das Gemisch auf Raumtemperatur aufwärmen und rührte über Nacht. Dann wurde die Lösung zweimal mit 2 N H_2SO_4 , wässrigem NaHCO_3 und Wasser gewaschen. Die organische Schicht wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde verdampft. Der so erhaltene Bis-allylester wurde aus Methanol umkristallisiert (Ausbeute: 90%).

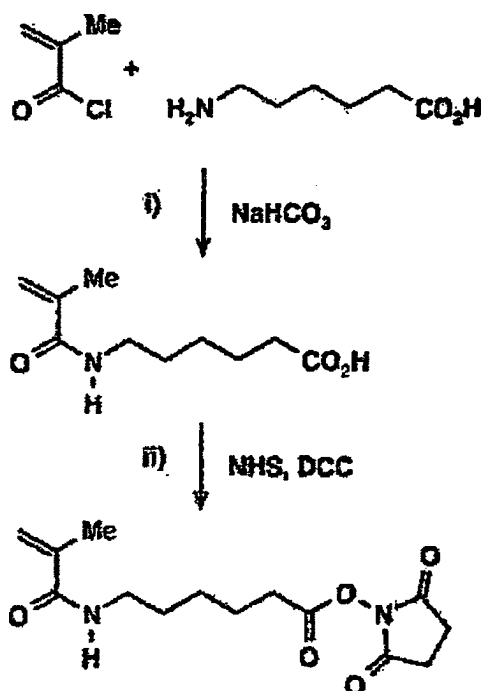
iii) Zu einer Suspension aus 3 g des Bis-allylesters in 30 ml Dimethylchlorsilan wurde eine Lösung aus 30 mg Hexachlorplatinsäure in 0,5 ml Dimethylether/Ethanol (1/1, Vol./Vol.) zugegeben und das Gemisch wurde für 3 h unter Rückfluss erhitzt. Der Silanüberschuss wurde verdampft, wobei sich die Verbindung 1 als fahlgrünes Öl in quantitativen Ausbeuten ergab. Der restliche Platinkatalysator wurde durch Filtration einer Methylenchloridlösung des Produkts über wasserfreiem Na_2SO_4 entfernt.

(2) Bilden einer Initiator-Monoschicht

[0071] Der unter (1) synthetisierte Initiator wird bei Raumtemperatur auf einer Glasoberfläche unter inerten Bedingungen (Atmosphäre aus trockenem Stickstoff) immobilisiert unter Verwendung von wasserfreiem Toluol als Lösungsmittel und trockenem Triethylamin als Katalysator. Die Toluollösung zeigt eine Konzentration des Initiators von etwa 50 mmol/l, es wird Triethylamin bis zu einer Konzentration von etwa 10 mmol/l zugegeben. Die Proben werden in der Lösung über Nacht belassen und dann durch extensives Spülen mit Methanol und Chloroform gereinigt.

(3) Synthese des funktionalisierten Monomers

[0072] Als ein Beispiel wird die Synthese von N-Methacryloyl-6-aminocapronsäurehydroxysuccinimidester beschrieben. Der Reaktionsweg wird nachstehend gezeigt. Die Indices i–iii in dieser Figur beziehen sich auf die Beschreibung der verschiedenen Schritte im Text.



i) Eine Lösung aus 13,2 g 6-Aminocapronsäure und 20 g NaHCO_3 in 100 ml Wasser und 50 ml 1,4-Dioxan wurde langsam zu einer Lösung aus 10,3 ml Methacrylsäurechlorid in 50 ml 1,4-Dioxan zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht gerührt. Dann wurden 50 ml Wasser zugegeben und das Gemisch wurde dreimal mit 100-ml-Portionen Ethylacetat gewaschen. Die Wasserschicht wurde mit verdünnter Salzsäure angesäuert (pH-Wert 2) und dann mit drei 100 ml-Portionen Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Schichten wurden über Na_2SO_4 getrocknet, auf ein Volumen von etwa 50 ml eingengt und zu 350 ml kaltem Hexan zugegeben. Dieses Gemisch wurde auf -20°C gekühlt und das Produkt trennte sich langsam über Nacht als weiße Kristalle ab (Ausbeute: ca. 14 g).

ii) Eine Lösung aus 14 g der Säure in 300 ml Methylenchlorid wurde auf 5°C gekühlt und 8,2 g N-Hydroxysuccinimid (NHS) und 14,6 g N,N-Dicyclohexylcarbodiimid wurden zugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei 5°C gehalten. Das Präzipitat (Dicyclohexylharnstoff) wurde abgefiltert und das Lösungsmittel wurde verdampft. Während dieses Schrittes trennte sich in einigen Fällen zusätzlicher Harnstoff ab und wurde

ebenfalls abgefiltert. Das rohe Produkt wurde aus Isopropanol umkristallisiert, um etwa 15 g des NHS-Ester-Monomers zu ergeben.

