



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 60 2005 000 189 T2 2007.02.08

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 553 415 B1

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: G01N 33/543 (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: 60 2005 000 189.1

(96) Europäisches Aktenzeichen: 05 000 285.6

(96) Europäischer Anmeldetag: 07.01.2005

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 13.07.2005

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 25.10.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 08.02.2007

(30) Unionspriorität:

2004001963 12.01.2004 KR

(74) Vertreter:

Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &  
Schwanhäusser, 80538 München

(73) Patentinhaber:

Samsung Electronics Co., Ltd., Suwon, Kyonggi,  
KR

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, FR, GB

(72) Erfinder:

Hwang, Kyu-youn, Incheon-si, KR

(54) Bezeichnung: **Verwendung eines Trägers mit einer aktivierte Carboxylgruppe an der Oberfläche in einem Verfahren zur hochdichten Immobilisierung von Biomolekülen auf besagtem Träger und ein Microarray welches über dieses Verfahren hergestellt wurde**

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 eingelebt, 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

### HINTERGRUND DER ERFINDUNG

#### 1. Gebiet der Erfindung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Immobilisierung eines Biomoleküls auf einem Microarray-Substrat und ein Biomolekülmicroarray, das unter Verwendung des Verfahrens hergestellt wird.

#### 2. Beschreibung des verwandten Standes der Technik

**[0002]** Der Begriff "Microarray" bezieht sich auf ein Substrat, das spezifische Moleküle hat, die in hoher Dichte auf vorbestimmten Bereichen immobilisiert sind. Beispiele des Microarrays umfassen zum Beispiel ein Polynukleotidmicroarray und ein Proteinmicroarray. Solche Microarrays sind im Stand der Technik gut bekannt, und Beispiele sind in den US Patenten 5,445,934 und 5,744,305 offenbart. Im Allgemeinen werden Microarrays unter Verwendung von photolithographischer Technologie hergestellt. In dem photolithographischen Verfahren wird ein vorbestimmter Bereich eines Substrats, das mit einem Monomer beschichtet ist, das eine entfernbare Schutzgruppe hat, einer Energiequelle ausgesetzt, um die Schutzgruppe von dem Monomer zu entfernen, und dann wird ein zweites Monomer, das eine entfernbare Schutzgruppe hat, an das Monomer gekoppelt. Der Vorgang des Aussetzens einer Energiequelle, des Entfernens der Schutzgruppe und des Koppelns eines Monomers wird wiederholt, um ein gewünschtes Polynukleotid auf dem Substrat herzustellen. Alternativ dazu werden Microarrays unter Verwendung eines Verfahrens hergestellt, in dem ein bereits synthetisiertes Polynukleotid an einem vorbestimmten Ort auf dem Substrat immobilisiert wird, wie beispielsweise ein Spotting-Verfahren, ein piezoelektrisches Druckverfahren, zum Beispiel unter Verwendung eines Tintenstrahldruckers, und ein Micropipettierungsverfahren, usw.. Dieser Ansatz ermöglicht das freie Anordnen von Biomolekülen und findet daher breite Anwendung. US 6,413,722 B1, US 5,320,944, US 5,643,721 und US 5,071,746 offenbaren Verfahren zur Modifizierung von festen Trägern und/oder Assaymaterialien.

**[0003]** Im Allgemeinen ist es schwierig, Biomoleküle auf einer Oberfläche eines Substrats wie Glas oder Plastik zu immobilisieren. Um ein vorher synthetisiertes Biomolekül auf einem festen Substrat nach herkömmlichen Verfahren zu immobilisieren, wurde die Oberfläche des Substrats so behandelt, um funktionelle Gruppen zu enthalten. Beispiele der funktionellen Gruppen umfassen eine Aminogruppe, eine Aldehydgruppe, eine Epoxidgruppe und eine Estergruppe.

**[0004]** Es sind Verfahren vorgeschlagen worden, die das Beschichten eines festen Substrats mit funktionellen Gruppen und dann das Immobilisieren aktiver Biomoleküle darauf umfassen. Zum Beispiel offenbart US Patent Nr. 5,350,800 ein Verfahren umfassend das Aktivieren einer Carboxylgruppe eines Carboxylgruppe enthaltenden Proteins, zum Beispiel Heparin oder Laminin unter Verwendung von Carbodiimid, und Umsetzen des sich daraus ergebenden Produkts mit einem festen Substrat, das mit einer Aminogruppe beschichtet ist, um das Produkt zu Immobilisieren. US Patent Nr. 5,760,130 offenbart ein Verfahren umfassend Immobilisieren eines Polynukleotids, das mit Phosphorimidazolid aktiviert ist, auf einem mit einer Aminogruppe beschichteten Substrat. Da jedoch in den herkömmlichen Verfahren das mit einer Aminogruppe beschichtete Substrat verwendet wird, ist das Aktivieren des Biomoleküls erforderlich.

**[0005]** US Patent Nr. 5,760,130 offenbart ein Verfahren zur Immobilisierung eines Polynukleotids auf einer Plastikplatte, die eine Carboxylgruppe hat. In diesem Verfahren können zum Beispiel "Sumilon" MS-3796F und MS-3696F (erhältlich von Sumitomo Bakelite), die beide sowohl eine Carboxylgruppe als auch eine Aminogruppe haben, verwendet werden. Da jedoch in diesem Verfahren die Plastikplatte eine Carboxylgruppe hat, gibt es das Problem, dass die Dichte der Carboxylgruppen zu niedrig ist. Ferner ist dieses in US-Patent Nr. 5,760,130 offenbarte Verfahren zur Synthese von cDNA unter Verwendung eines Trägers, der darauf immobilisierte Polynukleotide hat, gedacht. Es ist daher nicht erforderlich, zur Analyse eines Zielbiomoleküls wie in einem Microarray die Fluoreszenzintensität zu messen. Das Patent erwähnt keine Notwendigkeit zur Einführung der Carboxylgruppe in hoher Dichte. Daher haben die vorliegenden Erfinder intensive Forschung betrieben, um die Intensität des Fluoreszenzsignals, das von einer Analyse eines Zielbiomoleküls erhalten wird, durch Immobilisieren des Biomoleküls auf einem Microarray-Substrat in hoher Dichte zu erhöhen, und haben ein Verfahren zur Immobilisierung eines Biomoleküls auf einem Substrat in hoher Dichte unter Verwendung eines Carboxylanhydrids entdeckt.

## ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0006]** Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Immobilisierung eines Biomoleküls auf einem Substrat in hoher Dichte unter Verwendung des Substrats, das eine aktivierte Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat, bereit, wie im Anspruch 1 definiert ist. Bevorzugte Ausführungsformen sind in den Unteransprüchen angegeben.

**[0007]** Ferner stellt die vorliegende Erfindung ein Microarray bereit, das durch das obige Verfahren hergestellt wird.

**[0008]** Nach einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Immobilisierung eines Biomoleküls auf einem festen Substrat bereitgestellt, umfassend:

Beschichten des festen Substrats mit Silananhidrid, um eine funktionelle Anhydridgruppe auf eine Oberfläche des festen Substrats einzuführen;

Freilegen einer Carboxylgruppe von der funktionellen Anhydridgruppe durch Hydrolyse;

Umsetzen der Carboxylgruppe mit Carbodiimid und Succinimid, um die Carboxylgruppe zu aktivieren; und Kontaktieren des Biomoleküls mit dem festen Substrat, das die aktivierte Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat, um das Biomolekül auf dem festen Substrat zu immobilisieren.

**[0009]** Nach einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Immobilisierung eines Biomoleküls auf einem festen Substrat bereitgestellt, umfassend:

Beschichten des festen Substrats mit Aminosilan, um eine funktionelle Aminogruppe auf eine Oberfläche des festen Substrats einzuführen;

Unsetzen der funktionellen Aminogruppe mit Tetracarboxyldianhydrid, um eine funktionelle Anhydridgruppe in die Oberfläche des festen Substrats einzuführen;

Freilegen einer Carboxylgruppe von der funktionellen Anhydridgruppe durch Hydrolyse;

Umsetzen der Carboxylgruppe mit Carbodiimid und Succinimid, um die Carboxylgruppe zu aktivieren; und Kontaktieren des Biomoleküls mit dem festen Substrat, das die aktivierte Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat, um das Biomolekül auf dem festen Substrat zu immobilisieren.

## KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0010]** Die obigen und anderen Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden durch das detaillierte Beschreiben von beispielgebenden Ausführungsformen davon mit Bezugnahme auf die beigefügten Zeichnungen ersichtlicher, bei denen:

**[0011]** [Fig. 1](#) eine Ansicht ist, die ein Verfahren zur Herstellung eines Microarray-Substrats zeigt, das eine aktivierte Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat, nach einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung;

**[0012]** [Fig. 2](#) ein Schema ist, das ein Verfahren zur Herstellung eines Microarray-Substrats zeigt, das eine aktivierte Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat, gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung;

**[0013]** [Fig. 3A](#) und [Fig. 3B](#) Ansichten sind, die die Messergebnisse von Fluoreszenzintensitäten für ein Microarray zeigen, bei dem eine Nukleinsäuresonde auf einem Substrat immobilisiert wurde, das unter Verwendung des Verfahrens gemäß einer beispielgebenden Ausführungsform der vorliegenden Erfindung hergestellt wurde, und dann mit einer Zielnukleinsäure hybridisiert wurde, sowie für ein Microarray, bei dem eine Nukleinsäuresonde auf einem herkömmlichen Substrat immobilisiert und dann mit einer Zielnukleinsäure hybridisiert wurde; und

**[0014]** [Fig. 4A](#) bis [Fig. 4D](#) Ansichten sind, die die Messergebnisse von Fluoreszenzintensitäten für Microarrays zeigen, bei denen eine Nukleinsäureprobe auf einem Substrat immobilisiert wurde, das unter Verwendung einer anderen beispielgebenden Ausführungsform der vorliegenden Erfindung hergestellt wurde und dann mit einer Zielnukleinsäure hybridisiert wurde, sowie für Microarrays, bei denen eine Nukleinsäuresonde auf einem herkömmlichen Substrat immobilisiert und dann mit einer Zielnukleinsäure hybridisiert wurde.

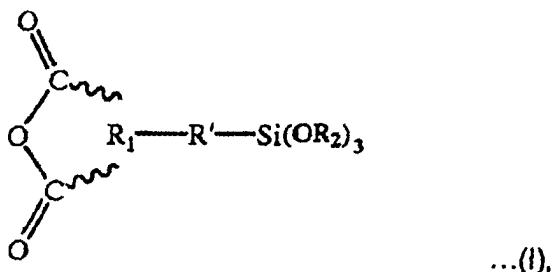
## DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0015]** Gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Immobilisierung eines Biomoleküls auf einem festen Substrat bereitgestellt, umfassend:

Beschichten eines festen Substrats mit Silanhydrid, um eine funktionelle Anhydridgruppe auf eine Oberfläche des festen Substrats einzuführen;  
 Freilegen einer Carboxylgruppe von der funktionellen Anhydridgruppe durch Hydrolyse;  
 Umsetzen der Carboxylgruppe mit Carbodiimid und Succinimid, um die Carboxylgruppe zu aktivieren; und  
 Kontaktieren des Biomoleküls mit dem festen Substrat, das die aktivierte Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat, um das Biomolekül auf dem festen Substrat zu immobilisieren.

**[0016]** Bei dem verfahren gemäß der vorliegenden Ausführungsform ist das feste Substrat nicht spezifisch beschränkt und kann transparent oder undurchsichtig sein. Das feste Substrat kann ein Material sein, das umweltfreundlich oder gegenüber Chemikalien resistent ist. Beispiele des festen Substrats umfassen Glas, Siliciumscheibe, Polyethylen, Polypropylen, Polycarbonat, Polyester, Polyacrylat und Polyurethan.

**[0017]** In dem verfahren gemäß der vorliegenden Ausführungsform kann das Silananhdyrid eine Verbindung sein, die durch Formel I dargestellt ist:

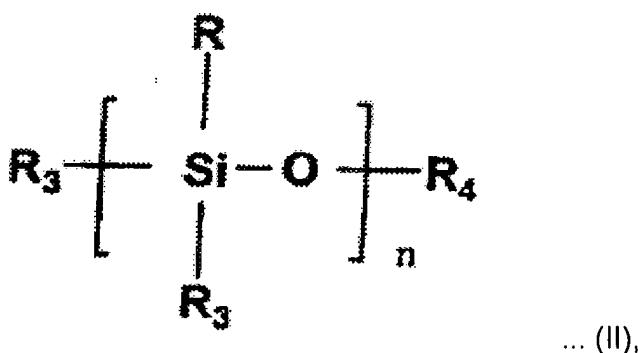


wobei

$\text{R}_1$  eine Alkylengruppe, eine Arylengruppe oder eine Alkylarylengruppe ist, vorzugsweise eine  $\text{C}_1\text{-}\text{C}_{20}$  Alkylengruppe mit gerader oder verzweigter Kette, und noch bevorzugter eine Methyl-, Ethyl-, Propyl- oder Butylgruppe ist,  $\text{R}'$  eine substituierte oder nichtsubstituierte  $\text{C}_1\text{-}\text{C}_{20}$  Alkylengruppe, eine  $\text{C}_1\text{-}\text{C}_{20}$  Arylengruppe, eine  $\text{C}_1\text{-}\text{C}_{20}$  Arylenalkylgruppe oder eine  $\text{C}_1\text{-}\text{C}_{20}$  Alkylenarylengruppe ist,  $\text{R}_2$  eine  $\text{C}_1\text{-}\text{C}_{20}$  Alkylgruppe eine Arylgruppe, eine Arylenalkylgruppe, eine Alkylenarylgruppe oder ein Wasserstoffatom ist, und die jeweiligen  $\text{R}_2$  Gruppen gleich oder voneinander verschieden sein können. Noch bevorzugter kann das Silananhdyrid 3-(Triethoxysilyl)propylbernsteinsäureanhdydrid sein, das zum Beispiel von Gelest, Inc. erhältlich ist.

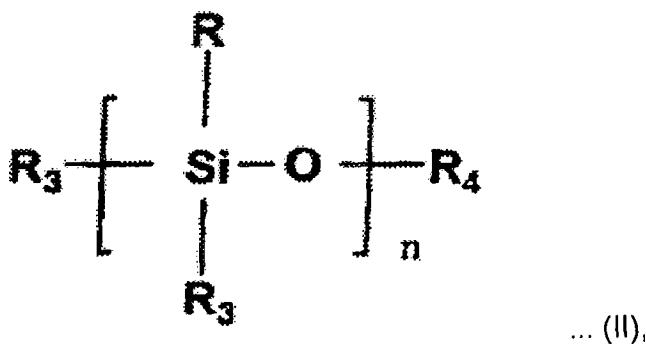
**[0018]** In dem Verfahren gemäß der vorliegenden Ausführungsform kann das feste Substrat mit einer Lösung, die 0,01 bis 90 Gew.-% des Silananhdyrids enthält, beschichtet werden.

**[0019]** Beim Beschichten des festen Substrats mit einem Silananhdyrid kann das feste Substrat ferner mit einer Silananhdyridlösung beschichtet werden, die des weiteren eine Silanverbindung umfasst, die durch irgendeine der Formeln II und III dargestellt ist:



wobei

$\text{R}_3$  eine  $\text{C}_1\text{-}\text{C}_{20}$  Alkoxygruppe, eine Hydroxylgruppe, oder ein Halogen ist,  $\text{R}_4$  eine  $\text{C}_1\text{-}\text{C}_{20}$  Alkylgruppe mit gerader oder verzweigter Kette, eine Arylgruppe, eine Arylenalkylgruppe oder eine Alkylenarylgruppe oder eine mit Fluor substituierte funktionelle Kohlenwasserstoffgruppe einschließlich  $\text{CF}_3$  ist, und  $n$  ein Integer von 1 bis 15 ist,



wobei

$R_5$  eine  $C_{1-C_{20}}$  Alkylgruppe mit gerader oder verzweigter Kette, eine Arylgruppe, eine Arylenalkylgruppe oder eine Alkylenarylgruppe oder ein Wasserstoffatom ist.

**[0020]** Die Menge der Silanverbindung, die durch irgendeine der Formeln II und III dargestellt ist, kann 0 bis 0,01 Gewichtsteile basiert auf 100 Gewichtsteile des Silananhydrids sein.

