



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 31 772 T2** 2007.09.06

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 173 620 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 31 772.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/11282**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 928 450.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/065097**

(86) PCT-Anmeldetag: **26.04.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **02.11.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **23.01.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **08.11.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.09.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/68** (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
299831 26.04.1999 US

(73) Patentinhaber:
Biocept, Inc., San Diego, Calif., US

(74) Vertreter:
HOFFMANN & EITLE, 81925 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:
**HAHN, Soonkap, San Clemente, CA 92672, US;
FAGNANI, Roberto, La Jolla, CA 92037, US;
TSINBERG, Pavel, San Diego, CA 92122, US**

(54) Bezeichnung: **BIOCHIP SOWIE VERFAHREN ZU DESSEN HERSTELLUNG**

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft neue Verfahren zur Herstellung von Biochips und die daraus hervorgehenden Biochips. Insbesondere stellt das hier beschriebene neue Verfahren die schnelle, einfache und die kostengünstige Herstellung von Biochips durch Verwendung von Isocyanat-funktionalen Hydrogelen bereit, um biomolekulare Sonden auf dem Substrat zu immobilisieren. Insbesondere werden sowohl in organischen Lösungsmitteln lösliche Biomoleküle wie Peptid-Nucleinsäuren (PNAs), und wasserlösliche Biomoleküle, wie DNA, RNA und andere Oligonucleotide, entweder vor oder während der Polymerisierung einfach und effizient an ein hydrophiles Polymer gebunden. Zusätzlich zu dem verbesserten Herstellungsverfahren der Biochips, das hier beschrieben ist, haben die Biochips selbst verbesserte Eigenschaften, einschließlich einer besseren Stabilität, was eine verbesserte Lagerfähigkeit und größere Flexibilität bei der Verwendung ermöglicht. Solche Biochips sind für die Genentdeckung, Gencharakterisierung, funktionale Genstudien, Screening nach biologischer Wirkung und ähnliche Studien nützlich.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Mittel, die selektiv an DNA, RNA oder Analoga binden, wie Peptid-Nucleinsäuren (PNAs) sind von bedeutendem Interesse für die Molekularbiologie und die medizinische Chemie, da sie in auf Gene abzielenden Medikamenten für diagnostische und therapeutische Anwendungen entwickelt werden können, sowie als Werkzeuge für die Sequenz-spezifische Modifizierung von DNA verwendet werden können. Zusätzlich können solche Reagentien als Werkzeuge für die Bestimmung von Gensequenzen und für die funktionalen Genanalysen verwendet werden.

[0003] Bis vor kurzem sind Verfahren zur Genentdeckung, Charakterisierung und für funktionale Genanalysen schwierig und kostenintensiv gewesen, und haben beträchtlichen zeitlichen Aufwand gefordert. Innerhalb der letzten zehn Jahre jedoch sind Verfahren zum Isolieren von Anordnungen von Biomolekülen auf verschiedenen Trägern, als Biochips bezeichnet, entwickelt worden, und sie sind für die DNA-Synthese, die Sequenzierung, für Mutationsstudien, die Genexpressionsanalyse und die Genentdeckung verwendet worden. Im Allgemeinen sind Biochips Micromatrizes (z.B. Microarrays) von Biomolekülen, die an ein Substrat gebunden sind, entweder direkt oder durch eine Bindungsgruppe, oder seit kürzerem mit Hilfe einer Gelschicht. Die meisten Biochips sind so entworfen, dass sie die Synthese von Biomolekülen an bekannten Stellen auf einem Substrat erleichtern. Beispielsweise benutzt ein solcher Biochip Licht und eine Reihe photolithographischer Masken, um spezifische Stellen auf dem Substrat zu aktivieren, wie beispielsweise Glas, um Nucleinsäuren hierauf selektiv zu binden, und um anschließend zusätzlich Nucleinsäuren anzuhängen, um an gewünschten Stellen bekannte Oligonucleotide zu bilden. Dieses Verfahren der Verwendung von Licht und photolithographischen Masken, um spezifische Stellen auf einem Substrat zu aktivieren, ähnelt Verfahren, die in der Herstellung von Mikroelektroden-Halbleiterchips benutzt werden.

[0004] Leider sind diese Biochips der ersten Generation sehr teuer in der Herstellung, sie benötigen große Kapitalaufwendungen, und Verfahren zum Herstellen und die Ausrüstung dafür. Außerdem führt dieses Syntheseverfahren der Herstellung von Oligonucleotiden in einer einzelnen Schicht auf einem Substrat in einem Biochip niedriger Empfindlichkeit dazu, dass man ein teures Laser-Confocal-Fluoreszenzmikroskop für die adäquate Detektierung der DNA, die spezifisch an den Chip hybridisiert ist, benötigt. Das U.S. Patent Nr. 5,744,305, das Fodor et al. verliehen wurde (nachfolgend das '305er-Patent) stellt ein Beispiel der Verwendung von photolabilen Schutzgruppen und der Photolithographie dar, um Anordnungen von Materialien zu erzeugen, die auf ein Substrat angebracht sind, wobei eine Synthesestrategie zur Erzeugung einer chemischen Diversität in großem Maßstab beschrieben ist, bei der ein Substrat, wie Glas, derivatisiert wird, entweder direkt oder durch die Zugabe eines Linkermoleküls, um eine Aminogruppe einzuschließen, die mit einer photolabilen Schutzgruppe blockiert ist. Maskierungstechniken werden verwendet, um eine selektive Entschützung der photolabilen Gruppen innerhalb der angegebenen, bekannten Stelle auf dem Substrat zu erlauben. Die entschützte Region wird dann mit einem „Baustein“-Molekül umgesetzt, z.B. mit einem Oligonucleotid, welches ebenfalls eine photolabile Schutzgruppe enthält, so dass das Baustein-Molekül kovalent an die aktive Gruppe auf der Oberfläche des Substrats (oder an das Bindungsmolekül) gebunden ist. Dieses Verfahren wird dann wiederholt, indem die Masken verwendet werden, um die Synthese von Polymeren zu leiten, z.B. von Biomolekülen, wie Oligonucleotiden oder Peptiden, oder von spezifischen Sequenzen an vorherbestimmten Stellen auf dem Substrat.

[0005] Die Synthesestrategien, die in dem '305er-Patent beschrieben sind, ziehen auch die Bereitstellung einer Menge von ungefähr 10 bis ungefähr 10^8 verschiedener Sequenzen auf einem einzelnen Substrat in Erwägung. Zusätzlich wird ausgesagt, dass die vorher definierten Bereiche auf dem Substrat, auf denen indivi-

duelle Polymere synthetisiert werden sollen, von ungefähr 10^{-10} cm² bis ungefähr 1 cm² betragen. Während die in dem '305er Patent dargestellten Beispiele hauptsächlich die Synthese von Peptiden und Nucleotiden einschließen, wird gesagt, dass die gleichen Techniken auch verwendet werden können, um andere Polymere zu synthetisieren. Gleichmaßen werden zahlreiche Bindegruppen, bevorzugt inaktive oder träge, zur Vernetzung der synthetisierten Polymere an das Substrat in dem '305er Patent diskutiert, wie auch zahlreiche Schutzgruppen zum Schützen einer aktiven Stelle des Monomers, wobei die Schutzgruppen selektiv für die direkte Synthese des Polymers entfernt werden können. Im '305er Patent wird ebenfalls in gewissen Details eine binäre Maskierungstechnik beschrieben, die in einer Ausführungsform für die direkte Synthese der Anordnung benutzt wird. Leider leiden die in dem '305er Patent beschriebenen Strategien an vielen der gleichen Nachteile wie andere Verfahren und Apparate des Stands der Technik. Die Anordnungen sind teuer in der Herstellung und der Verwendung, benötigen mehrere Schritte und lange Inkubations-/Waschzeiten während der Herstellung und bedeutenderweise erlauben sie die Synthese nur in einer einzelnen Schicht.

[0006] Im Hinblick auf die niedrige Sensitivität dieser Biochips der ersten Generation sind Biochips der zweiten Generation entwickelt worden.

[0007] Ein Beispiel eines Biochips der zweiten Generation wird in den U.S. Patent Nr. 5,736,257 und 5,847,019 beschrieben, die an Conrad et al. erteilt wurden. Die '257er und '019er Patente beschreiben ein Verfahren zum Synthetisieren eines Biochips, umfassend das Bereitstellen eines Substrats wie Glas mit Oberflächenhydroxylgruppen; das Umsetzen der Subratoberflächen-Hydroxylgruppen mit Silanen, um eine molekulare Schicht aus Vinylgruppen an das Substrat zu binden; das Platzieren einer Acrylamidverbindung auf der Molekülschicht, wobei die Acrylamidverbindung an einer Frei-Radikal-Polymerisierungsreaktion teilnehmen kann, um eine polymerisierte Netzwerkschicht zu bilden, die an die molekulare Schicht gebunden ist; die Photo-Aktivierung der polymerisierten Netzwerkschicht, um ein gemustertes, Photo-aktiviertes Polymerisierungsnetzwerk zu bilden; und das Platzieren einer oder mehrerer ähnlicher oder unähnlicher Biomoleküle auf der Photo-aktivierten polymerisierten Netzwerkschicht, um an die gemusterte Photo-aktivierte polymerisierte Netzwerkschicht zu binden.

[0008] Die Biochips, die in den '257er und '019er Patenten offenbart sind, sind in etwa ähnlich den Biochips der ersten Generation von Fodor et al., da sie photolithographische Techniken für die direkte Bindung (oder Synthese) von Biomolekülen in der Anordnung benutzen. Im Gegensatz zu den Biochips der ersten Generation jedoch benutzen die Biochips der '257er und '019er Patente ein Polyacrylamidnetzwerk auf einer molekularen Schicht aus Vinylgruppen, wodurch den Gelzellen eine dritte Dimension verliehen wird. Wie jedoch den Fachleuten auf dem Gebiet leicht zu erkennen sein wird, ist die Herstellung von Biochips nach den Offenbarungen der '257er und '019er Patente nicht nur teuer, sondern auch zeitaufwändig.

[0009] Das U.S. Patent Nr. 5,552,270, das Khrapko et al. erteilt wurde, beschreibt ein Verfahren zum Sequenzieren von DNA, das einen Biochip der zweiten Generation benutzt, welcher einen festen Träger in einer Matrix umfasst, die eine Anordnung von Oligonucleotiden gewünschter Längen einschließt. Die Matrix wird mit Hilfe einer Gelschicht mit einer Dicke von 30 µm oder weniger auf den Träger aufgetragen; eine Gelschicht ist in Form eines Satzes voneinander räumlich getrennter viereckiger „Punkte“ beschrieben. Im Gegensatz zu dem Format in Einzelschicht, das in dem '305er Patent beschrieben ist, stellt die Gelschicht des '270er Patents die dreidimensionale Anhängung von Oligonucleotiden an das Substrat in einer Menge bereit, die daher die Menge der mono-molekularen Schicht der Biochips der ersten Generation überschreitet. Dieser Biochip der zweiten Generation polymerisiert ein Polyacrylamidgel zwischen zwei Glasdeckelchen, die ungefähr 30 µm voneinander entfernt sind. Ein Glasdeckelchen wird entfernt, und der mit Gel beschichtete untere Glasstreifen wird getrocknet. Teile des Gels werden dann mechanisch entfernt, um die voneinander getrennten Punkte zurückzulassen. In alternativen Ausführungsformen, die auch Polyacrylamid-Matrizes verwenden, wie in den U.S. Patent Nr. 5,741,700, 5,770,721 und 5,756,050 beschrieben sind, die an Ershov et al. erteilt wurden, werden Gelteile von dem Glas unter Verwendung eines Lasers entfernt.

[0010] Obwohl die Polyacrylamidgel-Matrizes, die in den Ershov et al.-Patenten und dem '270er Khrapko-Patent beschrieben sind, Hydrogele sind, die einen Wassergehalt im Gleichgewicht von ungefähr 95 % bis 97 % haben, und eine günstige Diffundierbarkeit für Zielmoleküle, wie DNA, aufweisen, haben sie signifikante Nachteile. Ein signifikanter Nachteil eines solchen Biochips der zweiten Generation sind ihre Kosten. Die auf Polyacrylamid basierenden Biochips, die von Ershov et al. beschrieben sind, beruhen auf der Polymerisierung von Acrylamid-Monomeren durch Frei-Radikal-Initiierung oder ultraviolette Bestrahlungsverfahren; jedoch werden diese Polyacrylamid-basierten Gel-Biochips in einem Mehrschrittverfahren hergestellt, das langwierig und arbeitsintensiv ist. Die Herstellung eines solchen Biochips macht eine aufwändige Mehrschrittverarbeitung notwendig, einschließlich der Polymerisierung und der Bindung an die Oberfläche des Glassubstrats; mechani-

sche oder Laser-Schneidschritte, um Mikro-Quadrate der Gelmatrix auf dem Substrat zu bilden; einen Aktivierungsschritt unter Verwendung von Hydrazinen; schließlich die Reaktion mit Oligonucleotiden. Aufgrund des Polymerisierungsschrittes inhärenter Polyacrylamidgele, müssen diese Schritte unabhängig voneinander durchgeführt werden. Das bedeutet, dass die Gesamtdauer, die benötigt wird, um einen einzelnen Biochip in einem solchen Verfahren herzustellen, mindestens ungefähr 24 bis 48 Stunden beträgt. Außerdem müssen nach jedem Schritt intensive Wasch-Schritte und/oder andere Spezialbehandlungen ausgeführt werden, bevor der nächste Schritt begonnen wird. Beispielsweise macht der Oligonucleotid-Derivatisierungsschritt eine lange Inkubationszeit, wie 24 bis 48 Stunden notwendig. WO-A-94/09125 offenbart eine Matrix aus einem absorbierenden Schaum, wie Polyurethan, welcher in einem Bioreaktor verwendet wird, welcher bioaktive Moleküle enthält. Das aktive Material kann innerhalb der Matrix suspendiert sein, indem es in situ co-polymerisiert wird. Ein weiterer signifikanter Nachteil solcher Biochips der zweiten Generation liegt in der Tatsache, dass die Reaktion der Oligonucleotide mit den Hydrazingruppen instabile Morpholin-Derivate bildet, die zu einer sehr kurzen Lagerfähigkeit des Biochips von ungefähr 36 Stunden bei Raumtemperatur führen.

