

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Februar 2007 (15.02.2007)

PCT

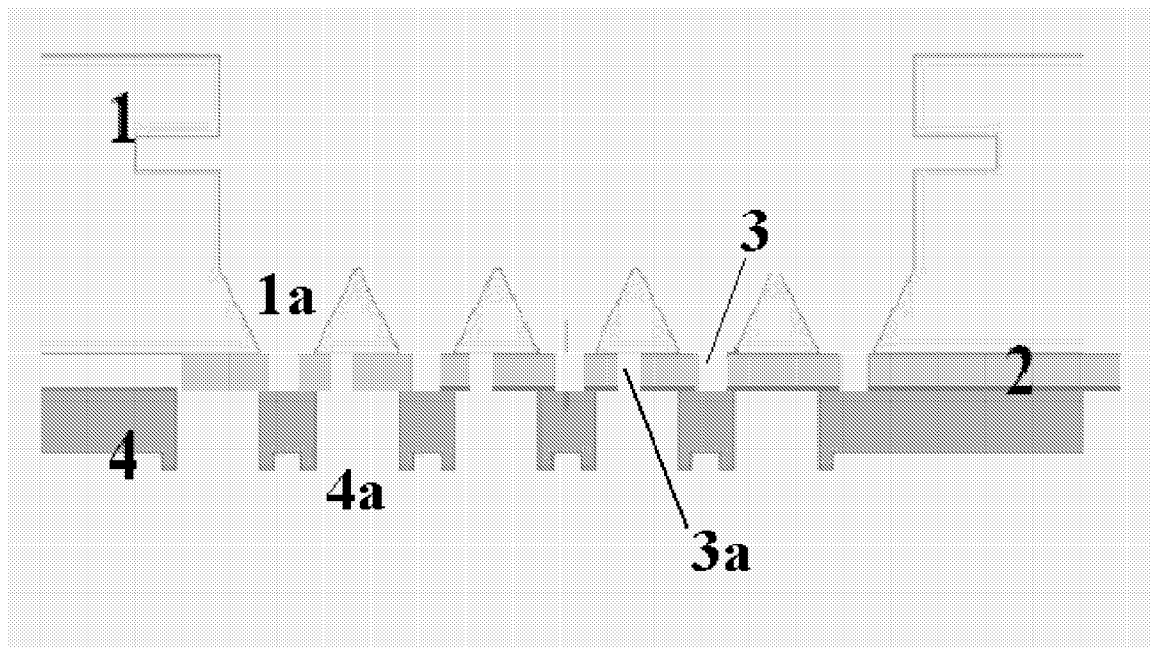
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2007/017443 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation:
B01L 11/00 (2006.01) **G01F 11/40** (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2006/064972
- (22) Internationales Anmeldedatum:
2. August 2006 (02.08.2006)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
102005036967.7 5. August 2005 (05.08.2005) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **FORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE GMBH** [DE/DE]; Weberstr. 5, 76133 Karlsruhe (DE). **DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM** [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 580, 69120 Heidelberg (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **RAPP, Bastian** [DE/DE]; Zähringerstr. 49, 76133 Karlsruhe (DE). **HERRMANN, Dirk** [DE/DE]; Frauenalberstr. 127, 76199 Karlsruhe (DE). **GUBER, Andreas** [DE/DE]; Grötzingerstr. 40, 76227 Karlsruhe (DE). **JACOB, Anette** [DE/DE]; Frauenpfad 29, 69221 Dossenheim (DE). **DAUBER, Marc** [DE/DE]; K2, 10-11, 68159 Mannheim (DE). **HOHEISEL, Jörg** [DE/DE]; Herderstr. 13, 69149 Wiesloch (DE).
- (74) Anwalt: **FITZNER, Uwe**; Hauser Ring 10, 40878 Ratingen (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: APPARATUS FOR FILLING RECEPTACLES IN PARALLEL

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG ZUM PARALLELEN BEFÜLLEN VON GEFÄßEN



(57) Abstract: The invention relates to an apparatus for filling receptacles in parallel (e.g. microtiter plates of any size, Eppendorf reaction vessels, or cartridges) or for coating planar surfaces (optionally comprising cavities or wells) such as glass supports, e.g. object supports, membranes, wafers, or similar. The inventive apparatus encompasses a frame (1) with outlets (1a), a movable portioning plate (2) with bores (3), and a bottom plate (4) with outlets (4a). Also disclosed is a method for filling receptacles.

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Vorrichtung zum parallelen Befüllen von Gefäßen (z.B. Mikrotiterplatten jeglicher Größe, Eppendorf- Reaktionsgefäße oder Kartuschen) oder zur Belegung planarer Oberflächen (eventuell mit Vertiefungen oder Wells), wie Glaträger z.B. Objektträger, Membrane, Wafer

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2007/017443 A1



KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Vorrichtung zum parallelen Befüllen von Gefäßen

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Vorrichtung und ein Verfahren zum Befüllen von Gefäßen. Die Vorrichtung kann auch als "Portionierer" oder
5 "Mikrowaage" bezeichnet werden.

Im letzten Jahrzehnt ist in der Biotechnologie, Gentechnik oder organischen Synthese eine Miniaturisierung der Reaktionsvolumina und das Bestreben zu beobachten, die im Laborbereich eingesetzten Chemikalien- und Substanzmengen zu reduzieren. Die Handhabung kleiner Volumina, zum Beispiel im Bereich von 0,1 µl
10 bis 1000 µl, ist in der Zellkultur, bei Arbeiten mit DNA, Proteinen oder der Peptidsynthese von großer Bedeutung. So werden zum Beispiel parallele Festphasensynthese, Aufreinigungen oder auch enzymatische Reaktionen häufig an Beads in Mikrotiterplatten durchgeführt.

Bei diesen Arbeiten müssen feste Substanzen in Form von Pulvern oder ähnlichem
15 Schüttzustand in Kleinstmengen portioniert und in geeignete Gefäße abgefüllt werden. Dabei ergibt sich das Problem, daß die verwendeten Feststoffe (z.B. Beads, Harze, Granulate) nur mit großer Ungenauigkeit oder unter hohem Arbeitsaufwand in kleinen Mengen eingewogen werden können. Dies geschieht meistens für jedes Well
einzelnen, somit kann nicht von einem parallelen Prozeß gesprochen werden.
20 Besonders bei Arbeiten mit Mikrotiterplatten ist das schnelle und nach Möglichkeit parallele Beladen der Reaktionsgefäße (Wells) wichtig.

Bisher wurde die Handhabung kleinster Mengen fester Stoffe dadurch ermöglicht, daß zunächst eine Suspension des zu portionierenden Materials hergestellt wird, die
25 anschließend mit handelsüblichen Pipetten in Mikrotiterplatten transferiert wurde. Ein weiterführender Ansatz, Harze als Suspension parallel mittels einer Spritze zu portionieren, beschreibt Lebl et al. (J. Comb. Chem, 7, 42-45, 2005).

Nachteil dieser Verfahren ist das Suspendieren, wobei zusätzlich darauf geachtet werden muß, daß die Verteilung in der Suspension über die Zeit der Portionierung
30 konstant bleibt. Außerdem kann es beim Pipettieren der Suspension leicht zur Verstopfung der Pipettenspitze durch Partikel kommen.

Ferner werden von verschiedenen Firmen, wie zum Beispiel Radleys Discovery Technologies, Essex, UK oder aappTec (advanced automated peptide protein technologies, Louisville, USA,) Vorrichtungen zum Portionieren von Harzen in Mikrotiterplatten oder Kartuschen angeboten. Wesentlicher Bestandteil dieser Vorrichtungen ist eine Platte mit Bohrungen, die das abzumessende Volumen vorgeben. Zwischen dieser Platte und der Mikrotiterplatte befindet sich eine Bodenplatte, welche die Bohrungen von unten abschließt. Bei dem Fabrikat von Radleys Discovery Technologies besitzt die Bodenplatte Öffnungen und wird zum Befüllen der Mikrotiterplatte so verschoben, daß der Inhalt der Bohrungen durch die Öffnungen der Bodenplatte in den Wells fällt. Bei dem Fabrikat von aappTec wird die Bodenplatte weggezogen, so daß der Inhalt der Bohrungen in Kartuschen fällt. Gemeinsam ist beiden Produkten das Befüllen der Bohrungen, das durch vorsichtiges Einstreichen des Harzes mittels eines Schiebers manuell erfolgt.

