

(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
17. Februar 2005 (17.02.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/014852 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68**,
B01J 19/00, B05D 1/28

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/007473

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. Juli 2004 (08.07.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 32 848.3 18. Juli 2003 (18.07.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **SUSTECH GMBH & CO. KG** [DE/DE]; Petersen-
strasse 20, 64287 Darmstadt (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **RONG, Haitao**

[DE/DE]; Erbacher Strasse 72, 64287 Darmstadt (DE).
LEVI, Stefano [IT/DE]; Havelstrasse 20, 64287 Darm-
stadt (DE). **GROLL, Jürgen** [DE/DE]; Hinter den Gärten
35, 89168 Niederstotzingen (DE). **MÖLLER, Martin**
[DE/DE]; Pippinstrasse 2b, 52070 Aachen (DE).

(74) **Anwalt: KANN, Wolfgang**; Henkel Kommanditge-
sellschaft auf Aktien, Patente (VTP), 40191 Düsseldorf
(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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** MICROARRAYS OF IMMOBILIZED BIOMOLECULES, PRODUCTION THEREOF, AND USE THEREOF

(54) **Bezeichnung:** MIKROARRAYS IMMOBILISierter BIOMOLEKÜLE, DEREN HERSTELLUNG UND DEREN VER-
WENDUNG

(57) **Abstract:** The invention relates to microarrays of immobilized biomolecules comprising at least two spatially separated sec-
tors B that are located on a surface. Each sector is provided with several spatially separated points P at which the biomolecules
are immobilized. On average, the dimension of said sections corresponds to a distance between the boundary line of a respective
sector B and the centroid thereof, said distance ranging from 10 µm to 250 µm. The invention also relates to a method for produc-
ing micro-bioarrays, according to which biomolecules are applied at a local resolution to an adequately structured matrix surface
by means of spotting techniques such that each spot covers several of the raised zones of the matrix surface, e.g. column-shaped
elevations, whereupon the matrix surface is contacted with the surface on which the biomolecules are to be immobilized and surplus
biomolecules, i.e. biomolecules that are not immobilized, are removed if necessary (variant 1); alternatively, a pattern of compounds
V that cause biomolecules to immobilize on a surface and are also called coupling means V in the description, is applied to the
surface by means of µCP technology, said pattern corresponding to the array, whereby an array is obtained which is provided with
a plurality of spatially separated points P that are occupied by compound V, whereupon a solution of said biomolecules is spotted
onto the prepared surface such that one spot covers several points P to which compound V is bound, and surplus biomolecules are
then removed (variant 2).

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft Mikroarrays immobilisierter Biomoleküle, die wenigstens zwei räum-
lich voneinander getrennte Flächenbereiche B aufweisen, die auf einer Oberfläche angeordnet sind, wobei jeder Flächenbereich meh-
rere, räumlich voneinander getrennte Plätze P aufweist, auf denen die Biomoleküle immobilisiert sind und wobei die Ausdehnung
der Bereiche im Mittel einem Abstand der Begrenzungslinie eines jeweiligen Bereichs B zu seinem Flächenmittelpunkt im Bereich
von 10 µm bis 250 µm entspricht. Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung von Mikroarrays bei dem man entwe-
der mittels Spotting-Techniken Biomoleküle ortsaufgelöst auf eine geeignet strukturierte Stempelfläche aufbringt, so dass jeder Spot
mehrere der erhabenen Bereiche der Stempelfläche, beispielsweise säulenförmige Erhebungen, abdeckt und dann die Stempelfläche
mit der Oberfläche, auf der die Biomoleküle immobilisiert werden sollen, in Kontakt bringt und gegebenenfalls überschüssige, d. h.
nicht immobilisierte Biomoleküle entfernt (Variante 1); oder mittels µCP-Technik ein dem Array entsprechendes Muster an Verbin-
dungen V, welche eine Immobilisierung von Biomolekülen auf einer Oberfläche bewirken, im Folgenden auch als Kupplungsmittel
V bezeichnet, auf die Oberfläche aufbringt, wobei man einen Array erhält, der eine Vielzahl räumlich getrennter Plätze P aufweist,
die mit der Verbindung V belegt sind, anschließend eine Lösung der Biomoleküle auf die so bereitgestellte Oberfläche spottet, so
dass ein Spot mehrere Plätze P, auf denen die Verbindung V gebunden ist, abdeckt und anschließend überschüssige Biomoleküle
entfernt (Variante 2).

WO 2005/014852 A1



(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, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, 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).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

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.

Mikroarrays immobilisierter Biomoleküle, deren Herstellung und deren Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft Mikroarrays immobilisierter Biomoleküle, deren Herstellung und deren Verwendung. Ebenfalls betrifft die vorliegende Erfindung Vorrichtungen auf Basis derartiger Mikroarrays, insbesondere Chips und Dip Sticks.

Mit der zunehmenden praktischen Bedeutung der molekularbiologischen Analytik stoßen die mit einem sehr hohen Arbeits- und Kostenaufwand verknüpften, oft Tage oder Wochen dauernden etablierten Standardtechniken an Grenzen. Neue Testformate wie Biochips sollen eine enorme Zeit und Kostenersparnis ermöglichen. Da mit dieser Technik sehr viele verschiedene auf engstem Raum immobilisierte Substanzen gleichzeitig mit einer einzigen zu analysierenden Probe in Kontakt gebracht werden können, ist der pro Messung aus einem Chip gewonnene Informationsgehalt sehr hoch.

Eine Übersicht über die bekanntesten Biochip-Systeme findet man beispielsweise in Bowtell D. D. L. Nature Genetics Supplement **21** (1999) 25-32; Lockhart et al, *Nature Biotechnology* 14 (1996) 1675. Eine Übersicht über Protein- und Antikörper-Arrays gibt Cahill, D. J. *Immunol. Methods*, 250 (2001) 81-91.

Ein typisches Beispiel eines sogenannten „high density array“ ist der GeneChip von Affymetrix, ein Oligonukleotidarray mit typischerweise über 400 verschiedenen Capture Probes, die Base für Base auf dem Glaswafer aufgebaut werden. Die Chips zeichnen sich durch eine sehr hohe Informationsdichte von bis zu 40.000 Oligonukleotiden/cm² aus. Die einzelnen "Spots" sind rechteckig.

"Low Density Arrays" sind beispielsweise von Genometrix erhältlich. Maximal 250 Spots von 50 µm Durchmesser werden mit einem Kapillar-Pin-Bündel aus bis zu 1000 Einzelkapillaren in die Kavitäten einer 96-er Mikrotiterplatte gedruckt. Zur Ankopplung an die Oberfläche werden konventionelle Techniken verwendet, denen insbesondere Aminosilanisierungen und NHS-aktivierte Haptene, epoxyaktivierte Oberflächen, Carbodiimidkopplungen an Carboxylgruppen sowie Biotin/Streptavidin-Bindungen zugrunde liegen

(vgl. WO 97/18226; EP 0910570 A1; WO 98/29736).

Zur Herstellung von Mikrobioarrays stehen derzeit mehrere Methoden zur Verfügung. Die am häufigsten und auch für die Massenproduktion von Biochips eingesetzten Methoden sind Lithographietechniken und Spotting-Techniken (siehe Cheng et al. (Editor), Biochip technology, Harvard Academic Publishers 2001). Bei den Lithographie-Techniken handelt es sich um lithographische Verfahren, die der Halbleiter-Technik entlehnt sind, und mit dem sich Moleküle ortslokalisiert auf eine Oberfläche aufbringen lassen. So beschreibt beispielsweise die US 5,599,695 ein Verfahren zur Herstellung von Oligonukleotid-Arrays, bei dem man eine Oberfläche, die mit einer Molekülschicht aus geschützten Verbindungen, welche die Anbindung von Oligonukleotiden erlauben, belegt ist, mit einer Maske abdeckt, die durch die Maske nicht abgedeckten Stellen entschützt und die so behandelte Oberfläche mit Oligonukleotiden in Kontakt bringt. Die Oligonukleotide werden dabei an die entschützten Stellen der Oberfläche gebunden und bilden so eine der Maske entsprechende Anordnung von mit Oligonukleotiden belegten Bereichen/Plätzen. Derartige Techniken sind insbesondere für die Herstellung von Oligonukleotid-Arrays mit sehr hoher Spot-Dichte (High Density Chips) geeignet und erlauben die Auflösung von einigen 100 nm. Allerdings sind derartige lithographische Prozesse in der Regel nicht kompatibel mit biologisch aktiven Molekülen wie Proteinen und Zellen. Weiterhin sind die apparativen Kosten für derartige Verfahren sehr hoch.

Bei den Spotting-Techniken handelt es sich um Druckverfahren. Die Biomoleküle werden als Lösungen mit einem Drucksystem in Form eines regelmäßigen Punktmusters auf eine Oberfläche aufgebracht. Kernstück des Drucksystems ist ein Druckkopf, der entweder eine Serie von Nadeln aufweist oder ein Mikrodosierkopf ist. Letzterer erlaubt das parallele Drucken von verschiedenen Lösungen der Biomoleküle. Beim Drucken mit einem Mikrodosierkopf können nämlich verschiedene Flüssigkeiten in die Reservoirs gefüllt werden, die mit dem Mikrodosierkopf verbunden sind. Man kann nacheinander mehrere 100 bis 1000 Druckvorgänge ohne Wiederbefüllung ausführen und so eine entsprechende Anzahl von Spots auf eine Oberfläche erzeugen. Mit den bislang üblichen Spotting-Techniken gelingt es jedoch nicht, Spots mit einem Durchmesser unterhalb 100 µm zu erzeugen. Damit ist diese Technik nicht geeignet, sogenannte High-Density Chips herzustellen, sondern lediglich Low- and Medium-Density Chips. Zwar wurden verschiedentlich Weiterentwicklungen der Spotting-Technik beschrieben, die es ermöglichen, Lösungen von Biomolekülen als Spots mit einer Auflösung im Bereich < 1 µm auf eine Oberfläche aufzubringen. In diesem Zusammenhang sind die von Boland et al. (222nd ACS National

Meeting 2001, S. 26-30) entwickelte Methode, die Nanopipetten-Methode (Bruckbauer et al. J. Am. Chem. Soc., 2002, 124, 8810), die Dip-Pen-Nanolithographie (DPN, Mirkin et al., Science 1999, 283, S. 661 und Science 1999, 286, S. 523) zu nennen. Diese Technologien sind allerdings sehr zeitaufwendig und ebenfalls mit hohen apparativen Kosten verbunden.