[0011] Daher gibt es in der Industrie einen erheblichen Bedarf nach einem einfachen, kostengünstigen, schnellen Verfahren zur Herstellung eines verlässlichen multifunktionalen Biochips mit hoher Sensitivität, und einer vernünftig langen Lagerzeit, die in der Genentdeckung, Gencharakterisierung, funktionalen Genanalyse und ähnlichen Studien verwendet werden können.

Zusammenfassung der Erfindung

[0012] Die vorliegende Erfindung stellt ein schnelles, einfaches, kostengünstiges Verfahren zur Herstellung eines verbesserten Biochips bereit, und einen daraus resultierenden verbesserten Biochip. Beispielsweise erlaubt das hier beschriebene Verfahren, dass biomolekulare Sonden vor- oder gleichzeitig mit der Polymerisierung des Gels gebunden werden. Des Weiteren werden hier verbesserte Biochips mit verbesserter Sensitivität, besserer Stabilität, sowohl bei der Verwendung und im Hinblick auf die Lagerfähigkeit, und mit verbesserter Kostenwirksamkeit bereitgestellt.

[0013] Diese Biochips können durch Dispergieren von optisch transparenten Mikrotröpfchen auf einem Hydrogelpräpolymer mit biomolekularen Sonden, die in geeigneter Weise, z.B. kovalent, auf ein Substrat gebunden werden, gebildet werden. Es kann jedoch vorzuziehen sein, Isocyanat-funktionale Hydrogel-Biochips herzustellen, die ein Biomolekül darauf immobilisiert haben, indem eine organische Lösungsmittel-Lösung eines Isocyanat-funktionalen Hydrogel-Präpolymers bereitgestellt wird, durch das Bereitstellen einer gepufferten wässrigen Lösung des Biomoleküls, das darauf immobilisiert werden soll, durch das Mischen der zwei Lösungen, um das Biomolekül auf dem Hydrogel-Präpolymer kovalent zu binden, während die Polymerisierung initiiert wird; und dann das Dispergieren des polymerisierenden Hydrogel-Präpolymers auf einem festen Substrat, so dass das polymerisierte Hydrogel in geeigneter Weise an ein solches Substrat gebunden wird. In einigen bevorzugten Ausführungsformen hat das Hydrogel ausreichende aktive Isocyanatgruppen, um sowohl an der kovalenten Bindung der biomolekularen Sonden auf dem Hydrogel-Präpolymer, wie auch an der Polymerisierung des Hydrogels teilzunehmen.

[0014] In einem Aspekt wird ein Verfahren zum Herstellen eines Hydrogel-Biochips mit einem darauf immobilisierten Biomolekül bereitgestellt, wobei das Verfahren die Schritte des (a) Bereitstellens einer organischen Lösungsmittel-Lösung eines Isocyanat-funktionalen Hydrogel-Präpolymers, (b) das Bereitstellen einer Lösung eines Biomoleküls, (c) das kovalente Binden des Biomoleküls an das Hydrogel-Präpolymer und (d) das Initiieren der Polymerisierung des Hydrogel-Präpolymers umfasst.

[0015] In einem weiteren Aspekt wird ein Verfahren zum Herstellen eines Biochips in einem organischen Lösungsmittel-löslichem Biomolekül bereitgestellt, das hieran kovalent gebunden ist, wobei das Verfahren (a) das Bereitstellen eines festen Substrats mit einer oberen Oberfläche, (b) das Bereitstellen einer Lösung, die das Biomolekül in einem aprotischen organischen Lösungsmittel umfasst, (c) das Bereitstellen eines Isocyanat-funktionalen Hydrogel-Präpolymers in einem aprotischen organischen Lösungsmittel, (d) das Derivatisieren des Präpolymers mit dem Biomolekül aus Schritt (b), (e) das Initiieren der Polymerisierung des derivatisierten Hydrogel-Präpolymers aus Schritt (d) durch Zugabe einer gepufferten wässrigen Lösung dazu, und (f) das Mikro-punktuellen Auftragen der polymerisierenden Hydrogel-Lösung aus Schritt (e) auf die obere Oberfläche des Substrats aus Schritt (a) umfasst, was zu einer Haftung des Hydrogels und des immobilisierten Biomoleküls an das Substrat führt.

[0016] In einem weiteren Aspekt wird ein Biochip bereitgestellt, der (a) ein festes Substrat mit einer oberen Oberfläche, (b) eine Vielzahl an Hydrogelzellen, die kovalent an die obere Oberfläche des Substrats gebunden

sind, wobei jede Hydrogelzelle aus einem Isocyanat-funktionalen Polymer gebildet wird, und (c) einer biomolekularen Sonde, die kovalent an und in mindestens eine der Hydrogelzellen gebunden ist, umfasst. Vorzugsweise wird in jeder Hydrogelzelle eine andere biomolekulare Probe gebunden, und vorzugsweise findet die kovalente Bindung über die Isocyanatgruppen statt.

[0017] In einem weiteren Aspekt wird ein Biochip bereitgestellt, der (a) ein festes Substrat mit einer oberen Oberfläche, (b) eine Vielzahl an Hydrogelzellen, die kovalent an die obere Oberfläche des Substrats gebunden sind, wobei das Hydrogel Polyethylenglucol, Polypropylenglucol oder Co-Polymere daraus umfasst, und (c) verschiedene biomolekulare Proben, die kovalent an und in verschiedene Hydrogelzellen gebunden sind, bereitstellt.

[0018] In noch einem weiteren Aspekt wird ein Biochip bereitgestellt, der (a) ein festes Substrat mit einer oberen Oberfläche, (b) eine Vielzahl an Hydrogelzellen, die kovalent an die obere Oberfläche des Substrats gebunden sind, wobei das Hydrogel ein Polymer mit Urethan-Harnstoff-Bindungen umfasst, und (c) verschiedene biomolekulare Sonden, die kovalent an und in verschiedene Hydrogelzellen gebunden sind, umfasst.

[0019] In noch einem weiteren Aspekt wird ein Hybridisierungs-Assay bereitgestellt, der (a) das Bereitstellen eines Biochips, der ein Substrat mit mindestens zwei Hydrogelzellen umfasst, die daran gebunden sind, wobei jede Zelle eine Dicke von mindestens ungefähr 20 µm hat, und einen Hauptanteil eines Polymers umfasst, das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Polyethylenglucol, Polypropylenglycol und Co-Polymeren daraus, wobei mindestens eine Hydrogelzelle außerdem eine biomolekulare Sonde umfasst, die daran kovalent gebunden ist, (b) Kontaktieren des Biochips unter Hybridisierungsbedingungen, mit einer Analyt-Lösung, die ein Ziel-Biomolekül enthält, (c) Waschen des Hydrogel-Biochips unter Bedingungen, die nicht spezifisch gebundene und ungebundene Ziel-Biomoleküle entfernen, und (d) Detektieren des gebunden Ziel-Biomoleküls, umfasst.

[0020] In einem weiteren Aspekt wird ein Hybridisierungs-Assay bereitgestellt, der umfasst (a) das Bereitstellen einer organischen Lösungsmittel-Lösung eines Hydrogel-Präpolymers mit einem aktiven Isocyanat-Gehalt von weniger als ungefähr 1 mÄq/g, (b) das Bereitstellen einer Lösung eines Biomoleküls, (c) das kovalente Binden des Biomoleküls an mindestens einen Teil des Hydrogel-Präpolymers, (d) das Initiieren der Polymerisierung des Hydrogel-Präpolymers, (e) das Dispergieren des polymerisierenden Hydrogel-Präpolymers auf einem festen Substrat, so dass diese Lösung kovalent in einer Dicke von mindestens ungefähr 20 µm an das Substrat gebunden ist, wodurch ein Biochip gebildet wird, (f) Waschen des Biochips aus Schritt (e) mit Waschpuffer, so dass die verbleibenden aktiven Stellen innerhalb des Hydrogels blockiert werden, (g) Kontaktieren des gewaschenen Biochips mit einer Analyt-Lösung, die ein Ziel-Biomolekül enthält, unter Hybridisierungsbedingungen, (h) dann Waschen des Biochips aus Schritt (g) mit einem zweiten Waschpuffer, so dass nicht spezifisch gebundene und ungebundene Ziel-Biomoleküle entfernt werden, und (i) Detektieren des Ziel-Biomoleküls, das an den Hydrogel-Chip gebunden ist.

[0021] Vorzugsweise enthält jedes Microtröpfchen aus Hydrogel auf einem Biochip eine unterschiedliche biomolekulare Sonde, wodurch das Screening einer großen Anzahl an biomolekularen Sonden als Teil eines einzelnen Hybridisierungs-Assays erlaubt wird. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die biomolekularen Sonden, die beim Herstellen des Biochips verwendet werden, PNA-Sonden, die überlegene Screening-Funktionen verglichen mit traditionellen DNA- und/oder RNA-Oligonucleotiden bereitstellen. Alternativ dazu werden DNA, RNA und andere Oligonucleotidsonden zusammen mit einer auf Polyurethan basierenden oder einer anderen Isocyanat-funktionalen Gelmatrix verwendet.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0022] [Fig. 1](#) ist eine schematische Darstellung der Reaktion eines Hydrogel-Präpolymers mit einem organischen, löslichen Biomolekül, gefolgt von der Polymerisierung des Hydrogels als Teil eines Verfahrens, das zahlreiche Merkmale der vorliegenden Erfindung verkörpert.

[0023] [Fig. 2](#) ist eine schematische Darstellung der alternativen Reaktion eines Hydrogel-Präpolymers mit einem wasserlöslichen Biomolekül, wie DNA, während der Polymerisierung des Hydrogels.

Detaillierte Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

[0024] Um eine dreidimensionale Gelmatrix bereitzustellen, die bei der Herstellung eines Biochips nützlich ist, sollte das ausgewählte Polymer, das die Gelmatrix umfasst, vorzugsweise eine Anzahl der gewünschten Ei-

genschaften haben, wie: 1) adäquate Porengröße und hohen Wassergehalt, um die Diffusion der Moleküle in und aus der Matrix zu erlauben; 2) die Fähigkeit, an die Oberfläche eines Substrats zu binden, z.B. an Glas; 3) ausreichende Transparenz im vollständig polymerisierten Zustand, um die optischen Interferenzen mit fluoreszierenden Markierungen zu reduzieren; 4) hinreichende strukturelle Integrität, wenn es vollständig polymerisiert ist, um den Kräften zu widerstehen, die während der Verwendung ausgeübt werden, und 5) adäquate Lagerstabilität für die normale Recherche und die klinische Verwendung. Außerdem sollte das ausgewählte Gel vorzugsweise leicht herzustellen und zu verwenden sein.

[0025] Hydrogele sind eine Klasse an Polymeren, die diese Kriterien erfüllen. Hydrogele sind hydrophile Netzwerkpolymere, die im dehydrierten Zustand glasartig sind, und in Gegenwart von Wasser aufquellen, um ein elastisches Gel zu bilden.

[0026] Im Gegensatz zu den Polyacrylamid-Gelsystemen von Ershov et al. und Khrapko et al. ist jetzt entdeckt worden, dass Isocyanat-funktionalen Hydrogelen die meisten der Nachteile der auf Polyacrylamid basierenden Gele fehlen, obwohl sie eine Anzahl bedeutender Vorteile gegenüber dem Stand der Technik haben. Isocyanat-funktionale Hydrogel-Polymere sind gut bekannt, und sind umfassend bei der Herstellung von Absorptionsmaterialien, wie chirurgischen Verbänden, Windeln, Bett-Unterlagen, Binden und ähnlichen verwendet worden.

[0027] Unter Isocyanat-funktionalen Hydrogelen werden organische Polymere verstanden, die mit Isocyanatgruppen verkappt sind, die so wirken, dass sie die gewünschten Polymerisierungseigenschaften ausüben, und auch kovalent an die Biomoleküle von Interesse binden können. Beispielsweise können es Polyurethane sein, die durch Umsetzung zwischen Diisocyanaten und Polyether oder Polyesterpolyolen gebildet werden.

[0028] Die als Ausgangsmaterial für diese Isocyanat-funktionalen Hydrogele verwendeten Präpolymere stellen vorzugsweise hydratisiertes Polyurethan, Polyharnstoff-Urethan und/oder Polyharnstoff-Polymergele bereit. Polyurethan-Polymere sind gut im Fachgebiet bekannt. Hydrogel-Polymere sind aus zahlreichen Präpolymeren hergestellt und für eine große Anzahl an Anwendungen verwendet worden. Typischerweise werden Hydrogele durch Polymerisieren eines hydrophilen Monomers in einer wässrigen Lösung unter Bedingungen gebildet, die das Präpolymer vernetzen lassen, wodurch ein dreidimensionales, polymeres Netzwerk gebildet wird, welches die Lösung in konzentrierter Form geliert. Polyurethan-Hydrogele werden durch die Polymerisierung von Isocyanat-endverkappten Präpolymeren gebildet, um Harnstoff- und Urethan-Bindungen zu erzeugen.

[0029] Die Isocyanat-funktionalen Präpolymere werden häufig aus relativ hoch-molekulargewichtigen Polyoxyalkylendiolen oder Polyolen hergestellt, die mit difunktionalen oder polyfunktionalen Isocyanat-Verbindungen umgesetzt werden. Die bevorzugten Präpolymere, werden aus Polyoxyalkylendiolen oder Polyolen hergestellt, welche Homopolymere aus Ethylenoxideinheiten oder Block- oder Zufalls-Copolymere umfassen, die Gemische aus Ethylenoxid-Einheiten und Propylenoxid- oder Butylenoxid-Einheiten enthalten. Im Fall von Block- oder Zufalls-Copolymeren sollten mindestens 75 % der Einheiten Ethylenoxid-Einheiten sein. Das Molekulargewicht des Polyoxyalkylendiols oder Polyols liegt bevorzugt bei 2.000 bis 30.000, mehr bevorzugt bei 5.000 bis 30.000. Geeignete Präpolymere können durch das Umsetzen ausgewählter Polyoxyalkylendiole oder Polyole mit Polyisocyanat hergestellt werden, bei einem Isocyanat-zu-Hydroxyl-Ratio-Verhältnis von ungefähr 1,2 bis ungefähr 2,2, so dass im Wesentlichen alle Hydroxylgruppen mit Polyisocyanat verkappt werden. Das Isocyanat-funktionale Präpolymer, das in dieser Erfindung vorzugsweise verwendet wird, enthält aktive Isocyanate in einer Menge von ungefähr 0,1 mÄq/g, bis ungefähr 1 mÄq/g, vorzugsweise ungefähr 0,2 mÄq/g bis ungefähr 0,8 mÄq/g. Im Allgemeinen sollte ein niedermolekular-gewichtiges Präpolymer, von z.B. weniger als 2.000, einen relativ hohen Isocyanatgehalt enthalten (ungefähr 1 mÄq/g oder höher). Die Polymerisierungsrate einiger dieser Präpolymere kann sehr schwer kontrollierbar sein, und kann zu einer zu schnellen Polymerisierung führen, um einen wirksamen Mikropot zu bilden. Diese Präpolymere haben auch einen so hohen Isocyanatgehalt, dass sie nach der Polymerisierung einen relativ hohen Gehalt an freien Aminen zurücklassen, deren positive Ladungen die unspezifische Bindung mit negativ geladenen Ziel-DNA-Proben erhöhen, was zu hohen Hintergrundsignalen führt. Daher werden hochmolekulargewichtige Präpolymere, die einen relativ geringen Isocyanatgehalt haben, für bestimmte Anwendungen bevorzugt.

