



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 698 34 645 T2 2007.05.03

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 005 573 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 698 34 645.9

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US98/15764

(96) Europäisches Aktenzeichen: 98 937 269.3

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1999/006595

(86) PCT-Anmeldetag: 29.07.1998

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 11.02.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 07.06.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 24.05.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 03.05.2007

(51) Int Cl.⁸: C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 19/00 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

54020 P 29.07.1997 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Polyprobe, Inc., Philadelphia, Pa., US

(72) Erfinder:

NILSEN, W., Thor, Haddenfield, NJ 08033, US

(74) Vertreter:

Samson & Partner, Patentanwälte, 80538 München

(54) Bezeichnung: DENDRITISCHE NUKLEINSÄUREN MIT MAXIMALER SELBSTZUSAMMENLAGERUNG

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 eingereicht, 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

Technisches Gebiet

[0001] Die Erfindung betrifft Verfahren zum Nachweis von Nucleinsäuren und spezieller markierte Träger für Sonden, die mit der Nucleinsäure von Interesse hybridisieren.

Den Hintergrund darstellender Stand der Technik

[0002] Dendritische Moleküle sind hochgradig verzweigte baumartige Strukturen und haben Anwendungen als chemische Reagenzien, Gleitmittel, Kontrastmedien für die Magnetresonanz und andere gefunden. Siehe z.B. Barth et al., Bioconjugate Chemistry 5:58-66 (1994); Gitsov & Frechet, Macromolecules 26:6536-6546 (1993); Hawker & Frechet, J. Amer. Chem. Soc. 112:7638-7647 (1990a); Hawker & Frechet, Macromolecules 23:4726-4729 (1990b); Hawker et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1:1287-1297 (1993); Lochmann et al., J. Amer. Chem. Soc. 115:7043-7044 (1993); Miller et al., J. Amer. Chem. Soc. 114:1018-1025 (1992); Mousy et al., Macromolecules 25:2401-2406 (1992); Naylor et al., J. Amer. Chem. Soc. 111:2339-2341 (1989); Spindler & Frechet, Macromolecules Macromolecules 26:4809-4813 (1993); Turner et al., Macromolecules 26:4617-4623 (1993); Wiener et al., Magnetic Resonance Med. 31(1):1-8 (1994); Service, 267:458-459 (1995); Tomalia, Sci. Amer. 62-66 (1995); und die U.S.-Patente Nr. 4,558,120; 4,507,466; 4,568,737; 4,587,329; 4,857,599; 5,527,524; und 5,338,532 von Tomalia. Dendritische Moleküle bieten gegenüber anderen molekularen Architekturen mehrere Vorteile. Erstens kontaktieren Dendrimere bei einem Minimum von Strukturelementen ein Maximum an Volumen oder Fläche. Zweitens kann das Wachstum von dendritischen Molekülen in einem hohen Ausmaß kontrolliert werden, so dass Moleküle von idealer Größe und idealem Molekulargewicht erhalten werden. Schließlich kann die große Anzahl von definierten „Enden“ derivatisiert werden, so dass hochgradig markierte Moleküle mit definierten Abständen zwischen den Markierungen erhalten werden.

[0003] Nucleinsäure-Dendrimere sind konstruiert worden gemäß der Technologie, die Tomalia auf herkömmliche organische Polymere angewendet hat. Siehe Hudson et al., „Nucleic Acid Dendrimers: Novel Biopolymer Structures“, Am. Chem. Soc. 115:2119-2124 (1993); und US-Patent 5,561,043 von Cantor.

[0004] Die US 5,288,609 beschreibt Verfahren für den Nachweis auf genetischem Material, welche zwei markierte einzelsträngige Polynukleotid-Segmente einsetzen, die zu den gleichen oder entgegengesetzten Strängen des genetischen Ziellmaterials komplementär sind. Die offenbarten Verfahren führen zu der Bildung von Multi-Hybrid-Strukturen, die auf verschiedene Weisen nachgewiesen werden können. US 5,288,609 offenbart keine Verfahren, bei welchen eine Selbst-Zusammenlagerung der einzelsträngigen Polynukleotid-Segmente minimiert ist.

[0005] Der DNA-Nachweis wird typischerweise mittels einer Absorptionsmessung, bei welcher die DNA-Menge direkt proportional zu der Absorption der Lösung ist, erzielt. Obwohl diese Technik mäßig empfindlich ist, liefert sie keine Informationen über die spezielle DNA-Sequenz, nur wie viel DNA vorhanden ist. DNA kann auch mit fluoreszierenden, radioaktiven oder chemolumineszierenden Molekülen markiert werden. Eine Markierung bietet die Vorteile einer erhöhten Nachweisempfindlichkeit und -spezifität. Die Spezifität resultiert daraus, dass nur die gewünschten DNA-Stücke markiert werden. Die bedeutendste Verwendung dieser Markierung zum DNA-Nachweis erfolgt durch Markierung einer zu der Ziel-DNA komplementären Sonde. Wenn die markierte Sonde mit ihrem Ziel hybridisiert und nachgewiesen werden kann, kann man daraus schließen, dass das Ziel vorhanden ist. Die üblichste Verwendung dieser Technik wird als Southern-Blotting bezeichnet, wo DNA-DNA-Ziele nach einer Hybridisierung mit einer markierten Sonde nachgewiesen werden. Dendritische Nucleinsäuren sind für die Entwicklung von Nucleinsäure-Diagnostika als Signalamplifizierungs-Werkzeuge nützlich. Aufgrund der relativ großen Größe von Nucleinsäuremolekülen werden Nucleinsäure-Dendrimere leicht mit zahlreichen fluoreszierenden Verbindungen und/oder Protein-Gruppierungen mit begrenzter sterischer Hinderung und/oder begrenztem Quenching markiert. Sie zeigen auch Potential als Arzneimittel (Antisinn)-Abgabevehikel.

[0006] Die vielleicht am üblichsten verwendete Nachweismethode für DNA beruht auf der Amplifizierung der DNA, anstatt eine Markierung hinzuzufügen. Diese Technik für die Amplifizierung wird als die Polymerasekettenreaktion (PCR) bezeichnet. Bei dieser Technik wird der Zielstrang *in situ* durch das Hinzufügen von Desoxyribonukleotidtriphosphaten von allen vier Basen, einer thermostabilen Polymerase und einer Primer-DNA, die ein kurzer, zu dem Ziel komplementärer Strang ist, amplifiziert. Der (oder die) Primer kennzeichnen den Verdopplungspunkt (und den Terminationspunkt). Wenn ein einzelner Primer verwendet wird, wird der komple-

mentäre Strang bis zum Ende kopiert werden, aber üblicher werden zwei Primer verwendet, um den Beginn und das Ende der amplifizierten Sequenz anzugeben. Der Nachweis der amplifizierten DNA kann durch eine jegliche von verschiedenen Techniken erzielt werden. Das vielleicht üblichste Verfahren umfasst das Auftrennen der amplifizierten DNA durch Elektrophorese (typischerweise in Agarose oder Polyacrylamid, obwohl Kapillarelektrophorese auch verwendet worden ist) und das Nachweisen von dieser durch Anfärbung mit einem fluoreszierenden interkalierenden Reagens (üblicherweise Ethidiumbromid). Die PCR-Technik ermöglicht dementsprechend sowohl erhöhte Empfindlichkeit als auch Spezifität.

[0007] Nucleinsäure-Matrizes, die im Wesentlichen nach Nucleinsäure-Hybridisierung zusammengefügt werden sind und die durch eine Architektur vom dendritischen Typ charakterisiert sind, die aber dennoch strukturell verschieden von den vorerwähnten organischen und Nucleinsäure-Dendrimeren sind, werden in den U.S.-Patenten Nr. 5,175,270; 5,484,904; und 5,487,973 von Nilsen et al. und überschrieben an Polyprobe, Inc., gelehrt. Die einzigartige molekulare Gestaltung der Matrices von Polyprobe beinhaltet eine große Anzahl von Markierungen, was zu einer mehr als 100-fachen Amplifizierung des Signals verglichen mit verschiedenen Verfahren des Standes der Technik führt – Ziel-Nucleinsäuren können sogar dann noch nachgewiesen werden, wenn sie in der Probe in extrem geringen (z.B. Femtogramm (10^{-15})) Mengen vorhanden sind. Dementsprechend stellt die Technologie von Polyprobe eine signifikante Verbesserung gegenüber Nucleinsäure-Nachweismethoden des Standes der Technik, ganz besonders der PCR, dar.

Zusammenfassung der Erfindung

[0008] Die Erfindung ist auf eine Verbesserung der in den vorerwähnten Patenten von Nilsen beschriebenen Nucleinsäure-Dendrimere, welche eine maximale Selbst-Zusammenlagerung zeigen, gerichtet. Ein Aspekt der Erfindung stellt ein dendritisches Polynucleotid mit einer Mehrzahl von einzelsträngigen Hybridisierungsarmen bereit; wobei das Polynucleotid eine Mehrzahl von Polynucleotid-Monomeren umfasst, die durch Hybridisierung zusammengebunden sind; jedes Polynucleotid-Monomer eine Zwischenregion aufweist, die eine lineare, doppelsträngige Taillenregion mit einem ersten Ende und einem zweiten Ende umfasst, wobei das erste Ende in zwei einzelsträngigen Hybridisierungsregionen endet, jede aus einem Strang der Taillenregion, und das zweite Ende in einer oder zwei einzelsträngigen Hybridisierungsregionen endet, jede aus einem Strang der Taillenregion; und in dem dendritischen Polynucleotid jedes Polynucleotid-Monomer an mindestens ein weiteres Polynucleotid-Monomer an mindestens einer derartigen Hybridisierungsregion hybridisierungsgebunden ist; und wobei jede der Hybridisierungsregionen und der Taillenregionen der Mehrzahl von Monomeren Sequenzen umfasst, welche keine Wiederholungen von Untersequenzen mit X Nucleotiden enthalten, wobei X eine ganze Zahl von mindestens 2 darstellt. In bevorzugten Ausführungsformen ist X eine ganze Zahl von 2 bis ungefähr 7; in mehr bevorzugten Ausführungsformen ist X 3, 4 oder 5.

[0009] Die Natur und Konstitution der DNAs, die die Monomere umfassen, ermöglichen einen extrem genauen und kontrollierten Zusammenbau, z.B. maximale Selbst-Zusammenlagerung, der dendritischen Nucleinsäure-Matrizes der Erfindung. D.h., dass die Hybridisierungsregionen eines gegebenen Monomers im Wesentlichen nur mit einer im Wesentlichen komplementären Hybridisierungsregion von einem anderen Monomer hybridisieren. Dementsprechend wird die Selbst-Hybridisierung verringert, vorzugsweise bis zu dem Ausmaß, dass sie vernachlässigbar ist. Die Vorteile sind, dass Beeinträchtigungen des Assays verringert werden, was zu größerer Genauigkeit und Empfindlichkeit führt.

[0010] Zusammensetzungen, Kits und Verfahren zur Herstellung und Verwendung der Polynucleotide werden ebenfalls beschrieben.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0011] [Fig. 1A](#) ist ein schematisches Diagramm einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung, nämlich sieben einzigartige einzelsträngige Nucleinsäure-Oligomere, die verwendet werden, um die vorliegenden Nucleinsäure-Monomere zusammenzufügen. Die durchgezogenen Linien bezeichnen „+“-Strang- und die unterbrochenen Linien bezeichnen „-“-Strang-Sequenzen. [Fig. 1B](#) zeigt die Heterodimere (Dendrimer-Monomere), die als Bausteine für den Zusammenbau von Nucleinsäure-Dendrimeren verwendet werden. Heterodimer A ist ein Kern-Monomer, da die Arme der Heterodimere B' und B" sich mit A zusammenlagern können. Im Gegenzug können sich die Arme von C' und C" mit den drei Armen von B' und B" zusammenlagern.