**[0021]** Die Lösung zur Beschichtung wird durch Verdünnen der Verbindung, die durch Formel I dargestellt ist, in einem geeigneten Lösungsmittel oder durch Mischen der Verbindung, die durch Formel I dargestellt ist, mit der Silanverbindung, die durch irgendeiner der Formeln II und III dargestellt ist, hergestellt. Ein Gewichtsverhältnis des Silananhydrids nach Formel I zur Silanverbindung, die durch irgendeiner der Formeln II und III dargestellt ist, kann 0,01 : 99,99 bis 100 : 0 betragen. Der Gehalt an synthetisiertem Silanoligomer in der Beschichtungslösung kann 0,01 bis 90 Gew.-% betragen. Beispiele des Lösungsmittels, das verwendet werden kann, umfassen ein Alkohollösungsmittel, wie Methanol, Ethanol, Propanol und Butanol und Methylethylketon, Dimethylformamid, Methylpyrrolidon(N-Methylpyrrolidon) und Mischungen davon.

**[0022]** In dem verfahren nach der vorliegenden Ausführungsform ist ein verfahren zur Beschichtung des Silananhydrids im Stand der Technik gut bekannt und kann unter Verwendung eines Verfahrens durchgeführt werden, das aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus Tauchbeschichten (Selbstmontage Molekularbeschichten), Spin-Beschichten, Sprühen und chemischem Aufdampfen besteht. Tauchbeschichten kann für 1 Minute oder länger durchgeführt werden. Spin-Beschichten kann bei Geschwindigkeiten von 300 bis 2500 U/min durchgeführt werden. Die Beschichtungsschicht des Anhydrids, die mit diesem verfahren gebildet wird, kann bei etwa 100 bis 300° C ausgehärtet werden, um eine dreidimensionale Netzwerkstruktur zu bilden.

**[0023]** In dem Verfahren nach der vorliegenden Ausführungsform kann die Hydrolyse des Anhydrids in einer wässrigen Lösung bei 20 bis 100° C durchgeführt werden. Die Hydrolyse kann durch Behandeln des Anhydrids mit einer sauren oder neutralen Lösung für mindestens eine Minute bei der Temperatur von 20 bis 100° C und dann Trocknen des resultierenden Produktes unter einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt werden. Aufgrund der Hydrolyse werden von einem Anhydrid zwei Carboxylgruppen erzeugt, weshalb ein Substrat hergestellt werden kann, das Carboxylgruppen in hoher Dichte darauf hat. Daher können aktivierte Carboxylgruppen in hoher Dichte auf dem Substrat gebildet werden, und dann können Biomoleküle an den aktivierten Carboxylgruppen chemisch gebunden werden. Bei dem herkömmlichen verfahren wird zum Beispiel Bernsteinsäureanhydrid mit einem Substrat umgesetzt, das eine Aminogruppe auf seiner Oberfläche hat, um eine Carboxylgruppe zu bilden. Währenddessen kann das Substrat in dem Verfahren nach der vorliegenden Ausführungsform eine Carboxylgruppe in zweifach höherer Dichte, als das herkömmliche Substrat haben, das eine Aminogruppe auf seiner Oberfläche hat. Beim Verwenden eines Microarrays, das unter Verwendung des Substrats nach einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung hergestellt wird, in einer Analyse kann die Intensität der detektierten Fluoreszenz erhöht werden.

**[0024]** In dem Verfahren gemäß der vorliegenden Ausführungsform kann das Carbodiimid durch Formel IV dargestellt sein:



wobei

$R_6$  eine Alkylgruppe oder eine Cycloalkylgruppe ist, und  $R_7$  eine Alkylaminogruppe oder eine Acycloalkylaminogruppe ist.

**[0025]** In dem Verfahren gemäß der vorliegenden Ausführungsform kann das Carbodiimid 1-Ethyl-3-(3-dime-

thyl-aminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (EDC) oder N,N'-dicyclohexylcarbodiimid (DCC) sein. Das Succinimid kann N-Hydroxysuccinimid oder N-Hydroxysulfosuccinimid sein. Das Carbodiimid oder das Succinimid kann in einem geeigneten Lösungsmittel bei 20 bis 200 mM umgesetzt werden. Die Reaktionszeit kann mindestens 30 Minuten betragen, ist jedoch nicht spezifisch beschränkt. Das Carbodiimid oder das Succinimid wie N-Hydroxysuccinimid ist von Aldrich Chemical Co., Inc. käuflich erhältlich.

**[0026]** Es wird davon ausgegangen, dass die Reaktion einer Carboxylgruppe mit Carbodiimid und Succinimid nach folgendem Mechanismus erfolgt, sie ist aber nicht darauf beschränkt. Zuerst bilden eine Carboxygruppe auf einer Oberfläche des Substrats und ein Carbodiimid ein unbeständiges Zwischenprodukt, das mit einer Aminogruppe reagieren kann, d.h. O-Acylisoharnstoffesterverbindung. Dann reagiert die resultierende Bindung mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) oder wasserlöslichem N-Hydroxysulfosuccinimid, um einen beständigeren Succinimidylester zu bilden, wobei das Substrat, das eine aktivierte Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat, bereitgestellt wird.

**[0027]** In dem Verfahren gemäß der vorliegenden Ausführungsform kann das zu immobilisierende Biomolekül irgendeines mit einer funktionellen Gruppe sein, die imstande ist, eine chemische Bindung mit der aktivierten Estergruppe einzugehen, zum Beispiel eine Aminogruppe. Das Biomolekül kann DNS, RNS, PNS oder ein Protein sein.

**[0028]** Beim Umsetzen eines Biomoleküls, das eine reaktive funktionelle Gruppe wie eine Aminogruppe hat, mit einem gemäß der vorliegenden Ausführungsform hergestellten Substrat, das eine aktivierte Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat, wirkt das Biomolekül auf eine Esterbindung der aktivierten Carboxylgruppe ein, um eine Amidbindung zu bilden, und so wird das Biomolekül auf dem Substrat immobilisiert. Ein solches Immobilisierungsverfahren hat den Vorteil, dass die Anzahl der nichtspezifischen Bindungen zwischen Zielmaterialien und einem Substrat, die während des Hybridisierens auftreten können, beträchtlich reduziert werden kann.

**[0029]** [Fig. 1](#) ist eine Ansicht, die ein Verfahren gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung zur Herstellung eines Microarraysubstrats darstellt, das eine aktivierte Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat. Zuerst wird ein festes Substrat mit einem Silananhdyrid, d.h. 3-(Triethoxysilyl)propylbernsteinsäureanhdyrid (TSA) beschichtet (a). Als nächstes wird dann eine Hydrolysereaktion durchgeführt, um ein Substrat zu erhalten, das eine Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat (b), und das erhaltene Substrat wird mit Carbodiimid wie 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (EDC) und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und Succinimid, wie N-Hydroxysuccinimid (NHS) und N-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS) umgesetzt, um das Substrat zu erhalten, das eine aktivierte Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat (c).

**[0030]** Gemäß einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird ein Biomolekül-Microarray bereitgestellt, das unter Verwendung des obigen Verfahrens zur Immobilisierung eines Biomoleküls auf einer Oberfläche eines festen Substrats hergestellt wird. In diesem Biomolekül-Microarray werden wie in dem herkömmlichen Microarray Punktbereiche, auf dem die Biomoleküle immobilisiert sind, in einem Arraymuster angeordnet.

**[0031]** Verfahren zur Immobilisierung eines Biomoleküls auf einem Substrat sind im Stand der Technik gut bekannt. Beispiele umfassen ein Spotting-Verfahren, das von der Kontaktart (Engl.: contact-type) ist, ein piezoelektrisches Druckverfahren, zum Beispiel unter Verwendung eines Tintenstrahldruckers und ein Micropipettierverfahren, usw..

**[0032]** Gemäß einer noch weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung gibt es ein Verfahren zur Immobilisierung eines Biomoleküls auf einem festen Substrat, umfassend:  
Beschichten des festen Substrats mit Aminosilan, um eine funktionelle Aminogruppe auf eine Oberfläche des festen Substrats einzuführen;  
Umsetzen der funktionellen Aminogruppe mit Tetracarboxyldianhydrid, um eine funktionelle Anhydridgruppe in die Oberfläche des festen Substrats einzuführen;  
Freilegen einer Carboxylgruppe von der funktionellen Anhydridgruppe durch Hydrolyse;  
Umsetzen der Carboxylgruppe mit Carbodiimid und Succinimid, um die Carboxylgruppe zu aktivieren; und  
Kontaktieren des Biomoleküls mit dem festen Substrat, das die aktivierte Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat, um das Biomolekül auf dem festen Substrat zu immobilisieren.

**[0033]** In dem Verfahren gemäß der vorliegenden Ausführungsform kann das feste Substrat mit einer Lösung enthaltend 0,01 bis 90 Gew.-% der Aminosilanverbindung beschichtet werden.