[0030] Solche hochmolekulargewichtigen Präpolymere werden häufig entweder durch zwei allgemeine Verfahren hergestellt, aber andere können ebenfalls verwendet werden:

- (1) Hochmolekulargewicht-Polyol (Triol oder höher, Molekulargewicht mindestens 2.000) wird mit Polyisocyanat, wie Isophorondiisocyanat umgesetzt; und
- (2) Hochmolekulargewichtiges Diol (Molekulargewicht mindestens 2.000) wird mit Polyisocyanat und einem Vernetzungsmittel wie Glycerol, Trimethylolpropan, Trimethylolethan, Triethanolamin oder organischem Tri-

amin umgesetzt.

[0031] Aromatische, aliphatische oder cycloaliphatische Polyisocyanate können verwendet werden. Die hochmolekulargewichtigen aliphatischen Isocyanat-verkappten Präpolymere gelieren typischerweise in ungefähr 20 bis 90 Minuten in einen hydratierten Polymerzustand, während Präpolymere, die mit aromatischen Polyisocyanaten verkappt sind, schneller gelieren. Beispiele geeigneter di- und polyfunktionaler Isocyanate sind Folgende: Toluol-2,4-diisocyanat, Toluol-2,6-diisocyanat, Isophorondiisocyanat, Ethylendiisocyanat, Ethylidendiisocyanat, Propylen-1,2-diisocyanat, Cyclobexylen-1,2-diisocyanat, Cyclohexylen-1,4-diisocyanat, m-Phenylendiisocyanat, 3,3'-Diphenyl-4,4'-biphenylendiisocyanat, 1,6-Hexamethylendiisocyanat, 1,4-Tetramethylendiisocyanat, 1,10-Decamethylendiisocyanat, Cumen-2,4-diisocyanat, 1,5-Naphthalendiisocyanat, Methylendicyclohexyldiisocyanat, 1,4-Cyclohexylendiisocyanat, p-Tetramethylxylylendiisocyanat, p-Phenylendiisocyanat, 4-Methoxy-1,3-phenylendiisocyanat, 4-Chloro-1,3-phenylendiisocyanat, 4-Bromo-1,3-phenylendiisocyanat, 4-Ethoxy-1,3-phenylendiisocyanat, 2,4-Dimethyl-1,3-phenylendiisocyanat, 5,6-Dimethyl-1,3-phenylendiisocyanat, 1,4-Diisocyanatdiphenylether, 4,4'-Diisocyanatodi-phenylether, Benzidindiisocyanat, 4,6-Dimethyl-1,3-phenylendiisocyanat, 9,10-Anthracendiisocyanat, 4,4'-Diisocyanatodi-benzyl, 3,3'-Dimethyl-4,4'-diisocyanatodiphenylmethan, 1,6-Dimethyl-4,4'-diisocyanatodiphenyl, 2,4-Diisocyanatostiben, 3,3'-Dimethoxy-4,4'-diisocyanatodiphenyl, 1,4-Antracendiisocyanat, 2,5-Fluorondiisocyanat, 1,8-Naphthalendiisocyanat, 2,6-Diisocyanatobenzluran, 2,4,6-Toluoltriisocyanat, p,p',p''-Triphenylmethantriisocyanat, trifunktionales Trimer (Isocyanurat) von Isophorondiisocyanat, trifunktionales Biuret von Hexamethylendiisocyanat, trifunktionales Trimer (Isocyanurat) von Hexamethylendiisocyanat, polymeres 4,4'-Diphenylmethandiisocyanat, Xylylendiisocyanat und m-Tetramethylxylylendiisocyanat.

[0032] Die Verkapppung der ausgewählten Diole oder Polyole mit Polyisocyanaten, um Präpolymere zu bilden, kann unter Verwendung stöchiometrischer Mengen an Reaktionsteilnehmern beeinflusst werden. Das Isocyanat-zu-Hydroxylgruppen-Verhältnis kann, wie im Stand der Technik bekannt ist, variieren, sollte aber vorzugsweise ungefähr 1 bis zu ungefähr 3 sein, und mehr bevorzugt ungefähr 1,2 bis zu ungefähr 2,2. Die Verkapppungsreaktion kann unter Verwendung irgendeines geeigneten Verfahrens oder einer Prozedur durchgeführt werden, wie beispielsweise bei ungefähr 20° bis ungefähr 150°C, unter trockenem Stickstoff, für ungefähr 2 Stunden bis ungefähr 14 Tage, vorzugsweise in Abwesenheit eines Katalysators. Die bevorzugte Temperatur beträgt ungefähr 60° bis ungefähr 100°C. Die Reaktion endet, wenn die Isocyanat-Konzentration sich den theoretischen Werten annähert.

[0033] Bevorzugte Präpolymere schließen Polyethylenglycol endverkappt mit Toluoldiisocyanat, Toluoldiisocyanat und das Copolymer aus Ethylenoxid und Propylenoxid, gegebenenfalls mit Trimethylolpropan, Toluoldiisocyanatpolyethylenglycoltrimethylolpropan, Methylendiisocyanatmethylenhomopolymer, polymerischem Methylendiisocyanatpolyethylenglycol, Isophorondiisocyanat und Polymer aus Ethylenoxidpropylenoxidtrimethylolpropan und Toluoldiisocyanatpolyethylenglycoltrilactat ein. Solche Präpolymere sind von Hampshire Chemical Corp. in Lexington, Mass. als HYPOL PreMA®, HYPOL® 2000, HYPOL® 3000, HYPOL® 4000 und HYPOL® 5000 bekannt, und schließen Copolymere aus Polyethylenoxid und einer geringeren Menge an Polypropylenoxid ein.

[0034] Wenn alle Umstände bedacht werden, setzt sich die Hauptkette des Hydrogelpolymers vorzugsweise aus Polyethylenglycol, Polypropylenglycol oder Copolymeren aus Polyethylenglycol und Polypropylenglycol zusammen. Während nicht beabsichtigt wird, sich durch irgendeinen theoretischen Mechanismus einzuschränken, wird vermutet, dass die nicht-ionischen, hydrophilen Eigenschaften von Polyethylenglycol und Polypropylenglycolhydrogelen sowohl niedrige Mengen unspezifischer Bindungen des Analyts an das Hydrogel und eine gute Kompatibilität mit den immobilisierten Biomolekülen bereitstellen, so dass deren ursprüngliche Konformation und deren Bioreaktivität bewahrt wird. Isocyanat-funktionale Hydrogele absorbieren vorteilhafterweise schnell und in einer relativ gleichmäßigen Weise große Mengen an Flüssigkeit, so dass die grundlegende Gesamtform des Gelmaterials bewahrt wird. Des Weiteren wird die Feuchtigkeit, die durch diese Materialien absorbiert wird, in dem das Absorptionsmaterial selbst unter Ausübung von Druck behalten. Solche Isocyanat-funktionalen Hydrogele, z.B. Polyurethan-basierende Hydrogele, sind in den U.S. Patent Nr. 3,939,123 (Mathews et al.) und 4,110,286 (Vandegaer et al.) beschrieben. Diese auf Polyurethan basierenden Hydrogele sind umfassend als Oberflächenbeschichtungen verwendet worden, und um flexible oder steife Schäume zu bilden, aber nicht um dreidimensionale Matrix zu bilden, an die chemische Verbindungen von Interesse gebunden werden.

[0035] In einer bevorzugten Ausführungsform werden Biochips unter Verwendung eines Isocyanat-funktionalen Hydrogels hergestellt, das auf einem Diol oder Triol eines hochmolekulargewichtigen Polyethylenoxids, Polypropylenoxids oder eines Copolymers aus Polyethylenoxid und Polypropylenoxid basiert, welches mit was-

ser-aktiven Diisocyanaten verkappt ist, und gegebenenfalls leicht mit einem geeigneten Vernetzungsmittel vernetzt wird, so dass die Menge aktiver Isocyanate vorhersehbar ist, beispielsweise vorzugsweise nicht mehr als ungefähr 0,8 mÄq/g. Im Allgemeinen schließen die bevorzugten Diisocyanate auf Aromaten basierende Diisocyanate ein, wie Toluoldiisocyanat oder Methylendiphenylisocyanat, wie auch aliphatische Diisocyanate, wie Isophorondiisocyanat. Die Polymerisierung des Präpolymers, welches in einem Wassermischbaren organischen Lösungsmittel präformuliert werden kann, findet durch die Bildung von Harnstoffbindungen statt, die einfach durch die Zugabe von Wasser auftreten. Dies ist ein einzigartiger Vorteil gegenüber den auf Hydrogelen basierenden Biochips, die zuvor bekannt waren, in denen ultraviolette Bestrahlung oder ähnliche starke Reaktionsbedingungen notwendig sind, um die Polymerisierung zu initiieren. Das durch Wasser aktivierte Polymerisierungssystem der vorliegenden Erfindung ist nicht nur sicherer, weniger teuer und leichter zu kontrollieren, sondern es ermöglicht auch die Derivatisierung des Präpolymers mit der geeigneten biomolekularen Sonde, entweder vor oder gleichzeitig bei der Polymerisierung.

[0036] In einer hier beschriebenen Ausführungsform wird das Hydrogel vor der Polymerisierung mit Biomolekülen, die in einem organischen Lösungsmittel löslich sind, derivatisiert, indem eine einfache zwei- bis dreiminütige Reaktion zwischen den Biomolekülen und den Isocyanaten des Präpolymers verwendet wird. Unter organisch löslichen Biomolekülen werden Moleküle wie PNAs verstanden, die zuvor mit Amin derivatisiert worden sind, und die natürlicherweise in organischen Lösungsmitteln löslich sind, und solche, die geändert wurden, um löslich zu sein. Um eine vorzeitige Polymerisierung des Hydrogels in der vorliegenden Ausführungsform zu verhindern, wird die Derivatisierungsreaktion in einem aprotischen Wasser-mischbaren organischen Lösungsmittel, wie beispielsweise Dimethylformamid (DMF), N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP), Aceton, Acetonitril oder ähnlichen oder in Gemischen daraus durchgeführt. Daher werden vor dem Aufquellen des Hydrogels oder dem Dispergieren des Hydrogels auf dem Substrat biomolekulare Sonden kovalent an das auf Polyurethan basierende Präpolymergel gebunden. Nach einer solchen Derivatisierung initiiert die Zugabe von Wasser die Polymerisierung, was zu biomolekular-derivatisierten Hydrogelen führt, z.B. zu PNA-derivatisierten Hydrogelen.

[0037] Eine derartige Verwendung und das Vorhandensein eines aprotischen Lösungsmittels in der Derivatisierung des Hydrogels hat eine Vielzahl an Vorteilen. Zum Ersten hilft es, eine homogene Lösung des Präpolymers in Wasser zu erzeugen. Zweitens dient es dazu, den Derivatisierungsschritt vom Polymerisierungsschritt zu trennen, wodurch eine kontrollierte Ausbeute der Biomolekül-Derivatisierung an das Hydrogel erreicht werden kann. Drittens dient es dazu, die Erzeugung von Kohlendioxid während des Polymerisierungsschrittes zu verlangsamen, und um Kohlendioxid durch Senken der Viskosität der Polymerisierungsmischung effizient aufzuschäumen. Bei der Polymerisierung der auf Polyurethan basierenden Hydrogele, die in einigen Fällen bevorzugt sind, wird Kohlendioxid durch Umsetzung von Wasser mit den Isocyanatgruppen des Hydrogel-Präpolymers erzeugt. Dieses Reaktionsschema ist beispielsweise in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) gezeigt, und die Kontrolle der Erzeugung von Kohlendioxid und dessen Entweichen aus dem Gel kann sehr wichtig sein, wenn ein Biochip aus einem solchen Präpolymer hergestellt wird. Wenn eine Polymerisierung in einer hoch viskosen Mischung zu schnell abläuft, ist das hierdurch erzeugte Kohlendioxid nicht in der Lage zu entweichen, und es wird in dem Gel gefangen, was zu einer diskontinuierlichen Schaummatrix führt, was ein Problem für die Kontinuität der Gelmatrix sein kann, die bei Biochips bedeutend ist, um eine akkurate und effiziente Detektion der Fluoreszenz sicherzustellen, welche für die erfolgreiche Hybridisierung indikativ ist. Die Erzeugung von Kohlendioxid wird durch Reduzieren der Gesamtreaktivität von Wasser/Hydroxid durch Zugabe eines aprotischen Lösungsmittels kontrolliert, und durch die Verwendung eines relativ niedrig-basischen pH-Puffers (pH ungefähr 7 bis ungefähr 8,4), welcher eine gute Kontrolle der Reaktionsrate ermöglicht.