[0012] [Fig. 2A](#) veranschaulicht schematisch ein 1-schichtiges Nucleinsäure-Dendrimer, bei welchem ein Initiator-Monomer mit vier Monomeren vom B-Typ hybridisiert ist;

[0013] [Fig. 2B](#) veranschaulicht schematisch ein 2-schichtiges Nucleinsäure-Dendrimer;

[0014] [Fig. 2C](#) veranschaulicht schematisch ein 3-schichtiges Nucleinsäure-Dendrimer;

[0015] und [Fig. 2D](#) veranschaulicht schematisch ein 4-schichtiges Nucleinsäure-Dendrimer. Anmerkung: Das zusätzliche Volumen der 3- und 4-schichtigen Dendrimere macht erforderlich, dass sie proportional kleiner als die 1- und 2-schichtigen Dendrimere dargestellt werden.

[0016] [Fig. 3](#) und [Fig. 4](#) sind Balkendiagramme, die den GC-Gehalt für oligomere Untersequenzen mit Längen von 29 bzw. 49 Basen, erhalten ausgehend von einer obigen bevorzugten Master-DNA-Sequenz, zeigen.

[0017] [Fig. 5](#) ist ein schematisches Diagramm eines „Blasen-Taillen“ („bubble-waist“)-Monomer-Struktur.

[0018] [Fig. 6](#) veranschaulicht zwei Nucleinsäurestränge aufweisende dendritische Konfigurationen.

[0019] [Fig. 7](#) veranschaulicht vier Nucleinsäurestränge aufweisende dendritische Konfigurationen.

[0020] [Fig. 8](#) ist eine Veranschaulichung der sterischen Hinderungen, die erzeugt werden, indem 5 Stränge für den Zusammenbau von Dendrimeren unter Verwendung von vierarmigen Dendrimer-Monomeren eingesetzt werden. Die Strukturen sind „Nucleinsäure-Bäume“ oder Dendrimere, bestehend aus Schichten von Nucleinsäuren, wobei jede Schicht aus partiell einzelsträngigen Heteroduplexen, die hier als Dendrimer-Monomere bezeichnet werden, gebildet wird. Die am weitesten Außen befindliche Schicht eines gegebenen Nucleinsäure-Dendrimers würde eine Mehrzahl von einzelsträngigen Armen, welche zu einer Hybridisierung mit einer komplementären Nucleinsäuresequenz in der Lage sind, aufweisen. Dendrimer-Monomere haben die Eigenschaft, dass ein in einer Abfolge erfolgendes Hinzufügen von Monomeren eine dreidimensionale Struktur, welche aus Nucleinsäure besteht, erzeugen würde.

[0021] [Fig. 9](#) ist ein Graph, welcher das Nucleinsäure-Dendrimer-Wachstum zeigt, wobei (*) das Verhältnis des Schalenvolumens zum Kugelvolumen darstellt, (\blacktriangleleft) das Verhältnis des Gesamtvolumens des Dendrimers durch die k-1-Schicht zu dem Volumen, das durch die Schicht k hinzugefügt wird, darstellt, (X) das Verhältnis des Gesamtvolumens der dendritischen DNA durch die Schicht k zu dem Kugelvolumen k darstellt und (\bullet) das Verhältnis des Volumens von dendritischer DNA, welche in Schicht k hinzugefügt wird, zu dem Schalenvolumen der Schicht k darstellt.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0022] Idealerweise wird eine dendritische Nucleinsäurestruktur bei relativ geringem Molekulargewicht hochgradig verzweigt sein, eine Mehrzahl von Sequenzspezifitäten aufweisen, aus nur einigen wenigen Einzelsträngen aufgebaut sein, ein vorhersagbares, kontrolliertes Wachstum aufweisen und die sterische Hinderung für die Addition von Monomeren minimieren. Nucleinsäure-Dendrimere können über Hybridisierung unter Verwendung von lediglich zwei einzelsträngigen Molekülen zusammengebaut werden. Die Verwendung von sieben einzelsträngigen Molekülen ist jedoch bevorzugt, da sie eine Struktur mit vielen wünschenswerten Merkmalen ergibt. Verschiedene Konfigurationen von Nucleinsäure-Molekülen können große dendritische Strukturen erzeugen. Die hier beschriebenen speziellen Strukturen repräsentieren einen Kompromiss zwischen der Komplexität der Reagenzien, deren leichter Synthese und der Geschwindigkeit des räumlichen Wachstums des Dendrimers mit jeder zusätzlichen Schicht über Hybridisierung.

[0023] In den offebarten Strukturen stellt ein Initiator-Dendrimer-Monomer, welches ein Heterodimer aus zwei teilweise einzelsträngigen Nucleinsäure-Molekülen mit zwei einzelsträngigen a(+)- und zwei einzelsträngigen c(+)-Regionen ist, vier Arme, mit welchen die erste Schicht von vier Dendrimer-Monomeren hybridisiert (siehe [Fig. 1](#) und [2](#)), bereit. Wie das Initiator-Molekül weisen auch die Dendrimer-Monomere der ersten Schicht vier einzelsträngige Regionen auf, eine einzelne (–)-Sequenz, entweder a(–) oder c(–), und drei (+)-Sequenzen, entweder d(+) oder e(+). Die Monomere der zweiten Schicht sind ähnlich zu dem Initiator-Monomer und den Monomeren der ersten Schicht mit der Ausnahme, dass die (–)-Sequenz entweder d(–) oder e(–) ist und die (+)-Sequenzen entweder a(+) oder c(+) sind. Dementsprechend wird ausgehend von dem Initiator-Molekül, welches a(+) und c(+) Sequenzen aufweist, die erste Schicht hinzugefügt, wodurch das 1-schichtige Dendrimer mit d(+) und e(+) Sequenzen erzeugt wird. Das Hinzufügen der zweiten Schicht erzeugt die a(+) und c(+) Sequenzen, wodurch der geometrische Zusammenbau der dendritischen Struktur durch alternierende Hybridisierung von Dendrimer-Monomeren ermöglicht wird. Durch die vierte Schicht wird die Konstruktion Moleküle mit 324 einzelsträngigen (ss) Arm-Regionen erzeugen, 2916 ss-Regionen durch die sechste Schicht und

26244 ss-Regionen durch die achte Schicht.

[0024] [Fig. 1a](#) zeigt die sieben einzelsträngigen Nucleinsäure-Oligomere, die für den Zusammenbau von bevorzugten dendritischen oder Matrix-Monomeren verwendet worden sind. Diese sieben Moleküle bestehen in toto aus sechs oligomeren Sequenzen – vier Armsequenzen und zwei Taillensequenzen. Jedes mit einem Buchstaben bezeichnete Segment (a, b, c, d, e) bezeichnet eine der einzigartigen Sequenzen auf den verschiedenen Oligomeren. Für jedes gezeigte Oligomer repräsentieren die durchgezogenen Linien „+“ (positive) Stränge und die unterbrochenen Linien repräsentieren „–“ (negative) oder Komplementärstrang-Sequenzen. Jede der Sequenzen (a, b, c, d, e) ist so gestaltet, dass sie minimale Sequenzähnlichkeit zu jeder anderen aufweist.

[0025] Wie in [Fig. 1b](#) gezeigt, sind die Monomere A, B', B'', C' und C'' die Wiederholungs- oder Grundeinheiten der Struktur und werden als Dendrimer-Monomere bezeichnet. Monomere werden ausgehend von den sieben einzelsträngigen Reagenzien, die in [Fig. 1A](#) veranschaulicht sind, zusammengebaut. Das Initiator- oder „A“-Monomer ist ss1(+), welches mit ss2(+) hybridisiert ist. Das A-Monomer weist vier einzelsträngige Arme auf, die jeweils zu einem der einzelsträngigen Arme der Monomere B' und B'' komplementär sind. Strang Nr. 4 ist der (–)-Taillenstrang für beide B-Typ-Monomere. Strang 4 ist entweder mit Strängen Nr. 3 (für B') oder Strang Nr. 5 (für B'') hybridisiert. Das B'-Monomer kann mit zweien der Arme des A-Monomers, des Initiator-Monomers, hybridisieren, während B'' mit den anderen beiden Armen des Initiator-A-Monomers hybridisieren kann. Eine alle Stellen absättigende Hybridisierung mit den ss-Armen von einem A-Monomer mit 4 B-Typ-Monomeren bildet die in [Fig. 2A](#) veranschaulichte 1-schichtige dendritische Struktur. Wenn der vorgeschlagenen Abfolge von Schritten gefolgt wird, ist keine andere Hybridisierung möglich.

[0026] Zusammen sättigen B'- und B''-Monomere alle verfügbaren Hybridisierungsstellen des Initiator-A-Monomers ab.

[0027] In einer ähnlichen Weise hybridisieren die Stränge Nr. 6 und 7 mit Strang Nr. 2 unter Bildung der Monomere C' und C''. Diese C-Typ-Monomere haben die Fähigkeit, durch Hybridisierung alle der einzelsträngigen Stellen der Monomere B' und B'' zu sättigen, wodurch der Zusammenbau des dendritischen Reagens durch die Schicht Nr. 2, wie in [Fig. 2B](#) veranschaulicht, vervollständigt wird. Alternierende Additionen von B' und B'', gefolgt von C' und C'', führen zum Dendrimer-Wachstum, wie in den [Fig. 2C](#) und [Fig. 2D](#) gezeigt.

[0028] Jedes Monomer weist vier einzelsträngige Arme mit einem (–)-Arm für eine Bindung auf, so dass jede Addition die Anzahl von einzelsträngigen Armen, die für eine nachfolgende Hybridisierung zur Verfügung stehen, verdreifacht. Die erste Schicht weist 12 Arme auf, die zweite 36, die dritte 108, die vierte 324 u.s.w. Zusätzlich zur Verdreifachung der Anzahl von einzelsträngigen Armen verdoppelt das Hinzufügen von jeder Schicht ungefähr die gesamte Masse der wachsenden Struktur. 2-schichtige Dendrimere weisen 17 Monomere auf (Initiator-Monomer, 4 Monomere in der ersten Schicht und 12 Monomere in der zweiten Schicht) und 36 Enden und folglich weist die dritte Schicht 36 Monomere auf. Dementsprechend befinden sich in jedem Stadium des Dendrimer-Wachstums zwei Drittel der gesamten Masse in der Oberflächen-Schicht.

[0029] Die Oligomere können ein breites Spektrum an Basenzusammensetzung und Länge aufweisen. In bevorzugten Ausführungsformen wird die Basenzusammensetzung so ausgewählt, dass die Oligomere minimale nichtspezifische Homologie und Längen, die eine spezifische Hybridisierung ermöglichen, aber kurz genug für eine effiziente Herstellung sind, aufweisen. Die Minimierung von nicht-spezifischer Homologie ist in zweierlei Hinsicht signifikant. Erstens sind die Reagenzien extrem beschränkt in ihrer Fähigkeit zur Selbst-Hybridisierung. Zweitens sind sie in Hinblick auf die komplementären Abschnitte von anderen Reagenzien, mit welchen sie hybridisieren, beschränkt und dirigieren folglich den Zusammenbau der DNA-Matrizes in einer präzisen und kontrollierten Weise. Im Allgemeinen reichen die Längen der Oligomere von ungefähr 20 bis ungefähr 200 Basen.