In jüngerer Zeit wurde verschiedentlich eine Stempeltechnik, das sogenannte Mikrokontakt-Drucken (μ CP) zur Herstellung von Arrays aus Biomolekülen auf Oberflächen angewendet (siehe Martin et al., Langmuir 1998, 14, S. 3971, Bernard et al., Langmuir 1998, 14, S. 2225, Chieng et al., Sensors and Actuators 2002, B 83, S. 22, Tan et al., Langmuir 2002, 18, S. 519, Inerowicz et al., Langmuir 2002, 18, S. 5263 und WO01/67104). Mit der μ CP-Technik, die ursprünglich zu anderen Zwecken entwickelt wurde, können die zu immobilisierenden Biomoleküle ortslokalisiert, d. h. in definierten Bereichen, auf eine Oberfläche aufgebracht werden. Hierbei geht man in der Regel so vor, dass man zunächst die Stempelfläche mit eine Lösung des zu immobilisierenden Biomoleküls in Kontakt bringt, den Stempel gegebenenfalls trocknet und anschließend die Stempelfläche mit der zu strukturierenden Oberfläche in Kontakt bringt. Hierbei wird das Biomolekül in denjenigen Bereichen, in denen die Stempelfläche mit der Oberfläche in Kontakt ist, auf die Oberfläche transferiert. Oberflächenbereiche, die nicht mit der Stempelfläche in Kontakt sind, bleiben hingegen unverändert. Auf diese Weise erhält man definierte Bereich auf der Oberfläche, die mit Biomolekülen belegt sind und so ein Abbild des Stempels darstellen. Mit der μ CP-Technik lassen sich Strukturen mit einer Auflösung bis hin zu etwa 100 nm herstellen. Im Unterschied zu der Spotting-Technik, die es erlaubt, auf einer Oberfläche mehrere Bereiche gleichzeitig aufzubringen, die mit verschiedenen Biomolekülen belegt sind, können mit der μ CP-Technik lediglich identische Bereiche erzeugt werden. Für die Herstellung von Biochips werden jedoch in der Regel Arrays benötigt, die mehrere Bereiche aufweisen, welche hinsichtlich der Art und/oder der Belegungsdichte der Biomoleküle voneinander verschieden sind.

Inerowicz et al. (Langmuir 2002, 18, S. 5263) beschreiben eine μ CP-Technik, bei der man mittels eines Polydimethylsiloxan-Stempels, der streifenförmige Erhebungen aufweist, zunächst streifenförmige Protein-Bereiche auf eine Oberfläche aufbringt. In einem zweiten Stempelvorgang wird dann ein Stempel mit gleicher Struktur mit einer Lösung eines zweiten Proteins benetzt und um 90° gedreht auf die bereits mit dem ersten Protein beschichtete Oberfläche aufgedrückt. So erhält man eine Oberfläche mit zwei unterschiedlichen, orthogonal angeordneten Proteinstreifen. Ein drittes Protein kann auf die noch nicht

von den ersten beiden Proteinen belegte Oberfläche aufgebracht werden, indem man die Oberfläche mit einer Lösung des dritten Proteins spült. Auf diese Weise können jedoch nur drei unterschiedliche Biomoleküle auf die Oberfläche aufgebracht werden. Außerdem ist eine Überlappung zwischen unterschiedlichen Biomolekülen naturgemäß nicht vermeidbar. Daher weisen derartige Arrays nur eine geringe Trennschärfe auf.

Chieng et al. (Sensor and Actuators 2002, B 83, S. 22-29) beschreiben ein Verfahren zur Herstellung von Proteinarrays, bei dem man zunächst eine Proteinlösung in sogenannte Mikro-Wells einfügt, anschließend mit einem Stempel die Proteinlösung aus diesen Mikro-Wells aufnimmt und auf eine geeignete Oberfläche aufdruckt. Auf diese Weise lassen sich Protein-Arrays herstellen, die mehrere Bereiche aufweisen, welche sich in der Art der Proteinbelegung unterscheiden. Mit den dort beschriebenen Maßnahmen lassen sich jedoch nur vergleichsweise große Bereiche (Kantenlänge $> 500 \mu\text{m}$) herstellen. Ein ähnliches Verfahren beschreibt Renault et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2002, 41, 2320. Hierbei wird eine Maske mit einer Vielzahl von durchgängigen Löchern auf eine Stempelfläche gelegt, wobei in die Löcher Lösungen unterschiedlicher Antigene gefüllt werden. Hierdurch werden die Antigene auf die Stempeloberfläche aufgebracht. Anschließend wird die Stempelfläche mit einer Lösung von Antikörpern in Kontakt gebracht und anschließend auf eine geeignete Oberfläche gedruckt. Auf diese Weise können ebenfalls Protein-Arrays hergestellt werden, die bezüglich ihrer Proteine mehrere verschiedene Bereiche aufweisen. Mit beiden Verfahren lassen sich jedoch nur großflächige Bereiche herstellen. Beide Verfahren sind von ihrer Durchführung äußerst kompliziert und haben den Nachteil einer geringen Trennschärfe. Diese ist auf Kapillarkräfte der Proteinflüssigkeiten zurückzuführen.

Die WO 02/48676 beschreibt mehrschichtige Mikroarrays zur Herstellung von Bioarrays, die eine auf einer Oberfläche angeordnete erste Membran mit sehr feinen durchgängigen Löchern und eine darüber angeordnete zweite Membran mit vergleichsweise großen Löchern umfasst. In die großen Löcher werden Lösungen von Biomolekülen eingefüllt und dringen durch die feinen Löcher auf die Oberfläche. Nach Entfernen der unteren Membran erhält man somit ein Muster immobilisierter Biomoleküle auf der Oberfläche. Auf diese Weise können jedoch nur Bioarrays mit sehr großflächigen Bereichen unterschiedlicher Biomoleküle erhalten werden. Zudem müssen diese Bereiche vergleichsweise große Abstände zueinander aufweisen, um eine ausreichende Auflösung zu erzielen, da Kapillarkräfte ein Verschmieren der Biomoleküle über die Bereichsgrenzen hinaus bewirken. Mit den drei letztgenannten Verfahren lassen sich nur solche Biochips herstellen, die eine

vergleichsweise geringe Anzahl an Bereichen mit unterschiedlichen Biomolekülen aufweisen. Zudem sind diese Verfahren sehr aufwendig in ihrer Durchführung.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Arrays immobilisierter Biomoleküle bereitzustellen, die einerseits eine möglichst große Anzahl von Bereichen aufweisen, die mit unterschiedlichen Biomolekülen belegt sein können und die eine erhöhte Auflösung bezüglich der unterschiedlichen Biomoleküle aufweisen. Zudem sollten diese Arrays einfach herstellbar sein, ohne dass es des Einsatzes kostenintensiver Techniken bedarf, wie sie für hochauflösende Spotting-Techniken erforderlich sind.

Diese Aufgabe wird durch Mikroarrays immobilisierter Biomoleküle, im Folgenden auch Mikrobioarrays genannt, gelöst, die wenigstens zwei, vorzugsweise wenigstens zehn, insbesondere wenigstens fünfzig und speziell wenigstens hundert räumlich voneinander getrennte Flächenbereiche B aufweisen, die auf einer Oberfläche angeordnet sind, wobei jeder Flächenbereich mehrere, vorzugsweise im Mittel wenigstens zehn, insbesondere wenigstens hundert räumlich voneinander getrennte Plätze P aufweist, auf denen die Biomoleküle immobilisiert sind und wobei die Ausdehnung der Bereiche im Mittel einem Abstand der Begrenzungslinie eines jeweiligen Bereichs B zu seinem Flächenmittelpunkt im Bereich von 10 μm bis 250 μm insbesondere 25 μm bis 200 μm entspricht. Derartige Mikrobioarrays sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Diese Mikrobioarrays können überraschenderweise durch eine bislang nicht bekannte und einfach durchzuführende Kombination konventioneller Spotting-Techniken mit der μCP -Technik (siehe den einleitend zitierten Stand der Technik) hergestellt werden, wobei man entweder

- mittels Spotting-Techniken Biomoleküle orts aufgelöst auf eine geeignet strukturierte Stempelfläche aufbringt, so dass jeder Spot mehrere der erhabenen Bereiche der Stempelfläche, beispielsweise säulenförmige Erhebungen, abdeckt und dann die Stempelfläche mit der Oberfläche, auf der die Biomoleküle immobilisiert werden sollen, in Kontakt bringt und gegebenenfalls überschüssige, d. h. nicht immobilisierte Biomoleküle entfernt (Variante 1); oder
- mittels μCP -Technik ein dem Array entsprechendes Muster an Verbindungen V, welche eine Immobilisierung von Biomolekülen auf einer Oberfläche bewirken, im Folgenden auch als Kupplungsmittel V bezeichnet, auf die Oberfläche aufbringt, wobei man einen Array erhält, der eine Vielzahl räumlich getrennter Plätze P aufweist, die mit der Verbindung V belegt sind, anschließend eine Lösung der Biomoleküle aufbringt, die mit der Verbindung V reagiert, um die Biomoleküle auf den Plätzen P zu immobilisieren.

leküle auf die so bereitgestellte Oberfläche spottet, so dass jeder Spot mehrere Plätze P abdeckt und anschließend überschüssige Biomoleküle entfernt (Variante 2).

Beide Verfahrensvarianten vereinen die hohe Auflösung, die durch die μ CP-Technik erreicht wird und die Vorteile der Spotting-Technik, die es erlaubt, unterschiedliche Bereiche immobilisierter Biomoleküle in einfacher Weise zu erzeugen.

Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Herstellung von Mikrobioarrays, bei dem man gemäß Variante 1 auf einer Stempelfläche, welche eine Vielzahl von erhabenen Bereichen (im Folgenden Erhebungen) aufweist, ein oder mehrere voneinander verschiedene Biomoleküle in wenigstens zwei, vorzugsweise wenigstens zehn, insbesondere wenigstens 50, speziell wenigstens 100, z. B. 100 bis 10000 voneinander räumlich getrennten Flächenbereichen B (=Spots) so aufbringt, dass die Biomoleküle in den Flächenbereichen B jeweils eine Vielzahl der Erhebungen in der Regel wenigstens 10, vorzugsweise wenigstens 50, insbesondere wenigstens 100, z. B. 100 bis 10000 Erhebungen der Stempelfläche abdecken, anschließend die Stempelfläche mit der Oberfläche, auf der die Biomoleküle immobilisiert werden sollen, in Kontakt bringt und gegebenenfalls nicht immobilisierte Biomoleküle, z. B. durch Waschen, entfernt.

Dabei entspricht die Anzahl, Anordnung und Größe der in den Flächenbereichen B durch die Biomoleküle abgedeckten, erhabenen Bereiche der Stempelfläche jeweils der Anzahl, Anordnung und Größe der Plätze P eines Bereichs, auf denen die Biomoleküle immobilisiert sind. Die Anzahl, Anordnung und Größe der Flächenbereiche B entspricht in erster Näherung der Anzahl, Anordnung und Größe der Spots auf der Stempelfläche.