[0038] Ein vierter und endgültiger Vorteil der Verwendung eines aprotischen Lösungsmittels, um das Hydrogel zu derivatisieren, ist die Verstärkung der optischen Transparenz des Hydrogels durch Reduzieren irgendwelcher Präzipitate von Präpolymeren. Es ist entdeckt worden, dass das Verhältnis des aprotischen Lösungsmittels zum Wasser mindestens ungefähr 0,25 zu 1 und vorzugsweise höher sein sollte, z.B. 0,3–0,35 zu 1, um eine gewünschte langsame Polymerisierung des Gels, und daher eine langsame Erzeugung von CO₂ zu ermöglichen, was zu einer kontinuierlichen und transparenten Gelmatrix führt. Die Derivatisierung und die Polymerisierung des Hydrogels wird im Allgemeinen innerhalb von 30 Minuten beendet, was im starken Kontrast zu den 24 Stunden bis 48 Stunden steht, die für die Herstellung der auf Polyacrylamid basierenden Biochips benötigt werden. Des Weiteren kann die Menge an Biomolekülen, z.B. PNAs, die an das Präpolymer gebunden sind, leicht durch einfache Variierung der Menge an Biomolekül, die zu der Reaktion hinzugegeben werden, eingestellt werden (z.B., wenn PNA das Biomolekül ist, das an das Gel gebunden werden soll, von ungefähr 10 fmol bis zu ungefähr 1 pmol an PNA in jedem Mikrotropfchen), wodurch eine stärkere Kontrolle der Konzentration der Biomolekül-Sonden innerhalb jedes Hydrogelmikrotropfchens erlaubt wird.

[0039] Wenn das Hydrogel mit PNA derivatisiert wird, und dann nach der Initiierung und vor der Komplettie-

rung der Polymerisierung auf dem festen Substrat abgelagert wird, kann das durch irgendein passendes Verfahren erfüllt werden, z.B. durch die Verwendung einer konventionellen Mikrospeck-Maschine, die vorzugsweise Gel aufträgt, um so eine Anordnung von Mikrotröpfchen zu bilden. Während das Gel inhärent nicht kovalent an einige Substrate anhaften kann, wird die Substratoberfläche im Allgemeinen vor der Zugabe des Hydrogels derivatisiert, um eine maximale Haftung des Gels an das Substrat zu erreichen. In einer bevorzugten Ausführungsform, in der Glas als Substrat verwendet wird, wird das Glas beispielsweise vor der Ablagerung des polymerisierenden Hydrogels auf dessen Oberfläche mit Amin derivatisiert. So bindet das polymerisierende Hydrogel, das mit biomolekularen Sonden, wie PNAs oder DNAs, derivatisiert ist, durch die Reaktion der aktiven Isocyanatgruppen mit dem Präpolymer mit den Aminen, die auf der Oberfläche des Glases zu finden sind, stark an das Substrat, wenn es auf das derivatisierte Glassubstrat aufgetragen wird, wodurch eine kovalente Anhaftung des Hydrogels an das Substrat erreicht wird.

[0040] Das Biochip-Substrat kann in einer Vielzahl an Materialien und Formaten vorliegen, welche für die automatisierte Handhabung während der Verwendung in einem Bindungs-Assay und späterer Detektion von Molekülen, die an die individuellen Biochip-Zellen binden, führt. Beispielsweise erlaubt ein optisch transparentes Substrat, wie Glas oder Polystyrol, die Transmissions-Lichtdetektion durch die Zellen, und ist für die Detektionsmodalitäten unter Verwendung von Fluoreszenz oder die optische Absorption günstig. Aufgrund der hohen Bindungskapazität der dreidimensionalen Hydrogelzellen sind reflektierende optische Verfahren ebenfalls möglich, und sie erlauben die Verwendung von trüben Substraten. Die Verwendung von steifen Substraten erlaubt die Präzision der Aneinanderlagerung während der Detektionsphase des Biochips, aber sie braucht nicht notwendig zu sein, wenn eine richtige Anlagerung in die Zellen eingeschlossen ist, um die Detektion zu erleichtern. Ein Beispiel wäre ein flexibles Format, wie ein Klebeband oder ein Filament, welches präzise in einer Scanmethode, ähnlich der Verwendung eines Magnetbands, nachgewiesen wird. Während optische Verfahren und geeignete Substrate aufgrund der Einfachheit bevorzugt sind, können auch andere Detektionsverfahren, die in Biochemie verwendet werden, benutzt werden. Einschließlich der Detektion radioaktiver Mittel.

[0041] Vorteilhafterweise schließen die in dieses System eingeschlossenen Reaktionen, d. h. (1) die Derivatisierung des Hydrogel-Präpolymers mit der biomolekularen Sonde, (2) die Polymerisierung des Hydrogels und (3) die Bindung des derivaten Hydrogels an die Substratoberfläche die Bildung einer starken Harnstoff- oder Urethan (Carbamat)-Bindungen ein. Diese Bindungen ermöglichen eine mechanische Integrität der Anordnung der Mikrotröpfchen und erhöhen signifikant die Halbwertszeit des Biochips, verglichen mit dem Stand der Technik bei Polyacrylamid-basierenden Biochips.

[0042] In einigen bevorzugten Ausführungsformen, die nachfolgend beschrieben werden, sind die Hydrogeltröpfchen, sobald sie auf dem Substrat polymerisiert sind, zwischen ungefähr 20 µm und 100 µm dick; vorzugsweise sind sie ungefähr 30 µm dick und mehr bevorzugt zwischen ungefähr 30 µm und ungefähr 50 µm dick. Die insgesamt größere Größe der Geltröpfchen (oder Zellen) ermöglicht einen signifikanten Anstieg der Menge an biomolekularen Sonden, die darin mobilisiert sind, wodurch die Sensitivität des Biochips erhöht wird, und dessen Verwendung erleichtert.

[0043] In alternativen Ausführungsformen, die hierin in Erwägung gezogen werden, werden wasserlösliche Biomoleküle, wie DNA oder andere Oligonucleotide statt der im organischen Lösungsmittel löslichen Biomoleküle, die zuvor beschrieben worden sind, an das Hydrogel gebunden. Unter wasserlöslichen Biomolekülen werden Moleküle, wie DNA und RNA verstanden, die natürlicherweise wasserlöslich sind, so wie auch andere, die modifiziert worden sind, damit sie wasserlöslich werden. In diesen Ausführungsformen ist es nicht möglich, das Hydrogel-Präpolymer zuerst zu derivatisieren, und dann die Polymerisierung zu initiieren. Jedoch können die auf Polyurethan basierenden Hydrogele vorteilhafterweise derivatisiert und in einer einzelnen Reaktion polymerisiert werden, während die Reaktion adäquat kontrolliert wird, um ein derivatives Hydrogel mit einer vorhersagbaren Quantität wasserlöslicher biomolekularer Sonden, die hieran gebunden sind, aufzuweisen. Insbesondere wird ein solches Hydrogel-Präpolymer zuerst in einem organischen Lösungsmittel gelöst. Die DNA oder das andere wasserlösliche Biomolekül in einer wässrigen Pufferlösung, wird dann zu einem solchen Präpolymer in einer Menge hinzugegeben, und unter den Umständen, dass das Hydrogel sowohl mit der biomolekularen Sonde derivatisiert ist und polymerisiert. Sobald das Hydrogel polymerisiert, und bevor die Polymerisierung komplett ist, wird es auf ein geeignetes Substrat, das vorgeschrieben worden ist, in Mikropunkten aufgetragen.

[0044] Alternativ dazu können wasserlösliche Biomoleküle, wie DNA, RNA und viele Proteine, chemisch modifiziert werden, um sie in aprotischen organischen Lösungsmitteln löslich zu machen, was vor der Polymerisierung ihre Derivatisierung an das Isocyanat-funktionale Hydrogel erlaubt. Modifizierungen können kovalente Modifikationen einschließen, wie eine Konjugierung mit Lipiden und die reversible Blockierung ionischer Grup-

pen, wie auch die nicht-kovalenten Modifikationen, wie die Verwendung ionischer Paarungsmittel. Gleichmaßen können PNAs chemisch modifiziert werden, damit sie hinreichend wasserlöslich sind.

Optimierung der Hydrogelbildung

[0045] Die Schwellkapazität, die Polymerisierungsdauer und die Transparenz und Stärke (d. h. die Stabilität) des endgültigen Polymers sind wichtige Eigenschaften, wenn ein Hydrogel zur Verwendung in einem Biochip untersucht wird. Die Optimierung dieser Eigenschaften stellt ein optimales Hydrogel bereit.

[0046] Die Schwellkapazität ist eine wichtige Eigenschaft eines Hydrogels, da es den Wassergehalt wieder spiegelt. Im Allgemeinen gilt, dass die Diffusion der Moleküle in und aus dem Gel umso schneller ist, je höher der Wassergehalt des polymerisierten Gels ist. Für einen Biochip gilt, je schneller die Diffusion von Molekülen, z.B. DNA-Proben, desto effizienter sind die Hybridisierungsbedingungen. Die Mathematik molekularer Diffusion bei einfach schwellenden Polymeren basiert auf der folgenden semi-empirischen Gleichung (Davis B.K. Porc. Natl. Acad. Sci. USA 21:3120, 1974):

$D_p = D_o \exp [-0,05 + (10^{-6} M) P]$, worin
 D_p = Diffusionskoeffizient der spezifizierten Moleküle in der Polymerlösung
 D_o = Diffusionskoeffizient der spezifizierten Moleküle in reinem Wasser
 M = Molekulargewicht der angegebenen Moleküle
 P = der prozentuale Polymergehalt

[0047] Aus dieser Gleichung kann daher erkannt werden, dass, je höher der Wassergehalt ist, die Diffusion der Moleküle in und aus dem Polymer umso schneller ist. Die Dichte und Porosität eines Hydrogel-Polymers kann durch eine Vielzahl an Parametern kontrolliert werden, einschließlich der Konzentrationen der Reaktionspartner, der Dichte der reaktiven Gruppen, und der gesamten Reaktionskinetiken.

[0048] Die Optimierung der Dauer, die für die Polymerisierung des Hydrogels benötigt wird, ist besonders bedeutend bei der Herstellung eines Biochips. Idealerweise sollte die benötigte Dauer für die Polymerisierung lang genug sein, um dem polymerisierenden Gel zu erlauben, durch eine konventionelle Mikro-Tropf-Maschine auf der Oberfläche des Glas-Substrats abgelagert zu werden, bevor die Polymerisierung beendet ist, aber kurz genug, dass das Hydrogel kurz danach vollständig polymerisiert, sobald es abgelagert worden ist. Auf Grundlage dieser Notwendigkeiten wurde bestimmt, dass ein Hydrogel mit einer Polymerisierungsdauer von ungefähr 30 Minuten und mit einer Schwellkapazität von ungefähr 96 % bis 97 % im Gleichgewicht gute Leistungsfähigkeit aufweist. Zahlreiche Experimente wurden durchgeführt, um die geeignetsten Formulierungen und Reaktionsbedingungen festzulegen, um eine optimale Hydrogel-Rezeptur bereitzustellen. Diese Experimente schließen die Untersuchung der Präpolymer-Lösungsmittel-Verhältnisse ein, die Lösungsmittelarten und die Pufferbedingungen sowohl bezüglich der Geltransparenz als auch der Polymerisierungsrate. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abschnitten dargestellt.

1. Untersuchung der Präpolymere und Präpolymer-Wasser-Verhältnisse

[0049] In den anfänglichen Experimenten wurde herausgefunden, dass Hydrogel-Präpolymere, die mit bestimmten aromatischen Polyisocyanatgruppen verkappt sind, in zwei bis drei Minuten polymerisierten, wenn sie mit deionisiertem Wasser behandelt wurden, d. h. zu schnell zur Verwendung bei der Herstellung von Biochips. Im Gegensatz dazu benötigten Hydrogel-Präpolymere, die mit bestimmten aliphatischen Polyisocyanaten verkappt waren, unter den gleichen Bedingungen länger als 35 Minuten für die vollständige Polymerisierung, was der Grund dafür war, dass sie für die weitere Optimierung ausgewählt wurden. Um das Präpolymer-Wasser-Verhältnis weiter zu optimieren, wurden variierende Mengen an Präpolymer mit einem aktiven Isocyanatgehalt von ungefähr 0,4 mÄq/g in Wasser bei einem pH-Wert von ungefähr 7 gelöst, und die entsprechenden Polymerisierungsdauern wurden bestimmt. Wie in Tabelle 1 gezeigt wird, stieg die Polymerisierungszeit an, wenn der Anteil des Präpolymers in der wässrigen Phase abnahm. Beispielsweise polymerisierte eine 5-%ige Präpolymer-Lösung selbst nach 48 Stunden hauptsächlich an der Oberfläche. Im Gegensatz dazu polymerisierte die Präpolymer-Lösung mit 10 % Präpolymergehalt in ungepuffertem DI-Wasser innerhalb von 3 Stunden, und die 20-%ige Lösung war innerhalb von 35 Minuten vollständig polymerisiert. Aus diesen anfänglichen Experimenten schien es, dass eine Präpolymer-Lösung von mindestens ungefähr 5 %, vorzugsweise mehr als ungefähr 10 % und mehr bevorzugt mindestens ungefähr 20 % bei der Herstellung von Biochips bei diesem pH-Wert verwendet werden sollte; jedoch war es unklar, wie diese verführerische Schlussfolgerung durch eine Änderung des pH-Werts oder einiger anderer Reaktionsbedingungen verändert werden könnte.

Tabelle 1

% Präpolymer in der wässrigen Lösung	Polymerisierungsdauer
5 %	>48 Stunden
10 %	3 Stunden
20 %	35 Minuten

2. Auswirkung des pH-Werts auf die Polymerisierung

[0050] Der nächste Schritt hinsichtlich einer Optimierung der Hydrogel-Rezeptur lag darin, die Wirkung des pH-Werts auf die Polymerisationsrate zu bestimmen. Tabelle 2 fasst die Ergebnisse dieser Experimente zusammen.

Tabelle 2

% Präpolymer in der wässrigen Lösung	pH 7,2	pH 8,4
5 %	90 Minuten	20 Minuten
10 %	17 Minuten	3 Minuten

[0051] In diesen Experimenten wurde herausgefunden, dass ein 50 mmol Natriumbicarbonatpuffer in Wasser bei einem pH-Wert von 7,2 und 8,4 die Polymerisationsrate des Hydrogels signifikant beschleunigte. Wenn daher beispielsweise nur eine 5-%ige Präpolymer-Rezeptur verwendet wurde, sank die Polymerisierungsdauer bei einem pH-Wert von 7,2 von mehr als 48 Stunden auf 90 Minuten, bis auf nur 20 Minuten bei pH 8,4. Die 10-%ige Präpolymer-Lösung war gleichermaßen innerhalb von 17 Minuten bei einem pH-Wert von 7,2 und innerhalb von 3 Minuten bei einem pH 8,4 polymerisiert. Diese Experimente wiesen darauf hin, dass durch Einstellung des pH-Werts der Polymerisations-Reaktionslösung bei der Hydrogelbildung ein niedrigerer Präpolymergehalt, d. h. 5 % oder 10 % verwendet werden könnte.