[0030] Bei mehr bevorzugten Ausführungsformen werden die Nucleinsäure-Matrizes der Erfindung unter Verwendung von Sequenzen vom „Euler“-Typ hergestellt. Diese Matrices zeigen nicht nur ein Fehlen von Selbst-Hybridisierung, sondern die Euler-Sequenzen hybridisieren nur mit ihrem Euler-Komplement. Bei diesen bevorzugten Ausführungsformen werden nicht-selbst-hybridisierende Oligomere hergestellt, indem eine sogenannte Master-Sequenz gestaltet wird, welche durch das Fehlen von wiederholten Untersequenzen einer bestimmten Länge gekennzeichnet ist. Um die Länge und Zusammensetzung einer solchen Master-Sequenz zu berechnen, wird die minimale Länge „X“ der nicht-wiederholten Untersequenz so ausgewählt, dass sie so klein wie möglich ist. Die Länge (L) der Master-Sequenz wird dann berechnet unter Verwendung der folgenden Gleichung:

$$L = ((4^x - P):2) + (x - 1),$$

worin x = die Länge der nicht-wiederholten Untersequenz; und P = Anzahl von palindromischen Untersequenzen mit einer Länge x . Palindrome existieren nur für Untersequenzen mit einem Minimum von 2 Basen und einer geraden Anzahl von Basen. Wenn beispielsweise $x = 3$ oder 5 , $P = 0$.

[0031] Die Anwendung der Gleichung auf eine Ausführungsform, in welcher $x = 2$ (so dass die Master-Sequenz keine Wiederholungen von Untersequenzen mit 2 oder mehr Nukleotiden enthält), funktioniert, wie folgt. Als erstes wird die Anzahl von „2-meren“ berechnet als $4^2 = 16$. Die 16 2-mere sind, wie folgt: AA, AC, AG, AT, CA, CC, CG, CT, GA, GC, GG, GT, TA, TC, TG und TT. Es gibt 4 Palindrome, nämlich: TA, AT, GC und CG. Die Gestaltung der Master-Sequenz wird begonnen, indem eines der 12 verbleibenden 2-mere ausgewählt wird, welches die Wahl eines zweiten 2-mers, welches zu dem ersten 2-mer komplementär ist, erfordert. Die willkürliche Auswahl des 2-mers AA ergibt das Folgende:

	1	2	3	4	5	6	7
5'	A	A	—	—	—	—	—
3'							
3'	T	T	—	—	—	—	—
5'							

[0032] In diesem Falle erfordert die Auswahl des 2-mers AA die Auswahl des 2-mers TT für den komplementären Strang. Die Auswahl der dritten Base für den oberen Strang (d.h. den positiven oder Watson-Strang) muss dann C oder G sein, da die Auswahl von A die Regel, dass keine Wiederholungen von 2-meren vorhanden sein sollen, verletzen würde und AT eine palindromische Untersequenz ist. Dementsprechend führt die Auswahl von C zu der wachsenden doppelsträngigen Master-Sequenz:

5' A A C 3'
3' T T G 5'

[0033] Die 2-mere AC und GT werden von einer weiteren Verwendung ausgeschlossen. Die nächste Auswahl für den oberen Strang kann A (d.h. CA), C, (d.h. CC) oder T (d.h. CT) sein. Die Auswahl von „A“ beschränkt die vierte Base auf G (wobei AG das letzte 2-mer ist), wohingegen die Wahl von C oder T höhere Flexibilität erlaubt (d.h. A oder T, wenn C gewählt wird, und C oder G, wenn T gewählt wird). Bei der Gestaltung der Master-Sequenz sollten die Nucleotide so gewählt werden, dass die Auswahlmöglichkeiten für zumindest das nächste Nucleotid maximiert werden. Die Auswahl von „C“ führt zu der doppelsträngigen Sequenz:

5' A A C C 3'
3' T T G G 5'

so dass die 2-mere CC und GG als weitere Auswahlmöglichkeiten ausgeschlossen werden.

[0034] Die fünfte Base für den oberen Strang kann A oder T sein. Die Auswahl von A wird festlegen, dass die sechste Base G sein muss (da AG jetzt das letzte verbleibende 2-mer, welches mit „A“ beginnt, ist). Die Auswahl von T ermöglicht andererseits, dass C oder G die letzte Base ist. Dementsprechend ist T die Wahl für die fünfte Base des oberen Stranges.

5' A A C C T 3'
3' T T G G A G T 5'

[0035] Jetzt sind CT und AG ausgeschlossen worden. Unabhängig davon, ob C oder G als sechste Base hinzugefügt wird, muss A die siebte Base sein (da CA und GA die letzten verbleibenden verfügbaren 2-mere, aus welchen man auswählen kann, sind). Die Master-Sequenz ist dann, wie folgt, komplettiert:

5' A A C C T C A 3'
3' T T G G A G T 5'

und alle 12 2-mere sind eingesetzt worden.

[0036] Es ist selbstverständlich, dass viele unterschiedliche Master-Sequenzen, die die gleichen Kriterien erfüllen, ersonnen werden können. Einfach gesagt, ist die Gestaltung von Master-Sequenzen, welche keine Wiederholungen von Untersequenzen mit Längen von 3, 4 oder sogar 5 Basen aufweisen, komplizierter als jene einer Master-Sequenz, welche keine Wiederholungen von Untersequenzen mit Längen von zwei Basen aufweist. Nichtsdestotrotz führt das Befolgen der obigen Regeln leicht zu einer Master-Sequenz. Die Erfindung erfordert nicht, dass die Gesamtheit der Master-Sequenz dadurch gekennzeichnet ist, dass sie keine Wiederholungen von Untersequenzen mit einer einzelnen vorher festgelegten Länge aufweist. Abschnitte der Master-Sequenz können keine Wiederholungen von Untersequenzen mit einer vorher festgelegten Länge und an-

dere Abschnitte, die keine Wiederholungen von Untersequenzen mit einer zweiten, unterschiedlichen Länge aufweisen, enthalten. Beispiele von solchen Sequenzen, welche als SEQ ID NO:1 und 2 bezeichnet werden, sind nachfolgend aufgeführt. Diese beiden Sequenzen enthalten beide 261 Basenpaare, wobei die ersten 86 Basenpaare keine Wiederholungen von Untersequenzen mit einer Länge von mehr als 3 Basen aufweisen, und die vollständige Sequenz, d.h. die Basen 1-261, enthält keine Wiederholungen von Untersequenzen mit Längen über 4 Basen.

```
CGACAAAAGA ACTGAGGAAG TGGGTAATG ATAGAGCAAC AGGTGACGGA TGGCAGACTA
AATAACGAA ACCAAGGGAG ATTGAATTAA GCTAGGCTGG ACCGAGTAGA AAAATGTGCA
TAACGTACAA TATAAAGTAA GATCGAATCA AACATGAAGG ATACGCAAGC GATGCTAACT
ATGGAACGAG AGGTAGGGCG CGACAGAAGA CGCCGAGTGA GTCGGCCAAC CGGAGCGGCA
CGGGTGTGGT CAGGCGAAC A (SEQ ID NO:1)
```

```
TTGTTCGCCT GACCACACCC GTGCCGCTCC GGTTGCCGA CTCACTGCCG GTCTTCTGTC
CCGCCCTACC TCTCGTTCCA TAGTTAGCAT CGCTTGCGTA TCCTTCATGT TTGATTGAT
CTTACTTTAT ATTGTACGTT ATGCACATTT TTCTACTCGG TCCAGCCTAG CTTAATTCAA
TCTCCCTTGG TTTCGTGTAT TTAGTCTGCC ATCCGTCACC TGTTGCTCTA TCATTACCCC
ACTTCCTCAG TTCTTTGTC G (SEQ ID NO:2)
```

[0037] Abhängig von dem gewünschten Ergebnis können unterschiedliche Abschnitte dieser Master-Sequenzen als die Oligomere, die schließlich die Taillen- oder Armsequenzen der Monomere bilden, ausgewählt werden. Die Auswahl einer Sequenz einer gegebenen Länge mit einem relativ hohen GC-Gehalt wird beispielsweise zu einem Oligomer führen, welches eine relativ hohe Schmelztemperatur aufweist. Dies ist vorteilhaft bei der Gestaltung von Strukturen, die in einer kontrollierten und vorhersagbaren Weise teilweise schmelzen, d.h. denaturieren werden. Die [Fig. 3](#) und [Fig. 4](#) sind Balkendiagramme, welche den GC-Gehalt für Untersequenzen mit Längen von 29 bzw. 49 Basen für die obigen Master-Sequenzen zeigen. Die Teilsequenz, die durch die ersten 86 Basen in der in [Fig. 8](#) analysierten Sequenz definiert wird, weist keine Wiederholungen, die größer als 3 Basen sind, auf und die Sequenz, die durch die Basen 1-261 definiert wird, weist keine Wiederholungen, die größer als 4 Basen sind, auf. Das gleiche trifft für die jeweiligen Teilsequenzen, die in [Fig. 9](#) analysiert werden, zu. Diese Art der Analyse würde es einem Fachmann auf diesem Gebiet ermöglichen, einen Abschnitt der Master-Sequenz, welcher einen vorher festgelegten Schmelzpunkt aufweist, auszuwählen. Master-Sequenzen können auch so ausgewählt werden, dass die Flexibilität bei der Auswahl der verschiedenen Taillen- und Armsequenzen maximiert wird. Beispielsweise werden 4 Arm-Oligomere mit 30 Basen und 2 Taillen-Oligomere mit 50 Basen, die jeweils unterschiedliche Schmelzpunkte aufweisen, u.s.w. leichter ausgewählt aus einer Master-Sequenz, welche mehr als 220 (d.h. $(4 \times 30) + (2 \times 50)$) Basen Länge aufweist, im Gegensatz zu einer Master-Sequenz, welche eine Länge von genau 220 Basen aufweist.

[0038] In einer mehr bevorzugten Ausführungsform enthält die Master-Sequenz keine Wiederholungen von Untersequenzen mit 4 oder mehr Nucleotiden. In diesen Ausführungsformen werden die Master-Sequenzen eine Länge (L) von $((4^4 - 16) \cdot 2) + (4 - 1) = 123$ Basen, doppelsträngig, haben. Die sechzehn palindromischen Sequenzen (d.h. P = 16) sind, wie folgt: AATT, TTAA, CCGG, GGCC, TATA, ATAT, GCGC, CGCG, ACGT, TCGA, AGCT, TGCA, CATG, CTAG, GATC und GTAC. Das Aufteilen der 123 Basen gleichmäßig unter den a-, b-, c-, d- & e-Monomeren ergibt 24 Basen für jedes Monomer (d.h. 24-mere). 24-mere haben eine relativ niedrige Schmelztemperatur ($\sim 55\text{--}70^\circ\text{C}$), so dass in bevorzugten Ausführungsformen die Master-Sequenz, die bei dem Zusammenbau der Matrix verwendet wird, keine Wiederholungen, welche größer als 4 Basen sind, für a-, b-, c-, d- und e-Sequenzen mit >30 Basen enthält. In diesen Ausführungsformen können doppelsträngige Master-Sequenzen mit einer Länge von 516 Basen zusammengebaut werden (d.h. $(4^5 \cdot 2) + (5 - 1) = 516$). Oligonucleotide, welche in der Größe von 30 bis 100 Basen reichen, welche keine Wiederholungen, die größer als vier Basen sind, aufweisen, werden basierend auf einer Master-Sequenz mit 512 Basen konstruiert.