Die gleiche Anordnung lässt sich auch durch Variante 2 des erfindungsgemäßen Verfahrens erzielen. Hierzu bringt man auf eine Stempelfläche, die eine Vielzahl von Erhebungen aufweist, eine Verbindung V auf und stempelt auf die Oberfläche, auf der die Biomoleküle immobilisiert werden sollen. Auf diese Weise erhält man eine Oberfläche, die eine Vielzahl von räumlich getrennten Plätzen P aufweist, wobei die Anzahl, Anordnung und Größe der Plätze P der Anzahl, Anordnung und Größe der erhabenen Bereiche der Stempelfläche entspricht und die mit der Verbindung V belegt sind. Anschließend bringt man eine oder mehrere voneinander verschiedene Lösungen der zu immobilisierenden Biomoleküle in wenigstens zwei, vorzugsweise wenigstens zehn, insbesondere wenigstens fünfzig und speziell wenigstens hundert, z. B. hundert bis zehntausend voneinander

räumlich getrennten Flächenbereichen B so auf, dass die Flächenbereiche B jeweils eine Vielzahl, in der Regel wenigstens zehn, vorzugsweise wenigstens fünfzig und speziell wenigstens hundert, z. B. hundert bis zehntausend der Plätze P, welche mit der Verbindung V belegt sind, abdecken. Dabei bewirkt die Verbindung V eine Anbindung, d.h. Immobilisierung der Biomoleküle auf der Oberfläche. Anschließend wird man die nicht immobilisierten Biomoleküle entfernen. In den so erhaltenen Arrays entspricht die Anzahl, Anordnung und Größe der separierten Bereiche B der Anzahl, Anordnung und Größe der Spots.

Das erfindungsgemäße Verfahren gemäß den Varianten 1 und 2 ist nicht auf die Herstellung der erfindungsgemäßen Arrays beschränkt sondern erlaubt auch die Herstellung von Arrays mit einer Anordnung von Plätzen P und Bereichen B, die den erfindungsgemäßen Arrays entspricht, in denen jedoch die Flächenbereich B auch größere Ausdehnungen, z.B. > 500 µm oder darüber aufweisen. Vorzugsweise setzt man jedoch diese Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Arrays ein.

Die Erfindung ist mit einer Reihe von Vorteilen verbunden:

Die erfindungsgemäßen Mikrobioarrays erlauben eine Kapazitätserhöhung gegenüber konventionellen durch Spotting-Techniken hergestellten Biochips, da bei letzteren in der Regel vier bis zehn Spots mit gleicher Biomolekül-Belegung erforderlich sind, um eine hinreichend genaue Detektion des Analyten zu gewährleisten. Bei den erfindungsgemäßen Arrays hingegen ist lediglich ein Flächenbereich, der in seiner Größe einem Spot entspricht, erforderlich. Aufgrund der Aufteilung der Bereiche in mehrere Plätze P wird zudem eine deutliche Empfindlichkeitssteigerung, d. h. ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis bei der Detektion von Analyten erreicht. Zudem werden zur Herstellung deutliche geringere Mengen an Biomolekülen benötigt. Weiterhin sind die erfindungsgemäßen Arrays vergleichsweise einfach herzustellen. Der Aufwand für ihre Herstellung entspricht auch bei einer Auflösung, die der eines High-Density-Biochip entspricht, lediglich dem Herstellungsaufwand eines durch konventionelle Spotting-Technik hergestellten Medium-Density-Biochips. Das erfindungsgemäße Verfahren lässt sich in einfacher Weise auch für die Massenproduktion von High-Density-Arrays einsetzen, denn die µCP-Technik erlaubt eine wiederholte Anwendung des Stempelvorgangs, ohne dass zwischendurch Spotting-Schritte erforderlich sind. Aufgrund der Anbindung der Biomoleküle an Plätze P innerhalb eines jeweiligen Bereichs sind die Bereichsgrenzen im Unterschied zu konventionellen Spots vergleichsweise scharf, d. h. "Kaffeeleckformen", wie sie bei konventio-

nellen Arrays, die durch Spotting-Technik hergestellt werden, auftreten, werden vermieden. Dies erlaubt eine sehr dichte Anordnung der einzelnen Flächenbereiche auf der Oberfläche des Arrays, ohne dass ein Verschmieren dieser Bereiche zu befürchten ist. Weiterhin zeigt sich überraschend, dass das erfindungsgemäße Verfahren bei komplexeren Biomolekülen, bei denen die Gefahr einer Denaturierung besteht, insbesondere bei Proteinen, eine solche Denaturierung nicht auftritt. Daher betrifft eine besonders bevorzugte Ausgestaltung der Erfindung Proteinmikroarrays, also Mikroarrays immobilisierter Proteine.

Der Begriff "Array" bezeichnet eine Anordnung definierter Plätze P, insbesondere eine örtliche Zuordnung bestimmter Substanzen zu definierten Plätzen P, wobei verschiedenen Plätzen P gleiche oder unterschiedliche Substanzen zugeordnet sein können. Bei den zugeordneten Substanzen handelt es sich erfindungsgemäß um Biomoleküle. Die räumlichen Abmessungen der Plätze P liegen im μm -Bereich oder im sub- μm -Bereich. Daher werden die erfindungsgemäßen Arrays auch als Mikroarrays oder als Mikroarrays immobilisierter Biomoleküle bezeichnet.

Die erfindungsgemäßen Mikroarrays weisen mehrere Bereiche auf, die ihrerseits wieder in räumlich voneinander getrennte Plätze P unterteilt sind. Den Plätzen P innerhalb eines jeden Bereichs ist die gleiche Substanzart zugeordnet, wobei allerdings auch denkbar ist, Gemische aus zwei oder mehreren Substanzarten den Plätzen P eines Bereichs zuzuordnen. Plätze P in unterschiedlichen Bereichen werden in der Regel bzgl. der Zusammensetzung und/oder der Belegungsdichte der jeweiligen Substanzart voneinander abweichen. In der Regel werden daher auf Plätzen P in unterschiedlichen Bereichen voneinander verschiedene Biomoleküle immobilisiert sein.

Der Begriff „Biochip“ bezeichnet hier einen Array von Biomolekülen, die auf einem festen Träger immobilisiert sind.

Der Begriff „Biomoleküle“ bezeichnet beliebige biochemische und biologische Substanzen, sowohl als einzelne Moleküle als auch als mehrere miteinander wechselwirkende Moleküle. Zu nennen sind beispielsweise:

- Nukleinsäuren, insbesondere Oligonukleinsäuren, z.B. einzel- und/oder doppelsträngige, lineare, verzweigte oder circuläre DNA, cDNA, RNA, PNA (Peptide Nucleic Acid), LNA (Locked Nucleic Acid), PSNA (Phosphothioate Nucleic Acid);

- Antikörper, insbesondere humane, tierische, polyklonale, monoklonale, rekombinante, Antikörperfragmente, z.B. Fab, Fab', F(ab)₂, synthetische;
- Proteine, z.B. Allergene, Inhibitoren, Rezeptoren;
- Enzyme, z.B. Peroxidasen, Alkalische-Phosphatasen, Glukose-Oxidase, Nukleasen;
- kleine Moleküle (Haptene), z.B. Pestizide, Hormone, Aminosäuren, Antibiotika, Pharmaka, Farbstoffe, synthetische Rezeptoren, Rezeptorliganden.

Einem weiteren Aspekt zufolge definiert der Begriff „Biomolekül“ die Fähigkeit einer Substanz, mit einer biologischen Probe bzw. einem Teil davon, insbesondere dem Analyt, in eine bestimmte analytische Wechselwirkung treten zu können.

Einem besonderen Aspekt zufolge ist ein bestimmter Typ von Biomolekül als Ligand zu bezeichnen. Liganden wechselwirken mit und insbesondere binden sie - vorzugsweise spezifisch - an bestimmte Targets.

In den erfindungsgemäßen Arrays sind die Biomoleküle auf definierten Plätzen P einer Oberfläche immobilisiert. Diese Plätze P weisen eine bestimmte Form und Ausdehnung auf. Die Form der Plätze P ist grundsätzlich beliebig. Vorzugsweise ist die Form der Plätze P gleichförmig und weist beispielsweise eine polygone, z. B. eine n-eckige mit $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11$ oder 12 , und hierunter bevorzugt eine rechteckige Geometrie, eine kreisförmige oder eine elipsoide Geometrie auf. Auch Mischformen dieser Geometrien sind grundsätzlich geeignet, z.B. gestreckte Ovale. Bevorzugt weisen die Plätze P eine kreisförmige oder elipsoide Geometrie auf. Die räumliche Ausdehnung dieser Plätze P korreliert naturgemäß mit dem Abstand der Begrenzungslinie eines jeweiligen Platzes zu seinem Flächenmittelpunkt. Dieser Abstand liegt im Mittel in der Regel im Bereich von 50 nm bis $50\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise 100 nm bis $25\text{ }\mu\text{m}$, insbesondere $0,25\text{ }\mu\text{m}$ bis $20\text{ }\mu\text{m}$ und speziell $0,5\text{ }\mu\text{m}$ bis $10\text{ }\mu\text{m}$.

Der Abstand benachbarter Plätze P, definiert durch den Abstand der Flächenmittelpunkte benachbarter Plätze P liegt in der Regel im Bereich von 200 nm bis $200\text{ }\mu\text{m}$, häufig im Bereich von $1\text{ }\mu\text{m}$ bis $150\text{ }\mu\text{m}$, insbesondere im Bereich von $5\text{ }\mu\text{m}$ bis $100\text{ }\mu\text{m}$ und speziell im Bereich von $10\text{ }\mu\text{m}$ bis $90\text{ }\mu\text{m}$. Der mittlere minimale Abstand benachbarter Plätze P, definiert durch den Minimalabstand, den die Begrenzungslinien zweier benachbarter Plätze P aufweisen, liegt in der Regel im Bereich von 100 nm bis $150\text{ }\mu\text{m}$, häufig im Bereich von 500 nm bis $120\text{ }\mu\text{m}$, insbesondere im Bereich von $2\text{ }\mu\text{m}$ bis 100

μm , und speziell im Bereich von 5 μm bis 80 μm (Zahlenmittel).

Die Anordnung der Plätze P auf der Oberfläche kann regelmäßig oder unregelmäßig sein. Bevorzugt werden regelmäßige Anordnungen, d. h. Anordnungen in denen der mittlere Abstand, den zwei benachbarte Plätze P aufweisen, nicht mehr als 20% und speziell nicht mehr als 10% variiert, bzw. vom Mittelwert abweicht.

Erfindungsgemäß lassen sich die Plätze P des Arrays verschiedenen Flächenbereichen B zuordnen. Die auf den erfindungsgemäßen Mikrobioarrays angeordneten Flächenbereiche B weisen in der Regel eine gleichmäßige Geometrie, vorzugsweise eine ellipsoide oder kreisförmige Geometrie auf. Ihre Ausdehnung korreliert naturgemäß mit dem Abstand der Begrenzungslinie eines jeweiligen Bereichs B zu seinem Flächenmittelpunkt. Dieser Abstand liegt im Mittel in der Regel im Bereich von 10 μm bis 250 μm , vorzugsweise im Bereich von 25 μm bis 200 μm und insbesondere im Bereich von 30 μm bis 150 μm . Bei kreisförmigen Flächenbereichen B entspricht dies dem halben Durchmesser des jeweiligen Flächenbereichs. Die jeweiligen Flächenbereiche B bilden in der Regel eine gleichmäßige Anordnung auf der Oberfläche des Arrays. Der mittlere Abstand benachbarter Bereiche B, definiert durch den mittleren Abstand der Flächenmittelpunkte benachbarter Bereiche, wird in der Regel einen Wert von 50 μm , insbesondere 100 μm und speziell 200 μm nicht unterschreiten. Der minimale Abstand benachbarter Bereiche B, definiert durch den Minimalabstand, den die Begrenzungslinien zweier benachbarter Bereiche aufweisen, wird im Mittel einen Wert von 5 μm , insbesondere 10 μm und speziell 50 μm nicht unterschreiten.