[0052] Zusätzlich zur Polymerisierungsdauer wurden die Schwelleigenschaften des Gels ebenfalls in Betracht gezogen. Während die Polymerisierung schnell auftreten kann, ist das Gel am nützlichsten, wenn es einen gewünschten Wassergehalt von mindestens ungefähr 95 % erreicht hat, vorzugsweise ungefähr 96 % bis 97 %. Daher wurden die Schwelleigenschaften der verschiedenen Polymer-haltigen Rezepturen ebenfalls analysiert, und Tabelle 2A vergleicht die Schwellprofile einer 5-%igen Hydrogel-Rezeptur und einer 10-%igen Hydrogel-Rezeptur. Der Wassergehalt wird im Hinblick auf das Schwellverhältnis angegeben, und das Schwellverhältnis wird durch Dividieren des Gesamtgewichts des Hydrogels durch das Gewicht des Präpolymers berechnet.

Tabelle 2A

Schwellverhältnis als Funktion der Dauer und der % des Präpolymers

Zusammensetzung	Stunden			
	1	1½	3	24
5 % Präpolymer	23	25	27,5	40
10 % Präpolymer	12	13	15	25

[0053] Aus diesen Testergebnissen kann erkannt werden, dass das Hydrogel, das unter Verwendung einer 10-%igen Präpolymer-Lösung hergestellt wurde, ungefähr einen Tag benötigte, um einen optimalen Wasser-

gehalt von 96 % zu erreichen, was einem Schwellverhältnis von ungefähr 25 entspricht. Zusätzlich war das Volumen des Hydrogels, wenn es vollständig gequollen war, direkt nachdem die Polymerisierung begann, ungefähr zweimal sein Volumen, was die strukturelle Integrität dieses Hydrogels schwer bewahren lässt. Im Gegensatz dazu erreichte das Hydrogel, das aus einer 5-%igen Präpolymer-Lösung hervorging, einen 96-%igen Wassergehalt in ungefähr einer Stunde und das ohne Verlust der strukturellen Integrität. Daher wurde die 5-%ige Präpolymer-Lösung für die weitere Optimierung sowohl aufgrund der Polymerisierungsrate in dieser leicht basischen Lösung als auch des Schwellprofils für die weitere Optimierung ausgewählt.

3. Optimierung der Transparenz des Hydrogels

[0054] Ein signifikanter Nachteil der meisten Hydrogele, die aus wässrigen Lösungen hergestellt werden, ist ihre allgemeine Trübheit. Um in einem Biochip am nützlichsten zu sein, sollte das Gel transparent sein, und insbesondere sollte es optisch transparent sein, so dass die Interferenz mit bestimmten molekularen Markierungen oder Labels, wie fluoreszierenden Anhängseln, minimiert ist. Um eine optimale Transparenz zu erreichen, wurde das Hydrogel-Präpolymer zuerst in einem aprotischen organischen Lösungsmittel, wie Acetonitril, Aceton, DMF, NMP oder einer Mischung daraus gelöst, und die erhaltene Lösung wurde mit 50 mmol Natriumbicarbonatpuffer bei pH 7,2 oder 8,4 behandelt, um die Polymerisierung auszulösen. NaHCO_3 puffert eine wässrige Lösung bei einem pH von ungefähr 8,4 normalerweise, jedoch kann die Zugabe einer Säure, z. B. HCl, oder einer Base, z.B. NaOH, verwendet werden, um den gepufferten pH-Wert leicht zu ändern, z.B. um den Bereich zu erweitern, der von 7,0 bis 9,5 reicht, obwohl etwas der Puffer-Kapazität verloren geht. Unter Verwendung der bevorzugten 5-%igen Polymer-Lösung wurde das Verhältnis des aprotischen Lösungsmittels zum wässrigen Puffer eingestellt, um eine optimale Rezeptur bezüglich der Polymerisationsdauer und der optischen Transparenz festzulegen. Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse des Testens von fünf verschiedenen Hydrogel-Rezepturen mit verschiedenen Verhältnissen des Puffers zum aprotischen Lösungsmittel, in diesem Fall Acetonitril. Jede Formulierung wurde bei einem gepufferten pH-Wert von 8,4 oder 7,2 getestet.

Tabelle 3

Formulierung #	Acetonitril: Puffer	Dauer bis zur Polymerisierung
DI-Wasser		
Kontrolle	0,3 g: 0,65 g	3 Stunden
pH 8,4 Puffer		
1	0,1 g: 0,85 g	45 Minuten
2	0,2 g: 0,75 g	42 Minuten
3	0,3 g: 0,65 g	35 Minuten
4	0,4 g: 0,55 g	35 Minuten
5	0,5 g: 0,45 g	32 Minuten
pH 7,2 Puffer		
6	0,1 g: 0,85 g	180 Minuten
7	0,2 g: 0,75 g	170 Minuten
8	0,3 g: 0,65 g	180 Minuten
9	0,4 g: 0,55 g	180 Minuten
10	0,5 g: 0,45 g	150 Minuten

[0055] Jede der bei pH 8,4 und pH 7,2 getesteten Rezepturen polymerisierte innerhalb von ungefähr 30–45 Minuten beziehungsweise 150–180 Minuten, unabhängig von den relativ großen Unterschieden beim Verhältnis des Acetonitrils zum Puffer. Je höher der pH, desto schneller lief die Polymerisierung ab. Es wurde heraus-

gefunden, dass der pH eines vorher gestellten Natriumbicarbonatpuffers mit der Zeit aufgrund der Freisetzung von CO₂-Gas aus dem Puffer anstieg, d. h., wenn Natriumbicarbonat als Puffersystem verwendet wird, es frisch zubereitet werden und am gleichen Tag verwendet werden sollte. Ein anderes Puffersystem, 50 mmol Boratpuffer, wurde getestet, und es wurde herausgefunden, dass es eine vollständige Polymerisierung in einem ähnlichen Zeitraum erreichte, wie der frisch hergestellte Natriumbicarbonatpuffer. Ein Boratpuffer ist eine wässrige Lösung, die Natriumtetraborat und Borsäure enthält, wobei die Anteile variiert werden können, um einen pH-Wert zwischen ungefähr 7,0 und ungefähr 9,5 zu ergeben.

[0056] Die visuellen Transparenzwerte jedes erhaltenen Hydrogels variierten bezüglich des Verhältnisses des organischen Lösungsmittels zum wässrigen Puffer. Man glaubt, dass die Transparenz durch Entstehen von CO₂ und/oder durch die Präzipitierung des Präpolymers betroffen wird. Die visuelle Transparenz schien sich zu verbessern, wenn das Verhältnis des organischen Lösungsmittels zum wässrigen Puffer erhöht wurde, was zu dem folgenden zusätzlich durchgeführten Experiment führte.

[0057] Um die Wirkung der visuellen Trübung des Hydrogels auf die optische Intensität der Fluoreszenz zu messen, wurde folgendes Experiment unter Verwendung von drei Rezepturen (10 %, 20 % und 30 % aprotische Lösungsmittel pro Gewicht) durchgeführt.

Formulierung I:

[0058] 0,2 g Hypol PreMa G-50 wurde in 0,22 g Acetonitril und 0,22 g NMP gelöst. Die erhaltene Lösung wird mit einer DNA-Lösung in 3,8 ml 50 mmol Boratpuffer pH 8,0 (Oligonucleotidkonzentration, G11, d. h. 5'-CTAAACCTCCAA-3' von 0,75 mg/ml des Puffers) umgesetzt. Die Rezeptur enthielt ungefähr 10 % (w/v) organisches Lösungsmittel.

Formulierung II:

[0059] 0,2 g Hypol PreMa G-50 wurde in 0,44 g Acetonitril und 0,44 g NMP gelöst. Die erhaltene Lösung wurde mit einer DNA-Lösung in 3,36 ml 50 mmol Boratpuffer bei pH 8,0 umgesetzt (Oligonucleotidkonzentration, G11, von 0,84 mg/ml des Puffers). Die Rezeptur II enthielt ungefähr 20 % (w/v) organisches Lösungsmittel.

Formulierung III:

[0060] 0,2 g Hypol PreMa G-50 wurde in 0,67 g Acetonitril und 0,67 g NMP gelöst. Die erhaltene Lösung wird mit einer DNA-Lösung in 2,89 ml 50 mmol Boratpuffer bei pH 8,0 umgesetzt (Oligonucleotidkonzentration, G11, von 1 mg/ml des Puffers). Die Formulierung III enthielt ungefähr 30 % (w/v) organisches Lösungsmittel.

[0061] Die Formulierungen I, II und III wurden unter Verwendung einer konventionellen Mikrospotting-Maschine in Mikrotröpfchen auf Glas-Objektträger auftragen, wie in detaillierter Form nachfolgend in Beispiel III erklärt werden wird. Nach 1 Stunde Härten in einer kontrollierten Feuchtekammer bei einer relativen Feuchtigkeit von ungefähr 95 %, wurden die erhaltenen Objektträger mit Waschpuffer gewaschen, und für 20 Minuten mit Fluoreszenz-markierten Zielsonden hybridisiert. Die Intensität jeder Formulierung wurde mit einer CCD-Kamera gemessen. Die Ergebnisse werden in Tabelle 3A beschrieben, aus der klar wird, dass die Opazität vom relativen Prozentsatz an organischem Lösungsmittel abhängt, und die Fluoreszenzintensität beeinflusst.

Tabelle 3A.

Wirkung der visuellen Opazität auf die Intensität der Fluoreszenz

(organische Lösungsmittel)	Visuelle Opazität	Fluoreszenz-intensität
Formulierung I (10 %)	trüb	2044 (±217)
Formulierung II (20 %)	leicht trüb	8223 (±779)
Formulierung III (30 %)	transparent	10209 (±632)

[0062] Als Ergebnis der oben erwähnten Tests wurde herausgefunden, dass Hydrogel-Formulierungen, die

mindestens ungefähr 20 %, und bevorzugt mindestens ungefähr 30 % organisches Lösungsmittel pro Gewicht der Gesamtlösung verwenden, welche polymerisiert wird, und vorzugsweise mindestens 15 % Acetonitril, bevorzugt sind, wenn optische Klarheit in dem endgültigen Biochip gewünscht wird.

4. Vergleich der aprotischen organischen Lösungsmittel

[0063] Der nächste Schritt der Optimierung des Hydrogels für die Biochips der vorliegenden Erfindung war ein Vergleich der aprotischen Lösungsmittel. Experimente, die denen ähneln, die in Abschnitt 2 beschrieben wurden, wurden unter Verwendung zahlreicher aprotischer Lösungsmittel durchgeführt, d. h. mit DMF, NMP und Aceton. Während vermutet wurde, dass diese alternativen organischen Lösungsmittel ähnlich wie Acetonitril arbeiten würden, war dies nicht der Fall. Die Ergebnisse der Polymerisierungsstudien der Hydrogelformulierungen mit 30 % DMF, NMP oder Aceton sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4

Lösungsmittel	pH des Puffers	Polymerisierungs-Dauer
DMF	ungepuffert DI-Wasser	polymerisierte nicht
	8,4	polymerisierte nicht
	9,15	20 Minuten
	9,5	8 Minuten
	10	polymerisierte nicht
NMP	ungepuffert DI-Wasser	polymerisierte nicht
	8,4	polymerisierte nicht
	9,15	polymerisierte nicht
	9,5	polymerisierte nicht
	10	polymerisierte nicht
Aceton	ungepuffert DI-Wasser	polymerisierte nicht
	8,4	30 Minuten

[0064] Auf Grundlage dieser Experimente wurde entdeckt, dass Formulierungen in DMF einen höheren pH-Wert benötigten, um zu polymerisieren, während Formulierungen in NMP unter gleichen Bedingungen überhaupt nicht polymerisierten. Formulierungen in Aceton waren den Acetonitril-Formulierungen am ähnlichsten, in der Hinsicht, als sie nur leicht basische pH-Werte benötigten, um zu polymerisieren.

[0065] Signifikanterweise waren die polymerisierten Hydrogele, die aus DMF oder Acetonformulierungen entstanden, hinsichtlich der strukturellen Integrität der polymerisierten Hydrogele, die aus Acetonitrilformulierungen hergestellt worden sind, unterlegen. Daher wurde aufgrund dieser Optimierungsstudien Acetonitril als bevorzugtes aprotisches Lösungsmittel zur Verwendung in der weiteren Entwicklung des optimierten Biochips ausgewählt; spätere Experimente zeigten, dass andere aprotische organische Lösungsmittel, wie Tetrahydrofuran und Dioxan, eine ähnliche Neigung beim Erzielen einer kompletten Polymerisierung aufwiesen, wie Acetonitril und Aceton.

[0066] Aufgrund all der zuvor beschriebenen Tests, wird allgemein angenommen, dass der pH-Wert der Polymerisierungs-Lösung zwischen ungefähr 7,0 und ungefähr 9,5 sein sollte, bevorzugt zwischen ungefähr 7,2 und ungefähr 8,6, mehr bevorzugt zwischen ungefähr 7,4 und ungefähr 8,4 und am meisten bevorzugt zwi-

schen ungefähr 7,6 und ungefähr 8,2.

5. Untersuchung der Auswirkungen der Feuchtigkeit während der Polymerisierung

[0067] Während oder nach dem Mikroauftragen sollte bei den aufgetropften Mikrotröpfchen eine starke Dehydratisierung oder ein sofortiger Verlust des organischen Lösungsmittels vermieden werden. Ein solcher Verlust kann während der Polymerisierung zu einer Übervernetzung auf dem Substrat führen, und zu einer resultierenden niedrigen Diffundierbarkeit von Zielproben mit großem Molekulargewicht. Dieses potentielle Problem wird durch das Platzieren des polymerisierenden Biochips in einer Kammer mit kontrollierter Feuchtigkeit direkt nach dem Mikro-Tropfen reduziert. Ein kontrollierter Befeuchter wurde hergestellt und bei ungefähr 97 bis 98 % Feuchtigkeit gelassen, wie mit einem „Digital-Sling-Psychrometer“ (Model THWD-1, Amprobe Instrument) bestimmt wurde. Nach dem Mikro-Tropfen wurde der Biochip sofort in die feuchte Kammer gegeben. Alternativ könnte die kontrollierte feuchte Kammer auf die Umgebung des Mikro-Tropf-Prozesses ausgeweitet werden.