⇒ Diese beiden Vorrichtungen verfügen über keinen integrierten Vorratsbehälter und werden nach wie vor manuell befüllt, das heißt zum Umsetzen der Platten, Einstreichen der Beads, etc. ist manuelle Arbeit notwendig. Somit können damit Mikrotiterplatten nur aufwendig befüllt werden.

Deshalb sind diese Vorrichtungen für einen Einsatz in der vollautomatisierten Serienproduktion ungeeignet.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es eine Vorrichtung zum Befüllen von Mikrotiterplatten zur Verfügung zu stellen, die diese Nachteile des Standes der Technik nicht aufweist. Ferner soll die Vorrichtung ein genaues Portionieren ermöglichen, unabhängig von einzelnen Arbeitsschritten, wie zum Beispiel manuelles Einstreichen oder Arbeitsschritten die für eine Gleichverteilung von Partikeln in einer Suspension sorgen. Außerdem soll die Vorrichtung eine einfache Handhabung und somit ein schnelles Beladen von Gefäßen erlauben. In diesem Zusammenhang muß die Vorrichtung in einem Automations-Prozeß einsetzbar sein.

Demgemäß wurde eine neue Vorrichtung zum Befüllen von Gefäßen gefunden, aufweisend

- einen Rahmen mit Austrittsöffnungen,
- eine verschiebbare Portionierplatte mit Bohrungen
- und einer Bodenplatte mit Austrittsöffnungen.

Der Rahmen kann gleichzeitig als Vorratsbehälter dienen.

Die Bohrungen der Portionierplatte definieren das zu portionierende Volumen und werden demgemäß auch als Füll- oder Portioniervolumen bezeichnet.

- 5 Bei den zu befüllenden Gefäßen kann es sich erfindungsgemäß um z.B. Mikrotiterplatten jeglicher Größe, Eppendorf-Reaktionsgefäße oder Kartuschen handeln. Ferner sind planare Oberflächen (eventuell mit Vertiefungen oder Wells), wie Glaträger z.B. Objektträger, Membrane, Wafer oder ähnliche im Sinne der vorliegenden Erfindung als zu befüllende Gefäße zu verstehen.
- 10 In einer bevorzugten Ausführung ist der Gegenstand der Erfindung eine Vorrichtung zum parallelen Befüllen von Gefäßen.

In einer Ausführung befinden sich in der Portionierplatte pro Rahmen-Austrittsöffnungen und Bodenplatten-Austrittsöffnungen je zwei Bohrungen, die paarweise so angeordnet sind, daß falls sich eine Bohrung des Paares unterhalb der

15 Rahmen-Austrittsöffnungen befindet, sich die jeweils andere Bohrung des Paares oberhalb der Bodenplatten-Austrittsöffnungen befindet. Auf diese Weise ist es möglich, bei jeder Bewegung der Portionierplatte einen Füllvorgang durchzuführen. Es fallen dadurch keine Leerbewegungen mehr an.

Ist die Portionierplatte nicht nur entlang einer Achse, sondern auch entlang der

20 senkrechten zu dieser Achse verschiebbar, so können auf einer Portionierplatte mehrere Muster von Portioniervolumen angeordnet werden. Somit ist es möglich, zwischen verschiedenen Portioniervolumen zu wählen. Zunächst kommt dabei ein Muster von Portioniervolumen der Portionierplatte über den Austrittsöffnungen der Bodenplatte (in Fig.7 als Kreise angedeutet) zum Liegen. Wird die Portionierplatte

25 nun um einen kleinen Betrag entlang der senkrechten Achse verschoben, so kann auf ein anderes Lochmuster gewechselt werden. Auf diese Weise ist es möglich, ohne Umrüstung der Vorrichtung mehrere Füllvolumina durch eine Portionierplatte zu befüllen. Die Anordnung der unterschiedlichen Füllvolumina und somit die Muster sind je nach Anforderung frei wählbar.

30 In einer weiteren Ausführung handelt es sich um eine Vorrichtung bei welcher die Anzahl der Bohrungen gleich der Anzahl der Austrittsöffnungen des Rahmen und/oder der Bodenplatte ist und/oder bei welcher die Anzahl der Bohrungen gleich der Anzahl der Probenbehältnisse (Wells) auf der Mikrotiterplatte ist. Entgegen zur

vorher beschriebenen Vorrichtung, muß bei dieser Ausführung die Portionierplatte einmal hin und wieder zurückbewegt werden, um einen Abfüllvorgang durchzuführen.

Bevorzugt kann die erfindungsgemäße Vorrichtung größer oder kleiner ausgeführt sein, als das zu befüllende Gefäß. Somit kann entweder nur ein Teil des Gefäßes (z.B. ein Teil einer Multititerplatte) oder mehrere Gefäße (z.B. mehrere Multititerplatten) befüllt werden.

In einer bevorzugten Ausführung der vorliegenden Erfindung bestehen alle Teile der Vorrichtung aus Teflon (Polytetrafluorethylen, $[C_2F_4]_n$) oder einem anderen Material (z.B. Messing), das einen geringen Reibkoeffizient von 0,05 aufweist. Bevorzugt sind all jene Teile der erfindungsgemäßen Vorrichtung aus Materialien auszuführen, die bei der notwendigen Relativbewegung zweier Komponenten der Vorrichtung aufeinander abgleiten müssen und damit Effekten der Reibung und Abrasion unterliegen. Diese Materialien können einen Reibkoeffizienten von 0,02 bis 0,15; bevorzugt 0,03 bis 0,10; von 0,04 bis 0,08; besonders bevorzugt von 0,045 bis 0,06, bevorzugt 0,05.

In einer besonders bevorzugten Ausführung besteht mindestens die Portionierplatte aus Keramik. Bevorzugt sind aber all jene Teile der erfindungsgemäßen Vorrichtung aus Keramik auszuführen, die mit dem zu befüllenden Material in Kontakt kommen, da auf diese Weise der Effekt der durch statische Aufladung verursachten Anhaftung an die Komponenten der Vorrichtung verringert wird. Geeignet sind hierfür z.B. Aluminiumoxid, Zirkoniumoxid oder ähnliche Materialien. Außer Keramik können auch alle oberflächenderivatisierte Materialien verwendet werden, die ein Anhaften des zu befüllenden Materials, zum Beispiel des Schüttguts verringern. Dies kann z.B. durch Ausnutzung des Lotuseffekts oder ähnlichem geschehen.

Prinzipiell können für den Aufbau der erfindungsgemäßen Vorrichtung alle Materialien verwendet werden, die bei der Herstellung den mechanischen Anforderungen gerecht werden. Es ist jedoch darauf zu achten, daß es für reproduzierbare Ergebnisse zu keiner Wechselwirkung zwischen zu portionierendem Material und Vorrichtung kommen darf. Solche Wechselwirkungen können mechanischer, zum Beispiel durch Verzahnung der Partikel ineinander oder Reibung, oder elektrostatischer Natur sein, wie zum Beispiel elektrostatische Aufladung.

Ferner kann die erfindungsgemäße Vorrichtung eine Schubschiene enthalten, welche die Portionierplatte aufnimmt.

5 In einer bevorzugten Ausführung kann der Rahmen so konstruiert sein, daß er als Aufnehmer für die anderen Komponenten fungiert. Zunächst wird die Schubschiene in die dafür vorgesehene Aussparung des Rahmens eingelegt. Die Schubschiene bildet wiederum die Aufnahme für die Portionierplatte. Als letztes Teil wird die Bodenplatte auf die Portionierplatte aufgelegt und mit dem Rahmen verschraubt.