Die erfindungsgemäßen Mikrobioarrays weisen in den jeweiligen Flächenbereichen B jeweils mehrere, im Mittel wenigstens 10, vorzugsweise wenigstens 50 und insbesondere wenigstens 100 und bis zu 10000, vorzugsweise bis 5000 und insbesondere bis 1000 räumlich voneinander getrennte Plätze P auf, auf denen die Biomoleküle immobilisiert sind.

Erfindungsgemäß sind die Biomoleküle in den Mikroarrays auf einer Oberfläche immobilisiert, d. h. ortsfest gebunden. Die Bindung kann über kovalente Wechselwirkungen, koordinative Wechselwirkungen, ionische bzw. elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken-Bindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und Mischformen der vorgenannten Wechselwirkungen erfolgen.

Die Anbindung kann dabei sowohl direkt an die Oberfläche erfolgen als auch über eine die Anbindung des Biomoleküls vermittelnde Substanz V erfolgen. Bei diesen Substanzen V handelt es sich in der Regel um Verbindungen, die kovalent an die Oberfläche, auf der die Biomoleküle immobilisiert werden sollen, gebunden ist, und die gleichzeitig an das Biomolekül binden kann, beispielsweise durch kovalente Wechselwirkung, ionische Wechselwirkung, koordinative Wechselwirkung, Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und Mischformen derartiger Wechselwirkungen, wie sie beispielsweise bei der Basenpaarung von Oligonukleotiden, bei der Protein-Protein-Wechselwirkung, Antikörper-Antigen-Bindung und bei der Protein-Ligand-Wechselwirkung auftreten (affinitive Wechselwirkungen).

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Anbindung über kovalente Wechselwirkungen. Die Biomoleküle sind dann beispielsweise über Ester-, Amid-, Sulfonamid, Imino-, Amidino-, Urethan-, Harnstoff-, Thiourethan-, Thioharnstoff-, Sulfid-, Sulfonyl-, Ether- oder Aminogruppen an die Biomoleküle gebunden.

In einer anderen Ausführungsform der Erfindung sind die Biomoleküle über eine durch ein Metallatom vermittelte, koordinative Bindung gebunden. In diesen Fällen erfolgt die Anbindung des Metallatoms an die Oberfläche über funktionelle Gruppen, die eine koordinative Bindung mit dem Metallatom ausbilden können, beispielsweise Carboxylgruppen, Hydroxylgruppen, Aminogruppen, SH-Gruppen, Oxim-Gruppen, Aldehyd-Gruppen, Keto-Gruppen oder heterocyclische Gruppen mit einem Imino-Stickstoff wie in Pyridin, Chinolin, Imidazol oder Oxazol. Vorzugsweise sind die Metallatome über wenigstens 2, z. B. 2, 3 oder 4 derartige Gruppen als Chelat gebunden. Beispiele für geeignete Metalle sind insbesondere Übergangsmetalle, speziell Übergangsmetalle der dritten Periode, die im wässrigen Milieu zweiwertige Ionen ausbilden können, beispielsweise Kupfer(II), Nickel(II), Zink(II), Kobalt(II) und Eisen(II). Die Biomoleküle binden dann an diese Metalle über eine, vorzugsweise über zwei oder drei räumlich benachbarte funktionelle Gruppen der vorgenannten Art.

In einer dritten Ausführungsform erfolgt die Anbindung der Biomoleküle über koordinierende Wasserstoffbrücken-Bindungen, wie sie beispielsweise bei der Basenpaarung von Nukleotid-Sequenzen auftreten. In dieser Ausführungsform sind kurze Oligo oder Polynukleotid-Sequenzen mit in der Regel wenigstens zwei, z. B. 2 bis 100, insbesondere 2 bis 20 Basen über vorzugsweise kovalente Bindungen an die Oberfläche gebunden. Das Biomolekül weist dann dementsprechend eine hierzu zumindest teilweise komplementäre

Oligo- oder Polynucleotidsequenz auf, wobei wenigstens 2, vorzugsweise wenigstens 10 benachbarte Basen zu einer entsprechenden Anzahl benachbarter Basen komplementär sind.

In einer vierten Ausführungsform der Erfindung sind die Biomoleküle über affinitive Wechselwirkungen, z. B. Protein-Protein-Wechselwirkungen, wie sie beispielsweise bei der Bindung von Antigenen an Antikörper auftreten, oder Protein-Ligand-Wechselwirkungen, beispielsweise über ein Biotin-Streptavidin- oder Biotin-Avidin-System gebunden.

Als Oberflächen für die erfindungsgemäßen Arrays kommen grundsätzlich alle Oberflächen in Betracht, auf denen sich Biomoleküle immobilisieren lassen, ohne dass es zu einer Deaktivierung der Biomoleküle kommt. Bei diesen Oberflächenmaterialien kann es sich um die Oberfläche eines Trägermaterials oder eine modifizierte Oberfläche eines Trägermaterials handeln. Die Trägermaterialien können starr oder flexibel sein. Typische Trägermaterialien umfassen oxidische Trägermaterialien wie Glas, Quarz, Keramik, Halbmateriale wie Silicium und Germanium, übliche Halbleitermaterialien, z. B. dotiertes Silicium oder dotiertes Germanium, Metalle und Metall-Legierungen, insbesondere auf Basis von Gold, Polymere, z. B. Polyvinylchlorid, Polyolefine wie Polyethylen, Polypropylen, Polymethylpenthen, Polyester, Fluorpolymere wie Teflon, Polyamide, Polyurethane, Polyalkyl(meth)acrylate, Polystyrol, Blends und Komposite der vorgenannten Materialien und dergleichen. Bevorzugt werden Materialien, deren Oberfläche eine geringe Rauigkeit aufweist. Vorzugsweise beträgt der die Rauigkeit charakterisierende R_a -Wert nicht mehr als 100 nm und insbesondere nicht mehr als 50 nm. Bevorzugte Trägermaterialien sind Glas und Siliciumwafer.

In der Regel empfiehlt es sich, die Oberflächen inerter Trägermaterialien, z.B. Glas, Keramik, Metall, Halbmetall wie Silizium, Polyolefin wie Polyethylen oder Polypropylen, zu aktivieren, d. h. in einer Weise zu behandeln, dass sie eine Vielzahl funktioneller Gruppen R aufweisen, die mit hierzu komplementär reaktiven Gruppen R' unter Ausbildung einer chemischen Bindung, vorzugsweise einer kovalenten chemischen Bindung, reagieren können. Diese funktionellen Gruppen R ermöglichen es, die Biomoleküle direkt über eine chemische Bindung oder indirekt, d. h. mittels einer der oben definierten Substanzen V, die über derartige Gruppen kovalent an die Oberfläche gebunden wird, auf der Oberfläche zu immobilisieren.

Reaktive Gruppen R in Sinne dieser Erfindung sind solche, die mit Nucleophilen in einer Additionsreaktion einschließlich einer Michael-Reaktion oder in einer Substitutionsreaktion reagieren, z. B. Isocyanat-Gruppen, (Meth)acrylgruppen, Vinylsulfongruppen, Oxiran-Gruppen, Aldehydgruppen, Oxazolingruppen, Carbonsäuregruppen, Carbonsäureester- und Carbonsäureanhydridgruppen, Carbonsäure- und Sulfonsäurehalogenid-Gruppen, aber auch die hierzu komplementären, als Nucleophil reagierenden Gruppen wie alkoholische OH-Gruppen, primäre und sekundäre Aminogruppen, Thiolgruppen und dergleichen. Als Beispiel für Carbonsäureestergruppen sind insbesondere sogenannte Aktivestergruppen der Formel $-C(O)O-X$ zu nennen, worin X für Pentafluorphenyl, Pyrrolidin-2,5-dion-1-yl, Benzo-1,2,3-triazol-1-yl oder einen Carboxamidin-Rest steht, sowie NHS-Ester (N-Hydroxy-succinimid-Ester). Reaktive Gruppen im Sinne der Erfindung sind auch nucleophile Gruppen, die mit den vorgenannten elektrophilen Gruppen unter Bindungsbildung reagieren, z. B. NH_2 , SH, oder OH, insbesondere jedoch NH_2 . Es versteht sich von selbst, dass eine erfindungsgemäße Oberfläche entweder überwiegend elektrophile Gruppen oder überwiegend nucleophile Gruppen aufweist, wobei im Falle von NCO/ NH_2 auch beide Gruppen nebeneinander vorliegen können.

Eine Übersicht über reaktive Gruppen R und hierzu komplementäre funktionelle Gruppen R' gibt die Tabelle 1, wobei die reaktiven Gruppen R in der ersten Zeile und die hierzu komplementären Gruppen R' in der ersten Spalte angegeben sind:

Tabelle 1: Komplementäre funktionelle Gruppen

Reaktive Gruppe R	Isocyanat	(Meth)Acryl/ Vinylsulfon	-SH	-NH ₂	-OH	-CHO	Oxiran
Komplementäre Gruppe R'							
Isocyanat	X*		X	X	X		
(Meth)Acrylat			X	X	X		
Vinylsulfon			X	X	X		
-SH	X	X				X	X
-NH ₂	X	X				X	X
-OH	X	X					X
-COOH	X						
Oxiran			X	X	X		

Reaktive Gruppe R	Isocyanat	(Meth)Acryl/ Vinylsulfon	-SH	-NH ₂	-OH	-CHO	Oxiran
Aktivester/NHS				X	X		
CHO			X	X			

* In Gegenwart von Wasser

Geeignet sind als reaktive Gruppen R auch radikalisch polymerisierbare C=C-Doppelbindungen, z. B. neben den oben genannten (Meth)acrylgruppen auch Vinylether- und Viny-lestergruppen, weiterhin aktivierte C=C-Doppelbindungen, aktivierte C≡C-Dreifachbindung und N=N-Doppelbindungen, die mit Allylgruppen im Sinne einer en-Reaktion oder mit konjugierten Diolefin-Gruppen im Sinne einer Diels-Alder-Reaktion reagieren. Beispiele für Gruppen, die mit Allylgruppen im Sinne einer en-Reaktion oder mit Dienen im Sinne einer Diels-Alder-Reaktion reagieren können, sind Maleinsäure- und Fumarsäure-Gruppen, Maleinsäureester- und Fumarsäureester-Gruppen, Zimtsäureestergruppen, Propiolsäure(ester)gruppen, Maleinsäureamid- und Fumarsäureamid-Gruppen, Maleinimid-Gruppen, Azodicarbonsäureester-Gruppen und 1,3,4-Triazolin-2,5-dion-Gruppen.

