



(11) **EP 1 527 203 B1**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT**

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des Hinweises auf die Patenterteilung:
18.04.2007 Patentblatt 2007/16

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

(21) Anmeldenummer: **03790655.9**

(86) Internationale Anmeldenummer:
PCT/DE2003/002548

(22) Anmeldetag: **29.07.2003**

(87) Internationale Veröffentlichungsnummer:
WO 2004/020660 (11.03.2004 Gazette 2004/11)

(54) **Radikalisch vernetzbares Hydrogel mit Linkergruppen**

Radically crosslinkable hydrogel comprising linker groups

Hydrogel réticulable par voie radicalaire comprenant des groupes de liaisons

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE

(56) Entgegenhaltungen:
WO-A-00/31148 WO-A-00/43355
DE-A- 4 023 578 US-A- 5 401 508
US-A- 5 428 076 US-A- 5 596 038

(30) Priorität: **08.08.2002 DE 10236461**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
04.05.2005 Patentblatt 2005/18

(73) Patentinhaber: **SIEMENS
AKTIENGESELLSCHAFT
80333 München (DE)**

- **VASILISKOV A V ET AL: "FABRICATION OF MICROARRAY OF GEL-IMMOBILIZED COMPOUNDS ON A CHIP BYCOPOLYMERIZATION" BIOTECHNIQUES, EATON PUBLISHING, NATICK, US, Bd. 27, Nr. 3, September 1999 (1999-09), Seiten 592,594,596-598,600,602,604,606, XP000849476 ISSN: 0736-6205**
- **TIMOFEEV E ET AL: "Binding specificity and stability of duplexes formed by modified oligonucleotides with a 4096-hexanucleotide microarray" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 29, Nr. 12, Juni 2001 (2001-06), Seiten 2626-2634, XP002961131 ISSN: 0305-1048**

(72) Erfinder:

- **ARQUINT, Philippe
CH-7402 Bonaduz (CH)**
- **FEUCHT, Hans-Dieter
71272 Renningen (DE)**
- **GUMBRECHT, Walter
91074 Herzogenaurach (DE)**
- **GÖTZ, Hannelore
73732 Esslingen a. N. (DE)**

EP 1 527 203 B1

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft radikalisch vernetzbare liquide Zusammensetzungen zur Erzeugung von Hydrogelen auf Basis von Polyacrylamid.

[0002] In der modernen biologischen Analysentechnik sowie in der medizinischen Diagnostik werden in zunehmenden Maße sogenannte Biochips eingesetzt. Biochips sind meist planare Trägersysteme aus Glas oder Kunststoff, deren Oberfläche mit einer zweidimensionalen Erkennungsschicht, welche biologische Erkennungsmoleküle umfasst, ausgerüstet sind. Ein bekanntes Beispiel für einen derartigen Biochip ist der optisch auslesbare DNA-Chip, welcher von F. Hänel, H.P. Saluz in BIOforum 9/99, Seiten 504-507 beschrieben ist.

[0003] Zur Steigerung der Empfindlichkeit derartiger Biochips sowie zur Optimierung der Reproduzierbarkeit der Messergebnisse ist der Einsatz dreidimensionaler Immobilisierungsschichten für die biologischen Erkennungsmoleküle sinnvoll. So verwendet die Firma Schleicher & Schuell GmbH eine dreidimensionale Immobilisierungsschicht für ein Produkt mit dem Namen FAST™ Slides DNA-Chips, in denen Fänger-Oligos in einer dreidimensionalen Nitrocellulose-Membran immobilisiert sind (Schleicher & Schuell, BioMolecular Screening, Catalog 2001 (int. Edt.)).

[0004] Ein Problem bei der technischen Realisierung entsprechender Immobilisierungsschichten ist zunächst der Wunsch nach einer kostengünstigen Methode zum Aufbringen der Schichten auf die Chips oder auf Transducersysteme. Günstigerweise werden die Immobilisierungssysteme aus flüssigen Vorstufen auf eine geeignete Unterlage aufgetropft, darauf dispensiert, aufgeschleudert oder aufgedruckt. Zum Verfestigen der Schichten werden zum Beispiel thermische Polymerisation bzw. Vernetzung, Trocknungsvorgänge oder fotochemische Polymerisierungs- bzw. Vernetzungsvorgänge gewählt.