[0039] Die Verwendung der Euler-Sequenzen führt zu Oligomeren, die einen extrem genauen und kontrollierten Zusammenbau der Nucleinsäure-Matrices der Erfindung ermöglichen. Die Oligomere und die Monomere, die daraus zusammengebaut werden, weisen eine vernachlässigbare oder kein Vermögen zur Selbsthybridisierung auf. D.h., sie hybridisieren nur mit dem Oligomer oder Monomer mit einer komplementären Euler-Sequenz, und verringern so Beeinträchtigungen des Assays. Das Ergebnis ist größere Genauigkeit und Empfindlichkeit. Beispielsweise werden zwei einzelsträngige Oligomere, welche eine Mehrzahl von nicht-wiederholten 3-meren, erhalten ausgehend von der gleichen oder unterschiedlichen Master-Sequenzen, welche keine Wiederholungen von Untersequenzen mit drei oder mehr Basen enthalten, ein Minimum von 33% Fehl-

paarung in der Basenpaarung aufweisen. In ähnlicher Weise werden jegliche zwei einzelsträngigen Oligomere, welche eine Mehrzahl von nicht-wiederholten 4-meren, gestaltet ausgehend von der gleichen oder unterschiedlichen Master-Sequenzen, welche keine Wiederholungen von Untersequenzen mit vier oder mehr Basen aufweisen, ein Minimum von 25% Fehlpaarung aufweisen. In dem Falle von Oligomeren mit einer Mehrzahl von nicht-wiederholten 5-meren wird die minimale Fehlpaarung 20% betragen.

[0040] Dieses Ausmaß an Sequenzähnlichkeit zwischen oligomeren Taillen- und Armsequenzen stellt weiter sicher, dass jede Taille und jeder Arm nur an deren bzw. dessen Euler-Komplement binden wird. Diese Ausführungsformen sind gleichfalls anwendbar auf die Gestaltung von Matrices, welche isoC-Nucleinsäuren, isoT-Nucleinsäuren und Inosin-enthaltende Nucleinsäuren enthalten, da sie alle die Hybridisierungsregeln für DNA befolgen.

[0041] Die Monomere für die Herstellung der Dendrimere der Erfindung weisen eine Zwischenregion auf, welche eine doppelsträngige Taille und zwei einzelsträngige Arme an jedem Ende enthält. In anderen Ausführungsformen werden Monomere, in welchen ein Ende des Monomers nur einen einzelsträngigen Arm aufweist, eingesetzt. In noch anderen Ausführungsformen werden beide Arten von Monomeren eingesetzt. Monomer-Reagenzien mit drei einzelsträngigen Regionen können in einigen Fällen bevorzugt sein, da sie weniger sterische Hinderung und größere Flüssigkeitsvolumina im Inneren der Dendrimere ermöglichen. Auch muss, wie in [Fig. 5](#) veranschaulicht, der Abschnitt der Zwischenregion des Monomers nicht entlang seiner gesamte Länge vollständig doppelsträngig sein, sondern kann einzelsträngige Abschnitte, welche bezogen auf die Monomer-Enden zwischengeschaltet positioniert sind, umfassen. Solche Monomer-Strukturen weisen eine größere Anzahl von Hybridisierungsstellen auf, sollte dies gewünscht werden.

[0042] Der Dendrimer-Zusammenbau über Hybridisierung kann mit einem Initiator-Nucleinsäure-Molekül mit drei oder mehr einzelsträngigen Regionen beginnen. In diesen Fällen erzeugt die Hybridisierung von Nucleinsäure-Molekülen mit den freien einzelsträngigen Enden des Initiator-Moleküls das Produkt mit der ersten Schicht. In dem Falle einer Hybridisierung eines Initiator-Moleküls mit drei Armen mit dreiarmigen Dendrimer-Monomeren wird eine erste Schicht, welche sechs Arme aufweist, hergestellt. Die mehr bevorzugte siebensträngige dendritische Struktur setzt Monomere mit vier Armen ein; folglich weist die erste Schicht zwölf Arme auf. Nachfolgende Hybridisierungsschichten führen zu einer geometrischen Expansion der einzelsträngigen Enden und einer dreidimensionalen dendritischen Organisation von Nucleinsäuren.

[0043] Der Dendrimer-Zusammenbau erfolgt ausgehend von gereinigten einzelsträngigen Nucleinsäure-Molekülen in Form einer sequenzspezifischen Anlagerung („annealing“) der Dendrimer-Monomere, gefolgt von dem Zusammenbau einer regelmäßigen Nucleinsäurestruktur in Lösung oder an einem festen Träger. Wie in diesem Kontext verwendet, sind die „Nucleinsäure-Dendrimere“ Nucleinsäure-Komplexe, welche Untereinheiten von teilweise doppelsträngigen Nucleinsäure-Molekülen umfassen.

[0044] Wie in [Fig. 6](#) veranschaulicht, kann ein Nucleinsäure-Dendrimer der Erfindung ausgehend von lediglich zwei einzelsträngigen Nucleinsäuren zusammengebaut werden, wobei Strang 1 = [seq1(+)]_n[seq2(-)], Strang 2 = [seq2(+)]_n[seq1(-)] und seq1 und seq2 Nucleinsäuresequenzen sind und (+) und (-) komplementäre Sequenzen bezeichnen (siehe [Fig. 6](#)). Eine sequentielle Hybridisierung von im Überschuss vorliegendem Strang 2 mit Strang 1, gefolgt von alternierendem im Überschuss vorliegendem Strang 1 und Strang 2, ergibt eine dendritische Struktur vorausgesetzt, dass n zwei oder mehr ist. Man würde erwarten, dass die durch zwei Einzelstränge erzeugte Struktur inhomogen ist, da eine jegliche Stöchiometrie von Strang 1 bezogen auf Strang 2 in halb-zufälliger Weise durch Hybridisierung polymerisieren könnte.

[0045] Das Hinzufügen eines dritten Strangs, welcher nur (+)-Sequenz-Elemente enthält, kann als ein Initiator verwendet werden, wodurch die Inhomogenität der wachsenden Strukturen verringert wird. Tatsächlich werden drei Arten von dendritischen Monomeren (die einzelsträngigen Nucleinsäuren) für eine kontrollierte Polymerisation durch Hybridisierung benötigt, ein „A“-Monomer, welches der Initiator ist und welches nur (+)-Sequenzen enthält, ein „B“-Monomer, welches die erste Schicht bildet, welches eine einzelne (-)-Sequenz, welche zu einer Sequenz auf dem „A“-Monomer komplementär ist, und eine Mehrzahl von (+)-Sequenzen, die sich von den auf dem „A“-Monomer gefundenen (+)-Sequenzen unterscheiden, enthält, und ein „C“-Monomer, welches eine einzelne (-)-Sequenz, welche zu der (+)-Sequenz aus dem „B“-Monomer komplementär ist, und eine Mehrzahl von (+)-Sequenzen, welche mit den (+)-Sequenzen des „A“-Monomers identisch sind, enthält.

[0046] Eine weitere Modifizierung des Dendrimer-Zusammenbaus, die in [Fig. 7](#) veranschaulicht wird, setzt vier Stränge ein, worin Strang 1 = [seq1(+)]_n, Strang 2 [seq1(-)][seq2(+)]_n, Strang 3 = [seq2(-)][seq3(+)]_n und Strang 4 = [seq3(-)][seq1(+)]_n. Diese Dendrimere bestehen aus dem Initiator-„A“-Monomer, den „B“-Monome-

ren der ersten Schicht, den „C“-Typ-Monomeren der zweiten Schicht und den „D“-Typ-Monomeren der dritten Schicht, gefolgt von der sequentiellen Addition von Monomeren vom B-, C- und D-Typ. Dendritische Strukturen können bei zunehmenden Arten von Monomeren sogar noch komplexer hergestellt werden. Jedoch ist eine Minimierung der Anzahl von Reagenzien bevorzugt.

[0047] Drei Einzelstränge könnten als die drei Monomere dienen. Jedoch würde die resultierende kammartige Struktur wahrscheinlich innerhalb von einigen wenigen Hybridisierungszyklen sterisch gehindert sein. Teilweise doppelsträngige Monomere, die aus zwei Nucleinsäure-Einzelsträngen bestehen, können die sterische Hinderung der kammartigen Struktur überwinden. In dieser Konfiguration weist jedes einzelsträngige Molekül drei Regionen, 5' → 3' = [Arm1seq][Taillenseq][Arm2seq] auf. In dieser Konfiguration besteht jedes Dendrimer-Monomer aus zwei einzelsträngigen Nucleinsäure-Molekülen, was Moleküle mit vier einzelsträngigen Armen und einer doppelsträngigen Taillenregion ergibt. Der Zusammenbau der Initiator-A-, erste Schicht-B- und zweite Schicht-C-Monomere kann mit lediglich fünf einzelsträngigen Nucleinsäure-Molekülen bewerkstelligt werden. Wie in [Fig. 8](#) gezeigt, würde die resultierende Struktur jedoch erhöhte sterische Hinderung aufweisen, welche aus der notwendigen zwangsweisen Einschränkung, dass sich zwei der Tailen der Monomere an dem gleichen Ende von zwei der Armsequenzen von jedem Monomer befinden, resultiert.

[0048] Ein maximaler Abstand der Dendrimer-Monomere kann mit lediglich sieben einzelsträngigen Nucleinsäuren bewerkstelligt werden. Eine andere Verfeinerung besteht in dem Einbau von zwei unterschiedlichen Taillensequenzen, was dazu dient, einen Strang-Austausch zwischen Dendrimer-Monomeren zu minimieren, und unerwünschte Hybridisierungsereignisse weiter einschränkt. Zusätzlich weisen die resultierenden Dendrimeren zwei Arten von einzelsträngigen Armen in gleichen Mengen in jeder Schicht auf, wodurch ermöglicht wird, dass eine Art von Arm für eine Hybridisierung mit einer bestimmten Zielsequenz verwendet wird und der andere Arm für eine Anheftung von Signalmolekülen verwendet wird.

[0049] Um die strukturelle Unversehrtheit des zusammengebauten Nucleinsäure-Dendrimers zu verstärken und zu helfen, diese aufrechtzuerhalten, wird eine Mehrzahl und werden vorzugsweise alle der Inter-Monomer-Verbindungen (d.h. die komplementären Arme, die hybridisierungsgebunden (über Hybridisierung miteinander verbunden) sind) vernetzt. In mehr bevorzugten Ausführungsformen wird die doppelsträngige Taillenregion einer Mehrzahl von oder, sogar mehr bevorzugt, von allen Monomeren ebenfalls vernetzt. Die Anmelderin hat entdeckt, dass eine Vernetzung der Matrix an diesen Stellen zu einer substantiell stabileren Struktur führt. Eine Vernetzung kann mit verschiedenen Mitteln gemäß Standard-Prozeduren ausgeführt werden. Geeignete Vernetzungsmittel umfassen Mitomycin C (z.B. Tomasz et al., *Science* 235:1204–1208 (1987); Basu et al., *Biochemistry* 32:4708–4718 (1993); Borowy-Borowski et al., *Biochemistry* 29:2999–3006 (1990); und Norman et al., *Biochemistry* 29:2861–2895 (1990)), Daunomycin und andere Antikrebsmittel, die eine Antikrebs-Wirkung durch die Vernetzung von DNA ausüben, Ethidiumdiazid, Cisplatin, Verbindungen vom EDC-Typ und Psoralene.