**[0034]** In dem verfahren gemäß der vorliegenden Ausführungsform ist das Aminosilan ein primäres Aminosilan, das durch die Formel V dargestellt ist, oder ein sekundäres Aminosilan, das durch Formel VI dargestellt ist:



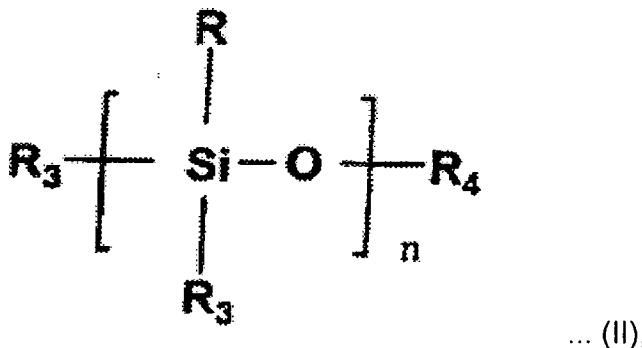
wobei

$\text{R}_8$  eine Alkylengruppe, eine Arylengruppe, eine Arylenalkylengruppe, eine Alkylenarylengruppe, eine Ether-, eine Ester- oder eine Imin enthaltende Gruppe ist, und  $\text{R}_9$  eine  $\text{C}_1\text{-}\text{C}_{20}$  Alkylgruppe, eine Arylgruppe, eine Arylenalkylgruppe, oder eine Alkylenarylgruppe oder ein Wasserstoffatom ist.

**[0035]**  $\text{R}_8$  und  $\text{R}_9$  sind vorzugsweise eine Alkylgruppe und noch bevorzugter eine Methyl-, Ethyl-, Propyl- oder Butylgruppe. Beispiele des Aminosilans umfassen 3-Aminopropyltrimethoxy-silan, 3-Aminopropyltriethoxysilan, 2-Aminoundecyltrimethoxysilan, Aminophenyltrimethoxysilan, Bis(trimethoxysilylpropyl)amin und N-(2-Aminoethylaminopropyl)triethoxysilan.

**[0036]** Beim Beschichten des festen Substrats mit Aminosilan wird zuerst zumindest eine Verbindung, die durch Formel V oder VI dargestellt ist, gemischt, um eine Mischung der Aminosilanverbindungen zu erhalten, der Wasser und ein Alkohollösungsmittel wie Ethanol und Methanol, zugemischt werden. Als nächstes wird die resultierende Lösung gerührt und die Silanverbindungen werden einer Kondensationsreaktion unterzogen, um ein Oligomerhydrat in der Lösung zu erhalten. Ein Substrat wird mit der/den Aminosilanverbindung/en beschichtet und bei etwa 200 bis 300°C gebacken, um eine Schicht zu bilden, die eine dreidimensionale Netzwerkstruktur hat.

**[0037]** Beim Beschichten des festen Substrats mit Aminosilan kann ferner das feste Substrat mit einer Aminosilanlösung beschichtet werden, die eine Silanverbindung umfasst, die durch irgendeiner der Formeln II und III dargestellt ist:



wobei

$\text{R}_3$  eine  $\text{C}_1\text{-}\text{C}_{20}$  Alkoxygruppe, eine Hydroxygruppe oder ein Halogen ist,  $\text{R}_4$  eine  $\text{C}_1\text{-}\text{C}_{20}$  Alkylgruppe mit gerader oder verzweigter Kette, eine Arylgruppe, eine Arylenalkylgruppe oder eine Alkylenarylgruppe oder eine funktionelle fluorierte Kohlenwasserstoffgruppe einschließlich  $\text{CF}_3$  ist und  $n$  eine ganze Zahl von 1 bis 15 ist,



wobei

$\text{R}_5$  eine  $\text{C}_1\text{-}\text{C}_{20}$  Alkylgruppe mit gerader oder verzweigter Kette, eine Arylgruppe, eine Arylenalkylgruppe oder eine Alkylenarylgruppe oder ein Wasserstoffatom ist.

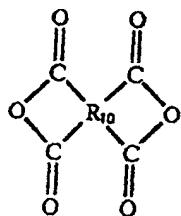
**[0038]** Als Silanverbindung, die durch Formeln II oder III dargestellt ist, kann eine Mischung umfaßend nur eine hydrophobe Silanverbindung zum Beeinflussen der Hydrophobizität der Aminschicht oder umfassend nur ein Silanalkoxid zur Erhöhung der Bindungsstärke an einer Substratoberfläche verwendet werden.

**[0039]** Die Menge der Silanverbindung, die durch Formeln II oder III dargestellt ist, kann 0,0001 bis 0,01 Gew.-Teile basiert auf 100 Gew.-Teile des Aminosilans betragen.

**[0040]** In dem verfahren gemäß der vorliegenden Ausführungsform ist ein verfahren zur Beschichtung des Aminosilans im Stand der Technik gut bekannt und kann unter Verwendung eines Verfahrens durchgeführt

werden, das aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus Tauchbeschichten (Selbstmontage-Molekularbeschichten), Spin-Beschichten, Sprühen und chemischem Aufdampfen besteht.

**[0041]** In dem verfahren gemäß der vorliegenden Ausführungsform kann das Tetracarboxyldianhydrid durch Formel VII dargestellt sein:



...(VII),

wobei

R<sub>10</sub> eine quaternäre organische Gruppe wie eine quaternäre carbocyclische aromatische, heterocyclische, alicyclische oder aliphatische Gruppe ist.

**[0042]** Das Tetracarboxyldianhydrid kann aus der Gruppe ausgewählt werden, die aus Pyromelitsäuredianhydrid, 3,3',4,4'-Biphenyltetracarboxyldianhydrid, 2,2',3,3'-Biphenyltetracarboxyldianhydrid, 2,3,3',4'-Biphenyltetracarboxyldianhydrid, 1,2,4,5-Benzoltetracarboxyldianhydrid, 3,3',4,4'-Benzophenontetracarboxyldianhydrid, 2,2',3,3'-Benzophenontetracarboxyldianhydrid, 2,3,3',4'-Benzophenontetracarboxyldianhydrid, Bis(3,4-dicarboxylphenyl)etherdianhydrid, Bis(3,4-dicarboxylphenyl)sulfondianhydrid, 1,4,5,8-Naphthalentetracarboxyldianhydrid, 1,2,5,6-Naphthalentetracarboxyldianhydrid, 2,3,6,7-Naphthalentetracarboxyldianhydrid, 2,2-Bis(3,4-dicarboxylphenyl)hexafluorpropandianhydrid, Cyclobutantetracarboxyldianhydrid, Methylcyclobutantetracarboxyldianhydrid und 1,2,3,4-tetracarboxylbutandianhydrid besteht.

**[0043]** In dem Verfahren gemäß der vorliegenden Ausführungsform kann das Tetracarboxyldianhydrid in einer Konzentration von 0,02 bis 90 Gew.-% umgesetzt werden. Das Tetracarboxyldianhydrid kann in gelöster Form in mindestens einem Lösungsmittel umgesetzt werden, das aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus Aceton, Methylethylketon, Dimethylformamid und N-Methylpyrrolidon besteht.

**[0044]** Die Reaktion zwischen der funktionellen Aminogruppe auf der Oberfläche des Substrats mit Tetracarboxyldianhydrid kann zum Beispiel durch Beschichten des Aminosubstrats mit dem Tetracarboxyldianhydrid durch Tauchbeschichten (Selbstmontage Molekularbeschichten), um eine einzelne Schicht zu bilden und dann Umsetzen des Tetracarboxyldianhydrids mit der Aminogruppe für mindestens 10 Minuten durchgeführt werden. Das Einführen eines solchen Dianhydrids kann durch eine nukleophile Substitutionsreaktion mit der Aminogruppe erreicht werden. Nach erfolgter Reaktion kann das auf dem Substrat adsorbierte Tetracarboxyldianhydrid mit dem Reaktionslösungsmittel weggespült und dann unter einer Stickstoffatmosphäre getrocknet werden. Das verbleibende Spülungslösungsmittel kann weiter durch Trocknen in einem Stickstoffofen entfernt werden.