(4) Bildung einer polyfunktionellen Polymermonoschicht

[0073] Ein Comonomergemisch aus N,N-Dimethylacrylamid (DMAA) und dem aus (3) erhaltenen N-Methacryloyl-6-aminocaprinsäurehydroxysuccinimidester (C₆AE) wird in Dimethylformamid (DMF) als Lösungsmittel polymerisiert. Die Monomerkonzentration beträgt 4 mmol/l in einem molaren Verhältnis der Comonomere DMAA/C₆AE = 5/1. Die Polymerisation wird bei 60°C durchgeführt. Vor der Polymerisation werden die Lösungen alle vorsichtig entgast durch mindestens 3 Gefrier-Tau-Zyklen, um alle Sauerstoffspuren zu entfernen. Nach der Polymerisation wird jede Probe mit DMF für mindestens 10 Stunden extrahiert.

(5) Nachweis von Oligonukleotidsträngen

[0074] Die so erhaltene Oberfläche wurde 1 nl einer 10 µM Oligonukleotidlösung ausgesetzt und man lässt die Kupplungsreaktion bei etwa 40–50°C für zwei Stunden in einer wässrigen Lösung voranschreiten.

[0075] Das synthetische Oligonukleotid ist 5-amino-modifiziert, und die Lösung ist mit einem 100 mM Natriumphosphatpuffer bei einem pH-Wert von 8,0 gepuffert. Nach der Kupplungsreaktion wird die Sensoroberfläche mit Natriumphosphatpuffer gespült. Um die räumliche Ausdehnung der spezifischen Oligonukleotidtypen auf der Sensoroberfläche für den parallelen Nachweis zu definieren, wurde der Reaktant auf die Polymer-schicht aufgedruckt.

[0076] Man ließ die so hergestellte Oberfläche mit einem Cy5-markierten PCR-Produkt in einem Puffer aus 2 × SSC, 10% Dextransulfat und 50% Formamid für 12 h bei 28°C reagieren. Der DNA-Gehalt betrug 100 ng DNA/80 µl Probe. Nachdem die Hybridisierungsreaktion stattgefunden hatte, wurde die Oberfläche in SSC-Puffer gewaschen und das Ergebnis wurde fluorometrisch über Laseraktivierung mit einer CCD-Kamera nachgewiesen. Ein Fluoreszenzsignal konnte nur für solche Bereiche nachgewiesen werden, welche synthetische Oligonukleotide trugen, die zu dem PCR-Produkt komplementär waren.

Patentansprüche

1. Polyfunktionelle Polymermonoschicht, umfassend eine Anordnung von Polymerketten, die an einer Oberfläche gebunden sind, erhältlich durch ein Verfahren, das die Schritte umfasst:

- a) Bedecken der Oberfläche mit einer Monoschicht eines Polymerisationsinitiators, welcher ein oder mehrere funktionelle Gruppen umfasst, die zur Bindung an der Oberfläche geeignet sind; und
- b) Initiieren und Durchführen einer Polymerisationsreaktion in Gegenwart von Monomeren, die funktionelle Gruppen tragen, die eine Kupplungsreaktion der erhaltenen Polymerkette mit spezifischen Probenmolekülen ermöglichen,

wobei jede Polymerkette eine Vielzahl von identischen oder verschiedenen Einheiten umfasst, die eine oder mehrere funktionelle Gruppen tragen, die eine Wechselwirkung des Polymers mit einem Proben- oder Sondenmolekül ermöglichen, und wobei die Polymerketten ein Fragment des Initiators in ihrer Struktur zurückbehalten, welches diese auf der Oberfläche immobilisiert.

2. Polymermonoschicht gemäß Anspruch 1, wobei die Polymerketten kovalent an der Oberfläche gebunden sind.

3. Polymermonoschicht gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei die funktionellen Gruppen aus Carbonsäuren, Maleinimiden, N-Hydroxysuccinimiden, Epoxiden, Isothiocyanaten, Isocyanaten oder Aziden ausgewählt sind.

4. Polymermonoschicht gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Probenmolekül oder das Sondenmolekül aus Proteinen, Peptiden, Polysacchariden oder Nukleinsäuren und Derivaten davon ausgewählt ist.

5. Polymermonoschicht gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Polymer Segmente umfasst, welche die Schicht wasserquellbar machen.

6. Polymermonoschicht gemäß Anspruch 5, wobei die Wasserquellbarkeit durch Monomere bereitgestellt wird, welche aus Acrylsäure, Methacrylsäure, Dimethylacrylamid oder Vinylpyrrolidon ausgewählt sind.

7. Polymermonoschicht gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, 5 und 6, welches weiterhin eine Vielzahl von

identischen oder verschiedenen Sondenmolekülen umfasst, die an der Polymerkette durch eine Reaktion mit den funktionellen Gruppen immobilisiert sind.