[0050] Die Fachleute auf diesem Gebiet werden erkennen, dass die Sequenzanforderungen und die Verfahrensbedingungen abhängig von dem spezifischen Vernetzungsmittel variieren. Siehe z.B. zusätzlich zu den vorerwähnten Veröffentlichungen Summerton et al., *J. Mol. Biol.* 122:145–162 (1978). Beispielsweise bevorzugt Mitomycin C 5'-CpG. Hinsichtlich Reaktionsbedingungen allgemein werden Vernetzungsreaktionen bei einer T_m von ungefähr -20°C und neutralem pH ausgeführt. In der Literatur sind reichlich Handreichungen bereitgestellt, um es einem Fachmann zu ermöglichen, die Nucleinsäure-Dendrimere der Erfindung zu vernetzen. Siehe z.B., The Pience Catalog und das U.S.-Patent Nr. 5,543,507 mit dem Titel „Covalently Cross-linked Oligonucleotides“ und die darin zusammenfassend angegebene Literatur, speziell Grineva et al., *FEBS*, 351–355 (1973); Summerton et al., *J. Mol. Biol.* 122:145–162 (1978); Summerton et al., *J. Theor. Biol.* 78:61–75 (1979); U.S.-Patent Nr. 4,123,610; Meyer et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 111:8517–19 (1989); Matteucci et al., *Nucleic Acids Res.*, 14:7661–7674 (1986); Matteucci et al., *Tetrahedron Letters*, 28:2469–2472 (1987); Ferentz et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 113:4000–4002 (1991); Lee et al., *Biochemistry*, 27:3197–3203 (1988); Manoharan et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7217–7219 (1987); Manoharan et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 110:2690–2691 (1988); Vasseur et al., *Nucleosides & Nucleotides* 8:863–866 (1989); Bertrand et al., *Nucleic Acids Research*, 17:10307–10319 (1989); Philippe et al., *Tetrahedron Letters*, 31:6347–6350 (1990); P. Iyer et al., *Nucleic Acids Research*, 18:2855–2859 (1990); Groehke et al., *Helvetica Chimica Acta*, 73:608–617 (1990); und Peoc'h et al., *Tetrahedron Letters*, 32:207–210 (1991).

[0051] Eine Psoralen-Behandlung ist bevorzugt. Aufgrund ihrer planaren Struktur können Psoralene zwischen die Basen-Anteile in der doppelhelikalalen molekularen Struktur der Nucleinsäuren interkalieren. Nach Bestrahlung mit Licht der korrekten UVA-Wellenlänge, z.B. von ungefähr 315 nm bis ungefähr 350 nm, können die Psoralene kovalente Bindungen zu Pyrimidin-Nucleotiden, die als Bestandteile von Nucleinsäure-Strängen

aufreten, bilden. Zusätzlich zu Psoralen umfassen Psoralen-Derivate, die für eine Vernetzung geeignet sind, 8-Methoxypsoralen, 4,5',8-Trimethylpsoralen und 4'-Addukte von Trioxsalen (z.B. 4'-Hydroxymethyl-4,5',8-trimethylpsoralen, 4'-Methoxymethyl-4,5',8-trimethylpsoralen, 4'N-Phthalimidomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen und 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen-hydrochlorid. Siehe z.B. U.S.-Patent 4,196,281.

[0052] Im Allgemeinen wird eine Vernetzung durch Psoralene gemäß Standardprozeduren ausgeführt. Siehe z.B. Cimino et al., Annu. Rev. Biochem. 54:1151–1193 (1985); Shi et al., Biochemistry 25:5895–5902 (1986); und Cimino et al., Biochemistry 25:3013–3020 (1986). Siehe auch U.S.-Patent Nr. 4,196,281 mit dem Titel „PSORALENE“, welches auf die Trioxsalen-4'-addukte als Nucleinsäure-Vernetzungsmittel gerichtet ist. Das '281-Patent gibt weitere Handreichungen hinsichtlich der Bestimmung von verschiedenen Reaktionsparametern, wie der Löslichkeit des Psoralens in wässriger Lösung und der Dissoziationskonstante für die nicht-kovalente Bindung des Psoralens an Nucleinsäure. Dementsprechend ist die Anzahl von Molekülen in dem umgebenden flüssigen Medium, welche für Bindungsstellen zur Verfügung stehen, umso größer, je höher die Löslichkeit ist. In ähnlicher Weise ist die Anzahl von Psoralenen, welche eine potentielle Bindungsstelle zu einem jeglichen Zeitpunkt besetzen, umso größer, je niedriger die Dissoziationskonstante ist. In bevorzugten Ausführungsformen beträgt die T_m ungefähr -20°C , ist die Nucleinsäure-Konzentration geringer als ungefähr 100 ng/ μl und wird das Psoralen unmittelbar vor der Verwendung umkristallisiert.

[0053] Die polyanionische Natur von Nucleinsäuren stellt sicher, dass Nucleinsäure-Konstrukte nahezu kugelförmig sind, Flüssigkeit in ihrem Inneren aufweisen und unterschiedliche Nucleinsäure-Konzentrationen in unterschiedlichen Schichten aufweisen. Mit jeder aufeinanderfolgenden Addition nimmt das Volumen der theoretischen Kugel, welche eine bestimmte Schicht enthalten kann, um das zusätzliche Volumen, das in der letzten Hybridisierungsschicht, d.h. der Schalenschicht, vorhanden ist, zu. Auch nimmt die mit jeder Schicht hinzugefügte Nucleinsäure sehr schnell zu und erreicht ungefähr zweimal die Summe der gesamten Nucleinsäure, die vor der Addition vorhanden war. Wenn sich zusätzliche Schichten anhäufen, nimmt so das anteilige Volumen der Kugel, das durch die Schale beigetragen wird, ab, während das anteilige Volumen der Nucleinsäure, die in dem Nucleinsäure-Dendrimer vorhanden ist, sich verdoppelt. Natürlich kann das Nucleinsäure-Volumen, das in der Schalen- oder letzten Additionsschicht vorhanden ist, nicht größer sein als das Volumen von jener Schale – bei einer bestimmten Schichten-Anzahl tritt eine Sättigung der Schale auf. Die Schicht, bei welcher die Nucleinsäure-Sättigung in der Schale auftritt, definiert den Beginn einer semipermeablen Nucleinsäure-Membran, und wird experimentell durch eine nahezu lineare Progression der gesamten Nucleinsäure, welche das Dendrimer umfasst, angezeigt im Gegensatz zu der geometrischen Progression der gesamten Nucleinsäure, welche vor der Sättigung beobachtet wird. Die Sättigung von Nucleinsäure in der Schale könnte auf eine sterische (Volumen/Volumen) Hinderung oder die hohe Konzentration von negativer Ladung in der Schale zurückzuführen sein. In jedem Falle ist zusätzliche Nucleinsäure sogar in der Schalenschicht teilweise ausgeschlossen, alle möglichen Hybride zu bilden, und vollständig ausgeschlossen aus dem Inneren des Dendrimers.

[0054] Dendrimere, die ausgehend von Monomeren mit der gleichen oder ähnlicher Konfiguration konstruiert worden sind, können mittels der folgenden Parameter beschrieben werden: der Gesamtanzahl von Monomeren, der Anzahl von in einer gegebenen Additionsschicht hinzugefügten Monomeren, des Kugelradius, des Kugelvolumens, des Schalenvolumens, des gesamten Nucleinsäure (NA)-Volumens und des in einem gegebenen Additionszyklus hinzugefügten Nucleinsäure-Volumens. Für Dendrimere, die mit variierenden Geometrien und Größen des Monomers konstruiert worden sind, müssen Anpassungen bei der Beschreibung des Monomers bei jeder Additionsnummer vorgenommen werden. Es können jedoch sogar Monomere mit verschiedenen Strukturen, gewichtete Durchschnittswerte für gesamte Basen, Länge in Basen, Volumen, Masse, Hybridisierungsstellen und Hybridisierungsstellenlänge bei einer Beschreibung, um zu einer Approximation für nicht-gleichförmige Nucleinsäure-Dendrimere zu gelangen, verwendet werden. Es folgt ein Modell für gleichförmige Nucleinsäure-Dendrimere.

[0055] Ein Nucleinsäure (NA)-Dendrimer ist definiert als eine Zusammenstellung von wenigstens drei einzelsträngigen Nucleinsäure-Molekülen, die über intermolekulare Basenpaarung, gegebenenfalls verstärkt durch intermolekulare kovalente Vernetzungen, in enger Assoziation gehalten werden. Ein Dendrimer-Monomer ist definiert als ein einzelner oder eine Gruppe von NA-Strängen, der bzw. die bei dem Zusammenbau eines NA-Dendrimers verwendet wird oder werden. Dieses Modell verwendet vier Dendrimer-Monomer-Variablen:

m = gesamte Basen des Monomers

n = Monomer-Länge in Basen

j = Monomer-Hybridisierungsstellen

und p = Hybridisierungsstellenlänge in Basen.

[0056] Diese Variablen sind ausreichend, um ein NA-Dendrimer-Wachstum modellartig nachzuempfinden.

[0057] Die Dendrimer-Monomer-Länge wird von n abgeleitet und ist definiert als die durchschnittliche längste Abmessung, radial projiziert von dem Ausgangs-Dendrimer-Monomer, wie in Lösung gemessen. Die Dendrimer-Monomer-Länge wird näherungsweise bestimmt anhand der Anzahl von Basen in dem längsten Einzelstrang eines Monomers mal dem Abstand pro Base.

Dendrimer-Monomer-Länge in nm = n Basen * 0,34 nm/Base = q nm.

[0058] Eine andere wichtige Länge, die in dem Modell verwendet wird, ist die Hybridisierungsstellenlänge: Monomer-Hybridisierungsstellenlänge in nm = p Basen * 0,34 nm/Base = r nm.

[0059] Das Volumen eines Dendrimer-Monomers ist definiert als das gesamte Lösemittel, welches durch ein einzelnes Monomer verdrängt wird. Das Dendrimer-Monomer-Volumen wird näherungsweise bestimmt, indem das Monomer als ein Zylinder mit einem Durchmesser von 1,0 (nm) und einer Länge, wie oben definiert, behandelt wird.

Dendrimer-Monomer-Volumen in nm ³ = p * (1 nm) ² * q nm = s nm ³.

[0060] Das mathematische Modell des Nucleinsäure-Dendrimer-Zusammenbaus macht mehrere Annahmen. Die erste Annahme besteht darin, dass die Dendrimer-Monomere ihre volle Länge minus der Hybridisierungsstellenlänge zu dem theoretischen Kugelradius beitragen. Zweitens nimmt das Modell an, dass für jede Addition die hinzugefügten Monomere sich in der Schalenschicht befinden. Schließlich wird angenommen, dass die Auswirkungen von pH, Temperatur und Salzkonzentration vernachlässigbar sind.

Nullte (Anfangs-)Schicht eines Nucleinsäure-Dendrimers

[0061] Ein einzelnes Monomer ist als die Schicht Nr. Null definiert.

k = 0

Kugelvolumen (0) = (4/3) * p * (Radius) ³

[0062] Der Radius (0) für die nullte Schicht ist eine Hälfte der Monomerlänge.

D.h. Kugelvolumen (0) = (4/3) * p * (q nm/2) ³.

[0063] Das Schalenvolumen (0) für die Schicht Nr. Null ist gleich dem Kugelvolumen für die nullte Schicht.

[0064] Das NA-Gesamtvolume (0) für die Schicht Nr. Null ist gleich dem Volumen von einem Monomer.
D.h. NA-Gesamtvolume (0) = s nm ³.