**[0045]** In dem Verfahren gemäß der vorliegenden Ausführungsform kann die Hydrolyse des Anhydrids in einer wässrigen Lösung bei 20 bis 100° C durchgeführt werden. Die Hydrolyse kann durch Behandeln des Anhydrids mit einer sauren oder neutralen Lösung für mindestens eine Minute bei der Temperatur von 20 bis 100° C und dann Trocknen des resultierenden Produktes unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt werden. Aufgrund der Hydrolyse werden von einem Anhydrid zwei Carboxylgruppen erzeugt, und es ist daher möglich, ein Substrat herzustellen, das Carboxylgruppen in hoher Dichte darauf hat. So können aktivierte Carboxylgruppen in hoher Dichte auf dem Substrat gebildet werden, und dann können Biomoleküle an den aktivierten Carboxylgruppen gebunden werden. In dem herkömmlichen Verfahren zum Beispiel wird Bernsteinsäureanhydrid mit einem Substrat umgesetzt, das eine Aminogruppe auf seiner Oberfläche hat, um eine Carboxylgruppe zu bilden. In dem Verfahren gemäß der vorliegenden Ausführungsform kann währenddessen das Substrat eine Carboxylgruppe in einer zweifach höheren Dichte als das herkömmliche Substrat, das eine Aminogruppe auf seiner Oberfläche hat, aufweisen. Beim Verwenden eines Microarrays, das unter Verwendung des Substrats gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung hergestellt ist, in einer Analyse kann eine höhere Fluoreszenzintensität detektiert werden.

**[0046]** In dem Verfahren gemäß der vorliegenden Ausführungsform kann das Carbodiimid durch Formel IV dargestellt sein:

$R_6N=C=NR_7$ 

(IV),

wobei

$R_6$  eine Alkylgruppe oder eine Cycloalkylgruppe ist, und  $R_7$  eine Alkylaminogruppe oder eine Acycloalkylaminogruppe ist.

**[0047]** Das Carbodiimid kann 1-Ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (EDC) oder N,N'-dicyclohexylcarbodiimid (DCC) sein.

**[0048]** In dem Verfahren gemäß der vorliegenden Ausführungsform kann das Succinimid N-hydroxysuccinimid oder N-hydroxysulfosuccinimid sein.

**[0049]** In dem Verfahren gemäß der vorliegenden Ausführungsform kann das Carbodiimid oder das Succinimid bei 20 bis 200 mM umgesetzt werden.

**[0050]** In dem Verfahren gemäß der vorliegenden Ausführungsform kann das zu immobilisierende Biomolekül irgendeines sein, das eine funktionelle Gruppe hat, die imstande ist, an der aktivierten Estergruppe zu binden, zum Beispiel eine Aminogruppe. Das Biomolekül kann DNS, RNS, PNS oder ein Protein sein.

**[0051]** [Fig. 2](#) ist ein Schema, das ein Verfahren gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung zur Herstellung eines Microarrayssubstrats darstellt, das eine aktivierte Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat. Zuerst wird ein Substrat mit einem Aminosilan wie  $\gamma$ -Aminopropyltriethoxysilan (GAPS) beschichtet, um das Substrat mit einer Aminogruppe auf seiner Oberfläche zu erhalten (a). Dann wird das erhaltene Substrat mit einem Tetracarboxyldianhydrid wie 1,2,4,5-Benzoltetracarboxyldianhydrid umgesetzt, um das Dianhydrid in das Substrat einzuführen (b). Als nächstes wird eine Hydrolysereaktion durchgeführt, um das Substrat zu erhalten, das eine Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat (c), und das erhaltene Substrat wird mit Carbodiimid wie 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid (EDC) und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und Succinimid wie N-Hydroxysuccinimid (NHS) und N-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS) umgesetzt, um das Substrat zu erhalten, das eine aktivierte Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat (d).

**[0052]** Gemäß einer noch weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird ein Biomolekül-Microarray bereitgestellt, das unter Verwendung des obigen verfahrens zur Immobilisierung eines Biomoleküls auf einer Oberfläche eines festen Substrats hergestellt wird.

**[0053]** Verfahren zur Immobilisierung eines Biomoleküls auf einem Substrat sind im Stand der Technik gut bekannt. Beispiele umfassen ein Spotting-Verfahren von der Kontaktart (Engl.: contact-type), ein piezoelektrisches Druckverfahren, zum Beispiel unter Verwendung eines Tintenstrahldruckers, und ein Micropipettierverfahren, usw.

**[0054]** Nachstehend wird die vorliegende Erfindung detaillierter mit Bezug auf die folgenden Beispiele beschrieben. Diese Beispiele werden jedoch zur Veranschaulichung aufgeführt und sollten den Umfang der Erfindung nicht einschränken.

## BEISPIEL

Beispiel 1: Beschichten einer Nukleinsäure auf ein Substrat, das eine aktivierte Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat, und ein Substrat, das mit Aminosilan beschichtet ist.

(1) Herstellung eines Substrats, das mit Aminosilan beschichtet ist

**[0055]**  $\gamma$ -Aminopropyltriethoxysilan (GAPS) wurde in Ethanol gelöst, um eine Lösung von 0,002 M GAPS zu erhalten. Die erhaltene Lösung wurde auf ein Substrat aus gewaschenem Glas in Form eines Objekträgers durch Tauchbeschichten beschichtet, und dann bei 120° C für 1 Stunde behandelt, um ein Substrat, das mit Aminosilan beschichtet ist, herzustellen.

(2) Herstellung eines Substrats, das eine aktivierte Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat

**[0056]** 3-(Triethoxysilyl)propylbernsteinsäureanhydrid (TSA) wurde in Ethanol gelöst, so dass eine Lösung von 0,002 M TSA erhalten wurde. Die erhaltene Lösung wurde auf ein Substrat aus gewaschenem Glas in Form eines Objekträgers durch Tauchbeschichten beschichtet und dann bei 120° C für 1 Stunde behandelt,

um ein Substrat, das mit Silananhdyrid beschichtet ist, herzustellen.

**[0057]** Das mit Silananhdyrid (TSA) beschichtete Substrat aus Glas wurde in einem schwach saurem Wasser für drei Minuten gewaschen, um durch Hydrolyse eine Carboxylgruppe von dem Silananhdyrid zu erhalten. Dann wurde das erhaltene Glassubstrat, das eine Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat, für 1 Stunde in einer DMF-Lösung enthaltend N-Hydroxsuccinimid (NHS) und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) bei jeweils 100 mM umgesetzt, um ein Microarray-Substrat herzustellen, das eine aktivierte Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat. Danach wurde das resultierende Glassubstrat mit Ethanol gewaschen und wurde in einem Stickstoffbehälter aufbewahrt.

### (3) Immobilisierung von Nukleinsäure und Hybridisierungstest

**[0058]** Eine Oligonukleotidsonde, die eine Nukleotidsequenz nach SEQ ID Nr. 1 hat, wurde mit DMSO gemischt und unter Verwendung eines Spotters jeweils auf dem Substrat, das eine aktivierte Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat, und auf dem Substrat, das mit Aminosilan beschichtet ist, die jeweils aus dem obigen verfahren erhalten wurden, gespottet. Das Immobilisieren wurde bei 37° C, 100% RH für 1 Stunde durchgeführt, und dann wurde eine Nachwaschbehandlung durchgeführt, um Microarrays herzustellen, die die darauf immobilisierte Sonde haben.

**[0059]** Für die jeweiligen hergestellten Microarrays wurde eine Zielnukleinsäure, die eine der obigen Sonde von SEQ ID Nr. 1 komplementäre Nukleotidsequenz hat, mit der obigen Sonde hybridisiert. In der Hybridisierung wurde die Zielnukleinsäure in 0,1 % SSPET (ein Puffer mit Kochsalz-Natriumphosphat-EDTA enthaltend 0,1% Triton X-100) gelöst und mit jedem Microarray bei 37° C für 14 Stunden umgesetzt. Nach der Reaktion wurde jedes Microarray mit jeweils 6 × SSPET und 3 × SSPET für 5 Minuten gewaschen und dann in Stickstoff getrocknet. Die getrockneten Microarrays wurden mit einem GenePix 4000B Scanner<sup>TM</sup> (Axon) gescannt. Die Ergebnisse sind in [Fig. 3A](#) und [Fig. 3B](#) gezeigt. In der Hybridisierung wurde das Substrat, das mit Aminosilan beschichtet ist, d.h. Aminosubstrat, einem Blockierverfahren mit Bernsteinsäureanhydrid/NMP unterzogen.