8. Polymermonoschicht gemäß Anspruch 7, wobei die Sondenmoleküle aus Nukleinsäuren, PNAs, Polysacchariden, Proteinen und Peptiden ausgewählt sind.

9. Oberfläche, die eine Polymermonoschicht gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 trägt.

10. Oberfläche gemäß Anspruch 9, wobei die Polymerketten in der Form von musterförmigen Arrays vorliegen.

11. Verfahren zur Herstellung einer polyfunktionellen Polymermonoschicht gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, umfassend die Schritte:

- a) Bedecken der Oberfläche mit einer Monoschicht eines Polymerisationsinitiators, der ein oder mehrere funktionelle Gruppen zur Bindung an der Oberfläche umfasst; und
- b) Initiieren und Durchführen einer Polymerisationsreaktion in Gegenwart von Monomeren, die funktionelle Gruppen tragen, die eine Kupplungsreaktion der erhaltenen Polymerkette mit spezifischen Probenmolekülen ermöglichen.

12. Verfahren gemäß Anspruch 11, wobei der Initiator ein Chlorsilan, ein Alkoxysilan, ein Disulfid oder eine Thiolgruppe umfasst.

13. Verfahren gemäß Anspruch 11 oder 12, wobei der Initiator eine Gruppe umfasst, die aus Azogruppen, Peroxogruppen oder einer Ketogruppe in Konjugation mit einem aromatischen System, ausgewählt ist.

14. Verfahren gemäß Anspruch 13, wobei der Initiator eine Gruppe umfasst, die aus aromatischen Ketonen oder aromatischen Ketonen, die Schwefel enthalten, ausgewählt ist.

15. Verfahren zur Detektion von Nukleinsäureprobenmolekülen, das eine Polymermonoschicht gemäß Anspruch 7 oder 8 verwendet, welches die Schritte umfasst

- a) Ermöglichen einer Hybridisierungsreaktion zwischen der Sonde und der Probe, gefolgt von
- b) Entfernen der nicht hybridisierten Nukleinsäuremoleküle in einem Waschschrift und
- c) Detektion der hybridisierten Nukleinsäuremoleküle.

16. Verfahren zur Reinigung einer Verbindung aus einer Probe umfassend die Schritte

- (a) Kontaktieren der Probe mit einer Polymermonoschicht gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 unter Bedingungen, die es ermöglichen, dass die Verbindung an die funktionelle Gruppe der Polymerkette oder des Sondenmoleküls bindet;
- (b) und Entfernen des Materials aus der Probe, das nicht an die Polymerschicht oder an ein Sondenmolekül gebunden wurde.

17. Verfahren gemäß Anspruch 16, welches weiterhin umfasst

- (c) Eluieren des gebundenen Komplexes aus der Polymerschicht.

18. Verfahren gemäß Anspruch 16 oder 17, wobei die Verbindung eine Nukleinsäure, ein (Poly)saccharid oder ein (Poly)peptid oder ein Komplex davon ist, vorzugsweise ein Antikörper oder ein Fragment oder Derivat davon.

19. Verwendung einer Oberfläche gemäß Anspruch 9 oder 10 als eine Affinitätsmatrix.

20. Verwendung einer Oberfläche gemäß Anspruch 9 oder 10 in einem Sensorchip.

21. Medizinisches oder diagnostisches Instrument, umfassend eine Oberfläche gemäß Anspruch 9 oder 10.

22. Verwendung einer Oberfläche gemäß Anspruch 9 oder 10 zur Immobilisierung von Startermolekülen zur Bildung von Oligo- oder Polymeren, vorzugsweise zur Nukleinsäure- oder Peptidsynthese.

23. Verwendung einer Polymerschicht gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 als ein Gel bei der Trennung

von Molekülen in einem elektrischen Feld.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1

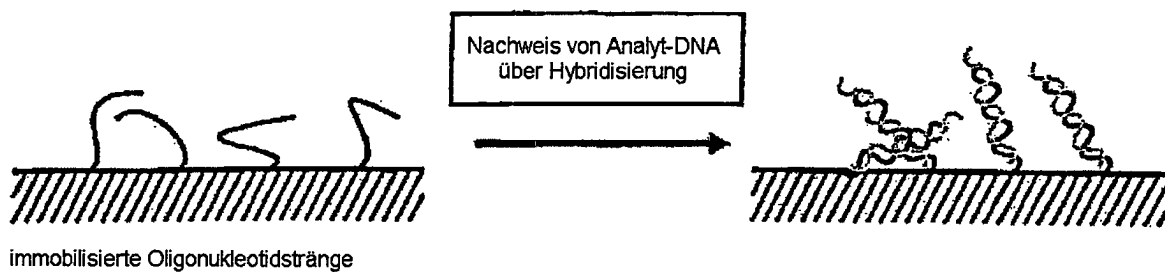


Fig. 2

funktionelle Polymerbürste