10 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum parallelen Befüllen von Gefäßen mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird in folgenden Schritten durchgeführt:

- (a) Befüllen des Vorratsbehälters mit Material
- (b) Verschieben der Portionierplatte, so daß sich die Bohrungen unterhalb der Austrittsöffnungen des Vorratsraumes befinden,
- 15 (c) Befüllen der Bohrungen,
- (d) Verschieben der Portionierplatte, so daß sich die Bohrungen über den Austrittsöffnungen der Bodenplatte befinden.

20 In einer bevorzugten Ausführung handelt es sich bei dem erfindungsgemäßen Verfahren um ein Verfahren zum parallelen Befüllen von Gefäßen oder Absetzen auf beziehungsweise Belegen von planaren Oberflächen (eventuell mit Wells) bei dem die erfindungsgemäße Vorrichtung eingesetzt wird. Dieser Vorgang kann auch vollautomatisch in Serie durchgeführt werden.

25 In einer Ausführung wird bei dem Verschieben der Portionierplatte ein Impuls ausgelöst, der eine Erschütterung verursacht, durch welche das Material aus dem Vorratsbehälter durch die Austrittsöffnungen in die Bohrungen und/oder aus den Bohrungen in die Mikrotiterplatte durch die Austrittsöffnungen der Bodenplatte fällt.

Im einfachsten Fall wird der Impuls durch das Verschieben der Portionierplatte hervorgerufen. Dies kann manuell oder in automatisierter Form mittels eines Motors durchgeführt werden.

In der manuellen Ausführung hält der Benutzer mit einer Hand den Rahmen (und somit auch die damit verschraubte Bodenplatte) fest und schiebt die Schubschiene (und die in ihr liegende Portionierplatte) hin und her.

Bevorzugt wird der Impuls durch einen Reißzahnmechanismus ausgelöst. Bei dem durch einen Reißzahnmechanismus verursachten Impuls im System greift ein in den Rahmen eingebrachter Zahn zunächst in eine Nut auf der Portionierplatte ein. Wenn nun die Portionierplatte relativ zum Rahmen bewegt wird, so springt der Zahn von dieser Nut in eine andere, parallel dazu verlaufende Nut um, wobei durch das Vorspannen und schlagartige Freigeben des Zahns ein kurzer Impuls erzeugt wird.

10 In einer anderen Ausführung wird ein sequentieller Impuls aufgeprägt. Dieser kann über Resonanzschwingung durch zum Beispiel akustische Schallgeber hervorgerufen werden oder über Resonanzschwingung mittels eines Piezo-Elements.

In einer alternativen Ausführung werden die Bohrungen der Portionierplatte mechanisch entleert. Dies kann durch Ausspülen der Bohrungen mittels Druckluft oder Flüssigkeit durchgeführt werden oder die Entleerung kann durch Einführen von
15 Stiften in die Bohrungen durchgeführt werden.

Selbstverständlich ist auch eine automatisierte Ausführung der vorliegenden Erfindung möglich, in der die einzelnen Schritte ohne manuelles Eingreifen vollzogen werden, durch Anschließen der erfindungsgemäßen Vorrichtung an eine
20 entsprechende Apparatur, die für den Fachmann leicht herstellbar ist.

In einer anderen Ausführung dieses automatisierten Verfahrens können mindestens 2 oder mehrere Anordnungen von Gefäßen (z. B. Mikrotiterplatten) zum Beispiel über ein Fließband unterhalb der erfindungsgemäßen Vorrichtungen positioniert und nacheinander befüllt werden.

25

Die erfindungsgemäße Vorrichtung wird zum Befüllen von Gefäßen mit fließfähigen Materialien verwendet. Unter dem Begriff "fließfähige Materialien" sind erfindungsgemäß sowohl Flüssigkeiten, Flüssigkeiten enthaltende Feststoffe, Dispersionen, als auch Feststoffe, zum Beispiel Schüttgut zu verstehen. Als
30 Schüttgut sind Pulver, Granulate, Kapseln, Harze, bevorzugt Beads, besonders bevorzugt Beads, wie sie bei der Festphasensynthese z.B. von Peptiden verwendet werden, zu verstehen.

Hierzu zählen Beads bzw. Harze oder auch feste Phasen, die auf Polystyrolbasis beruhen. Es können sämtliche, handelsüblichen Harze (resins) eingesetzt werden, die für die Peptidsynthese verwendet werden. Diese werden zum Beispiel im Katalog Novabiochem, Sigma oder von glschina, matrix-innovation.com oder Firma Rapp angeboten. Außerdem Harze für "solid phase organic synthesis" (ebenfalls Novabiochem), worunter auch die kombinatorische organische Synthese fällt. Generell gibt es Harze mit unterschiedlichen Oberflächenmodifikationen, also unterschiedlichen Linkermolekülen und unterschiedlichen abspaltbaren Linkermolekülen auf der Oberfläche.

Ferner sind erfindungsgemäß als Schüttgut auch Beads für die Oligonucleotidsynthese zu verstehen, wie z.B. Controlled Pore Glass (CPG) (von z.B. purebiotech oder Proligo oder glenresearch). Sogenannte Dynabeads (Fa. Dynal, Hamburg) die magnetisch und oberflächenmodifiziert sind und Streptavidin an der Oberfläche tragen, sowie jede andere handelsübliche Art von oberflächenmodifizierten und nicht modifizierten Beads die unter anderem für selektives Binden von Reagenzien verwendet werden. Letztere werden zum Beispiel in der Affinitätschromatographie bzw. Affinitätstrennung und -aufreinigung eingesetzt.

Als Schüttgut sind weiterhin Beads einzuordnen, die auf Silica-Partikeln basieren, oberflächenmodifiziert oder nicht modifiziert sind, (Modifizierungen: Z.B. C2-C18, Linker, Linker mit funktionellen Gruppen wie -NH₂, -OH, -COOH, Epoxy, Maleimide etc.). Generell zählen dazu alle Materialien welche für die Auftrennung und Chromatographie, einschließlich HPLC (Säulenmaterial z.B. der Firma Grom Analytik + HPLC GmbH, Fa. Merck, Fluka, Sigma etc.) erhältlich sind.

Als Schüttgut werden erfindungsgemäß auch alle Harze und/oder Beads bezeichnet, die als Kationenaustauscher, Anionenaustauscher dienen, sowie alle pulverförmigen Materialien zur Anreicherung, Auftrennung und auch "Filtern" (Größenausschlußchromatographie) von Stoffen.

Ferner gehören Kryobeads dazu, die zum Einfrieren von Zellen verwendet werden.

Des Weiteren sind die mit Zellen beschichteten Kryobeads, Zellen oder verkapselte, zum Beispiel in Beads verkapselte Zellen erfindungsgemäß als Schüttgut zu verstehen. Ferner gehören dazu auch Harze, an denen Nukleinsäuren, Oligonukleotide, Peptide, Proteine und ähnliche Biomoleküle angebunden sind.

Da die einzelnen Komponenten des Systems während der Benutzung immer miteinander verbunden sind und kein Umsetzen von Platten notwendig ist, können die einzelnen Komponenten mit handelsüblichen Dichtmassen beschichtet und so gegeneinander abgedichtet werden. Die Vorrichtung kann nun effizient zur

5 Mikrodosierung von Flüssigkeiten verwendet werden. Die Flüssigkeit kann im Vorratsbehälter vorgelagert werden und auf die gleiche Art und Weise portioniert werden.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung ermöglicht es, definierte Mengen von fließfähigen

10 Materialien parallel direkt in geeignete Gefäße, z.B. Wells von Multititerplatten zu portionieren. Im Gegensatz zu herkömmlichen, kommerziell verfügbaren Systemen sind hierbei weder Trägermedien (wie z.B. Flüssigkeiten oder Gasströmungen) noch weitere Handhabungsschritte (wie z.B. Umschichten der Platten, Einstreichen der Harze etc.) notwendig.