**[0060]** Wie in den [Fig. 3A](#) und [Fig. 3B](#) gezeigt wurden für ein Microarray unter Verwendung des Substrats, das eine aktivierte Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat, und das unter Verwendung des Verfahrens gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung hergestellt wurde, eine höhere Fluoreszenzintensität und eine bessere Spot-Morphologie ohne die Notwendigkeit für das Blockierverfahren während der Hybridisierung erreicht. [Fig. 3A](#) veranschaulicht die Ergebnisse des TSA Substrats und [Fig. 3B](#) veranschaulicht die Ergebnisse des GAPS Substrats, wobei jeweils die linke Seite die Ergebnisse für eine Sonde-Konzentration von 100 µM zeigt und jeweils die rechte Seite die Ergebnisse für eine Sonde-Konzentration von 25 µM zeigt. Die Ergebnisse der Messung der Fluoreszenzintensität, die in [Fig. 3A](#) und [Fig. 3B](#) gezeigt sind, werden in der Tabelle 1 als Zahlenwerte gezeigt.

Tabelle 1

DNS Konzentration (µM)	TSA	GAPS
100	17.000	12.000
25	14.000	11.000

Beispiel 2: Beschichten einer Nukleinsäure auf einem Substrat, das eine aktivierte Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat, einem Aminosubstrat, und einem Substrat, das eine aktivierte Carboxylgruppe auf einer Aminoschicht hat

### (1) Herstellung eines Substrats, das eine aktivierte Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat

**[0061]** 3-(Triethoxsilyl)propylbernsteinsäureanhydrid (TSA) und 1,2-Bis-(triethoxsilyl)ethan wurden in Ethanol gelöst, so dass jede Konzentration von TSA und 1,2-Bis(triethoxsilyl)ethan in einer Lösung 0,002 M betrug. Die erhaltene Lösung wurde auf ein Substrat aus gewaschenem Glas in Form eines Objektträgers durch Tauchbeschichten beschichtet und dann bei 120° C für 1 Stunde behandelt, um ein mit Silananhdyrid beschichtetes Substrat herzustellen.

**[0062]** Das mit den obigen Anhydrid beschichtete Glassubstrat wurde in einem schwach sauren Wasser für 3 Minuten gewaschen, um durch Hydrolyse eine Carboxylgruppe von dem Silananhidrid zu erhalten. Dann wurde das erhaltene Glassubstrat, das eine Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat, für 1 Stunde in eine DMF-Lösung enthaltend N-hydroxysuccinimid (NHS) und N,N'-dicyclohexylcarbodiimid (DCC) bei jeweils 100 mM umgesetzt. Nach der Reaktion wurde das resultierende Glassubstrat mit Ethanol gewaschen und in einem Stickstoffbehälter aufbewahrt. Nachfolgend wurde das erhaltene Substrat "TSA Substrat" bezeichnet.

(2) Herstellung eines Substrats, das mit Aminosilan beschichtet ist

**[0063]** 3-Aminopropyltrimethoxysilan und 1,2-Bis(triethoxysilyl)ethan wurden durch Röhren in Ethanol gelöst, so dass jede Konzentration von 3-Aminopropyltrimethoxysilan und 1,2-Bis(triethoxysilyl)ethan in einer Lösung 0,002 M betrug. Die erhaltene Lösung wurde auf einem gewaschenen Glassubstrat in Form eines Objektträgers durch Tauchbeschichten beschichtet, und dann bei 120° C für 1 Stunde behandelt, um ein mit Aminosilan beschichtetes Substrat herzustellen. Nachfolgend wurde das erhaltene Substrat "Aminosubstrat" bezeichnet.

(3) Herstellung eines Substrats, das eine aktivierte Carboxylgruppe auf einer Aminschicht hat

**[0064]** Das obige Aminosubstrat wurde in einer Lösung enthaltend Bernsteinsäureanhydrid oder 1,2,4,5-Benzoltetracarboxyldianhydrid in DMF in einer Konzentration von 0,01 M getaucht und für 1 Stunde reagiert. Nach der Reaktion wurde jedes der resultierenden Substrate mit Ethanol gewaschen und wurde in einem Stickstoffbehälter getrocknet. Dann wurde jedes der Substrate in einem schwach sauren Wasser für 3 Minuten gewaschen, um durch Hydrolyse eine Carboxylgruppe von dem Anhydrid zu erhalten. Dann wurde das erhaltene Glassubstrat, das eine Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat, für eine Stunde in einer DMF-Lösung enthaltend N-Hydroxysuccinimid (NHS) und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) bei jeweils 100 mM umgesetzt, um die Carboxylgruppe zu aktivieren. Nach erfolgter Reaktion wurden die resultierenden Glassubstrate mit Ethanol gewaschen und in einem Stickstoffbehälter aufbewahrt. Nachfolgend wurden die jeweils erhaltenen Substrate "SA (Bernsteinsäureanhydrid) Substrat" und "BD (1,2,4,5-Benzoltetracarboxyldianhydrid) Substrat" bezeichnet.

(4) Immobilisierung von Nukleinsäure und Hybridisierungstest

**[0065]** Eine Oligonukleotidsonde, die eine Nukleotidsequenz nach SEQ ID Nr. 1 hat, wurde mit DMSO gemischt und unter Verwendung eines Spotters auf jedem der oben erhaltenen Substrate gespottet. Immobilisieren wurde bei 37° C, 100% RH für 1 Stunde durchgeführt, und dann wurde eine Nachwaschbehandlung durchgeführt, um jedes Microarray mit der darauf immobilisierten Sonde herzustellen.

**[0066]** Für die jeweiligen hergestellten Microarrays wurde eine Zielnukleinsäure, die eine der obigen Sonde von SEQ ID Nr. 1 komplementäre Nukleotidsequenz hat, mit der obigen Sonde hybridisiert. In der Hybridisierung wurde die Zielnukleinsäure in 0,1 % SSPET (ein Puffer mit Kochsalz-Natriumphosphat-EDTA enthaltend 0,1 % Triton X-100) gelöst und mit jedem Microarray bei 37° C für 14 Stunden umgesetzt. Nach der Reaktion wurde jedes Microarray mit jeweils 6 × SSPET und 3 × SSPET für 5 Minuten gewaschen und dann in Stickstoff getrocknet. Die getrockneten Microarrays wurden mit einem GenePix 4000B Scanner™ (Axon) gescannt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 und in [Fig. 4](#) gezeigt. In der Hybridisierung wurde das Aminosubstrat einem Blockierverfahren mit Bernsteinsäureanhydrid/NMP unterzogen.

Tabelle 2

Substrat	TSA	BD	SA	Amino-substrat
Fluoreszenzintensität	9588	9612	4811	5294
Bernsteinsäureanhydrid/NMP Blockierverfahren	x	X	x	o

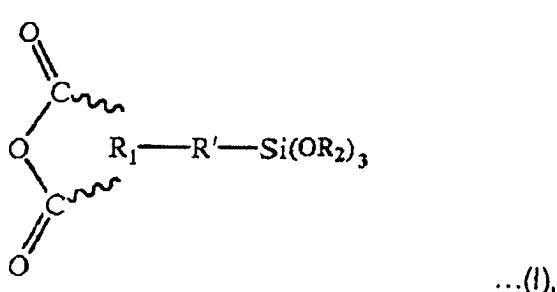
**[0067]** Wie in Tabelle 2 gezeigt, haben die Spots in Microarrays, die unter Verwendung des Verfahrens gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung hergestellt wurden, bessere Eigenschaften gezeigt, d.h. höhere Fluoreszenzintensität, und das Blockierverfahren nach dem Immobilisieren der Oligonukleotidsonde nicht erforderlich. [Fig. 4A](#) bis [Fig. 4D](#) umfassen Ansichten, die die Ergebnisse der Hybridisierung für die jeweili-

gen Microarrays zeigen, die jeweils als TSA Substrat, BD Substrat, SA Substrat und Aminosubstrat bezeichnet sind. Die Fluoreszenzintensitäten der Spots werden als stärker in Richtung roter Farbe und schwächer in Richtung blauer Farbe angesehen.