[0068] Tabelle 5 zeigt die Auswirkungen der Feuchtigkeit bei der Polymerisierung auf die endgültige Intensität der Fluoreszenz der gebundenen Biomoleküle.

Tabelle 5

Die Auswirkung der Feuchtigkeit während der Polymerisierung

Bedingung	Fluoreszenz-Intensität
trocken	762 (± 207)
Feuchtigkeit 97-98 %	7161 (± 2454)

[0069] Dieser Test zeigt, dass es einen nahezu 10-fachen Anstieg der Intensität gibt, wenn die Polymerisierung unter trockenen Bedingungen durchgeführt wird. Dieser Unterschied ist der übermäßigen Vernetzung des polymerisierten Mikrotröpfchens zuzuschreiben, wenn keine feuchten Bedingungen verwendet werden, und es schließlich eine niedrige Diffundierbarkeit der Zielproben gibt. Es ist daher bevorzugt, den Biochip mit den Mikrotröpfchen während der Polymerisierung mindestens gegenüber ungefähr 90 % relativer Feuchtigkeit auszusetzen.

6. Temperaturkontrolle der Hydrogel-Polymerisierung

[0070] Nachdem sich das Präpolymer mit der wässrigen DNA-Pufferlösung mischt, beginnt die Polymerisierung, was zu einem niedrigen Anstieg der Viskosität des Gemischs führt, während sie auf das Biochip-Substrat aufgetragen wird. Obwohl kontinuierliche Misch- und Dispergiervverfahren verwendet werden können, ist gefunden worden, dass eine einfache Kontrolle der Reaktionskinetiken ein Batch-Verfahren ermöglicht, das zum Herstellen und Mikrospotten des polymerisierenden Hydrogels verwendet werden kann. Bei Raumtemperatur wurde während eines 5- bis 10-minütigen Zeitraums eine signifikante Viskositätsänderung beobachtet, welcher die Größe und die Höhe der Mikrotröpfchen während des Auftragens beeinflussen kann. Dieses potentielle Problem wurde im Wesentlichen durch das Mikro-Tropfen in einer kühlen Box bei 7°C eliminiert. Das Absenken der Temperatur verlangsamte den Polymerisierungsprozess, was zu einer konsistenteren Viskosität führte.

[0071] 0,2 g des Isocyanat-funktionalen Hydrogels Hopol PreMa G-50 wurde in 0,67 g Acetonitril und 0,67 g N-Methyl-2-pyrrolidon gelöst, und das erhaltene Gemisch wurde durch Zugabe von 2,89 g 50 mmol Boratpuffer bei pH 8,0 polymerisiert. Die Polymerisierung wurde bei Raumtemperatur (~24°C) und bei 7°C durchgeführt. Die Zeit, um vollständig zu polymerisieren, wurde beobachtet und ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6

Polymerisierungsdauer bei verschiedenen Temperaturen

Temperatur	Polymerisierungsdauer
Raumtemperatur	50 Minuten
7°C	2 Stunden

[0072] Dieser Test zeigt, dass die komplette Polymerisierung durch das Unterwerfen der Mikrotröpfchen gegenüber einer niedrigeren Temperatur verzögert werden kann, und vorzugsweise wird eine Temperatur von nicht mehr als ungefähr 10°C verwendet.

7. Auswirkung der Dicke auf die Sensitivität

[0073] Durch das Lösen von 0,2 g Hypol PreMa G-50 in 0,67 g Acetonitril und 0,67 g N-Methyl-2-pyrrolidon wurde eine Lösung hergestellt. Die erhaltene Lösung wurde mit einer DNA-Lösung in 2,89 ml 50 mmol Boratpuffer bei pH 8,0 umgesetzt; die DNA lag in Form des Oligonucleotids G11 vor, d. h. in Form von 5'-CTAAACCTCCAA-3', bei einer Konzentration von 1 mg/ml des Puffers. Die Gesamtformulierung enthielt ungefähr 30 % organische Lösungsmittel bezogen auf das Gesamtgewicht.

[0074] Die polymerisierende Lösung des Hydrogels wurde unter Verwendung einer konventionellen Mikrospeckmaschine in Micro-Tröpfchen auf Glasobjektträger aufgetragen. Nach dem Härten in der kontrollierten angefeuchteten Kammer für 1 Stunde wurden die erhaltenen Objektträger mit Waschpuffer gewaschen und dann für 20 Minuten mit einer Fluoreszenz-markierten Zielprobe hybridisiert. Die Intensität jeder Formulierung wurde mit einer CCD-Kamera gemessen.

[0075] Drei verschiedene Höhen, 21 µm, 32 µm und 52 µm der Hydrogel-Mikrotröpfchen wurden unter Verwendung der gleichen Hydrogelformulierung durch das entsprechende Adjustieren des Mikro-Tropf-Mechanismus hergestellt. Die Höhen der Mikrotröpfchen wurden mit einem Dicke-Messinstrument gemessen, KLA-Tencor P11. Die Hydrogelzellen wurden unter Verwendung von Standardverfahren hybridisiert, und die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten wurden optisch nachgewiesen und gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7

Wirkung der Hydrogel-Dicke auf die Fluoreszenz

Dicke (µm)	Fluoreszenz-Intensität
21	2728 (±480)
32	4404 (±640)
52	5616 (±432)

[0076] Die Ergebnisse dieser Tests zeigen, dass die Sensitivität umso höher ist, je dicker die Hydrogelzelle ist.

[0077] Derivatisierung des Hydrogels mit einer biomolekularen Sonde.

Derivatisierung mit einer Peptidnucleinsäure-Sonde

A. Optimierung der Reaktionsbedingungen

[0078] Nachdem die Hydrogel-Formulierung und deren Polymerisierung wie angegeben optimiert worden waren, richtete sich die Aufmerksamkeit auf die Derivatisierung des Gels mit einer geeigneten biomolekularen Sonde, um einen Biochip mit PNAs herzustellen, welche als stabil angesehen werden. Zur Verwendung beim Derivatisieren einer bevorzugten Hydrogel-Formulierung wurden daher PNA-Sonden hergestellt.

[0079] Die DNAs wurden zuerst in Acetonitril gelöst, einem bevorzugten aprotischen Lösungsmittel, zum Herstellen des Hydrogels, aber es wurde entdeckt, dass PNAs nur schwach löslich in Acetonitril sind. Ein polareres Lösungsmittel, z.B. NMP, wurde für die Untersuchung ausgewählt, obwohl die Hydrogel-Formulierung unter Verwendung von NMP unter zahlreichen der getesteten Bedingungen nicht polymerisierte, um zu sehen, ob eine Lösung, die sowohl NMP und Acetonitril enthält, zur Optimierung fähig ist, um sowohl eine adäquate Löslichkeit der PNAs, und günstige Polymerisierungen des Hydrogels bereitzustellen. Zahlreiche Experimente mit verschiedenen Acetonitril-/NMP-Verhältnissen zeigten, dass eine optimale Formulierung ein Lösungsmittelverhältnis im Bereich von 3:1 bis 1:1 Acetonitril zu NMP haben sollte, wenn diese zwei aprotischen Lösungsmittel verwendet werden. Eine wässrige Lösung aus 50 mmol Natriumbicarbonat wurde dann verwendet, um die Polymer-/PNA-Lösung bei ungefähr pH 8,0 zu puffern, was eine Formulierung ergab, die in 20–30 Minuten vollständig polymerisierte. [Fig. 1](#) stellt schematisch die Reaktion des Hydrogel-Präpolymers mit einem organisch löslichen Biomolekül, wie einem PNA dar, und die Polymerisierung des derivatisierten Präpolymers.

B. Wirkung der PNA-Derivatisierung auf die Polymerisierung des Hydrogels

[0080] Der nächste Schritt bei der Bereitstellung eines PNA-Biochips gemäß dieser ersten bevorzugten Ausführungsform war die Bestimmung des Ausmaßes, durch den der Grad der Derivatisierung mit PNA die Polymerisierung des Hydrogels beeinflusst. Es wurde allgemein davon ausgegangen, dass die Hydrogel-Formulierung in Acetonitril einen aktiven Isocyanatgehalt von mindestens ungefähr 0,1 mÄq/g und nicht mehr als ungefähr 1 mÄq/g haben sollte, und dass ungefähr 0,2–0,8 mÄq/g bevorzugt wären. Unter Verwendung von Präpolymeren innerhalb dieses Bereichs wurden Experimente durchgeführt, wobei die verschiedenen Prozentteile der aktiven Isocyanate mit einer Testverbindung, Benzylamin, für 5 Minuten derivatisiert wurden; das Hydrogel, das verwendet wurde, hat eine aktive Isocyanat-Konzentration von ungefähr 0,4 mÄq/g. Die derivatisierten Hydrogele wurden dann durch Behandlung mit einem 50 mmol Natriumbicarbonatpuffer bei einem pH von 8,0 behandelt. Die Derivatisierung von 10 % der aktiven Isocyanate mit Benzylamin führte zu einem polymerisierten Hydrogel mit Eigenschaften, die denen des nicht derivatisierten, polymerisierten Hydrogels ähneln. Wenn demgegenüber mindestens ungefähr 20 % der aktiven Isocyanate mit Benzylamin derivatisiert waren, polymerisierte die erhaltene Formulierung nicht, was darauf hinwies, dass anschließend eine nicht ausreichende Menge an aktiven Isocyanaten für die Polymerisierung zur Verfügung stand. Daher wird davon ausgegangen, dass eine Derivatisierung von ungefähr 10 % der aktiven Isocyanate des Gels bevorzugt ist, und dass nicht mehr als ungefähr 15 % der aktiven Isocyanate so umgesetzt werden sollten. Wenn 10 % der aktiven Isocyanate mit dem PNA derivatisiert sind, wird geschätzt, dass ungefähr 1 bis 2 pmol an PNAs innerhalb eines Tröpfchens des Hydrogels von ungefähr 1 nl gebunden haben werden. Die Kontrolle dieses Parameters wird durch die Menge an PNA oder eines anderen Biomoleküls bewirkt, was zu der Präpolymer-Lösung hinzugegeben wird.

Derivatisierung mit einer DNA-Sonde

[0081] In einer alternativen Ausführungsform wird das Hydrogel der vorliegenden Erfindung mit einer DNA (oder mit einer ähnlichen Oligonucleotid)-Sonde derivatisiert. Anders als PNA ist DNA jedoch in einem organischen Lösungsmittel nicht löslich. Daher sind die Derivatisierung und die Polymerisierungsschritte, wenn DNA als biomolekulare Sonde verwendet wird, nicht getrennt, sondern wird als ein Teil eines einzelnen Schritts durchgeführt. Zusätzlich hat DNA, anders als PNA, keine aktive Amin-(oder andere)Gruppe, die für die Bindung der aktiven Isocyanate des Polymers verfügbar sind; daher ist die DNA vorzugsweise vor der Reaktion mit dem Präpolymer modifiziert worden, um eine geeignete reaktive Gruppe hinzuzufügen, wie beispielsweise durch eine Reaktion mit einem Diamin oder einem anderen Reaktionsmittel, das ein aktives primäres Amin bereitstellen könnte, wie durch die Verwendung von Standard-Amidit-Chemie.

[0082] Wie in der zuvor beschriebenen Ausführungsform, in der das Hydrogel mit PNA derivatisiert worden war, werden die Mengen der organischen Lösungsmittel und der wässrigen Pufferlösungen und die Reaktionsbedingungen ausgewählt, um die Hydrogel-Polymerisierung bezüglich der Polymerisierungsdauer, der Transparenz des Gels und der ähnlichen Eigenschaften auszuwählen. Ein Polymergehalt von ungefähr 4–10 % und ein Gehalt an organischen Lösungsmitteln von mindestens ungefähr 20 % (mehr bevorzugt mindestens ungefähr 30 %) werden als bevorzugt angesehen. Es ist ebenfalls zu vermuten, dass nicht mehr als ungefähr 20 % derivatisiert sein sollten, vorzugsweise nicht mehr als ungefähr 15 %, und mehr bevorzugt ungefähr 10 % oder weniger der aktiven Isocyanate des Hydrogels, indem diese mit der DNA-Sonde verbunden werden. Daher können beispielsweise, wie unten beispielhaft beschrieben wird, ungefähr 2,5 % der aktiven Isocyanate-Hydrogels mit der DNA-Sonde derivatisiert sein, wobei die Polymerisierung vorzugsweise unter Verwendung einer basischen gepufferten wässrigen Lösung erreicht wird, bei ungefähr pH 7,2 bis ungefähr 8,6, und mehr bevorzugt ungefähr 7,6 bis ungefähr 8,2.

[0083] Um dieses derivatisierte Hydrogel herzustellen, wird das Präpolymer zuerst in einem organischen Lösungsmittel gelöst, beispielsweise in Acetonitril, und dann wird die derivatisierte DNA (oder ein anderes wasserlösliches Oligonucleotid)-Sonde in einem wässrigen Puffer hergestellt. Die DNA-Lösung wird dann zu der Präpolymer-Lösung durch gutes Mischen zugegeben, was sowohl zur Derivatisierung des Gels und der Initiierung der Polymerisierung führt. Dieses allgemeine Verfahren des Lösens eines auf Polyurethan basierenden Hydrogels in einem wässrigen Lösungsmittel und das Zugabe einer wasserlöslichen biomolekularen Sonde in einer wässrigen Lösung ist anwendbar. [Fig. 2](#) stellt schematisch dar, wie die gleichzeitige Umsetzung eines wasserlöslichen Biomoleküls, wie DNA, mit dem Hydrogel-Präpolymer und die Polymerisierung des Hydrogels abläuft.