15 Mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung kann die Portionierung zum Beispiel von Beads in einem Schritt für alle Wells einer Mikrotiterplatte parallel durchgeführt werden. Die Portionierplatte entnimmt die Beads einem Vorratsbehälter, wiegt sie auf ein verlangtes Volumen ab und stellt sie dann für die Verteilung bereit. Dabei sind

20 die Vorrichtungen so konstruiert, daß sie durch ein vorgegebenes Volumen, die Menge an Beads abwägt. Die Beladung der Mikrotiterplatten erfolgt nicht für jedes Well sequentiell, sondern für zum Beispiel 384 Wells in einem parallelen Schritt.

In einer alternativen Ausführung kann die Vorrichtung dazu verwendet werden, lediglich einzelne Reihen zu befüllen, wodurch die gesamte Vorrichtung entweder

25 kleiner ausgeführt werden kann, oder aber der Vorratsbehälter mit einem zusätzlichen Modul ausgestattet wird. Dieses Modul deckt nur einzelne Reihen ab.

Im Folgenden wird die Erfindung unter Bezugnahme auf die Figuren näher erläutert:

30 **Beschreibung der Figuren:**

Fig. 1:

Die Vorrichtung besteht aus

- einem Rahmen 1, welcher als Vorratsbehälter für das verwendete Schüttgut dient
- einer verschiebbaren Portionierplatte 2, welche über definierte Bohrungen 3 die abzuwiegende Portioniermenge bestimmt
- und einer Bodenplatte 4, welche auf der eigentlichen Mikrotiterplatte aufsitzt (oder wenig über ihr angeordnet ist).

Fig. 2:

- 10 Ausführung der Vorrichtung wie in Fig. 1 mit dem Unterschied, daß sich in der Portionierplatte 2 neben den Bohrungen 3 weitere Bohrungen 3a befinden, die paarweise so angeordnet sind, daß falls sich Bohrungen 3 unterhalb der Austrittsöffnungen 1a befinden, sich die Bohrungen 3a oberhalb der Austrittsöffnungen 4a befinden und falls sich Bohrungen 3a unterhalb der
- 15 Austrittsöffnungen 1a befinden, so sind die Bohrungen 3 oberhalb der Austrittsöffnungen 4a. Auf diese Art kann während der Entleerung der Portioniervolumen bereits die Befüllung der Volumen für die nächste Portionierung erfolgen.

20 Fig. 3:

Komponenten des Portionierers:

oben – Rahmenplatte 1 mit Austrittöffnung 1a,

zweite Zeile – Schubschiene 1',

dritte Zeile – Bodenplatte mit Austrittöffnung 4a,

25 unten – Portionierplatte 2 mit Bohrungen 3

jeweils Ansicht von oben (linke Spalte) und unten (rechte Spalte)

Fig.: 4

Skizze der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit Reißzahnmechanismus.

- Der Portionierer besteht insgesamt aus vier Komponenten. Der Rahmenplatte 1, welche den Vorratsraum für die Beads zur Verfügung stellt (siehe hierzu auch Fig. 1-3), der Schubschiene, welche die für die Portionierung erforderliche Platte aufnimmt
- 30

(in der Skizze nicht gezeigt, siehe hierzu auch Fig. 3), der Portionierplatte 2, die keramische Komponente, welche die eigentliche Portionierung der Beads durchführt und der Bodenplatte 4, welche direkt auf der Mikrotiterplatte aufsitzt (oder wenig über ihr angeordnet ist) und sicherstellt, daß die Beads in die richtigen Wells gefüllt werden.

Die gleichmäßige Befüllung und Entleerung der Beads wird durch das Aufprägen eines Impulses (rote Pfeile, z.B. Reißzahn-Mechanismus) sichergestellt.

Fig. 5:

- 10 Vorversuch (Mikroskopische Aufnahme der Bohrung vor, während und nach der Befüllung)

Bohrungen 3 in der Portionierplatte 2 aus Keramik, Portionierbohrung 1000 µm Durchmesser somit Füllvolumen 100 µg

oben - Volumen vor der Befüllung,

- 15 mitte - Befüllung mit Beads,

unten - Entleerung nach Aufprägen eines Impulses.,

- 20 Fig. 6:

Mengenverteilung der Beads nach Beispiel 4 auf 25 Wells in quadratischer Anordnung.

Fig. 7:

- 25 Befüllen von Gefäßen mit unterschiedlichen Portioniervolumina in einer Portionierplatte. Die Portionierplatte umfaßt dabei zwei Muster mit je unterschiedlichen Bohrungen (siehe a), kleine und große Kreise). Diese sind im Zeilenmuster angeordnet. Die Portionierplatte wird so eingelegt, daß eines der beiden Muster während des Befüllvorgangs zur Entleerung der Füllvolumina über
30 den Austrittsöffnungen zu liegen kommt, das andere Muster jedoch permanent verdeckt und verschlossen bleibt (siehe b). Wird die Portionierplatte nun um einen

geringen Betrag in die XXX Richtung verschoben (hier als x bezeichnet), so kann auf ein anderes Lochmuster gewechselt werden. Anschließend kommt das andere Muster von Portionervolumen (kleine Kreise) der Portionierplatte während des Betriebs über den Austrittsöffnungen der Bodenplatte (als große Kreise angedeutet) zum Liegen. Nun ist das andere Muster permanent verschlossen (siehe c).

Im Folgenden wird die Erfindung unter Bezugnahme auf die Beispiele näher erläutert:

Beispiele:

10

1. Aufbau der erfindungsgemäßen Vorrichtung

Der Rahmen 1 ist so konstruiert, daß er als Aufnehmer für die anderen Komponenten fungiert. Zunächst wird die Schubschiene 1' in die dafür vorgesehene Aussparung des Rahmens eingelegt. Die Schubschiene 1' bildet wiederum die Aufnahme für die Portionierplatte 2. Als letztes Teil wird die Bodenplatte 4 auf die Portionierplatte 2 aufgelegt und mit dem Rahmen verschraubt. Der Benutzer hält nun mit einer Hand den Rahmen 1 (und somit auch die mit ihr verschraubte Bodenplatte 4) fest und schiebt die Schubschiene 1' (und die in ihr liegende Portionierplatte 2) hin und her.

Eine beispielhafte Ausführung der Komponenten wird in Fig. 3 beschrieben.

20 Eine beispielhafte Ausführung mit Reißzahnmechanismus wird in Fig. 4 beschrieben.

2. Voruntersuchung

Im vorliegenden Prototyp wurde eine parallele Befüllung von fünfmal fünf (25) Wells zur Demonstration der Prinzip-tauglichkeit angestrebt.

25 Der Füllgrad entspricht dabei dem Teiler aus Füllvolumen und tatsächlich durch Beads eingefülltem Volumen. Er entspricht bei Annahme einer kubisch dichtesten Packung exakt 74%. Dieser Wert wird aber in der Realität nicht erreicht werden können, da es für die Beads keinen Grund gibt, sich in dichtester Packung anzuordnen. Im oben skizzierten Versuch betrug der Füllgrad 19,25%.

30 3. Versuche zur Reproduzierbarkeit der Be- und Entleerungsvorganges

Das Hauptproblem dabei stellt die Anhaftung der Beads an die Oberfläche der Bohrung in Folge von elektrostatischer Wechselwirkung dar. Deshalb ist es wichtig, die Oberfläche der Bohrung entsprechend anzupassen.