[0065] Das hinzugefügte NA-Volumen (0) ist für die Schicht Nr. Null gleich dem NA-Gesamtvolume (0).

Erste Schicht eines Nucleinsäure-Dendrimers

k = 1

[0066] Im Allgemeinen sind die in der Schicht Nr. eins hinzugefügten Monomere gleich der Anzahl von Hybridisierungsstellen, die pro Anfangs-Monomer zur Verfügung stehen.

Radius (1) = q/2 + q - r

Kugelvolumen (1) = (4/3) * p * (q/2 + q - r) ³

Schalenvolumen (1) = Kugelvolumen (1) - s

NA-Volumen (1) = j * s

NA-Volumen gesamt (1) = (1 + j) * s

k. Schicht für ein generalisiertes Dendrimer (k > 0)

$$\frac{1 + j * (1 - (j - 1)^{-k})}{2 - j}$$

Monomere gesamt (k) =

Hinzugefügte Monomere (k) = j * (j - 1) ^(k-1)

Kugelradius (k) = q/2 + k * (q - r)

Kugelvolumen (k) = (4/3) * p * (q/2 + k * (q - r)) ³

Schalenvolumen (k) = (Kugelvolumen (k)) – (Kugelvolumen (k – 1))

NA-Volumen gesamt (k) = (Monomere gesamt (k)) * s

Hinzugefügtes NA-Volumen (k) = (Hinzugefügte Monomere (k)) * s

[0067] Aufeinanderfolgende Additionen von Nucleinsäure würden zu der schließlichen Sättigung der Kugeloberfläche führen, was zu dem „Membran-Charakter“ der Reagenzien führt; das potentielle hinzugefügte Nucleinsäure-Volumen würde größer sein als die Zunahme des Volumens der verfügbaren Kugel. Nach Schicht 11 würde die Nucleinsäure ~90% des gesamten verfügbaren Oberflächenvolumens einnehmen, was eine näherungsweise Dichte von über 899 mg/ml darstellen würde. Die Nucleinsäure-Konzentration an der Oberfläche des Dendrimers würde extrem hoch sein und die Hauptmenge aller Nucleinsäure-Moleküle würde nahe der Oberfläche frei für eine Hybridisierung mit komplementären Sequenzen sein. Darüber hinaus könnte die hohe Nucleinsäure-Konzentration auf einer Kugel von nicht mehr als 10 Zyklen (obwohl weniger Zyklen möglicherweise die gewünschten Semipermeabilitätseigenschaften aufweisen würden) nicht-spezifische Absorptionen von Nucleinsäure innerhalb der sferischen dendritischen Struktur vermeiden.

[0068] Die vorhergesagten Parameter einer dendritischen Nucleinsäure, die mittels bis zu 20 aufeinanderfolgenden Monomer-Additionen hergestellt worden ist, sind in Tabelle 1 gezeigt, welche eine mathematische Behandlung unseres Konstrukts von Monomeren, welche zu Nucleinsäure-Dendrimeren geformt worden sind, darstellt. Bei den höheren Schichten-Nummern liegt das Modell eindeutig unterhalb der Nucleinsäure-Sättigung in den Schalen- oder Oberflächenschichten. [Fig. 3](#) ist eine graphische Darstellung der Volumen-Beziehungen als Funktion der Additions-Nr.

[0069] Der Zusammenbau der Nucleinsäure-Dendrimer-Monomere zu Nucleinsäure-Dendrimeren könnte an einem festen Träger, d.h. einem in Wasser unlöslichen Substrat, wie fluoreszierenden Polystyrol-Kügelchen, Nylonmembranen, Nitrocellulose und dergleichen, ausgeführt werden. Das Kern-Dendrimer-Monomer „A“ würde durch eine Starter-Schicht von einzelsträngiger Nucleinsäure, die an der festen Oberfläche fixiert ist, ersetzt werden. Die Starter-Schicht von ausgewählter Nucleinsäure könnte komplementär zu einem jeglichen der einzelsträngigen Arme der oben beschriebenen B'-, B'', C'-, C''-Monomere sein. Eine sequentielle Hybridisierung mit einem Überschuss von (B' + B''), gefolgt von einem Waschschritt (Spülen eines Membranträgers oder Zentrifugation von Polystyrol-Kügelchen), gefolgt von einer Hybridisierung mit einem Überschuss von (C' + C'') u.s.w., würde zu einer semipermeablen Nucleinsäure-Oberfläche, welche an einem festen Träger fixiert ist, führen.

Vorhergesagte Hybridisierungskinetiken von Nucleinsäure-Dendrimeren

[0070] Wieder ohne auf eine bestimmte Theorie hinsichtlich der Wirkungsweise festgelegt werden zu wollen, kann die DNA-Menge, welche in den Dendrimeren benötigt wird, um zu einer vernünftigen Reaktionsrate für die Hybridisierung zu gelangen, berechnet werden. Die Renaturierungsrate von vollständig denaturierter DNA ist kinetisch gesehen eine Reaktion zweiter Ordnung, und die Renaturierungsgeschwindigkeitskonstanten für DNAs werden näherungsweise angegeben durch:

$$k_2 = \frac{3e+5 \times L^{-0.5}}{N} \text{ liter mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

wobei L = Länge des kürzesten Einzelstrangs und N = Komplexität der DNA oder die Anzahl von nicht-repetitiven Basenpaaren (Wetmur & Davidson, J. Mol. Biol. 31:349–370 (1968)). Die vorhergesagte Hybridisierungsgeschwindigkeit von Nucleinsäuren sollte auf dendritische Moleküle anwendbar sein, da gezeigt worden ist, dass die experimentellen Werte von k_2 auf gescherte und ungescherte T4- und T7- und E. coli-DNAs, die ein mit der vorhergesagten Masse der Nucleinsäure-Dendrimere vergleichbares Molekulargewicht aufweisen, anwendbar sind.

[0071] Als ein Beispiel würde ein sechs Schichten aufweisendes Dendrimer, welches ausgehend von 110-Basen-Monomeren konstruiert worden ist, aus 1457 Monomeren bestehen, was einer Gesamtmenge von 160270 Basenpaaren entspräche. Diese Größe steht im Gegensatz zu den 39936 Basenpaaren der T7-Bakteriophage-DNA; d.h. die 6-schichtigen Dendrimere sind ungefähr viermal größer als T7-DNA. Diese Dendrimere weisen 2916 einzelsträngige Armsequenzen, 1458 Arme von zwei Arten, welche für eine Hybridisierung mit einer einzelnen DNA mit einer Sequenz von 50 Nukleotiden (nt) Länge, die detektiert werden soll, zur Verfügung stehen, auf.

[0072] Da jede Reaktion zu den gleichen 50 Basenpaaren führt, N = 50. L ist die Länge der kürzesten einzelsträngigen Region, welche an der Region teilnimmt, in diesem Falle L = 50. Dementsprechend ist die Ge-

schwindigkeitskonstante:

$$k_2 = \frac{3e5 * 50^{-0.5}}{50} = 4.24e+4 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

[0073] Es wird angenommen, dass die Reaktion durch die DNA-Matrix-Konzentration angetrieben wird (um empfindliche Detektionsbedingungen nachzuahmen). Man kann die Konzentration der Ziel-DNA in der Probe vernachlässigen und dementsprechend die Konzentration von Dendrimer-DNA, welche benötigt wird, um die gewünschten Hybridisierungsparameter zu realisieren, bestimmen. Wenn die Dendrimer-Konzentration 1 mg/ml beträgt, d.h. 3e-6 M, und da 50% der Nucleotide für eine Reaktion zur Verfügung stehen, d.h. eine Hälfte der ss-Arme:

C_0 der einzelsträngigen Arme = $3e-6/2 = 1,5e-6$ molar.

[0074] Dementsprechend beträgt die halbe Reaktionszeit, $t_{1/2} = \ln 2 / [4,24e4 * 1,5e-6] = 11$ Sekunden oder $t_{3/4} < 0,5$ min. Es ist verifiziert worden, dass diese Berechnung die Ergebnisse einer Hybridisierung von Oligonucleotiden an komplementäre Sequenzen, die kovalent an die Oberfläche von Körnchen gebunden sind, genau vorhersagt. Diese Berechnung nimmt an, dass die gesamten Dendrimer-Oligonucleotide für eine Reaktion zur Verfügung stehen (oder die Rate ist proportional verringert) und dass das Mischen vollständig ist (oder die Reaktion besteht aus einer schnellen homogenen Reaktion, gefolgt von einer langsameren Diffusions-kontrollierten Reaktion). Bei dem angegebenen Beispiel, d.h. Dendrimer-Konzentration gleich 1 mg/ml, werden mehr als 75% aller möglichen Brücken in dreißig Sekunden gebildet werden. Es ist anzumerken, dass 1 mg/ml gleich 1 ng/ml ist, so dass eine 50 ml-Reaktion nur 50 ng DNA-Dendrimer für einen 75%-igen Einfang eines 50-meren Nucleinsäure-Moleküls unabhängig von der Konzentration des 50-mers erfordern würde.

Tabelle 1

Matrix-Monomer-Basen gesamt	220
Matrix-Monomer-Länge in Basen	110
Matrix-Monomer-Länge (nm)	37,4
Matrix-Monomer-Volumen (nm) ³	2,94e+01
Matrix-Monomer-Masse (mg)	1,21e-16
Monomer-Hybridisierungsstellen	4
Hybridisierungsstellenlänge (BP)	30
Hybridisierungsstellenlänge (nm)	10,2

Addition Nr.	Gesamte Monomere	Hinzugefügte Monomere	[Gesamte DNA] mg/ml	[Schalen- DNA] mg/ml
0	1	1	4	4
1	5	4	1	1
2	17	12	1	1
3	53	36	2	2
4	161	108	2	3
5	485	324	4	6
6	1457	972	7	12
7	4373	2916	14	27
8	13121	8748	29	62
9	39365	26244	62	148
10	118097	78732	138	361
11*	354293	236196	317	899*
12*	1,06e+06	708588	744*	2273*
13*	3,19e+06	2,13e+06	1778*	5824*
14*	9,57e+06	6,38e+06	4317*	15096*

* Für diese Schicht-Nr. wird vorhergesagt, dass die Nucleinsäure-Konzentration bei oder oberhalb einer gesättigten Lösung liegt, d.h. das Modell hat versagt und die Anzahl von einzelsträngigen Armen, die Masse und die vorhergesagte DNA-Konzentration müssen allesamt niedrigere Werte haben.

Abkürzungen:

BP	= Basenpaar
C ₀	= Konzentration zum Zeitpunkt Null
DNA	= Desoxyribonucleinsäure
ds	= doppelsträngig
l	= Liter
In:	natürlicher Logarithmus
M	= Molar
-mer	= Oligomer
mg	= Milligramm
ml	= Milliliter
NA	= Nucleinsäure
nm	= Nanometer
nt	= Nucleotid
RNA	= Ribonucleinsäure
ss	= einzelsträngig
t	= Zeit
mg	= Mikrogramm
ml	= Mikroliter

Symbole

- * = Multiplikation
- p = pi ~3,1415926
- ^ = hoch
- e = Exponent zur Basiszahl 10
- [] = Konzentration

[0075] Die dendritischen Polynucleotide der Erfindung können zur Herstellung von Zusammensetzungen, wie sie in U.S. 5,175,270 beansprucht werden, und in Assays, wie sie in U.S. 5,487,973 offenbart und beansprucht werden, verwendet werden.

Industrielle Anwendbarkeit

[0076] Die Erfindung ist nützlich in Assays zum Nachweis einer Vielzahl von Analyten von Interesse, einschließlich Nucleinsäuren und Antigene.