Zu den Gruppen R zählen im weiteren Sinne auch als Liganden wirkende Gruppen, die Metallionen, insbesondere von Übergangsmetallen und speziell von Übergangsmetalle der dritten Periode, die im wässrigen Milieu zweiwertige Ionen ausbilden können, wie beispielsweise Kupfer(II), Nickel(II), Zink(II), Kobalt(II) und Eisen(II), binden, welche ihrerseits eine koordinative Bindung an das Biomolekül vermitteln. Zu den als Liganden wirkenden Gruppen zählen beispielsweise Carboxylgruppen, Hydroxylgruppen, Aminogruppen, SH-Gruppen, Oxim-Gruppen, Aldehyd-Gruppen, Keto-Gruppen und heterocyclische Gruppen mit einem Imino-Stickstoff wie in Pyridin, Chinolin, Imidazol oder Oxazol. Vorzugsweise sind die als Liganden wirkenden Gruppe auf der Oberfläche so angeordnet, dass die Metallatome über wenigstens 2, z. B. 2, 3 oder 4 derartige Gruppen als Chelat gebunden sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform weist die organische Oberflächenschicht auf ihrer Oberfläche solche funktionellen Gruppen auf, die einer Additions- oder Substitutionsreaktion durch Nucleophile zugänglich sind. Bevorzugte Gruppen R sind Isocyanat-, Isothiocyanat-, Aldehyd, Aktivester, Acryl- und Methacrylgruppen, so dass die Biomoleküle mit der Oberfläche über eine der folgenden funktionellen Gruppen, ausgewählt unter A-

midgruppen, Urethangruppen, Harnstoffgruppen, Thiourethangruppen, Estergruppen, Iminogruppen, Thioharnstoffgruppen oder Sulfoethylgruppen und gegebenenfalls über einen Spacer, gebunden sind.

In einer speziellen Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Anbindung der Biomoleküle oder der Substanz V über auf der Oberflächenschicht befindliche Isocyanat-Gruppen unter Ausbildung von Urethan- oder Harnstoffgruppen.

In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist die Oberfläche eine Vielzahl an nucleophilen Gruppen, insbesondere NH_2 -Gruppen auf, so dass die zur Immobilisierung eingesetzten Biomoleküle oder die Substanz V eine hierzu komplementär-reaktive Gruppe, beispielsweise eine Isocyanat-Gruppe, eine Estergruppe, z.B. eine Aktiv- oder NHS-Ester-Gruppe aufweisen.

Zur Erzeugung von Oberflächen, die eine Vielzahl reaktiver Gruppen R aufweisen, kann man beispielsweise die Oberflächen inerter Trägermaterialien durch Behandlung mit Säuren oder Laugen aktivieren. Die Aktivierung kann auch durch Oxidation (Abflammen), durch Elektronenbestrahlung oder durch eine Plasmabehandlung mit einem sauerstoffhaltigen Plasma erfolgen wie sie von P. Chevallier et al. J. Phys. Chem. B 2001, 105(50), 12490-12497; in JP 09302118 A2; in DE 10011275; oder von D. Klee. et al. Adv. Polym. Sci. 1999, 149, 1-57, beschrieben wurde. Die Aktivierung der Oberfläche kann auch mittels Plasmabehandlung mit einem NH_3 -haltigen Plasma erfolgen, wie sie in US 6,017,577, 6,040,058 und 6,080,488 beschrieben wird. Durch Plasma-Modifizierung hergestellte mit Aminogruppen hergestellte PE-Folien sind auch im Handel erhältlich.

Häufig umfasst das Aktivieren der Oberfläche auch das Aufbringen einer organischen Beschichtung, die an ihrer Oberfläche eine Vielzahl der oben definierten funktionellen Gruppen R aufweist. Diese Beschichtung wird im Folgenden auch als Haftschrift bezeichnet. Hierzu werden bi- oder polyfunktionelle organische Verbindungen oder Polymere auf die Oberfläche aufgebracht, die wenigstens eine funktionelle Gruppe aufweist, die mit den funktionellen Gruppen auf der Oberfläche des Trägermaterials unter Bindungsbildung (kovalent, ionisch und/oder koordinativ) reagieren und die wenigstens zusätzliche eine weitere funktionelle Gruppe R der oben bezeichneten Art aufweisen. Diese Substanzen können als dünne oder ultradünne Schichten, insbesondere als monomolekulare oder multimolekulare Schichten auf die Trägeroberfläche aufgebracht oder mittels "Chemical Vapor Deposition" (CVD) auf der Oberfläche des Trägermaterials erzeugt werden. Erfin-

dungsgemäß bevorzugt sind sehr dünne Haftsichten mit einer Dicke vorzugsweise <100 nm, insbesondere <10 nm und speziell monomolekulare Schichten, insbesondere selbst organisierende Monoschichten (Self-Assembled Monolayers, SAM), beispielsweise von Thiol-Verbindungen, die wenigstens eine weitere Gruppe R aufweisen, speziell für die Behandlung von Edelmetalloberflächen, von Silanverbindungen, die wenigstens eine Gruppe R aufweisen, insbesondere zur Erzeugung von Monoschichten auf Silicium oder Glasoberflächen, weiterhin makromolekulare Monoschichten, die durch Pfropfung von Polymeren auf die Oberfläche oder durch Pfropfpolymerisation auf der Oberfläche erhalten werden und deren Polymere geeignete funktionelle Gruppen R aufweisen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden zur Erzeugung der Haftsicht Verbindungen eingesetzt, die als haftungsvermittelnde Gruppen Silangruppen, insbesondere Trialkoxysilangruppen aufweisen. Beispiele für derartige Verbindungen sind Trialkoxyaminoalkylsilane wie Triethoxyaminopropylsilan und N[(3-Triethoxysilyl)propyl]-ethylendiamin, Trialkoxyalkyl-3-glycidylethersilane wie Triethoxypropyl-3-glycidylethersilane, Trialkoxyalkylmercaptane wie Triethoxypropylmercaptan, Trialkoxyallylsilane wie Allyltrimethoxysilan, Trialkoxy(isocyanatoalkyl)silane sowie Trialkoxysilyl(meth)acryloxyalkane und -(meth)acrylamidoalkane wie 1-Triethoxysilyl-3-acryloxypropan. Diese Verbindungen werden in sehr dünnen Schichten, insbesondere als Monolage auf die Oberfläche aufgebracht, vorzugsweise nach vorheriger Aktivierung. Verfahren hierzu sind aus dem eingangs zitierten Stand der Technik bekannt.

Weiterhin sind zur Herstellung von Haftsichten auch Polyammoniumverbindungen mit freien primären Amingruppen, wie sie z. B. von J. Scheerder, J.F.J. Engbersen, und D.N. Reinhoudt, Recl. Trav. Chim. Pays-Bas 1996, 115(6), 307-320, und von Decher, Science 1997, 277, 1232-1237 zu diesem Zweck beschrieben werden, zu nennen. Geeignet sind weiterhin polyfunktionelle Polymere, die mit dem Kettenrückgrat auf der Trägeroberfläche absorbiert werden und die weitere funktionelle Gruppen R aufweisen. Hier sind insbesondere monomolekulare Beschichtungen aus Polylysin und/oder Polyethylenimin zu nennen.

Vorzugsweise erfolgt das Aufbringen der Haftsicht auf den Träger, insbesondere im Falle inerter Trägermaterialien, nach einer Aktivierung durch Behandlung mit Säuren oder Laugen, durch Oxidation (Abflammen), durch Elektronenbestrahlung oder durch eine Plasmabehandlung in der oben beschriebenen Weise.

Die Aktivierung der Oberfläche kann auch in einer Weise erfolgen, dass man anstelle einer Haftschrift oder vorzugsweise auf die Haftschrift oder auf eine in sonstiger Weise aktivierte Oberfläche eine weitere Beschichtung aufbringt, die zur Immobilisierung der Biomoleküle besonders geeignet ist und anstelle der reaktiven Gruppen R solche Gruppen aufweist, die eine Anbindung der Biomoleküle über koordinative Bindungen, über Wasserstoffbrückenbindungen, über hydrophobe Wechselwirkungen oder über affinitive Bindungen erlaubt. Hierzu wird man auf der Oberfläche eine vorzugsweise monomolekulare Schicht der oben genannten Verbindungen V generieren, z.B. Schichten aus Chelat-Bildnern, niedermolekularen Liganden für Proteinsequenzen wie Biotin, aus Proteinen wie Avidin oder Streptavidin, oder aus Oligonucleotiden. Es versteht sich von selber, dass man eine derartige Aktivierung nur dann vornehmen wird, wenn die Herstellung der Arrays nach Variante 1 erfolgt.

Trägermaterialien, die eine derartige organische Oberflächenschicht (Haftschrift) aufweisen, sind grundsätzlich bekannt, beispielsweise aus dem eingangs zitierten Stand der Technik und großteils kommerziell erhältlich, beispielsweise von der Firma Bioslide Technologies, Walnut CA, USA (NH_2 -funktionalisierte Träger, CHO-funktionalisierte Träger, Epoxy-funktionalisierte Träger, Polylysine-beschichtete Träger), von der Firma Xenopor Corp., Hawthorne, NJ, USA (NH_2 -funktionalisierte Träger, Aldehyd-funktionalisierte Träger, Epoxid-funktionalisierte Träger, Maleimid-funktionalisierte Träger, Nickel-Chelat-Träger, Streptavidin-funktionalisierte Träger, biotinylierte Träger, Thiol-modifizierte Träger), von der Firma Greiner Bio-One GmbH, (Amino-funktionalisierte Träger, Aldehyd-funktionalisierte Träger, Streptavidin-Träger), Xan Tec Bioanalytics GmbH (mit Polysaccharid-Hydrogelen beschichtete Träger, Streptavidin-funktionalisierte Träger, Biotin-funktionalisierte Träger, ultrahydrophobe Alkyl-Schichten, Carboxyl-funktionalisierte Träger, Hydrazon-funktionalisierte Träger, Thiol-funktionalisierte Träger) Firma Amersham Biosciences UK Ltd., England (polymere Amino-modifizierte Oberfläche), Firma Schott Glas, Mainz, Deutschland (Multifunktionalisierte Aminosilan-Beschichtungen, Nexterion®-Träger), Firma Sunergia Group Inc. (Aminosilan-modifizierte Träger, Isothiocyanat-modifizierte Träger).

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die Biomoleküle auf einer Hydrogel-bildenden Oberflächenschicht gebunden. Diese Oberflächenschicht sollte naturgemäß sehr dünn sein, vorzugsweise im trockenen Zustand eine Dicke $\leq 50 \mu\text{m}$, insbesondere $\leq 10 \mu\text{m}$ und speziell $\leq 1 \mu\text{m}$, besonders bevorzugt $\leq 500 \text{ nm}$ und speziell $\leq 100 \text{ nm}$ aufweisen, um die Funktion des Biochips nicht nachteilig zu beeinflussen. In der Re-

gel wird diese Hydrogel-bildende Schicht eine mittlere Dicke von wenigstens 0,5 nm, vorzugsweise wenigstens 1 nm und speziell wenigstens 5 nm aufweisen. Unter einer Hydrogel-bildenden Schicht versteht man polymere Schichten, die bei Einwirkung von Feuchtigkeit durch Interkalation von Wasser quellen.