3.a) Untersuchung mit dem Lichtmikroskop

- 5 Zunächst wurde untersucht, ob und wenn ja wie gut sich Beads in den Bohrungen anlagern und ob sie sich wieder entfernen lassen. Hierfür wurden Beads auf die Bohrungen aufgestreut, die Platte durch kurzes Antippen mit einem Impuls beaufschlagt und die Volumenfüllung im Anschluß im Lichtmikroskop untersucht. Die im Vorversuch verwendeten Bohrungen hatten einen Durchmesser von 1000 µm,
10 500 µm und 150 µm.

Die Versuchsreihe wurde mit einer Portionierplatte aus Keramik durchgeführt. In Fig. 5 ist das Füllvolumen mit 1000 µm Durchmesser gezeigt. Die Bohrungen wurden mit einem Laser gefertigt. Man kann deutlich sehen, daß für ein Füllvolumen in Keramik mit einem Durchmesser von 1000 µm eine genügend genaue und nahezu
15 vollständige Entleerung erreicht werden kann. Im folgenden System wurde als Portioniereinheit somit eine Keramikplatte mit Bohrungen des Durchmessers 1000 µm gewählt. Das Füllvolumen kann somit über die Höhe der Keramikplatte variiert werden.

- In einem Laborversuch wurde an einer 1000 µm-Bohrung in einem ZrO₂-Wafer die
20 Prinziptauglichkeit überprüft. Dabei wurde untersucht, ob die Beads über eine geeignete Bohrung portioniert und durch einen Impuls aus dieser Bohrung auch wieder entfernt werden können. Zunächst wurden Beads des Durchmessers 100 µm auf die Bohrung aufgestreut und im Lichtmikroskop die Befüllung untersucht. Im Anschluß wurde der Wafer angehoben und angetippt, um einen Impuls aufzuprägen.
25 Die Entleerung der Bohrung wurde im Lichtmikroskop überprüft und erfolgte quantitativ (siehe Fig. 5).

3.b) Reproduzierbarkeit der Befüllung bei Mikrotiterplatten

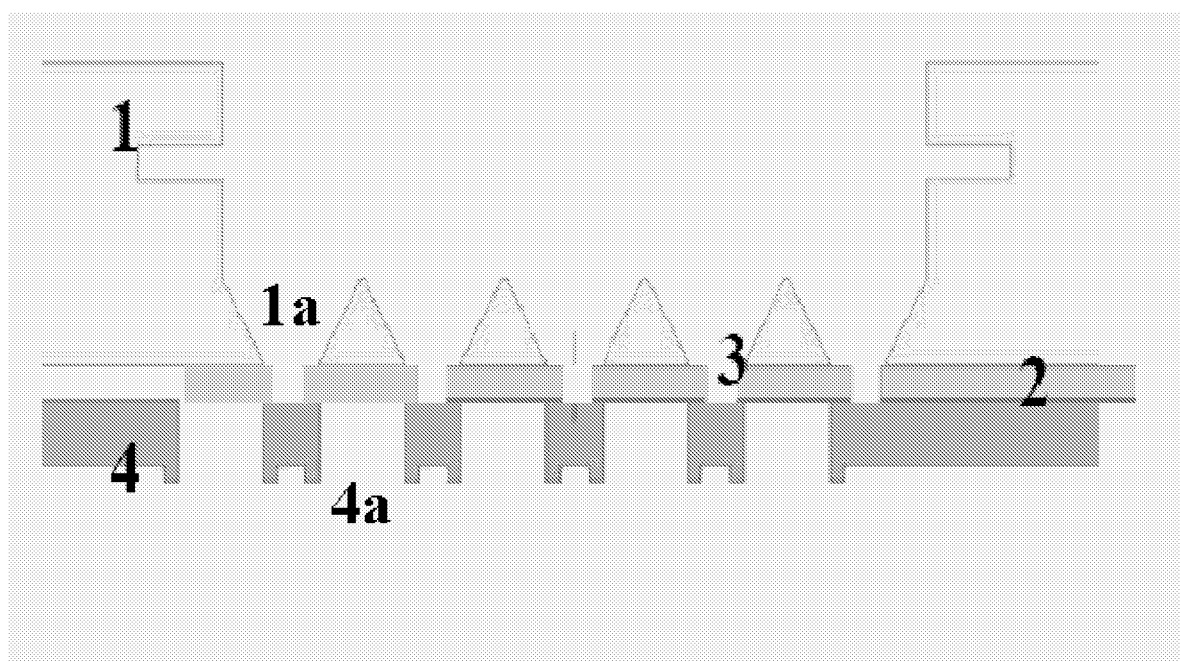
- Mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung wie in Fig. 1 und 3 gezeigt wurde eine
30 Testreihe zur Untersuchung der Tauglichkeit durchgeführt. Der Portionierer wurde mit Beads befüllt, auf eine Mikrotiterplatte aufgesetzt, die Schiebevorrichtung wurde manuell betätigt.

Um die Reproduzierbarkeit der Portionierung von Well zu Well zu untersuchen, wurde der Portionierer auf eine Mikrotiterplatte aufgesetzt und 5 mal 5 Wells (25) befüllt. Hierfür wurden Beads verwendet, die für die Festphasensynthese von Peptiden zum Einsatz kommen, und eine Fmoc-Schutzgruppe (9-Fluorenylmethoxycarbonyl) tragen. Da die Konzentration der abgespaltenen Fmoc-Gruppen durch Extinktion im UV-Spektrum nachgewiesen werden kann, konnte darüber die Menge an eingewogenen Beads bestimmt werden. Um eine ausreichende Menge an Fmoc-Gruppen nachweisen zu können, wurde der Portionierer 10 mal betätigt. Pro Betätigung sollten mit der eingesetzten Portionierplatte circa 0,1 mg Beads pro Well abgegeben werden, was bedeutet, daß nach 10 Betätigungen die Menge bei genau 1 mg pro Well liegen sollte. Wie Fig. 6 zeigt liegt der Mittelwert, der über die Abspaltung der Fmoc-Gruppe bestimmt wurde bei 0,97 mg pro Well, die Standardabweichung beträgt 0,13 mg.

Patentansprüche:

1. Vorrichtung zum Befüllen von Gefäßen welche
 - einen Rahmen (1) mit Austrittsöffnungen (1a),
 - eine verschiebbare Portionierplatte (2) mit Bohrungen (3)
 - und einer Bodenplatte (4) mit Austrittsöffnungen (4a) aufweist.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß der Rahmen (1) als Vorratsbehälter (1) dient.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß ein zusätzliches Modul innerhalb des Rahmens als Vorratsbehälter dient.
4. Vorrichtung nach Anspruch 1 bei der alle Teile aus Teflon (Polytetrafluorethylen, $[C_2F_4]_n$) oder einem anderen Material mit niedrigem Reibwert !!!ZAHLENWERT!!! (z.B. Messing, etc.) bestehen.
5. Vorrichtung nach Anspruch 1 bei der mindestens die Portionierplatte (2) aus Keramik besteht.
6. Vorrichtung nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet daß die Portionierplatte pro Austrittsöffnungen (1a) und/oder (4a) jeweils paarweise zwei Bohrungen (3) und (3a) aufweist.
7. Vorrichtung nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet daß die Portionierplatte pro Austrittsöffnungen (1a) und/oder (4a) jeweils mindestens paarweise zwei Bohrungen unterschiedlichen Durchmessers (3) und (3a) aufweist
8. Verfahren zum Befüllen von Gefäßen bei dem eine Vorrichtung nach Anspruch 1 eingesetzt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8 das in folgenden Schritten durchgeführt wird:

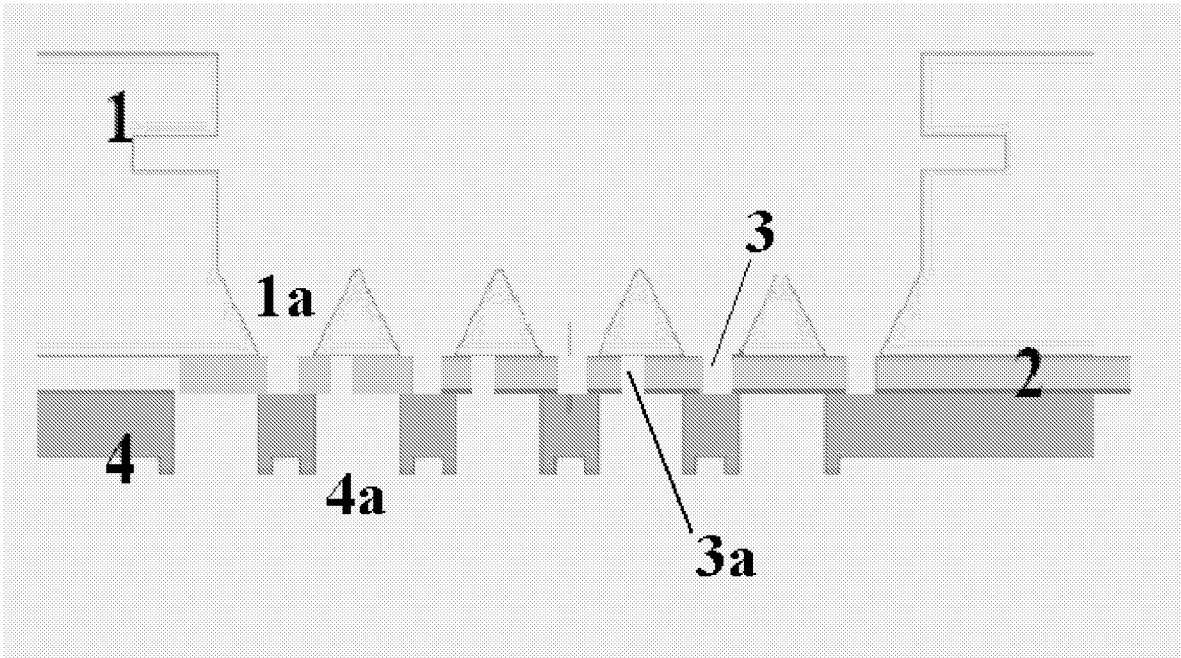
- (a) Befüllen des Vorratsraumes (1) mit Material
 - (b) Verschieben der Portionierplatte (2), so daß sich die Bohrungen (3) unterhalb den Austrittsöffnungen (1a) des Vorratsraumes (1) befinden,
 - (c) Befüllen der Bohrungen (3)
 - 5 (d) Verschieben der Portionierplatte (2), so daß sich die Bohrungen (3) über den Austrittsöffnungen (4a) der Bodenplatte befinden.
10. Verfahren nach Anspruch 9 bei dem das Verschieben der Portionierplatte (2) einen Impuls auslöst, der eine Erschütterung verursacht, durch welche das
- 10 Material aus dem Vorratsraumes (1) durch die Austrittsöffnungen (1a) in die Bohrungen (3) oder (3a) und/oder aus den Bohrungen (3) oder (3a) in die Mikrotiterplatte durch die Austrittsöffnungen (4a) fällt.
11. Verfahren nach Anspruch 10 bei dem der Impuls durch einen
- 15 Reißzahnmechanismus ausgelöst wird.
12. Verfahren nach Anspruch 10 bei dem ein sequentieller Impuls aufgeprägt wird.
13. Verfahren nach Anspruch 9 bei dem das die Bohrungen (3) und/oder (3a) mechanisch entleert werden.
14. Verfahren nach Anspruch 8 dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Gefäßeinheiten nacheinander befüllt werden, indem die jeweils folgende
- 25 Gefäßeinheit unterhalb der Vorrichtung nach Anspruch 1 positioniert wird. Dies kann manuell oder vollautomatisch erfolgen (Serienfertigung).
15. Verwendung der Vorrichtung nach Anspruch 1 zum Befüllen von Gefäßeinheiten mit fließfähigen Materialien.
- 30 16. Verwendung der Vorrichtung nach Anspruch 1 zum Portionieren von Flüssigkeiten