[0005] Ph. Arquint beschreibt für eine solche Anwendung ein photovernetztes Hydrogel auf Basis eines vernetzten Polyacrylamids ("Integrated Blood Gas Sensor for pO₂, pCO₂ und pH based on Silicon Technology (Dissertation, Ph. Arquint, Uni Neuchatel, Schweiz, 1994).

[0006] Hydrogele spielen eine bedeutende Rolle in der chemischen und/oder biochemischen Analytik sowie insbesondere bei der Realisierung von Chemo- und Biosensoren. Sie dienen dazu, ein wässriges Milieu in mechanisch stabiler Form bei gleichzeitiger Gewährleistung des Stoffaustausches in einer überwiegend wässrigen Umgebung zu realisieren. Durch Wahl der chemischen Zusammensetzung, was die Komponenten und deren Verhältnis untereinander anbetrifft, können die Eigenschaften der Hydrogele, wie Wassergehalt, Quellverhalten, mechanische Stabilität, etc. über weite Bereiche variiert werden.

[0007] Ph. Arquint beschreibt in seiner Dissertation eine Methode, bei welcher Poly-Acrylamid-Hydrogele mit Hilfe einer annähernd halbleiterkompatiblen Methode auf

Silicium-Wafern aufgebracht und fototechnisch strukturiert werden. Bei der beschriebenen Technologie liegt jedoch ein entscheidendes Problem vor:

[0008] Ein Nachteil des von Arquint beschriebenen Systems, d.h. der Hydrogel-Vorstufe, ist darin zu sehen, dass in der vernetzten Schicht keine reaktiven Linkergruppen zur Verfügung stehen, mit deren Hilfe chemische oder biologische Erkennungsmoleküle für analytische Anwendungen eingekoppelt werden.

[0009] Timofeev et al. beschreiben in Nucleic Acids Research, 1966, Band 24, Nr. 16, Seiten 3142-3148 ein chemisch modifiziertes radikalisch vernetztes Polyacrylamid, dass u.a. für die Immobilisierung von Fänger-Oligos eingesetzt werden kann. Als Kopplungsgruppen im Hydrogel werden Amino- oder Aldehyd-Gruppen verwendet. Aldehyd- bzw. Amino- funktionalisierte Fänger-Oligos können an diese Kopplungsgruppen unter reduktiven Reaktionsbedingungen kovalent immobilisiert werden. Das bedeutet, dass neben der eigentlichen Kopplungsreaktion zwischen Amino- und Aldehydgruppe bzw. umgekehrt ein zusätzlicher Reduktionsschritt unter Einsatz von Reduktionsmitteln erforderlich ist. Weitere von Timofeev et al. beschriebene Methoden zur chemischen Aktivierung des vernetzten Polyacrylamids erfordern ebenfalls zusätzliche Reaktionsschritte in der Polymermatrix.

[0010] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher die Bereitstellung eines radikalisch vernetzbaren Hydrogelsystems auf Acrylamidbasis, das ein Comonomer enthält, das die kovalente Ankopplung entsprechend modifizierter Biomoleküle, d.h. chemischer oder biologischer Erkennungsmoleküle, mit kompatiblen Linkergruppen, über eine reaktive Linkergruppe in einem einfachen, schnellen Reaktionsschritt ohne zusätzlichen Chemikalieneinsatz möglich macht.

[0011] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist demzufolge eine radikalisch vernetzbare, liquide Zusammensetzung zur Erzeugung einer Hydrogelschicht auf Basis von Polyacrylamid gemäß Anspruch 1.

[0012] Nach Schichtherstellung und thermischer bzw. Fotovernetzung wird ein mit Wasser quellbares Hydrogel erhalten, das reaktive Linkergruppen zur Immobilisierung chemischer oder biologischer Erkennungsmoleküle für analytische oder diagnostische Anwendungen enthält.

[0013] Die Monomervorstufe des Polyacrylamids basiert auf Methylenbisacrylamid, wodurch wie bei Arquint zwei Monomerketten miteinander verbunden sind. Durch Variation der Konzentration des Vernetzungsmittels Methylenbisacrylamid, Dimethylacrylsäureester, wie zum Beispiel Tetraethylglycoldimethacrylat, lässt sich die Maschenweite des Hydrogeles leicht einstellen.

[0014] Das Comonomer mit reaktiven Linkergruppen ist aus der Gruppe ausgewählt, die aus Maleinsäureanhydrid und/oder Glycidyl(meth)acrylat besteht. Der Weichmacher ist Mono-, Di- und/oder Triethylenglykol. Durch Optimierung des Weichmacheranteiles in der Zusammensetzung kann die getrocknete Vorstufenschicht

in ihrem Polymerisierungsverhalten optimiert werden.