Die Hydrogel-bildenden Beschichtungen können direkt auf die Oberfläche des Trägers, z.B. auf eine durch Behandlung mit Säuren oder Laugen, durch Oxidation (Abflammen), durch Elektronenbestrahlung oder durch eine Plasmabehandlung aktivierte Oberfläche, oder an die oben beschriebene Haftschicht gebunden sein. Bevorzugt sind naturgemäß Hydrogel-bildende Beschichtungen, die an ihrer Oberfläche eine große Anzahl freier funktioneller Gruppen R wie oben beschrieben aufweisen. Träger mit Hydrogel-Beschichtungen sind aus dem Stand der Technik bekannt und werden für die Zwecke der Biochip-Herstellung auch kommerziell angeboten, beispielsweise von der Firma Perkin-Elmer, Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA (mit Polyacrylamid-Hydrogelen beschichtete Träger, Hydrogel® Coated Slides) und XanTec Bioanalytics GmbH (mit Polysaccharid-Hydrogelen beschichtete Träger, die an ihrer Oberfläche freie Carboxyl-, Amino-, Hydrazino-, SH, Streptavidin- oder Biotin-Gruppen aufweisen).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Hydrogel-Schicht aus untereinander vernetzten sternförmigen Präpolymeren aufgebaut sind, wobei die sternförmigen Präpolymere im Mittel wenigstens 4, in der Regel 4 bis 12, vorzugsweise 5 bis 10 und speziell 6 bis 8 Polymerarme A aufweisen, die für sich gesehen wasserlöslich sind. Derartige Beschichtungen sind im Prinzip bekannt, beispielsweise aus den deutschen Patentanmeldungen 10203937.2 und 10216639.0, auf deren Offenbarung hiermit Bezug genommen wird. Diese Oberflächen zeichnen sich durch eine besonders geringe Affinität gegenüber einer unspezifischen Bindung von Biomolekülen, insbesondere Proteinen und Zellen aus. Zudem weisen diese Oberfläche eine Vielzahl funktioneller Gruppen R, insbesondere die in Tabelle 1 genannten Gruppen, auf, die in der oben beschriebenen Weise zur Immobilisierung der Biomoleküle genutzt werden können. Zudem sind die dort beschriebenen Hydrogel-bildenden Beschichtungen außerordentlich stabil gegenüber Alterung und mechanischer Belastung.

Unter sternförmigen Präpolymeren versteht man solche Polymere, die mehrere an eine niedermolekulare Zentraleinheit gebundene Polymerketten aufweisen, wobei die niedermolekulare Zentraleinheit in der Regel 4 bis 100 Gerüst-atome wie C-Atome, N-Atome oder O-Atome aufweisen wird.

Das zahlenmittlere Molekulargewicht der Polymerarme liegt in der Regel im Bereich von 200 bis 20000 Dalton, vorzugsweise im Bereich von 300 bis 10000 Dalton, insbesondere im Bereich von 400 bis 8000 Dalton und speziell im Bereich von 500 bis 5000 Dalton. Dementsprechend weist das sternförmige Präpolymer ein zahlenmittleres Molekulargewicht im Bereich von in der Regel wenigstens 1500 Dalton, vorzugsweise 2000 bis 100000 Dalton, insbesondere 2500 bis 50000 Dalton und speziell 3000 bis 30000 Dalton auf. Die hydrogel-bildenden Eigenschaften der Oberflächenschicht wird durch die Wasserlöslichkeit der Polymerarme gewährleistet. Sie ist in der Regel dann gewährleistet, wenn der molekulare Aufbau, d. h. zumindest die Art der Wiederholungseinheiten, vorzugsweise auch das Molekulargewicht des Polymerarms, einem Polymeren entspricht, dessen Löslichkeit in Wasser wenigstens 1 Gew.-% und vorzugsweise wenigstens 5 Gew.-% (bei 25 °C und 1 bar) beträgt. Beispiele für derartige Polymere mit hinreichender Wasserlöslichkeit sind Poly-C₂-C₄-alkylenoxide, Polyoxazoline, Polyvinylalkohole, Homo- und Copolymere, die wenigstens 50 Gew.-% N-Vinylpyrrolidon einpolymerisiert enthalten, Homo- und Copolymere, die wenigstens 30 Gew.-% Hydroxyethyl(meth)acrylat, Hydroxypropyl(meth)acrylat, Acrylamid, Methacrylamid, Acrylsäure und/oder Methacrylsäure einpolymerisiert enthalten, hydroxilierte Polydiene und dergleichen. Vorzugsweise leiten sich die Polymerarme A von Poly-C₂-C₄-alkylenoxiden ab und sind insbesondere ausgewählt unter Polyethylenoxid, Polypropylenoxid und Polyethylenoxid/Polypropylenoxid-Copolymeren, die eine Block- oder eine statistische Anordnung der Wiederholungseinheiten aufweisen können. Insbesondere bevorzugt sind sternförmige Präpolymere deren Polymerarme A von Polyethylenoxiden oder von Polyethylenoxid/Polypropylenoxid-Copolymeren mit einem Propylenoxid-Anteil von nicht mehr als 50 % abgeleitet sind.

Um eine Vernetzbarkeit der Präpolymere zu gewährleisten weisen sie an den Enden Ihrer Polymerarme funktionelle Gruppen auf, die mit hierzu komplementär reaktiven funktionellen Gruppen unter Ausbildung kovalenter Bindungen reagieren. Beispiele für derartige Gruppen sind die in Tabelle 1 unter R bzw. R' genannten funktionellen Gruppen.

Für die Herstellung Hydrogel-bildender Beschichtungen, die aus untereinander vernetzten sternförmigen Präpolymeren aufgebaut sind, haben sich insbesondere solche Präpolymere bewährt, die an den Enden ihrer Polymerarme Isocyanat-Gruppen aufweisen und besonders bevorzugt Isocyanat-Endgruppen, die von aliphatischen Diisocyanaten abgeleitet sind, insbesondere solche wie sie durch Addition von Isophorondiisocyanat (IPDI) auf die Kettenenden von OH-Gruppen-terminierten sternförmigen Präpolymervorstufen erhalten

werden.

Die erfindungsgemäß zur Anwendung kommenden Präpolymere sind z. T. bekannt, z. B. aus der WO 98/20060, US 6,162,862, Götz et al., Macromol. Mater. Eng. 2002, 287, S. 223, Bartelink et al. J. Polymer Science 2000, 38, S. 2555, DE 10216639.0 und DE 10203937 (sternförmige Polyether-Präpolymere), Chujo Y. et al., Polym. J. 1992, 24(11), 1301-1306 (sternförmige Polyoxazolin-Präpolymere), WO 01/55360 (sternförmige Polyvinylalkohole, sternförmige, Vinylpyrrolidon enthaltende Copolymere) oder können nach den dort beschriebenen Methoden hergestellt werden.

Die Bereitstellung der im wesentlichen aus miteinander vernetzten sternförmigen Präpolymeren aufgebauten organischen Oberfläche umfasst daher üblicherweise das Abscheiden der sternförmigen Präpolymere auf der Oberfläche eines Trägers und anschließendes Vernetzen der reaktiven Gruppen der sternförmigen Präpolymere. Die Schritte der Abscheidung und der Vernetzung können gewünschtenfalls wiederholt durchgeführt werden. Man gelangt auf diese Weise zu dickeren Schichten.

In der Regel umfasst das Verfahren des Abscheidens der sternförmigen Präpolymere die folgenden Schritte:

- i.a. Abscheiden des sternförmigen Präpolymeren auf der Oberfläche eines Trägers durch Aufbringen einer Lösung wenigstens eines sternförmigen Präpolymeren, das im Mittel wenigstens vier Polymerarme A aufweist, die für sich gesehen in Wasser löslich sind und an ihren freien Enden eine reaktive funktionelle Gruppe tragen, auf die zu Oberfläche des Trägers;
- i.b. anschließend Durchführen einer Verknüpfungsreaktion der reaktiven Gruppen untereinander und Entfernen des Lösungsmittels; und
- i.c. gegebenenfalls Umwandeln der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der Oberflächenschicht.

In Schritt i.a. erhält man eine Beschichtung, die aus unvernetzten Präpolymeren aufgebaut ist und die eine Vielzahl funktioneller Gruppen auf ihrer Oberfläche aufweist. In dieser Beschichtung wird eine Verknüpfungsreaktion der reaktiven Gruppen untereinander durchgeführt, wobei die Verknüpfungsreaktion nach dem Aufbringen und Entfernen des Lösungsmittels durch nachträgliches Behandeln der Beschichtung mit einem Vernetzer oder beim Entfernen des Lösungsmittels erfolgen kann, wenn die Lösung bereits einen geeigneten Vernetzer enthält und/oder die funktionellen Gruppen des Präpolymeren un-

tereinander eine chemische Reaktion unter Bindungsbildung eingehen.

Beispiele für Abscheidungsverfahren sind die Immersion der zu beschichtenden Oberfläche in der Lösung des Präpolymeren sowie das Spincoating - hierbei wird die Lösung des Präpolymeren auf die mit hoher Geschwindigkeit rotierende zu beschichtende Oberfläche aufgebracht. Es versteht sich von selbst, dass man zur Herstellung ultradünner Beschichtungen die Beschichtungsmaßnahmen in der Regel unter staubfreien Bedingungen durchführt.

Bei dem Immersionsverfahren taucht man die Substrate in eine Lösung des sternförmigen Präpolymers in einem geeigneten Lösungsmittel und lässt anschließend die Lösung ablaufen, so dass ein dünner Flüssigkeitsfilm mit möglichst einheitlicher Dicke auf dem Substrat verbleibt. Dieser wird anschließend eingetrocknet. Die resultierende Filmdicke hängt von der Konzentration des Präpolymers in der Lösung ab. Anschließend wird die Vernetzung ausgelöst.

Beim Spincoating wird in der Regel das zunächst nicht rotierende Substrat mit der Lösung des sternförmigen Präpolymeren vollständig benetzt. Anschließend wird das zu beschichtende Substrat mit hohen Umdrehungszahlen, in der Regel wenigstens 50 U/min, häufig wenigstens 500 U/min, z.B. 500 bis 30000 U/min, vorzugsweise oberhalb 1000 U/min, z. B. 1000 bis 10000 U/min, und besonders bevorzugt 3000 bis 6000 U/min, in Rotation versetzt, wobei die Lösung weitgehend abgeschleudert wird und ein dünner Beschichtungsfilm auf der Oberfläche des Substrats verbleibt. Anschließend wird auch hier eine Vernetzung ausgelöst.

Üblicherweise beträgt die Konzentration wenigstens 0,001 mg/ml, vorzugsweise wenigstens 0,01 mg/ml, insbesondere wenigstens 0,1 mg/ml, besonders bevorzugt wenigstens 1 mg/ml. Die Konzentration des Präpolymeren in der Lösung wird in der Regel einen Wert von 500 mg/ml, vorzugsweise 250 mg/ml und insbesondere 100 mg/ml nicht überschreiten. Über die Konzentration lässt sich naturgemäß die Dicke der Beschichtung steuern.