5 Fig. 1

10

15



5

Fig. 2

10

15

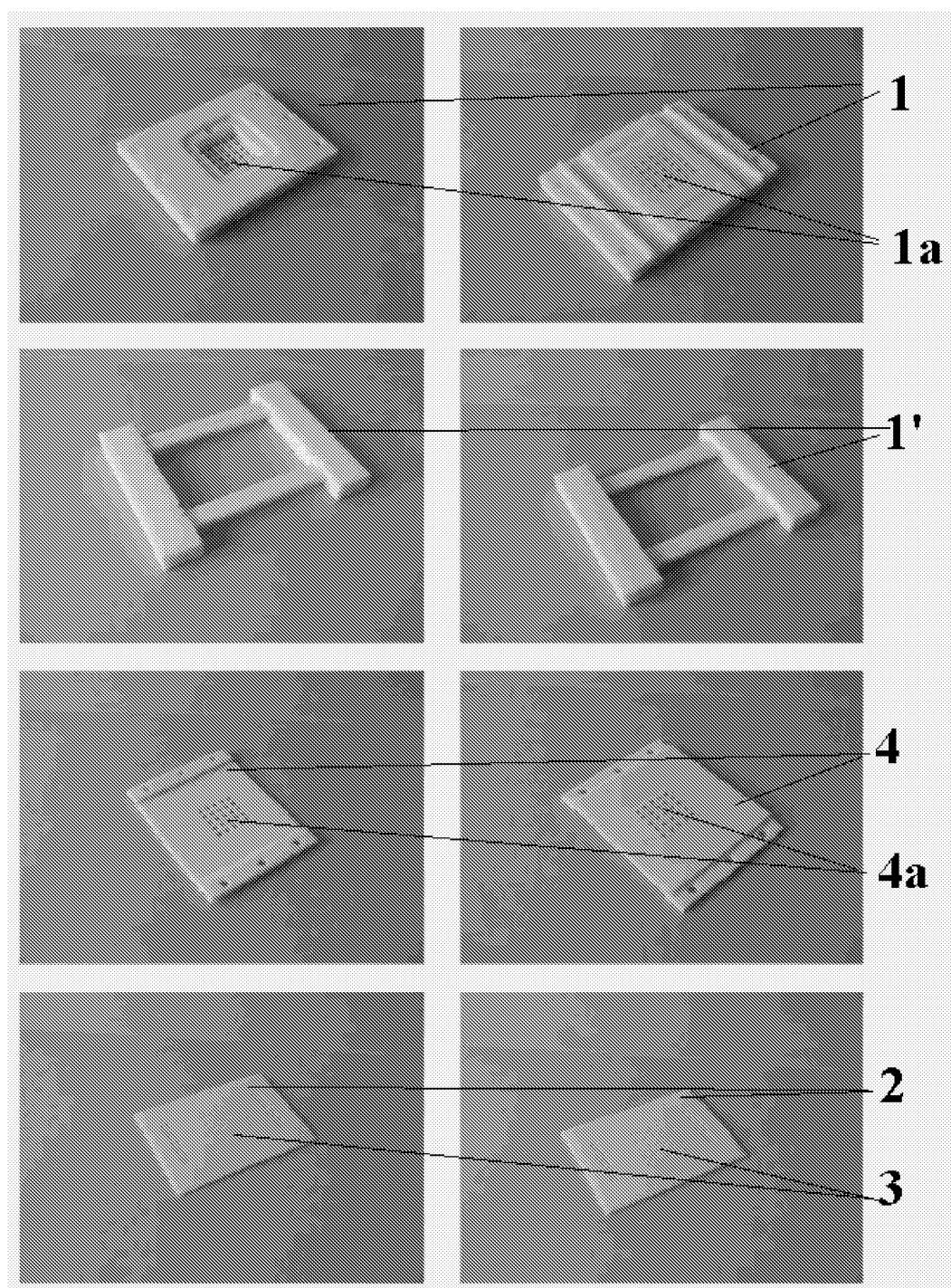


Fig. 3

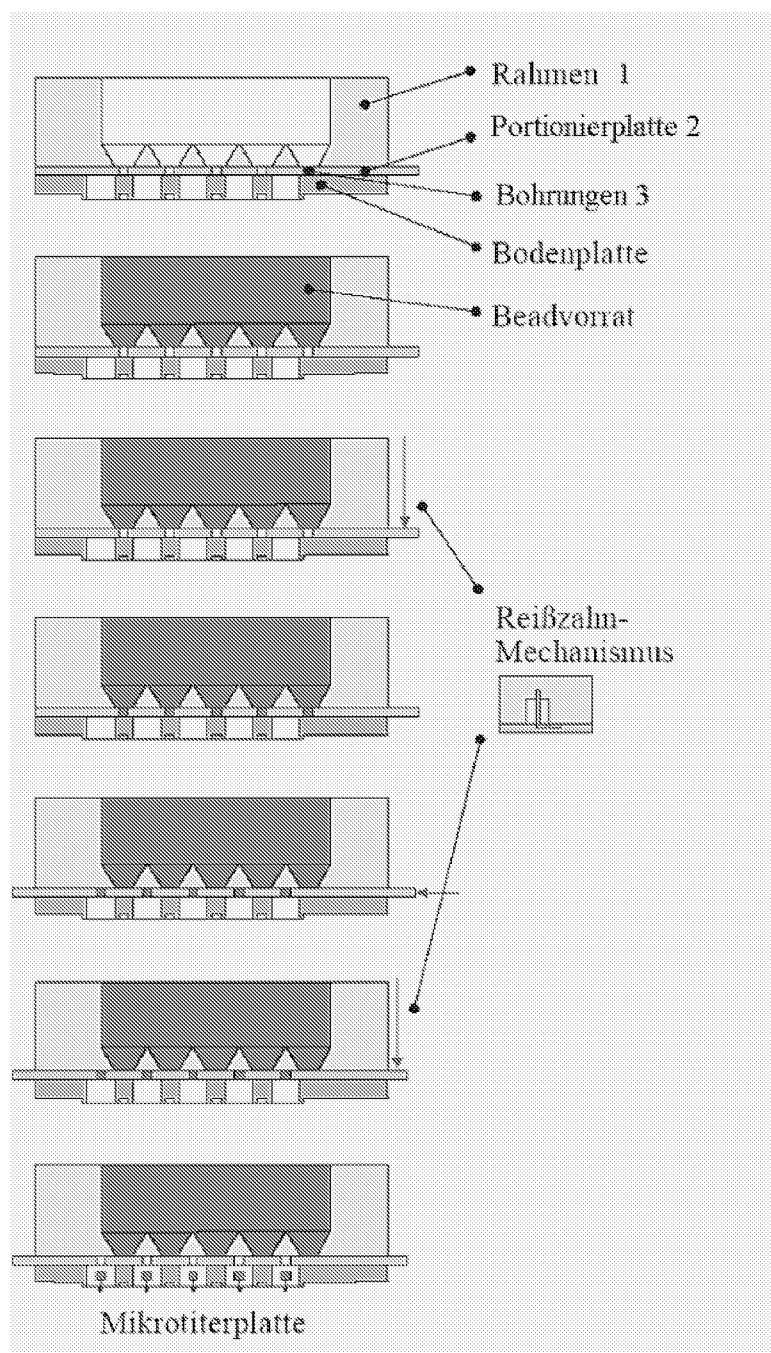


Fig. 4

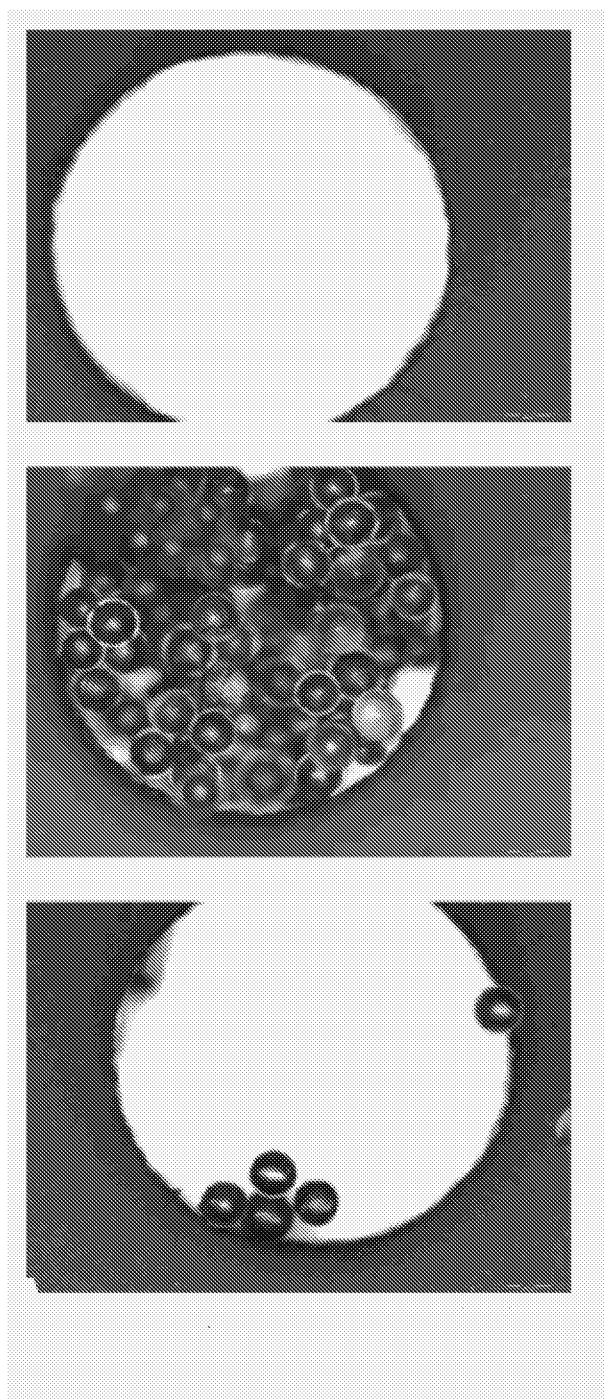


Fig. 5

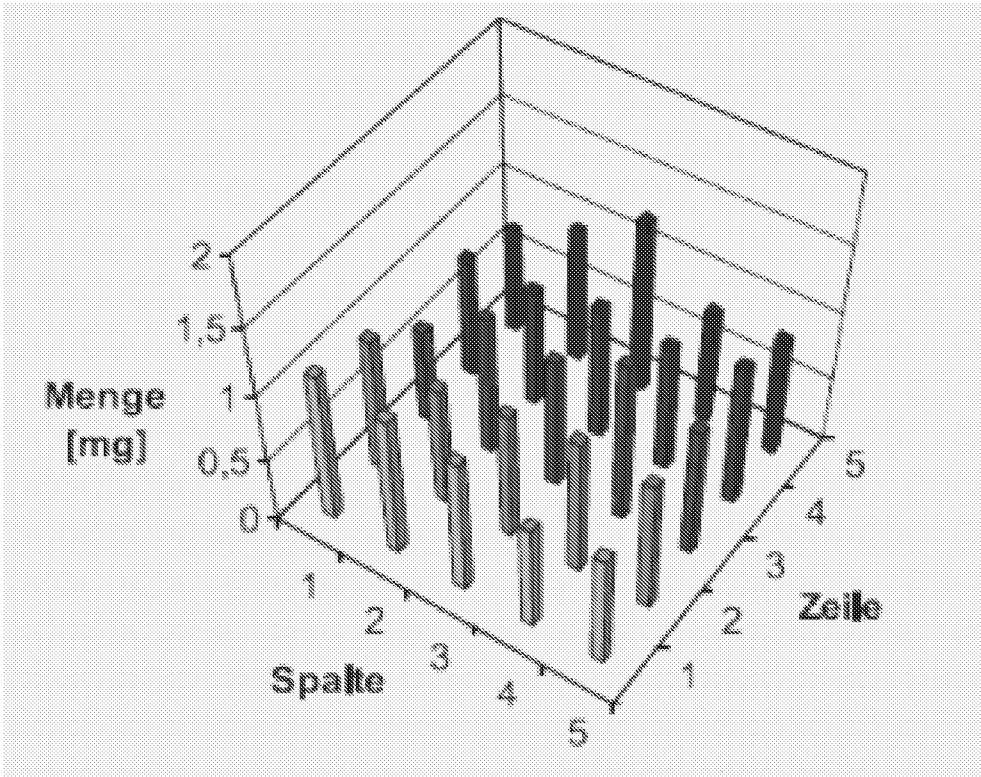


Fig. 6

5

10

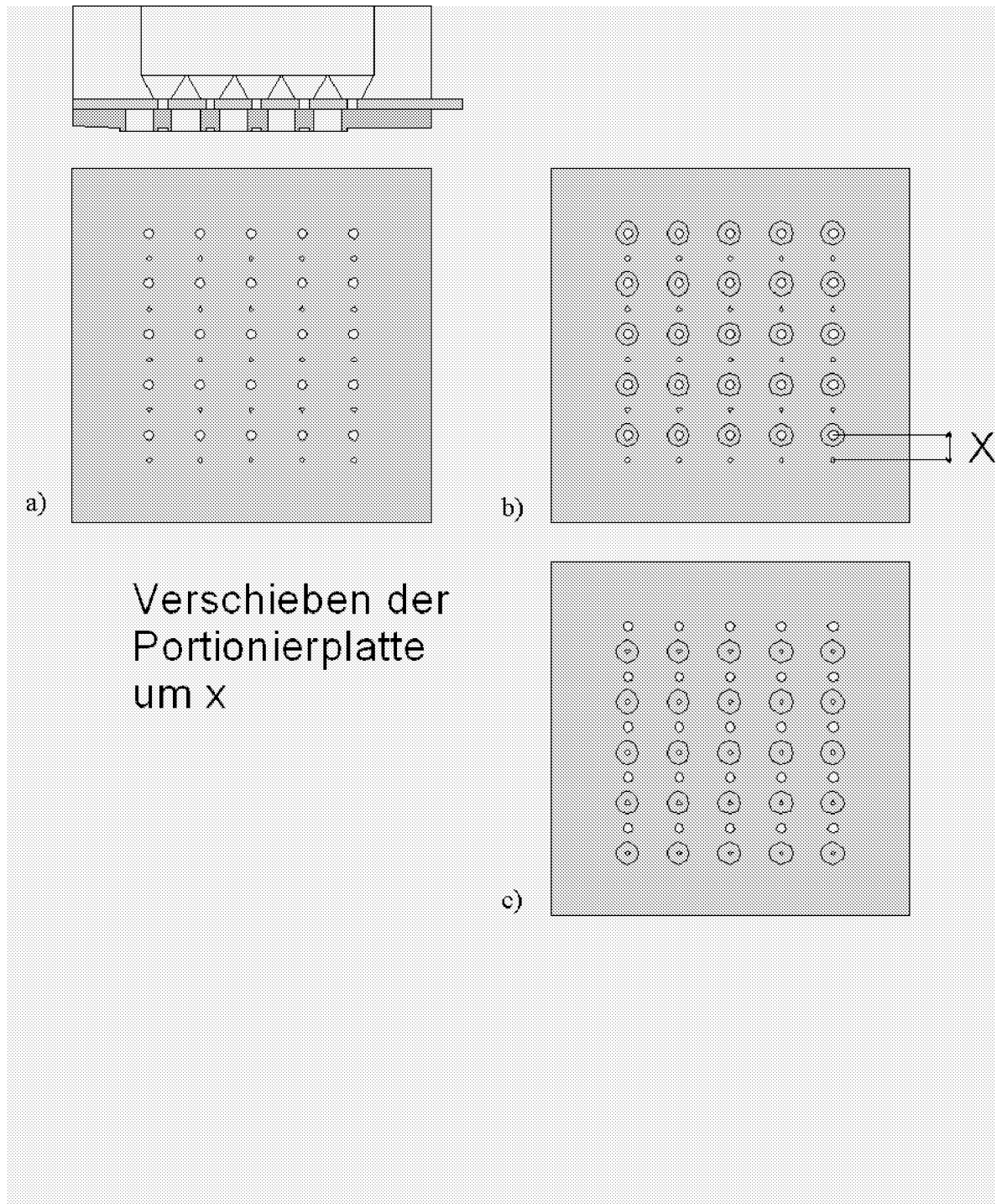


Fig. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/064972

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. B01L11/00 G01F11/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01F B01J B01L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 651 401 A (CADOS DIMITRI [US]) 29 July 1997 (1997-07-29) the whole document	1-16
X	US 4 101 284 A (DIFIGLIO JOSEPH J ET AL) 18 July 1978 (1978-07-18) the whole document	1-16
X	WO 99/59722 A (SELECTIDE CORP [US]) 25 November 1999 (1999-11-25) abstract page 35, line 15 - page 37, line 16 page 4, line 21 - page 6, line 16 figure 25	1-16
X	US 4 974 548 A (LYNCH DELMAR J [US]) 4 December 1990 (1990-12-04) the whole document	1-16
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

17 October 2006

Date of mailing of the International search report

26/10/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sinn, Cornelia

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/064972

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 1 605 832 A (NATHAN K. GARHART) 2 November 1926 (1926-11-02) the whole document -----	1-16
X	US 4 733 803 A (SISSON CHARLES W [US] ET AL) 29 March 1988 (1988-03-29) the whole document -----	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2006/064972

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5651401	A	29-07-1997	NONE	
US 4101284	A	18-07-1978	NONE	
WO 9959722	A	25-11-1999	EP 1085943 A1	28-03-2001
			JP 2002515330 T	28-05-2002
			US 2003068644 A1	10-04-2003
			US 6541211 B1	01-04-2003
			US 2004058391 A1	25-03-2004
US 4974548	A	04-12-1990	NONE	
US 1605832	A	02-11-1926	NONE	