Bindung des Hydrogels an die Oberfläche des Substrats

[0084] Der letzte Schritt ist der des Auftragens der derivatisierten Hydrogel-Präpolymer-Formulierung auf ein geeignetes Substrat unter geeigneten Bedingungen, die Bindung des Hydrogels an die Oberfläche des Substrats zu ermöglichen. Wenn das ausgewählte Substrat transparent ist, um die Interferenz mit der Signaldetektion zu reduzieren, und wenn der Biochip durch transmittiertes Licht gescannt wird, ist Glas, dessen Oberfläche zuerst mit Amin derivatisiert ist, um die aktiven Stellen für die kovalente Bindung des polymerisierenden Hydrogels bereitzustellen, ein bevorzugtes Substrat. Direkt vor dem Auftragen des derivatisierten Hydrogels auf das derivatisierte Glassubstrat wird die Polymerisierung entweder durch Zugabe von wässrigem Puffer zum derivatisierten Präpolymer initiiert (im Fall der Derivatisierung mit einem in einem organischen Lösungsmittel löslichen Biomolekül) oder durch die Zugabe eines wässrigen Puffers, der ein wasserlösliches Biomolekül enthält. Das polymerisierende Hydrogel wird dann durch Mikro-Tropfen auf das Glassubstrat aufgetragen, um eine Anordnung von Mikrotröpfchen zu bilden, die vorzugsweise eine Dicke von ungefähr 30 bis 50 µm haben.

[0085] Eine 50 mmol wässrige Natriumbicarbonatpufferlösung, pH von ungefähr 7,2 bis ungefähr 8,4, kann verwendet werden, um die Polymerisierung des Hydrogels zu initiieren, und die Hydrogel-Formulierung bindet innerhalb von ungefähr 1 bis 10 Minuten ab der Initiierung der Polymerisierung fest an die Oberfläche des derivatisierten Glases. Wenn PNA oder eine andere in einem organischen Lösungsmittel gelöste Sonde verwendet wird, muss das derivatisierte Präpolymer nicht direkt nach der Derivatisierung verwendet werden, sondern es kann unter geeigneten Bedingungen vor der Initiierung der Polymerisierung durch Zugabe eines wässrigen Puffers gelagert werden. Wenn dagegen das Präpolymer mit einer wasserlöslichen Sonde derivatisiert ist, beginnen die Polymerisierung und die Derivatisierung nach der Zugabe der Sonde zu der Präpolymer-Lösung, so dass das polymerisierende Hydrogel kurz danach aufgetragen werden sollte.

[0086] Vorzugsweise polymerisieren diese Isocyanat-funktionalen Hydrogele in sehr stabilen Mikrotröpfchen, und diese sind vorzugsweise auf ein Substrat aufgetragen, um ein Mikrotröpfchen von mindestens ungefähr 20 µm Höhe, mehr bevorzugt von mindestens ungefähr 30 µm Höhe, und am meisten bevorzugt von ungefähr 30 µm bis ungefähr 50 µm Höhe zu bilden. Die Konsistenz der Hydrogel-Tröpfchen wird durch Auftragen des polymerisierenden Gels unter Verwendung einer Mikro-Tropf-Maschine oder einer ähnlichen automatisierten Maschine erreicht, da die Bereitstellung derartiger dicker Geltröpfchen oder Gelzellen die Empfindlichkeit des Biochips dramatisch erhöhen kann.

[0087] Um die übermäßige Vernetzung des polymerisierenden Gels zu verhindern, was zu einem Anstieg der Polymerkonzentration führen kann, wenn Wasser aus dem Gel verdunstet, und auch das Schrumpfen der Oberfläche des Geltröpfchens verursachen kann, wird der Biochip vorzugsweise in einer feuchten Umgebung gehärtet, beispielsweise in einer feuchten Kammer, und danach mit deionisiertem Wasser gewaschen.

[0088] Die Viskosität und die schichtbildenden Eigenschaften des polymerisierenden Hydrogels gegenüber dem Glassubstrat können wichtig sein, um eine richtige und konsistente Form der Tröpfchen über die gesamte Anordnung zu ergeben. In einer idealen Situation erhöht sich die Viskosität des polymerisierenden Hydrogels langsam und in linearer Form. Unglücklicherweise neigt die Viskosität der Hydrogele jedoch dazu, während der Polymerisierung exponentiell anzusteigen. Um eine eher lineare Expansion des Hydrogels während der Polymerisierung zu erleichtern, kann die Viskosität unter Verwendung von Verdickungsmitteln wie Polyethylenglycol verschiedener Molekulargewichte modifiziert sein. Die Viskosität des Hydrogels während der Polymerisierung kann beispielsweise mit einem Viskometer gemessen werden, gefolgt von der Zugabe des Verdickungsmittels. Durch Experimentieren wurde bestimmt, dass die Zugabe von Polyethylenglycol mit einem Molekulargewicht von ungefähr 1.000 oder mehr, z.B. so hoch wie das Molekulargewicht des Präpolymers, die Viskosität der Formulierung signifikant und die Schichteigenschaften verbessern kann. Daher wird in einigen bevorzugten Ausführungsformen Polyethylenglycol oder ein ähnliches Verdickungsmittel während der Polymerisierung zu dem Hydrogel hinzugegeben, um die Polymerisierungsrate zu kontrollieren.

Beispiel I: Herstellung eines PNA-Biochips und eines Tests

[0089] Eine Lösung aus 1 mg PNA (0,3 µm) mit der Sequenz NH₂-CATTGCTCAAAC-CO₂H wurde in 0,1 g NMP hergestellt. Als nächstes wurde eine Lösung aus 0,05 g Hypol PreMa G-50, einem Polyurethan-Präpolymer mit einem aktiven Isocyanatgehalt von ungefähr 0,4 mÄq/g in 0,2 g Acetonitril hergestellt, und zu der PNA-NMP-Lösung gegeben. Die erhaltene Lösung wurde mit 0,65 g einer 50 mmol NaHCO₃-Lösung bei einem pH-Wert von ungefähr 8,0 behandelt. Nach gutem Durchmischen wurden 2 Tröpfchen der erhaltenen Lösung manuell unter Verwendung einer Kapillar-Mikroröhre auf einen silanisierten Glasobjektträger aufgetragen. Die Tröpfchen polymerisierten auf der Oberfläche des Glases in ungefähr 15 Minuten. Als Negativkontrolle wurden zwei Hydrogel-Tröpfchen, die kein PNA enthielten, neben die PNA-haltigen Hydrogeltröpfchen aufgetragen.

[0090] Der Glasobjektträger, mit den Hydrogeltröpfchen darauf, wurde für 30 Minuten in Waschpuffer (5 mmol Natriumphosphatpuffer mit 0,05 % SDS bei pH 7,0) getränkt, um die organischen Lösungsmittel zu entfernen, und die verbleibenden aktiven Reste zu blockieren, um die nicht spezifische Bindung von Test-DNA zu verhindern. Als nächstes wurde der Objektträger mit 1 mg der komplementären Fluoreszenz-markierten DNA 3'-TAGTAACGAGTTTGCC-5'-Fluoreszein in Hybridisierungspuffer, der 600 µl 10 mmol Natriumphosphatpuffer mit 0,1 % SDS bei pH 7,0 enthält, bei Raumtemperatur für 1 Stunde behandelt. Nicht spezifisch gebundene DNA wurde durch 2 Stunden Waschen in Waschpuffer entfernt. Der erhaltene Objektträger wurde mit einem handbetriebenen Fluoreszenz-Detektor (Modell UVGL-25, UVP) beobachtet. Die Test-DNA diffundierte in die Hydrogel-Mikrotröpfchen und hybridisierte an die komplementäre PNA-„capture“-Sondensequenz, was ein starkes Fluoreszenzsignal ermöglichte, während die Test-DNA aus den Negativkontroll-Tröpfchen gewegewaschen wurde, die keine Signale zeigten. Dieser Test zeigt die Nützlichkeit solcher Hydrogel-Biochips.

Beispiel II: Herstellung eines DNA-Biochips und Test

[0091] Eine Lösung aus 0,025 g Hypol PreMa G-50 in 0,15 g Acetonitril wurde hergestellt. Als nächstes wurde eine Lösung aus 1 mg DNA (0,3 µm), mit einem Hexanamin an dessen 5'-Ende und mit der Sequenz NH₂(CH₂)₆-CATTGCTCAAAC-3' bei pH 8,0 in 0,32 g eines wässrigen 50 mmol NaHCO₃-Puffers hergestellt. Die DNA-Lösung wurde zu der Präpolymerlösung hinzugegeben und gut gemischt. Tröpfchen der erhaltenen Lösung wurden manuell unter Verwendung eines Kapillar-Mikroröhrchens auf einen silanisierten Glasobjektträger aufgetropft. Als Negativkontrolle wurden Hydrogeltröpfchen, die keine DNA enthielten, neben die DNA-haltigen Hydrogeltröpfchen aufgetropft.

[0092] Der Glasobjektträger mit den Hydrogeltröpfchen wurde für 30 Minuten in Waschpuffer (10 mmol Natriumphosphatpuffer mit 0,5 mol NaCl und 0,1 % SDS bei pH 7,0) getränkt, um organische Lösungsmittel zu entfernen, und die verbleibenden aktiven Reste zu blockieren, um die nicht-spezifische Bindung der Test-DNA zu verhindern. Als nächstes wurde der Objektträger mit 1 mg einer komplementären Fluoreszenz-markierten DNA, 3'-TAGTAACGAGTTTGCC-5'-Fluoreszenz in 600 µl Hybridisierungspuffer (10 mmol Natriumphosphatpuffer mit 0,5 mol NaCl und 0,1 % SDS bei pH 7,0) bei Raumtemperatur für 1 Stunde behandelt. Nicht spezifisch gebundene DNA wurde durch Waschen für zwei Stunden in Waschpuffer entfernt. Der Objektträger wurde mit einem handbetriebenen Fluoreszenz-Detektor (Modell UVGL-25, UVP) beobachtet. Die komplementäre Test-DNA diffundierte in die Hydrogel-Mikrotröpfchen und hybridisierte an die Gel-gebundene DNA-Sondensequenz, was zu einem starken Fluoreszenzsignal führte, aber sie wurde von den Negativkontroll-Tröpfchen gewegewaschen, was die Zuverlässigkeit und Nützlichkeit der vorliegenden Hydrogel-Biochips bei DNA-Hybridisierungs-Assays zeigt.

Beispiel III: Herstellung eines DNA-Biochip-Arrays und eines Tests zur Detektion der menschlichen β-Globin-Gensequenz

[0093] Ein DNA-Biochip wurde wie folgt hergestellt:

1. Die folgenden zwei Reaktionslösungen wurden hergestellt:

Lösung A = 0,1 g Hypol PreMa G-50 in 0,33 g Acetonitril und 0,33 g NMP (Gewichtsverhältnis von 4,5:15:15)

Lösung B = 1 mg Oligonucleotid in 1 ml 50 mmol Boratpuffer bei pH 8,0

2. Lösung A (34,5 Teile) wurde mit Lösung B (65,5 Teile) gemischt, und die erhaltene Lösung wurde auf einen Glasobjektträger in Mikrotröpfchen aufgetragen. Das Auftragen in Mikrotröpfchen wurde mit einem Zapfen mit offener Konfiguration, CT MicroPipets DP-120 µm, geliefert von Conception Technologies, durchgeführt.

3. Die Objektträger mit den Mikrotröpfchen wurden für 1 Stunde in eine kontrollierte feuchte Kammer gegeben und dann für 10 Minuten mit Waschpuffer gewaschen, was die Herstellung der Biochips komplettierte.

[0094] Das Testen eines solchen Biochips wird durch Hybridisierung bei verschiedenen Konzentrationen in einem Hybridisierungs-Puffersystem für 20 Minuten bis 2 Stunden durchgeführt, proportional zum Molekulargewicht des Ziels, mit einer Zielsonde durchgeführt, die einen Fluoreszenz-Rest oder ähnliches trägt. Jedes nicht spezifisch gebundene Ziel wird mit dem Hybridisierungspuffer gewaschen, und der Biochip wird dann gescannt, um das gebundene Ziel mittels optischer Fluoreszenz nachzuweisen.

[0095] Um die Leistungsfähigkeit dieser Biochips, die DNA-Sonden tragen, zu validieren, wurden die 20 folgenden 12-Mer Oligonucleotide, die mit einem primären Amin am jeweiligen 5'-Ende unter Verwendung von Standard-Amidit-Chemie derivatisiert waren, auf separaten Hydrogelzellen als Teil eines auf diese Weise hergestellten Biochips immobilisiert:

G1	5' - CCTAAGTTCATC - 3'
G2	5' - TATCTCTTATAG - 3'
G3	5' - CTATCGTACTGA - 3'
G4	5' - TTCCTTCACGAG - 3'
G5	5' - ATTATTCCACGG - 3'
G6	5' - ATCTCCGAAC TA - 3'
G7	5' - CCTTATTATGCA - 3'
G8	5' - ACGCTTCCTCAG - 3'
G9	5' - GACTTCCATCGG - 3'
G10	5' - CGTACCTTGTA A - 3'
G11	5' - CTAAACCTCCAA - 3'
G12	5' - CTAGCTATCTGG - 3'
G13	5' - TAATTCCATTGC - 3'
G14	5' - ATTCCGATCCAG - 3'
G15	5' - TTAGTTATT CGA - 3'
G16	5' - AAGTTCATCTCC - 3'
G17	5' - TTCATCTCCGAA - 3'
G18	5' - CCGAACTAAACC - 3'
G19	5' - AACTAAACCTCC - 3'
G20	5' - CTAAACGTCCAA - 3'
G21	Kontroll-Hydrogel

[0096] Eine 30-Mer DNA-Zielprobe der Sequenz des menschlichen β -Globin-Gens wurde synthetisiert und mit einem Markermolekül, z.B. Fluoreszein, an dessen 5'-Ende unter Verwendung von Standard-Amidit-Chemie markiert. Die Sequenz dieser Zielsonde ist wie folgt:
5'-(Fluoreszein)-TTGGAGGTTTAGTTCGGAGATGAACTTAGG-3'

[0097] Die Sequenzen von G1, G6, G11, G16, G17, G18 und G19 sind vollständig komplementär zu verschiedenen Bereichen der Zielsonde. Die Sequenz von G20 hat eine interne ein Basenpaar umfassende Fehlüber-einstimmung gegenüber der in G11. Die Ergebnisse der Tests sind in Tabelle 8 aufgeführt:

Tabelle 8

Intensität der Fluoreszenz abhängig von der Sequenz

Oligonucleotid	G1	G6	G11	G16	G17	G18	G19	G20
Intensität	1528	2713	5630	650	841	2098	6066	2181
Standardabweichung	77	151	238	164	127	354	638	225

[0098] Wie in Tabelle 8 gesehen werden kann, war die Unterscheidungskraft der Hybridisierung zwischen einer perfekten Übereinstimmung und einer ein Basenpaar umfassenden Fehlübereinstimmung (G20) (Fluoreszenz-Intensität von 5630 gegenüber 2182). Die nicht relevanten Oligonucleotide in G2, G3, G4, G5, G7, G8, G9, G10, G12, G13, G14 und G15, wie auch die Kontroll-Hydrogelzelle, wiesen eine Intensität von knapp über dem Hintergrund auf, und zeigten eine minimale, unspezifische Bindung an das Hydrogel.