Zur Herstellung der Lösungen der Präpolymere sind grundsätzlich alle Lösungsmittel geeignet, welche keine oder nur eine geringe Reaktivität gegenüber den funktionellen Gruppen des zu lösenden Präpolymeren aufweisen. Hierunter sind solche bevorzugt, die einen hohen Dampfdruck aufweisen und sich somit leicht entfernen lassen. Bevorzugt sind daher solche Lösungsmittel die bei Normaldruck eine Siedetemperatur unterhalb 150 °C

und vorzugsweise unterhalb 120 °C aufweisen. Beispiele für geeignete Lösungsmittel sind aprotische Lösungsmittel, z. B. Ether wie Tetrahydrofuran (THF), Dioxan, Diethylether, tert.-Butylmethylether, aromatische Kohlenwasserstoffe wie Xylole und Toluol, weiterhin Acetonitril, Propionitril und Mischungen dieser Lösungsmittel. Im Falle von Präpolymeren mit OH-, SH-, Carboxyl-, (Meth)acryl- und Oxirangruppen sind auch protische Lösungsmittel wie Wasser oder Alkohole, z. B. Methanol, Ethanol, n-Propanol, Isopropanol, n-Butanol und tert.-Butanol, sowie deren Mischungen mit aprotischen Lösungsmitteln geeignet. Im Falle von Präpolymeren mit Isocyanat-Gruppen sind neben den vorgenannten aprotischen Lösungsmitteln überraschenderweise auch Wasser sowie Mischungen von Wasser mit aprotischen Lösungsmitteln geeignet, da der Abbau der Isocyanatgruppen der Präpolymere in derartigen Lösungen vergleichsweise langsam erfolgt.

Die Vernetzung der Präpolymere kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Beispielsweise kann die Präpolymere mit einem Vernetzungsmittel umsetzen. Als Vernetzungsmittel sind grundsätzlich alle Verbindungen mit 2 oder mehr funktionellen Gruppen geeignet, welche mit den funktionellen Gruppen des Präpolymeren unter Bindungsbildung reagieren.

Demnach erfolgt gemäß einer ersten Ausführungsform der Erfindung die Bereitstellung der organischen Oberfläche durch ein Verfahren, bei dem man die Verknüpfung der reaktiven Gruppen des Präpolymeren durch Zugabe einer Verbindung Vm1 auslöst, die wenigstens zwei komplementär reaktive Gruppen pro Molekül aufweist, die mit den reaktiven Gruppen des sternförmigen Präpolymers unter Bindungsbildung reagieren.

Bei den polyfunktionellen Verbindungen Vm1 kann es sich um niedermolekulare Verbindungen handeln, z. B. um aliphatische oder cycloaliphatische Diole, Triole und Tetraole, z. B. Ethylenglykol, Butandiol, Diethylenglykol, Triethylenglykol, Trimethylolpropan, Pentaerythrit und dergleichen, aliphatische oder cycloaliphatische Diamine, Triamine oder Tetramine, z. B. Ethylendiamin, Diethylentriamin, Triethylentetramin, Tetraethylenpentaamin, 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan, Diaminocyclohexan, Isophorondiamin und dergleichen, Aminoalkohole wie Ethanolamin, Diethanolamin, aliphatische oder cycloaliphatische Dithiole, um Dicarbonsäuren oder Tricarbonsäuren wie Sebazinsäure, Glutarsäure, Adipinsäure, Phthalsäure, Isophthalsäure, oder um die vorgenannten Diisocyanate, je nachdem welche Art von reaktiven Gruppen das Präpolymer aufweist. Die niedermolekularen polyfunktionellen Verbindungen weisen im Unterschied zu den Präpolymeren in der Regel ein Molekulargewicht < 500 g/mol auf.

Die polyfunktionelle Verbindung Vm1 kann bereits in der Lösung des Präpolymeren enthalten sein. In der zunächst entstehende Oberflächenschicht aus weitgehend unvernetzten Präpolymeren reagieren dann, z. B. beim Trocknen oder beim Erwärmen der Schicht die reaktiven Gruppen des Vernetzungsmittels mit den reaktiven Gruppen des Präpolymeren und bilden auf diese Weise eine Schicht aus miteinander vernetzten Präpolymeren, die in der Regel noch eine Vielzahl funktionelle Gruppen auf ihrer Oberfläche aufweist.

Als polyfunktionelle Verbindungen Vm1 sind grundsätzlich auch Präpolymere geeignet, die wenigstens vier Polymerarme A aufweisen, welche für sich gesehen in Wasser löslich sind und an ihren freien Enden eine reaktive funktionelle Gruppe aufweisen, die mit den reaktiven Gruppen des Präpolymeren unter Bindungsbildung reagieren. Mit anderen Worten, zur Bereitstellung der Hydrogel-Beschichtung können erfindungsgemäß auch Lösungen von wenigstens zwei unterschiedlichen Präpolymeren eingesetzt werden, worin das eine Präpolymer reaktive Gruppen aufweist, die gegenüber den reaktiven Gruppen des anderen Präpolymeren eine komplementäre Reaktivität aufweisen.

In einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird die Verknüpfung der reaktiven Gruppen im Präpolymer dadurch ausgelöst, dass man eine ausreichende Menge einer Verbindung Vm2 zugibt, die mit einem Teil der reaktiven Gruppen des Präpolymeren unter Bildung von funktionellen Gruppen mit einer hierzu komplementären Reaktivität reagiert. Im Falle von Präpolymeren mit Isocyanatgruppen kann man beispielsweise die Vernetzung auslösen, indem man den beschichteten Gegenstand mit Wasser behandelt, z. B. durch Lagern in einer feuchten Atmosphäre oder unter Wasser. Hierbei reagiert ein Teil der Isocyanatgruppen unter Bildung von Aminogruppen ab, die ihrerseits mit den verbleibenden Isocyanatgruppen unter Bindungsbildung reagieren, wobei eine Schicht aus miteinander vernetzten Präpolymeren entsteht. Das Vernetzungsmittel Vm2 ist hier somit Wasser. So hergestellte Beschichtungen weisen, wenn sie frisch hergestellt worden sind, noch freie Isocyanat-Gruppen auf. Bei längerer Einwirkung von Feuchtigkeit werden die an der Oberfläche angeordneten Isocyanatgruppen in Aminogruppen umgewandelt. In einer Variante dieser Ausführungsform setzt man Lösungen des Präpolymeren in Wasser oder in einem Gemisch aus Wasser mit einem oder mehreren mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln ein. Beispiele für geeignete, mit Wasser mischbare Lösungsmittel sind insbesondere solche, die mit den Isocyanatgruppen nicht oder nur sehr viel langsamer als Wasser eine Reaktion eingehen. Beispiele hierfür sind cyclische Ether wie Tetrahydrofu-

ran und Dioxan, weiterhin N-Alkylamide wie N-Methylpyrrolidon, Dimethylformamid und Dimethylacetamid. Das Mischungsverhältnis Wasser:Lösungsmittel liegt in der Regel im Bereich von 1:100 bis 100:1, vorzugsweise im Bereich von 50:1 bis 1:10 und speziell im Bereich 20:1 bis 1:1. Diese Variante eignet sich insbesondere zur Herstellung dickerer Schichten. Die Konzentration an Präpolymer liegt dann vorzugsweise im Bereich von 0,1 bis 500 mg/ml, insbesondere im Bereich von 0,5 bis 200 mg/ml und speziell im Bereich von 1 bis 100 mg/ml.

Bevorzugt wird die aus vernetzten, sternförmigen Präpolymeren aufgebaute Hydrogel-Schicht auf einem Träger bereitgestellt, der aktiviert und/oder mit einer Haftschrift versehen ist.

Die erfindungsgemäßen Mikrobioarrays lassen sich, wie bereits erläutert, durch eine Kombination von Mikro-Kontakt-Drucken (μ CP) und Spotting-Technik herstellen. Die Anordnung und Größe der Bereiche wird dabei durch die Spotting-Technik bestimmt. Die Anordnung der Plätze P innerhalb dieser Bereiche B ergibt sich durch die Art des verwendeten Stempels. Dementsprechend weist der Stempel auf seiner Oberfläche ein Vielzahl räumlich voneinander getrennter erhabener Flächenbereiche auf, z.B. eine Vielzahl bandförmiger oder insbesondere säulenförmiger Erhebungen, die hinsichtlich ihrer Abmessung und Anordnung der erhabenen Flächenbereiche der gewünschten Anordnung und den gewünschten Abmessungen der Plätze P entsprechen. Bevorzugt sind insbesondere Stempel mit einer Vielzahl säulenförmiger Erhebungen. Die Säulen und ihre Anordnung sind insbesondere durch die folgenden Abmessungen charakterisiert:

- Der mittlere Abstand der Begrenzungslinie der Stirnfläche einer Säule zum Flächenmittelpunkt der Stirnfläche beträgt im Mittel üblicherweise etwa 50 nm bis 50 μ m, vorzugsweise 100 nm bis 25 μ m, insbesondere 0,25 μ m bis 20 μ m und speziell 0,5 μ m bis 10 μ m. Dies entspricht bei den bevorzugten zylindrischen Säulenformen einen mittleren Durchmesser der Säulen im Bereich von 100 nm bis 100 μ m, vorzugsweise 200 nm bis 50 μ m, insbesondere 0,5 μ m bis 40 μ m und speziell 1 μ m bis 20 μ m.
- Der mittlere Abstand benachbarter Säulen, definiert durch den mittleren Abstand der Flächenmittelpunkte der Stirnflächen benachbarter Säulen liegt in der Regel im Bereich von 200 nm bis 200 μ m, häufig im Bereich von 1 μ m bis 150 μ m, insbesondere im Bereich von 5 μ m bis 100 μ m und speziell im Bereich von 10 μ m bis 90 μ m.

- Der mittlere minimale Abstand zweier benachbarter Säulen liegt in der Regel im Bereich von 100 nm bis 150 μm , häufig im Bereich von 500 nm bis 120 μm , insbesondere im Bereich von 2 μm bis 100 μm , und speziell im Bereich von 5 μm bis 80 μm (Zahlenmittel). Vorzugsweise ist der mittlere Abstand zweier benachbarter Säulen, definiert durch den Abstand der Flächenmittelpunkte der Stirnflächen der Säulen, wenigstens doppelt so groß wie der mittlere Abstand der Begrenzungslinie der Stirnfläche einer Säule zu dem Flächenmittelpunkt der Stirnfläche.

Die Stirnflächen der Säulen entsprechen der Geometrie der Plätze P und sind insbesondere kreisförmig oder elipsoid und besonders bevorzugt kreisförmig.

Entsprechend einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die Säulen auf der Stempeloberfläche regelmäßig angeordnet, d.h. der individuelle Abstand benachbarter Säulen wird im Mittel nicht mehr als 20% und vorzugsweise nicht mehr als 10% vom mittleren Abstand der Säulen zueinander abweichen.