US 4733803	A	29-03-1988	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/064972

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. B01L11/00 G01F11/40

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
G01F B01J B01L

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 651 401 A (CADOS DIMITRI [US]) 29. Juli 1997 (1997-07-29) das ganze Dokument	1-16
X	US 4 101 284 A (DIFIGLIO JOSEPH J ET AL) 18. Juli 1978 (1978-07-18) das ganze Dokument	1-16
X	WO 99/59722 A (SELECTIDE CORP [US]) 25. November 1999 (1999-11-25) Zusammenfassung Seite 35, Zeile 15 - Seite 37, Zeile 16 Seite 4, Zeile 21 - Seite 6, Zeile 16 Abbildung 25	1-16
X	US 4 974 548 A (LYNCH DELMAR J [US]) 4. Dezember 1990 (1990-12-04) das ganze Dokument	1-16

-/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
 - *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
 - *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
 - *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
 - *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. Oktober 2006

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

26/10/2006

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Sinn, Cornelia

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/064972

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 1 605 832 A (NATHAN K. GARHART) 2. November 1926 (1926-11-02) das ganze Dokument -----	1-16
X	US 4 733 803 A (SISSON CHARLES W [US] ET AL) 29. März 1988 (1988-03-29) das ganze Dokument -----	1-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/064972

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5651401	A	29-07-1997	KEINE		
US 4101284	A	18-07-1978	KEINE		
WO 9959722	A	25-11-1999	EP	1085943 A1	28-03-2001
			JP	2002515330 T	28-05-2002
			US	2003068644 A1	10-04-2003
			US	6541211 B1	01-04-2003
			US	2004058391 A1	25-03-2004
US 4974548	A	04-12-1990	KEINE		
US 1605832	A	02-11-1926	KEINE		
US 4733803	A	29-03-1988	KEINE		