Patentansprüche

1. Biochip, umfassend

- (a) ein festes Substrat mit einer oberen Oberfläche;
- (b) eine Vielzahl Hydrogelzellen, jede mit einer individuellen Dicke von mindestens 20 µm, die an die obere Oberfläche des Substrats angeheftet sind; und
- (c) eine biomolekulare Sonde, die kovalent an und in mindestens eine der Hydrogelzellen gebunden ist, **dadurch gekennzeichnet**, dass diese Zellen aus einem Isocyanat-funktionalen Polymer gebildet werden und optisch transparent sind, und dadurch dass verschiedene Sonden an und in verschiedene dieser Zellen gebunden sind.

2. Biochip gemäß Anspruch 1, ferner dadurch gekennzeichnet, dass jede Hydrogelzelle ein Polymer mit Urethan- und Harnstoffbindungen umfasst.

3. Biochip gemäß Anspruch 1 oder 2, ferner dadurch gekennzeichnet, dass das Hydrogelpolymer Polyethylenglykol, Polypropylenglykol oder ein Copolymer davon umfasst.

4. Biochip gemäß irgendeinem der Ansprüche 1, 2 oder 3, worin das Substrat transparent ist und reaktive Moleküle auf seiner oberen Oberfläche hat, die das Hydrogel kovalant an das Substrat binden, infolge der Isocyanatfunktionalität.

5. Biochip gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 4, worin die Zellen zwischen 20 µm dick und 100 µm dick sind.

6. Biochip gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5, worin die biomolekulare Sonde DNA, RNA oder PNA umfasst.

7. Verfahren zum Herstellen eines Hydrogel-Biochips mit einem darauf immobilisierten Biomolekül, wobei das Verfahren die Schritte umfasst:

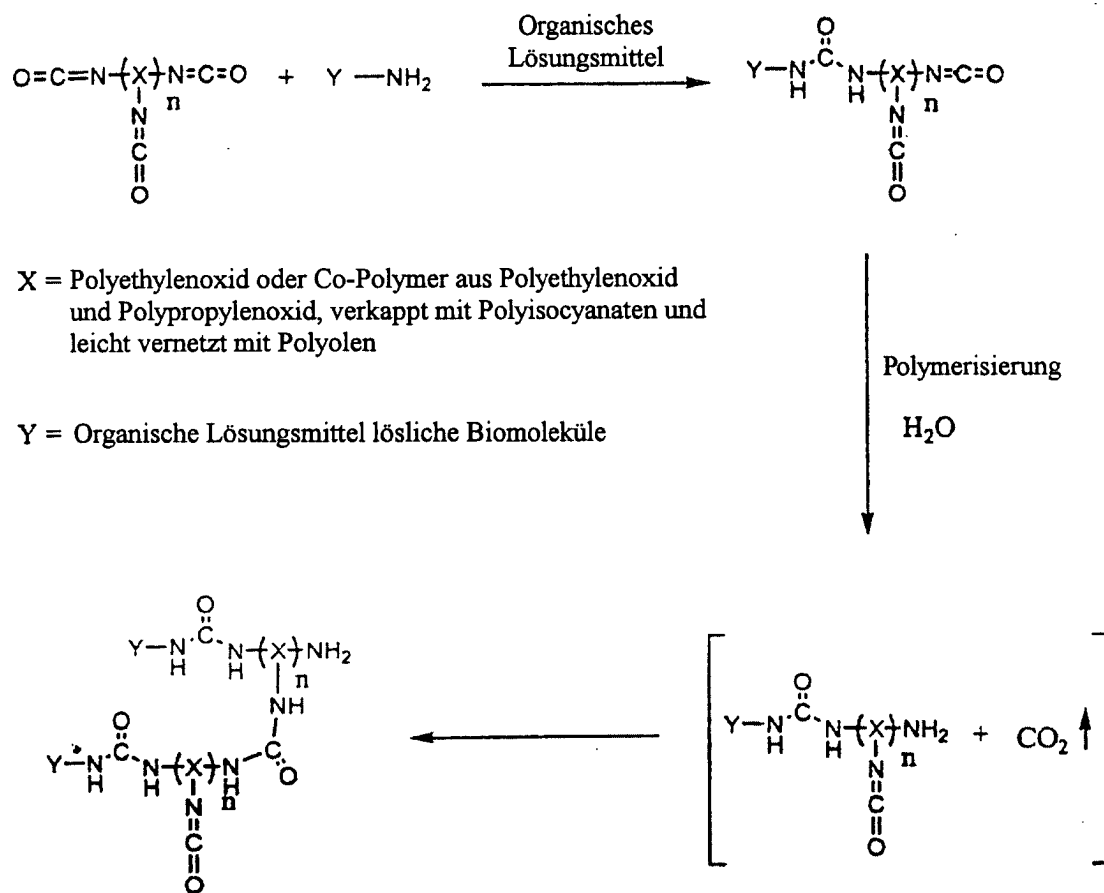
- (a) Bereitstellen eines festen Substrats mit einer oberen Oberfläche;
- (b) Bereitstellen einer Lösung eines Präpolymers in einem aprotischen wassermischbaren organischen Lösungsmittel;
- (c) Bereitstellen einer Lösung eines Biomoleküls;
- (d) kovalentes Binden des Biomoleküls an das Präpolymer; und
- (e) Initiieren der Polymerisierung des Hydrogel-Präpolymers in wässriger Lösung bei einem pH von 7,0 bis 9,5, dadurch gekennzeichnet, dass das Präpolymer ein Isocyanat-funktionales Hydrogel-Präpolymer ist, und dass die Polymerisierung so kontrolliert wird, dass das entstehende Hydrogel eine adäquate Porengröße hat, um die Biomolekül-Diffusion zu ermöglichen und in seinem vollständig polymerisierten Zustand optisch transparent ist.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, worin das aprotische wassermischbare organische Lösungsmittel ausgewählt wird aus der Gruppe, bestehend aus N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP), Dimethylformamid (DMF), Tetrahydrofuran, Dioxan, Aceton, Acetonitril und Gemischen daraus.

9. Verfahren gemäß Anspruch 7 oder 8, worin das aprotische wassermischbare organische Lösungsmittel Aceton oder Acetonitril ist.
10. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 7 bis 9, weiter dadurch gekennzeichnet, dass das Hydrogel ein Polymer mit Urethan-Harnstoff-Durchlässen umfasst, die durch Isocyanatvernetzung gebildet werden, und dadurch dass das Biomolekül kovalent an das Präpolymer durch eine Bindung gebunden wird, die aus der Isocyanatreaktivität des Substrats entsteht.
11. Verfahren gemäß Anspruch 10, worin das Präpolymer mit einem primären Amin des Biomoleküls reagiert, welches weiter dadurch gekennzeichnet ist, dass das Substrat aktive Amine an seiner oberen Oberfläche hat, die ebenfalls mit Isocyanatgruppen reagieren, um das Hydrogel kovalent an das Substrat zu binden.
12. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 7 bis 11, ferner dadurch gekennzeichnet, dass das Hydrogel-Präpolymer als eine Lösung mit aktiven Isocyanaten von zwischen ungefähr 0,1 mÄq/g und ungefähr 1 mÄq/g bereitgestellt wird, und dadurch, dass dieses Präpolymer Polyethylenoxid, Polypropylenoxid oder ein Copolymer aus Polyethylenoxid und Polypropylenoxid umfasst, welches mit Diisocyanaten verkappt ist, wobei das Präpolymer gegebenenfalls leicht vernetzt sein kann.
13. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 7 bis 12, weiter dadurch gekennzeichnet, dass die Schritte des kovalenten Bindens des Biomoleküls an das Hydrogel-Präpolymer und des Initiierens der Polymerisierung des Hydrogel-Präpolymers gleichzeitig durch Mischen der Präpolymerlösung mit einer wässrigen Lösung dieses Biomoleküls durchgeführt werden.
14. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 7 bis 13, welches weiter dadurch gekennzeichnet ist, dass der pH-Wert und eine Menge des aprotischen Lösungsmittels, die in der Hydrogellösung vorhanden sind, verwendet werden, um die Entstehung von Kohlendioxid zu kontrollieren und die Präzipitierung von Isocyanat-funktionalem Präpolymer zu verhindern, um die Opazität des erhaltenen Hydrogels zu minimieren, dadurch, dass die Polymerisierung bei mindestens 90 % relativer Feuchtigkeit durchgeführt wird.
15. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 7 bis 12, weiter dadurch gekennzeichnet, dass das Biomolekül in einem aprotischen organischen Lösungsmittel gelöst ist, und die Polymerisierung des Hydrogel-Präpolymers durch Zugabe einer gepufferten wässrigen Lösung hierzu initiiert wird, bei einem Verhältnis des organischen Lösungsmittels zu Wasser, das größer als 0,25 bis 1 ist, zum Zeitpunkt, bei dem das Hydrogel polymerisiert, worin das Verfahren weiter den Schritt des Mikropottings der polymerisierten Hydrogellösung auf die obere Oberfläche des Substrats einschließt, was zur Haftung des Hydrogels und des immobilisierten Biomoleküls an das Substrat führt.
16. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 7 bis 12, worin der aktive Isocyanatgehalt des Hydrogel-Präpolymers zwischen 0,2 und 0,8 mÄq/g liegt, worin 10 % oder weniger der reaktiven Isocyanate in dem Präpolymer reagieren, um die biomolekularen Sonden zu immobilisieren, wobei andere reaktive Isocyanate kovalent an das Substrat binden und ein vernetztes Hydrogel bilden.
17. Hybridisierungsassay, umfassend
- (a) Bereitstellen eines Biochips, welcher ein Substrat umfasst, das mindestens zwei Hydrogelzellen daran gebunden hat, wobei jede Zelle eine Dicke von mindestens 20 µm hat und ein Polymer umfasst, das aus einem Isocyanat-funktionalen Hydrogel-Präpolymer gebildet wird, was aus Polyethylenglykol, Polypropylenglykol oder einem Copolymer davon gebildet wird, worin mindestens eine Hydrogelzelle außerdem eine biomolekulare Sonde einschließt, die kovalent daran gebunden ist;
 - (b) Kontaktieren des Biochips mit einer Analyt-Lösung, die das Ziel-Biomolekül unter Hybridisierungsbedingungen kontaktiert;
 - (c) Waschen des Hydrogel-Biochips unter Bedingungen, die unspezifisch gebundene und nicht-gebundene Ziel-Biomoleküle entfernen; und
 - (d) Nachweisen des gebundenen Ziel-Biomoleküls.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



Fortsetzung der Polymerisierung,
bis alle Isocyanate verbraucht sind.

FIG. 1

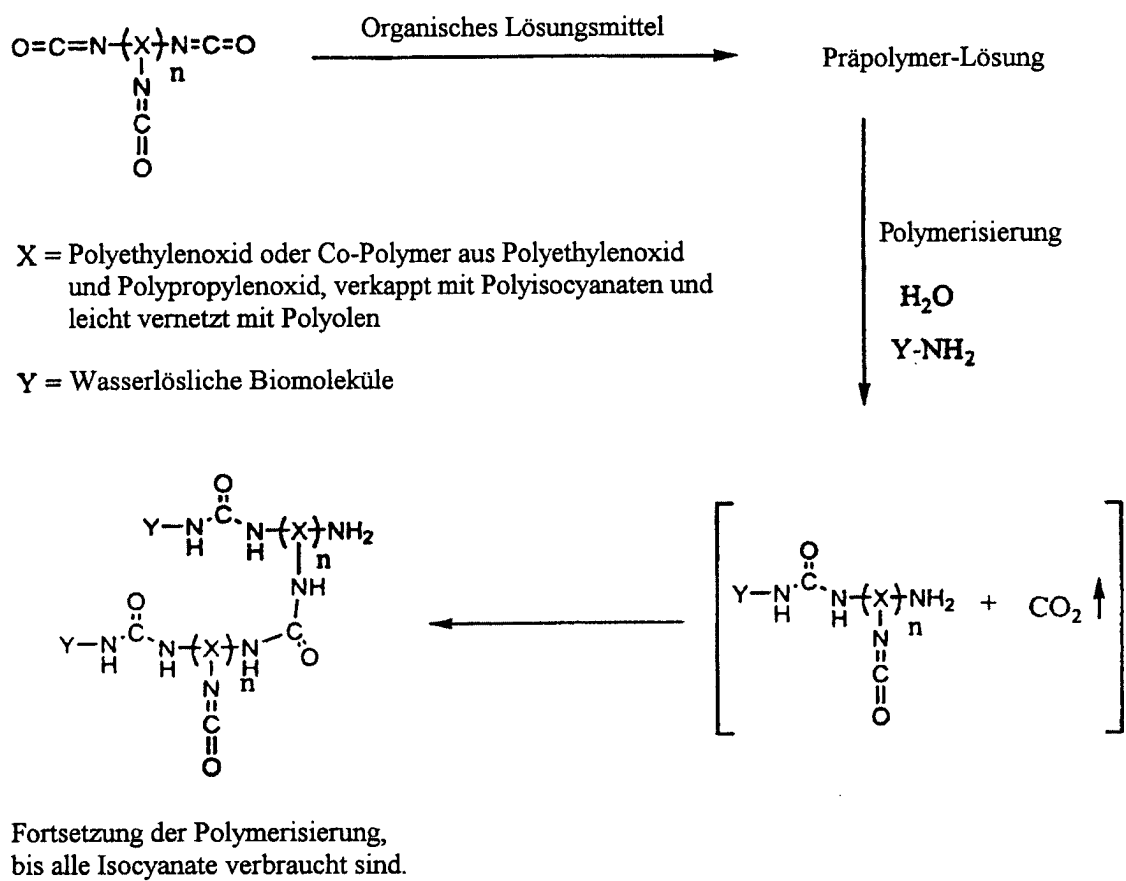


FIG. 2