[0077] Alle Patent- und Nicht-Patent-Veröffentlichungen, die in diesen Unterlagen zitiert werden, zeigen das Niveau der Fachkenntnisse der Fachleute auf dem Gebiet, auf welches sich die Erfindung bezieht, an.

[0078] Obwohl die Erfindung hier unter Bezugnahme auf besondere Ausführungsformen beschrieben worden ist, soll es sich verstehen, dass diese Ausführungsformen lediglich der Veranschaulichung der Prinzipien und Anwendungen der Erfindung dienen. Es muss sich daher verstehen, dass zahlreiche Modifikationen an den der Veranschaulichung dienenden Ausführungsformen vorgenommen werden können.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Nilsen, Thor

<120> Dendritische Nukleinsäuren mit maximaler
Selbstzusammenlagerung

<130> POLYPROBE 3.4-010 EUROPAT

<140> 98 937 269.3

<141> 2000-01-27

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 261

<212> DNA

<213> Unbekannter Organismus

<220>

<223> Beschreibung des unbekannten Organismus:
erläuternde DNA-Sequenz

<400> 1

```

cgacaaaaaga actgaggaag tgggtaatg atagagcaac aggtgacgga tggcagacta 60
aatacacgaa accaagggag attgaattaa gctaggctgg accgagtaga aaaatgtgca 120
taacgtacaa tataaagtaa gatcaatca aacatgaagg atacgcaagc gatgctaact 180
atggAACGAG aggttagggcg ggacagaaga cgccgcagtga gtcggccaac cggagcggca 240
cgggtgtggt caggcgaaca a 261

```

<210> 2

<211> 261

<212> DNA

<213> Unbekannter Organismus

<220>

<223> Beschreibung des unbekannten Organismus:
erläuternde DNA-Sequenz

<400> 2

```

ttgttcgcct gaccacaccc gtgccgcctcc ggttggccga ctcactgcgc gtcttcgtc 60
ccgccttacc tctcggttccaa tagtttagcat cgcttgcgtta tccttcatgt ttgattcgat 120
cttactttat attgtacgtt atgcacattt ttctactcggtt ccagccttag cttaattcaa 180
tctcccttgg tttcgtgtat ttagtctgcc atccgtcaco tggtgctcta tcattacccc 240
acttcctcag ttcttttgcg 261

```

Patentansprüche

1. Dendritisches Polynucleotid mit einer Mehrzahl von einzelsträngigen Hybridisierungsarmen; wobei das Polynucleotid eine Mehrzahl von Polynukleotid-Monomeren umfasst, die durch Hybridisierung zusammengebunden sind; jedes Polynucleotid-Monomer eine Zwischenregion aufweist, die eine lineare, doppelsträngige Taillenregion mit einem ersten Ende und einem zweiten Ende umfasst, wobei das erste Ende in zwei einzelsträngigen Hybridisierungsregionen endet, jede aus einem Strang der Taillenregion, und das zweite Ende in einer oder zwei einzelsträngigen Hybridisierungsregionen endet, jede aus einem Strang der Taillenregion; und in dem dendritischen Polynucleotid jedes Polynucleotid-Monomer an mindestens ein weiteres Polynucleotid-Monomer an mindestens einer derartigen Hybridisierungsregion hybridisierungsgebunden ist; und wobei jede der Hybridisierungsregionen und der Taillenregionen der Mehrzahl von Monomeren aus Sequenzen besteht, die aus einer Master-Sequenz erhalten sind, welche keine Wiederholungen von Untersequenzen mit X Nucleotiden enthält, wobei X eine ganze Zahl von mindestens 2 darstellt.

2. Dendritisches Polynucleotid nach Anspruch 1, in dem die vorhandene Mehrzahl von Matrix-Polynucleo-

tid-Monomeren die Sättigung des dendritischen Polynucleotids nicht überschreitet.

3. Dendritisches Polynucleotid nach Anspruch 1, in dem die Hybridisierungsregionen, die zusammengebunden sind, vernetzt sind.
4. Dendritisches Polynucleotid nach Anspruch 1, in dem Taillenregionen der Monomere vernetzt sind.
5. Dendritisches Polynucleotid nach Anspruch 1, in dem Taillen- und Hybridisierungsregionen vernetzt sind.
6. Dendritisches Polynucleotid nach Anspruch 1, in dem X 3 ist.
7. Dendritisches Polynucleotid nach Anspruch 1, in dem X 4 ist.
8. Dendritisches Polynucleotid nach Anspruch 1, in dem X 5 ist.
9. Zusammensetzung zur Verwendung als Hybridisierungsreagens zum Nachweis einer Nucleinsäuresequenz, umfassend ein dendritisches Polynucleotid mit einer Mehrzahl von einzelsträngigen Hybridisierungsarmen; wobei das Polynucleotid eine Mehrzahl von Polynucleotid-Monomeren umfasst, die durch Hybridisierung zusammengebunden sind; wobei jedes Polynucleotid-Monomer eine Zwischenregion aufweist, die eine lineare, doppelsträngige Taillenregion mit einem ersten Ende und einem zweiten Ende umfasst, wobei das erste Ende in zwei einzelsträngigen Hybridisierungsregionen endet, jede aus einem Strang der Taillenregion, und das zweite Ende in einer oder zwei einzelsträngigen Hybridisierungsregionen endet, jede aus einem Strang der Taillenregion; und in dem dendritischen Polynucleotid jedes Polynucleotid-Monomer an mindestens ein weiteres Polynucleotid-Monomer an mindestens einer derartigen Hybridisierungsregion hybridisierungsgebunden ist; und wobei jede der Hybridisierungsregionen und der Taillenregionen der Mehrzahl von Monomeren aus Sequenzen besteht, die aus einer Master-Sequenz erhalten sind, welche keine Wiederholungen von Untersequenzen mit X Nucleotiden enthält, wobei X eine ganze Zahl von mindestens 2 darstellt.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

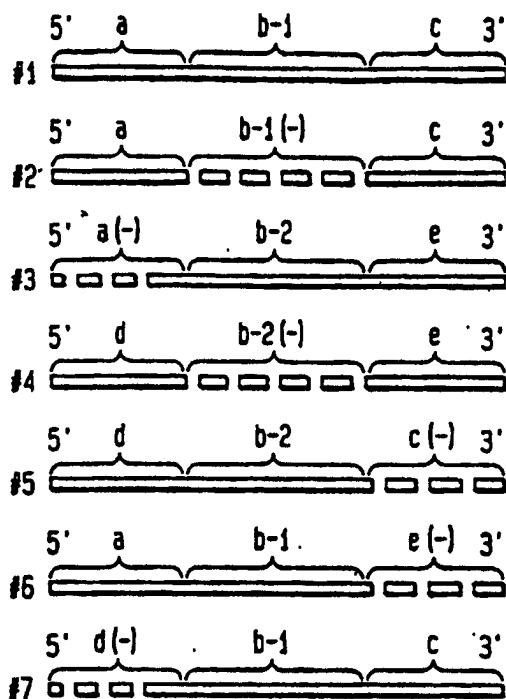
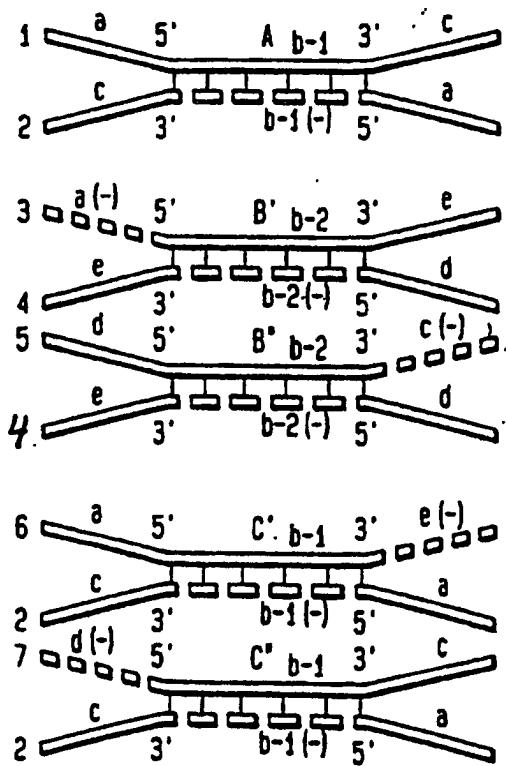
FIG. 1A**FIG. 1B**