[0015] Die Zusammensetzung liegt vorzugsweise in einem polaren, mit Wasser mischbaren Lösungsmittel, vorzugsweise Dimethylformamid vor. Durch Variation des Lösungsmittelanteils kann die Verarbeitungsviskosität leicht eingestellt werden.

[0016] Die erfindungsgemäße Zusammensetzung bietet für die Erzeugung von Hydrogelen, insbesondere solcher, welche zur Herstellung von Immobilisierungsschichten Verwendung finden sollen, viele Vorteile. Die Vorstufenkomponenten sind in einem breit variierbaren Mischungsverhältnis mischbar. Die Viskosität der Zusammensetzung ist leicht einstellbar. Eine gute Schichtbildung ist gewährleistet, während welcher keine Phasentrennung auftritt. Die Schicht ist für Licht zur Fotoinitiation ausreichend transparent. Vernetzungsdichte und Wasserquellbarkeit lassen sich beliebig einstellen. Die Hilfskomponenten, wie Weichmacher etc., können nach der Vernetzung leicht ausgewaschen werden. Die Haftung an der Substratoberfläche kann mittels üblicher Haftvermittlersysteme auf beispielsweise Silanbasis verstärkt werden.

Patentansprüche

1. Radikalisch vernetzbare liquide Zusammensetzung zur Erzeugung einer Hydrogelschicht auf Basis von Polyacrylamid, wobei die Zusammensetzung neben dem Monomer-Vorstufe des Polyacrylamids, dem Vernetzungsmittel und den/dem Radikalinitiator (en), wenigstens ein Comonomer mit reaktiven Linkergruppen und wenigstens einen Weichmacher umfasst, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Monomer-Vorstufe des Polyacrylamids Methylenbis(meth)acrylamid und/oder Dimeth-acryl-säureester ist, das Comonomer mit reaktiven Linkergruppen aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Maleinsäureanhydrid und/oder Glycidyl(meth)acrylat besteht und der Weichmacher aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Mono-, Di- und/oder Triethylenglycol besteht.
2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie in einem polaren, mit Wasser mischbaren Lösungsmittel vorliegt.
3. Zusammensetzung nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Lösungsmittel Dimethylformamid ist.
4. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Erzeugung einer Immobilisierungsschicht für Biomoleküle auf einer Transduzoberfläche.

Claims

1. Radically crosslinkable liquid composition for producing a polyacrylamide-based hydrogel layer, with the composition comprising at least one comonomer with reactive linker groups and at least one softener in addition to the monomer precursor of the polyacrylamide, the crosslinking agent and the radical initiator, **characterised in that** the monomer precursor of the polyacrylamide is based on acrylamide methylenbis(meth)acrylamide and/or dimethacrylic acid ester, the comonomer with reactive linker groups is selected from the group comprising maleic acid anhydride and/or glycidyl(meth)acrylate and the softener is selected from the group comprising monoethylene glycol, diethylene glycol and/or triethylene glycol.
2. Composition according to claim 1, **characterised in that** it is available in a polar solvent which can be mixed with water.
3. Composition according to claim 2, **characterised in that** the solvent is dimethyl formamide.
4. Use of a composition according to one of the claims 1 to 3 to produce an immobilization layer for biomolecules on a transducer surface.

Revendications

1. Composition liquide réticulable par voie radicalaire pour générer une couche d'hydrogel à base de polyacrylamide, la composition comprenant outre le précurseur monomère, du polyacrylamide, l'agent de réticulation et l'initiateur/les initiateurs radicalaire (s), au moins un comonomère avec des groupes de leurs réactifs et au moins un plastifiant, **caractérisée en ce que** le précurseur monomère du polyacrylamide est du méthylènebis(meth)acrylamide et/ou de l'ester diméthylacrylique, le comonomère est choisi avec des groupes de leurs réactifs dans le groupe qui se compose d'anhydride d'acide maléique et/ou de glycidyl(méth)acrylate et le plastifiant est choisi dans le groupe qui se compose de mono-, di-, et/ou triéthylène glycol.
2. Composition selon la revendication 1, **caractérisée en ce qu'elle** est présente dans un solvant polaire et miscible avec de l'eau.
3. Composition selon la revendication 2, **caractérisée en ce que** le solvant est du formamide de diméthyle.

4. Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 pour générer une couche d'immobilisation pour des biomolécules sur une surface de transducteur.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55