**[0068]** Beim Verwenden eines Verfahrens zur Immobilisierung eines Biomoleküls auf einem festen Substrat gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden zwei Carboxylgruppen von einem Anhydrid erzeugt, und ein Biomolekül kann daher auf dem festen Substrat in hoher Dichte immobilisiert werden. Beim Verwenden eines Microarrays, das ein darauf immobilisiertes Biomolekül in hoher Dichte gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung hat, in einer Analyse kann die Fluoreszenzintensität erhöht werden.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Immobilisierung eines Biomoleküls auf einem festen Substrat, umfassend:  
Beschichten des festen Substrats mit Silananhdyrid, um eine funktionelle Anhydridgruppe auf eine Oberfläche des festen Substrats einzuführen;  
Freilegen einer Carboxylgruppe von der funktionellen Anhydridgruppe durch Hydrolyse;  
Umsetzen der Carboxylgruppe mit Carbodiimid und Succinimid, um die Carboxylgruppe zu aktivieren; und  
Kontaktieren des Biomoleküls mit dem festen Substrat, das die aktivierte Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat, um das Biomolekül auf dem festen Substrat zu immobilisieren.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das feste Substrat aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus Glas, Siliziumscheibe, Polyethylen, Polypropylen, Polycarbonat, Polyester, Polyacrylat und Polyurethan besteht.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Silananhdyrid eine durch Formel I dargestellte Verbindung ist:



wobei

R<sub>1</sub> eine Alkylengruppe, eine Arylengruppe oder eine Alkyarylengruppe ist, R' eine substituierte oder nicht substituierte C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> Alkylengruppe, eine C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> Arylengruppe, eine C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> Arylenalkylgruppe oder eine C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> Alkenarylengruppe ist, R<sub>2</sub> eine C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> Alkylgruppe, eine Arylgruppe, eine Arylenalkylgruppe, eine Alkenarylgruppe oder ein Wasserstoffatom ist und die jeweiligen R<sub>2</sub>-Gruppen gleich oder voneinander verschieden sein können.

4. Verfahren gemäß Anspruch 3, wobei R<sub>1</sub> eine Methyl-, Ethyl-, Propyl- oder Butylgruppe ist.
5. Verfahren gemäß Anspruch 3, wobei das Silananhdyrid (3-(Triethoxysilyl)propylbernsteinsäureanhydrid) ist.
6. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das feste Substrat mit einer Lösung, die 0,01 bis 90 Gew.% des Silananhdyrids enthält, beschichtet wird.
7. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Beschichten des festen Substrats mit Silananhdyrid unter Verwendung eines Verfahrens durchgeführt wird, das aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus Selbstmontage-Molekularbeschichten, Spin-Beschichten, Sprühen und chemischem Aufdampfen besteht.
8. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Hydrolyse in einer wässrigen Lösung bei 20 bis 100 °C durchgeführt wird.
9. Verfahren zur Immobilisierung eines Biomoleküls auf einem festen Substrat, umfassend:  
Beschichten des festen Substrats mit Aminosilan, um eine funktionelle Aminogruppe auf eine Oberfläche des festen Substrats einzuführen;  
Umsetzen der funktionellen Aminogruppe mit Tetracarboxyldianhydrid, um eine funktionelle Anhydridgruppe in

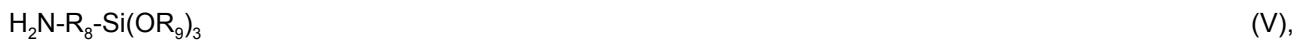
die Oberfläche des festen Substrats einzuführen;

Freilegen einer Carboxylgruppe von der funktionellen Anhydridgruppe durch Hydrolyse;

Umsetzen der Carboxylgruppe mit Carbodiimid und Succinimid, um die Carboxylgruppe zu aktivieren; und Kontaktieren des Biomoleküls mit dem festen Substrat, das die aktivierte Carboxylgruppe auf seiner Oberfläche hat, um das Biomolekül auf dem festen Substrat zu immobilisieren.

10. Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei das feste Substrat mit einer Lösung, die 0,01 bis 90 Gew.% der Aminosilanverbindung enthält, beschichtet wird.

11. Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei das Aminosilan ein primäres Aminosilan ist, das durch die Formel V dargestellt ist, oder ein sekundäres Aminosilan, das durch die Formel VI dargestellt ist:

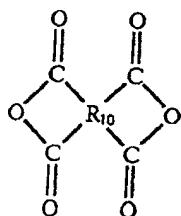


wobei

$\text{R}_8$  eine Alkylengruppe, eine Arylengruppe, eine Arylenalkylengruppe, eine Alkylenarylengruppe, eine Ether-, eine Ester- oder eine Imin enthaltende Gruppe ist, und  $\text{R}_9$  eine  $\text{C}_{1\text{-}}\text{C}_{20}$  Alkylgruppe, eine Arylgruppe, eine Arylenalkylgruppe oder eine Alkylenarylgruppe oder ein Wasserstoffatom ist.

12. Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei das Beschichten des festen Substrats mit Aminosilan unter Verwendung eines Verfahrens durchgeführt wird, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Selbstmontage-Molekularbeschichten, Spin-Beschichten, Sprühen und chemischem Aufdampfen besteht.

13. Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei das Tetracarboxyldianhydrid durch Formel VII dargestellt ist:



...(VII),

wobei

$\text{R}_{10}$  eine quaternäre organische Gruppe ist, die aus einer quaternären, carbocyclischen aromatischen, heterocyclischen, alicyclischen oder aliphatischen Gruppe ausgewählt ist.

14. Verfahren gemäß Anspruch 13, wobei das Tetracarboxyldianhydrid aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Pyromellitsäuredianhydrid, 3,3'4,4'-Biphenyltetracarboxyldianhydrid, 2,2',3,3'-Biphenyltetracarboxyldianhydrid, 2,3,3',4'-Biphenyltetracarboxyldianhydrid, 1,2,4,5-Benzoltetracarboxyldianhydrid, 3,3',4,4'-Benzopheon-tetracarboxyldianhydrid, 2,2',3,3'-Benzophenontetracarboxyldianhydrid, 2,3,3',4'-Benzophenontetracarboxyldianhydrid, Bis(3,4-dicarboxylphenyl)etherdianhydrid, Bis(3,4-dicarboxylphenyl)sulfondianhydrid, 1,4,5,8-Naphthalintetracarboxyldianhydrid, 1,2,5,6-Naphthalintetracarboxyldianhydrid, 2,3,6,7-Naphthalintetracarboxyldianhydrid, 2,2-Bis(3,4-dicarboxylphenyl)-hexafluoropropandianhydrid, Cyclobutantetracarboxyldianhydrid, Methylcyclobutantetracarboxyldianhydrid und 1,2,3,4-Tetracarboxybutandianhydrid besteht.

15. Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei das Tetracarboxyldianhydrid bei 0,02 bis 90 Gew.% umgesetzt wird.

16. Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei das Tetracarboxyldihydrid in mindestens einem Lösungsmittel gelöst wird, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Aceton, Methylethylketon, Dimethylformamid und N-methylpyrrolidon besteht.

17. Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei die Hydrolyse des Anhydrids in einer wässrigen Lösung bei 20 bis 100 °C durchgeführt wird.

18. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 oder 9, wobei das Carbodiimid 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimidhydrochlorid (EDC) oder N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) ist.

19. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 9, wobei das Succinimid N-Hydroxysuccinimid oder N-Hydroxysulfosuccinimid ist.
20. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 9, wobei das Carbodiimid oder das Succinimid bei 20 bis 200 mM umgesetzt wird.
21. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 9, wobei das Biomolekül eine Aminogruppe hat.
22. Verfahren gemäß Anspruch 21, wobei das Biomolekül DNS, RNS, PNS oder ein Protein ist.
23. Ein Biomolekülmikroarray, das unter Verwendung des Verfahrens von einem der Ansprüche 1 bis 22 hergestellt wird.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