FIG. 2A

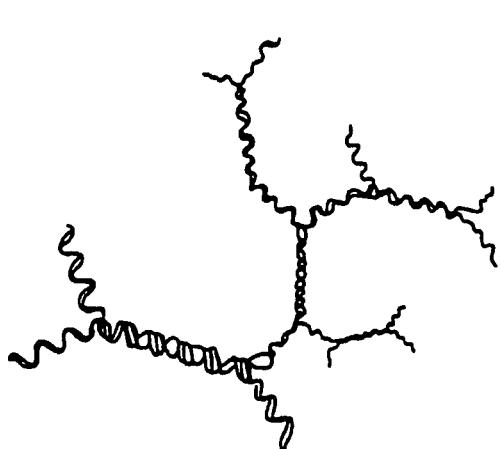


FIG. 2B

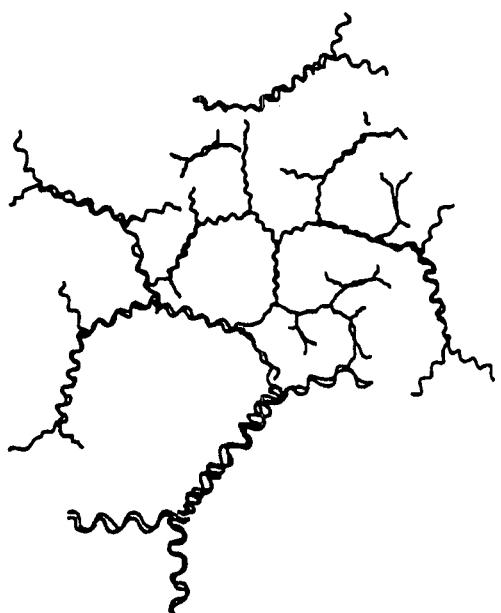


FIG. 2C

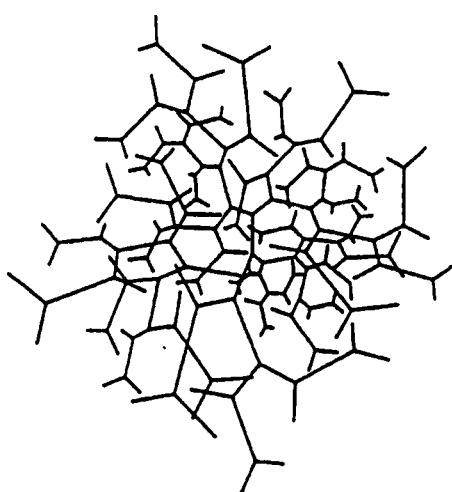


FIG. 2D

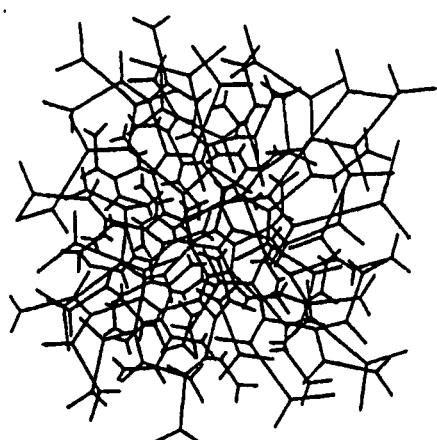


FIG. 3

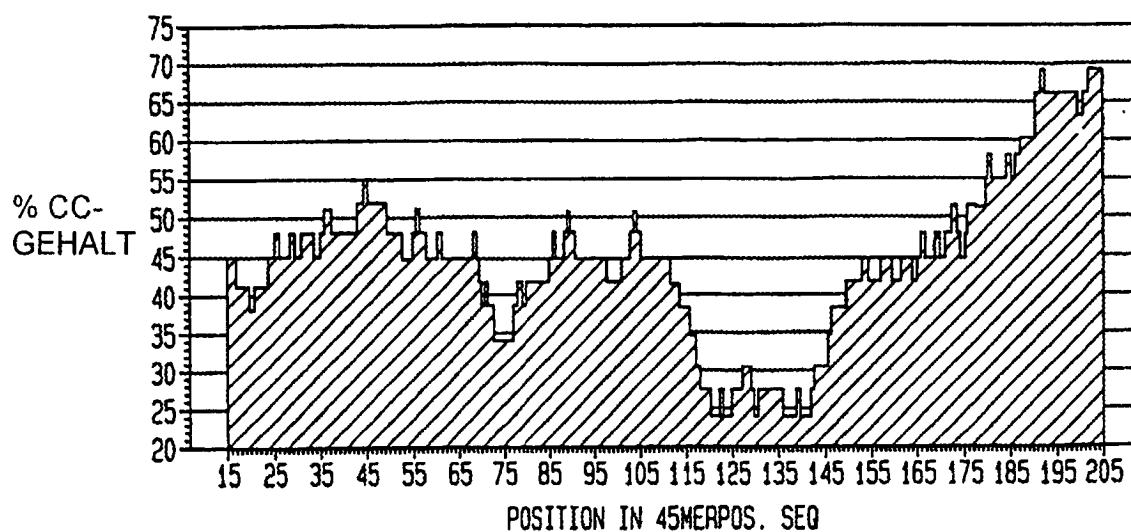


FIG. 4

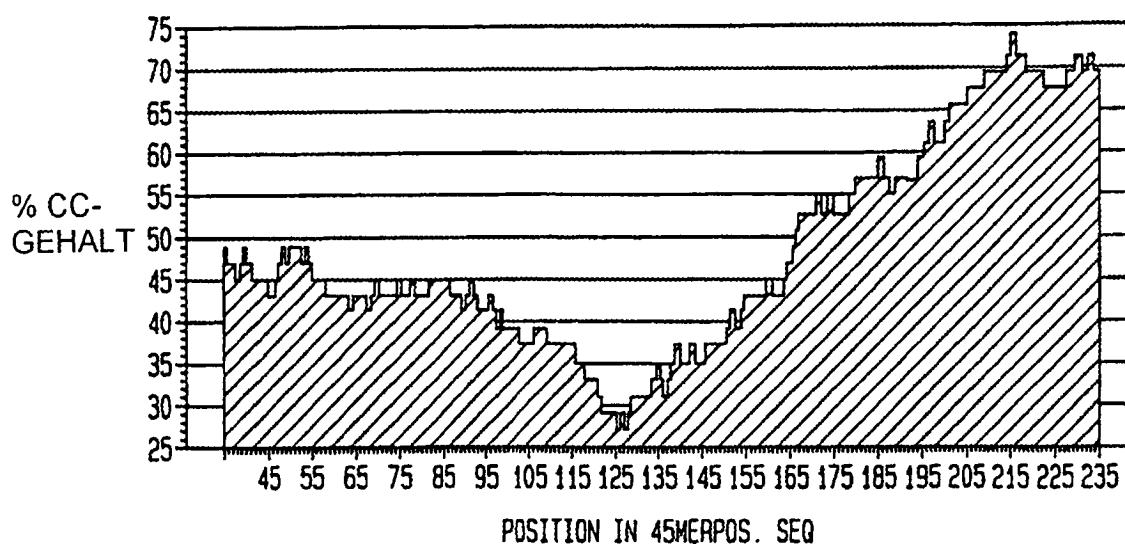


FIG. 5

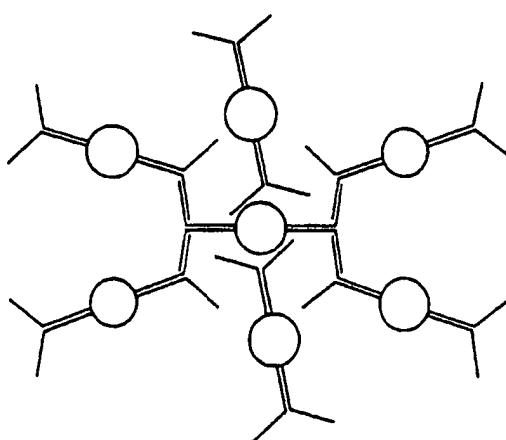


FIG. 7

STRANG 1

$$\text{seq1 (+)}_n = \underbrace{\text{seq1 (+)}}_{\text{---}} \underbrace{\text{seq1 (+)}}_{\text{---}} \underbrace{\text{seq1 (+)}}_{\text{---}} \underbrace{\text{seq1 (+)}}_{\text{---}}$$

STRANG 2

$$\text{seq1 (-)} \text{seq2 (+)}_n = \underbrace{\text{seq1 (-)}}_{\text{---}} \underbrace{\text{seq2 (+)}}_{\text{---}} \underbrace{\text{seq2 (+)}}_{\text{---}} \underbrace{\text{seq2 (+)}}_{\text{---}}$$

STRANG 3

$$\text{seq2 (-)} \text{seq3 (+)}_n = \underbrace{\text{seq2 (-)}}_{\text{---}} \underbrace{\text{seq3 (+)}}_{\text{---}} \underbrace{\text{seq3 (+)}}_{\text{---}} \underbrace{\text{seq3 (+)}}_{\text{---}}$$

STRANG 4

$$\text{seq3 (-)} \text{seq1 (+)}_n = \underbrace{\text{seq3 (-)}}_{\text{---}} \underbrace{\text{seq1 (+)}}_{\text{---}} \underbrace{\text{seq1 (+)}}_{\text{---}} \underbrace{\text{seq1 (+)}}_{\text{---}}$$

FIG. 6

EINZEL-
STRANG1(+)

EINZEL-
STRANG2(+)

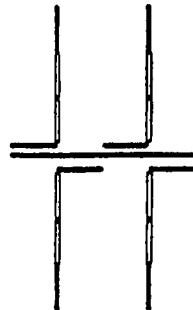
WOBEI n=3:

seq1(+) seq1(+) seq1(+) seq2(-)

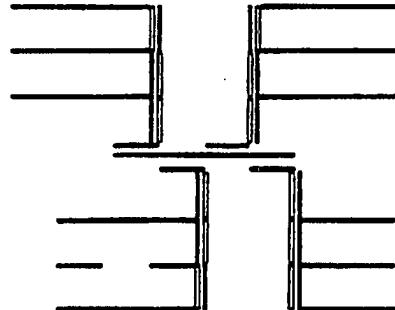
WOBEI n=3:

seq2(+) seq2(+) seq2(+) seq1(-)

1 SCHICHT
"IDEAL"



2 SCHICHTEN
"IDEAL"



a) 1(+) 2(-)
1(-) 2(+)

b) 1(+) 2(-)
1(-) 2(+)

c) 2(-) 2(+)
1(-) 1(+)

d) 1(+) 1(-) 1(+) 2(-) 2(-) 1(-) 1(-) 1(+) 2(-) 1(-)
1(-) 1(+) 1(-) 2(+) 2(+) 1(+) 1(-) 1(-) 2(+) 1(+)

FIG. 8

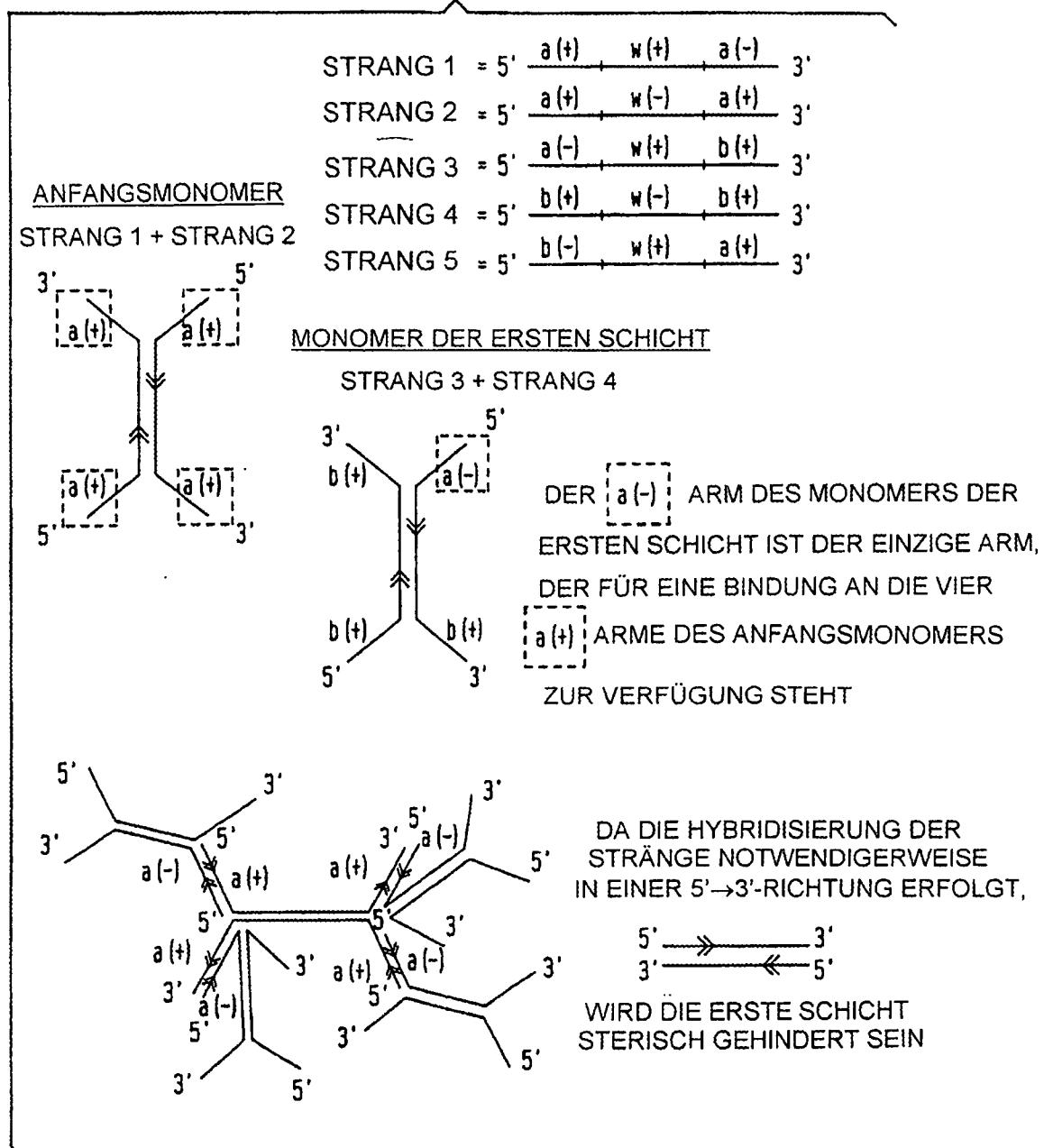


FIG. 9