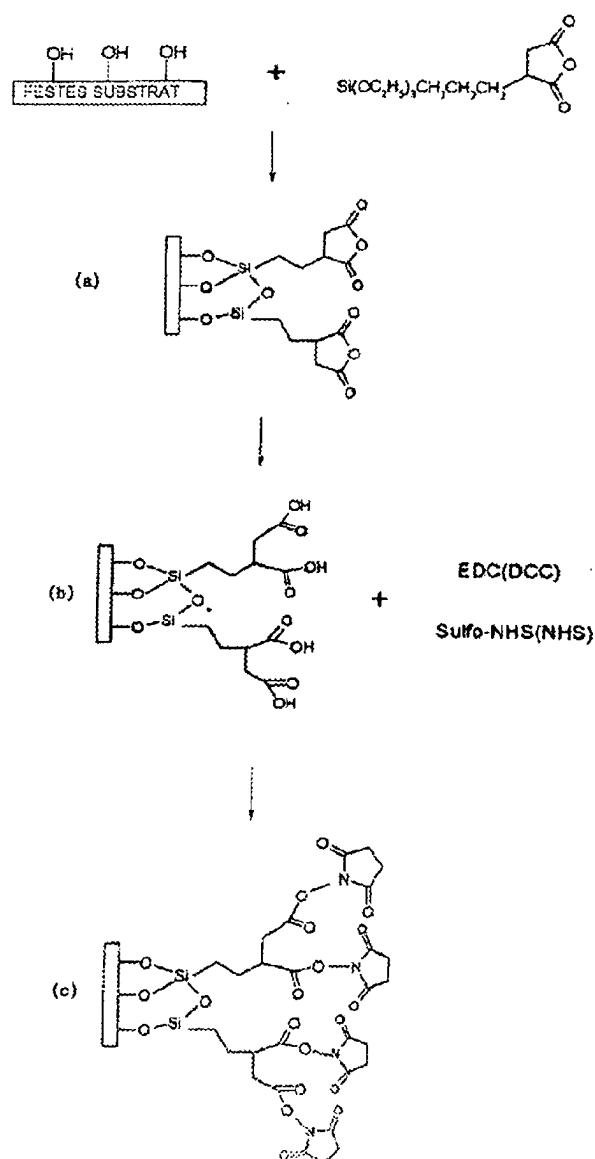


FIG. 2

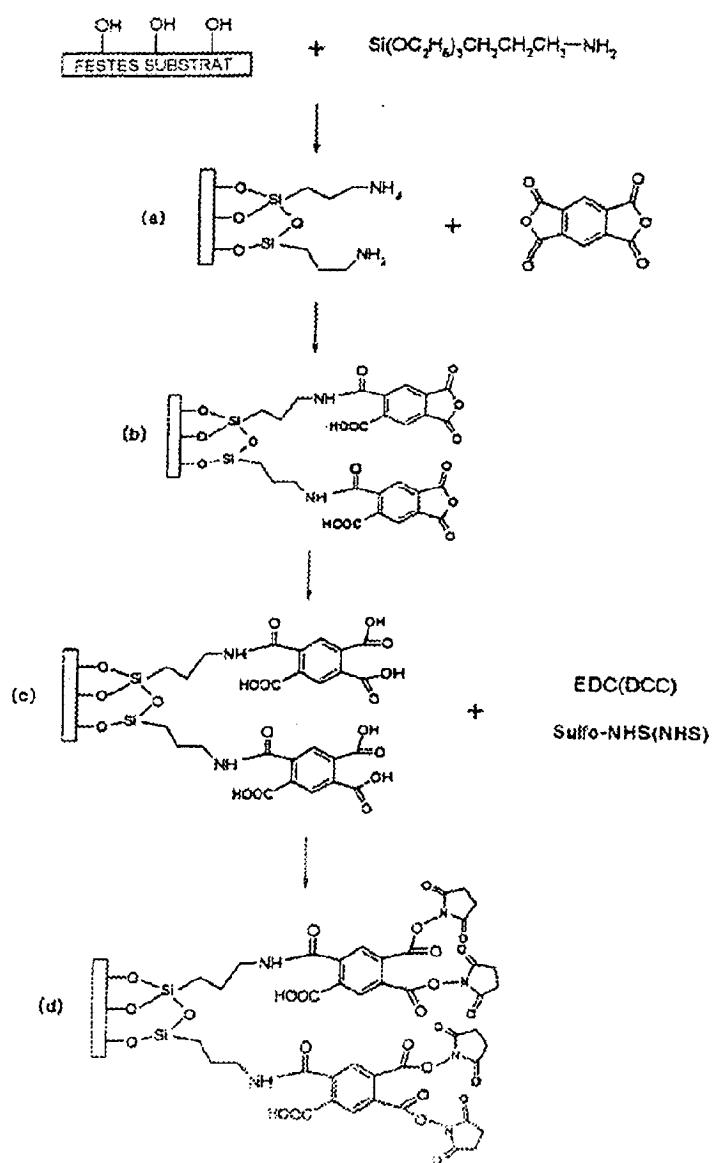


FIG. 3A

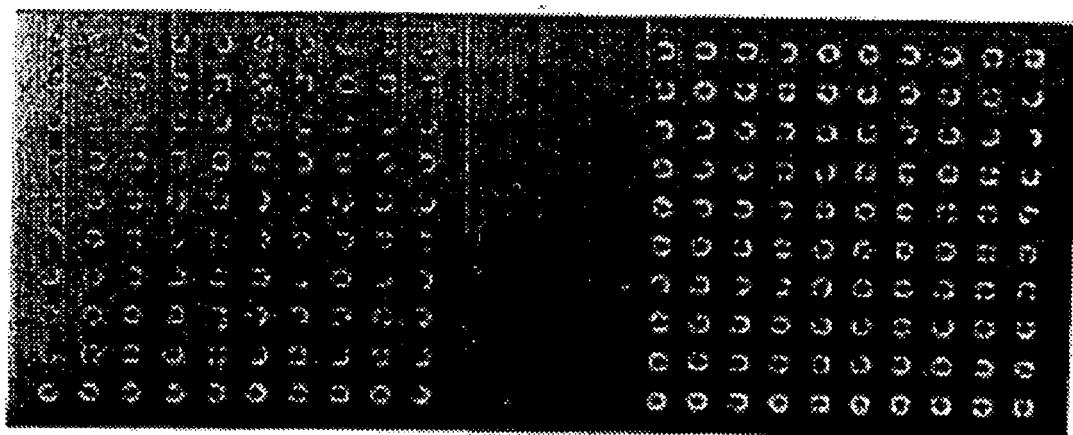
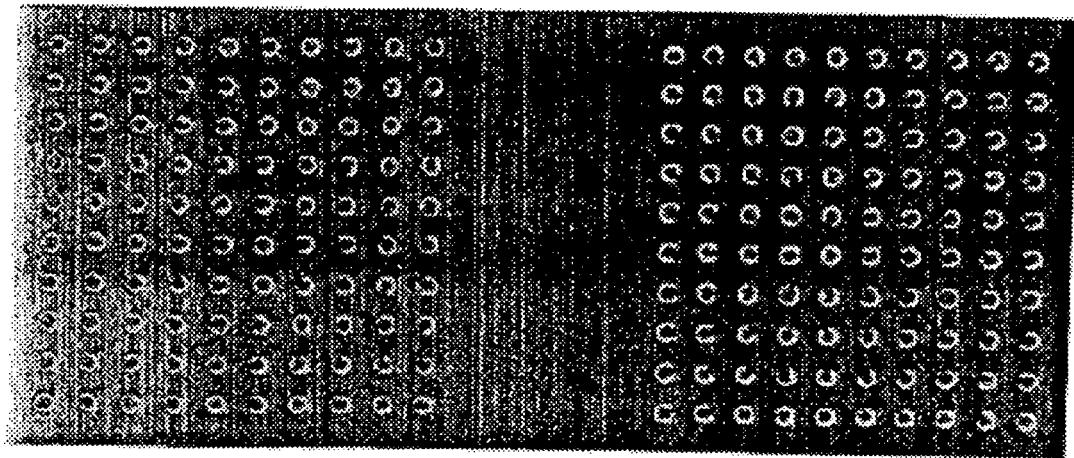
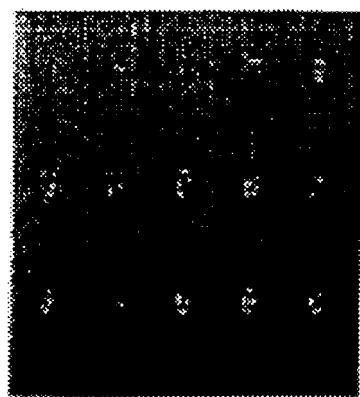


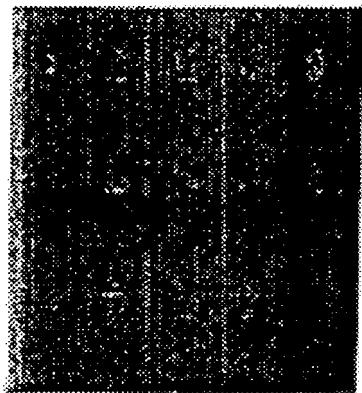
FIG. 3B



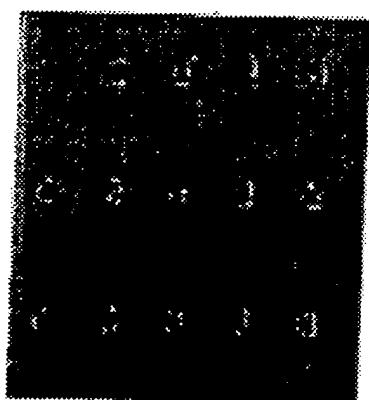
**FIG. 4A**



**FIG. 4B**



**FIG. 4C**



**FIG. 4D**