Bei bandförmigen Erhebungen gelten bezüglich des Abstands der Bänder zueinander, das für die Abstände benachbarter Säulen gesagte. Die durchschnittliche Breite der bandförmigen Erhebungen liegt in der Regel im Bereich von 100 nm bis 100 μm , vorzugsweise 200 nm bis 50 μm , insbesondere 1 μm bis 30 μm und speziell 2 μm bis 20 μm .

Die Höhe der Erhebungen über die Stempelgrundfläche liegt in der Regel im Bereich von 0,5 bis 500 μm , insbesondere im Bereich von 0,5 bis 50 μm und speziell im Bereich von 1 bis 10 μm . Sie ist für das erfindungsgemäße Verfahren von untergeordneter Bedeutung. Um eine hinreichend Stabilität der Säulen zu gewährleisten, beträgt das Verhältnis von Höhe H zu dem Abstand A zwischen den Begrenzungslinien der Stirnfläche einer Säule und ihrem Flächenmittelpunkt $H:A$ nicht mehr als 10, insbesondere nicht mehr als 5. D. h. eine zylindrische Säule mit einem Durchmesser von etwa 1 μm wird eine Höhe von 5 μm und insbesondere 2,5 μm nicht überschreiten. Analoges gilt für das Verhältnis der Breite einer Bandförmigen Erhebung zu ihrer Höhe über die Stempelgrundfläche.

Bevorzugt werden die säulenförmigen Erhebungen eines Stempels von einem elastischen Material gebildet, um eine hinreichend gute Übertragung zu gewährleisten. In der Regel handelt es sich bei dem elastischen Material um ein polymeres Elastomer, beispielsweise um ein vernetztes Polydimethylsiloxan. Derartige Stempel sind aus dem eingangs zitierten Stand der Technik bekannt oder können nach den dort angegebenen Methoden her-

gestellt werden (siehe insbesondere Kane et al., *Biomaterials* 1999, 20, S. 2363-2376 und dort zitierte Literatur, Xia et al., *Chem. Rev.* 1999, 99, 1823-1848 und dort zitierte Literatur, Michel et al., *IBM J. Res. & Dev.* 45, 2001, 697-718 und dort zitierte Literatur, Tan et al., *Langmuir* 2002, 18, S. 519-523, und dort zitierte Literatur). In der Regel werden solche Stempel durch Abformung eines Masters hergestellt, der eine Vielzahl von Vertiefungen aufweist, welche den späteren Erhebungen des Stempels entsprechen. Hierzu wird in der Regel eine Mischung eines geeigneten Elastomer-Vorläufers mit einem Vernetzer auf eine strukturierte Abgussform, die ein Negativ der Stempeloberfläche darstellt (Master, üblicherweise ein Silicium-Wafer) aufgegeben und ausgehärtet. Nach dem Aushärten erhält man einen elastischen Stempel, dessen Stempelfläche das Positiv-Bild des Masters darstellt. Derartige Verfahren sind umfangreich in dem hier zitierten Stand der Technik beschrieben, auf den wegen weiterer Details Bezug genommen wird. Die Oberfläche des Stempels kann auch mit einer hydrophilen Oberflächenschicht versehen sein. Derartig modifizierte Stempel werden beispielsweise von Donzel et al., *Adv. Mater.* 2001, 13, S. 1164-1167, beschrieben. Die Herstellung dieses Masters erfolgt nach an sich bekannten Methoden, beispielsweise durch photolithographische Methoden, wie sie in dem hier zitierten Stand der Technik und der darin zitierten Literatur ausführlich beschrieben sind.

Die Dicke des Stempels und seine Flächenabmessungen sind von untergeordneter Bedeutung und richtet sich in erster Linie nach den Abmessungen des herzustellenden Arrays. Wenn es sich bei dem Stempelmateriale um ein Elastomer handelt, hat es sich als vorteilhaft erwiesen, wenn die Stempelfläche auf einem festen oder flexiblen Träger angeordnet ist, beispielsweise auf einer Metallfolie. Üblicherweise sind die Erhebungen und die Stempelfläche aus dem gleichen, vorzugsweise elastomeren Material. Die Dicke des die Stempelfläche bildenden Materials beträgt vorzugsweise jedoch wenigstens 1 μm , insbesondere wenigstens 0,1 mm bis etwa 1 cm.

Gemäß Variante 1 des erfindungsgemäßen Verfahrens bringt man eine oder vorzugsweise mehrere voneinander verschiedene Biomoleküle in wenigstens 2, vorzugsweise wenigstens 10, insbesondere wenigstens 50 und besonders bevorzugt wenigstens 100, z. B. 100 bis 10000 und insbesondere 100 bis 10000 vorzugsweise bis 5000 und speziell bis 1000 räumlich voneinander getrennten Flächenbereichen so auf, dass die Biomoleküle in jedem Flächenbereich jeweils eine Vielzahl, vorzugsweise wenigstens 10, insbesondere wenigstens 50 und speziell wenigstens 100, z. B. 100 bis 1000 der Erhebungen der Stempelfläche abdecken. Das Aufbringen der Biomoleküle kann in an sich bekannter Weise mit Hilfe üblicher Spotting-Techniken nacheinander oder insbesondere gleichzeitig

erfolgen. Die hierzu erforderlichen Apparaturen sind die für die Spotting-Techniken üblichen Nadeldrucker, Dispenser, Plotter, Mikropipetten und dergleichen, mit denen sich nach einem Kontakt-Verfahren oder einem Kontakt-freien Verfahren die Flüssigkeitstropfen auf eine Oberfläche aufbringen lassen (Contact Mode, Non-contact Mode).

In einer ersten Ausführungsform der Variante 1 bringt man die Biomoleküle als Lösung direkt auf die Stempelfläche auf. Beim Aufbringen der Lösungen der Biomoleküle auf die Stempelfläche hat es sich als vorteilhaft erwiesen, ein vorzeitiges Abdampfen des Lösungsmittels zu vermeiden. Geeignete Methoden hierfür sind die Kühlung des Stempels und/oder die Sättigung der Atmosphäre mit dem jeweiligen Lösungsmittel. Beim Kühlen werden die Stempel vor dem Spotten in der Regel stark abgekühlt und anschließend dem Spotting-Vorgang unterworfen. Bei der Sättigungs-Methode wird die Arbeitskammer mit dem Lösungsmittel gesättigt, in welchem das Biomolekül gelöst ist. Vorzugsweise werden die Spotting-Bedingungen so eingestellt, dass die Lösungsmittel unmittelbar verdampfen, wenn sie auf die Stempelfläche aufgebracht worden sind. Die hierfür erforderlichen Bedingungen kann der Fachmann mit wenigen Routine-Experimenten leicht ermitteln. Bevorzugt erfolgt der Spot-Vorgang bei Temperaturen im Bereich von 5 bis 50°C und insbesondere bei etwa Raumtemperatur in einer partiell mit Lösungsmittel gesättigten Atmosphäre, d. h. einer Atmosphäre, die verdampftes Lösungsmittel enthält, jedoch in einer Menge, die unterhalb seiner Sättigungskonzentration, vorzugsweise im Bereich von 10 bis 80% der Sättigungskonzentration liegt.

Für eine saubere Übertragung der Biomoleküle auf die Oberfläche hat es sich als vorteilhaft erwiesen, die Stempelfläche nach Benetzen mit der Lösung des Biomoleküls zu trocknen. Weiterhin hat es sich als günstig erwiesen, wenn die Konzentration der Biomoleküle in der Lösung im Bereich von 1 nmol/ml bis 1 µmol/ml liegt. Die für eine saubere Übertragung der Biomoleküle vom Stempel erforderliche Kontaktzeit beträgt in der Regel wenige Sekunden bis 30 min. Längere Kontaktzeiten sind in der Regel nicht erforderlich aber auch nicht von Nachteil.

Die abgegebene Flüssigkeitsmenge ist von Bedeutung, da sie die Größe der Flächenbereiche B, also insbesondere die Spotgröße bestimmt. In der Regel werden Flüssigkeitsmengen im Femto- bis Nanoliter-Bereich aufgebracht. So sind Spots mit einem Durchmesser von etwa 150 bis 200 µm mit einer kontaktfrei aufgetragenen Menge von etwa 10 nl bis 2 µl erhältlich. Spots mit Durchmessern im Bereich von 10 µm können erzeugt werden, indem man mittels Kapillardispensern Mengen von etwa 0,01 nl bis 0,1 µl aufbringt.

Die Lösungsmittel zur Herstellung der Lösungen der Biomoleküle richten sich in an sich bekannter Weise nach der Art des zu lösenden Biomoleküls. Häufig handelt es sich bei dem Lösungsmittel um Wasser oder um wässrige Mischungen von Wasser mit organischen Lösungsmitteln, die mit Wasser unbegrenzt mischbar sind. Hierzu zählen beispielsweise Alkohole wie Methanol, Ethanol, Isopropanol oder n-Butanol, Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, Tetrahydrofuran und dergleichen und deren Mischungen mit Wasser. Je nach Art des Biomoleküls können auch ausschließlich organische Lösungsmittel, z.B. die vorgenannten Lösungsmittel und deren Mischungen eingesetzt werden, insbesondere im Falle von niedermolekularen Verbindungen. Neben den Biomolekülen können die Lösungen auch oberflächenaktive Substanzen, beispielsweise Emulgatoren wie Alkylsulfate, Alkylsulfonate, Ethoxylate langkettiger Alkanole und deren Schwefelsäure-Halbester, ethoxylierte Hydroxycarbonsäuren, ethoxylierte Ester von langkettigen Carbonsäuren mit Glycerin, weiterhin quartäre Amoniumverbindungen und dergleichen enthalten. Weiterhin können insbesondere wässrige Lösungen der Biomoleküle übliche Puffer wie PBS-Puffer, SSC-Puffer und dergleichen enthalten.

In einer zweiten Ausführungsform der Variante 1 werden Lösungen der Biomoleküle in mehreren, räumlich voneinander getrennten Flächenbereichen auf eine glatte, d. h. unstrukturierte Oberfläche, auf welcher die Biomoleküle nicht immobilisiert werden, aufgebracht. Diese Oberfläche kann als Release-Fläche aufgefasst werden. Das Aufbringen der Lösungen erfolgt in an sich bekannter Weise mittels üblicher Spotting-Techniken, wie oben beschrieben. Die abgegebene Flüssigkeitsmenge wird dabei so bemessen, dass die Anordnung und Größe der Spots den späteren Flächenbereich B des Arrays entspricht. Anschließend wird die Stempelfläche des oben beschriebenen, vorzugsweise aus einem elastischen Material gebildeten, strukturierten Stempels mit der Release-Fläche in Kontakt gebracht. Hierdurch werden die Biomoleküle auf die Stempelfläche des strukturierten Stempels übertragen. Danach wird dann die Stempelfläche des Stempels mit der Oberfläche, auf welcher die Biomoleküle immobilisiert werden sollen, in Kontakt gebracht. Bezüglich der verwendeten Lösungen der Biomoleküle, der Konzentrationen, der Strukturierung der Stempel und der Kontaktzeiten gilt das oben gesagte. Als Releaseflächen sind die oben genannten inerten Träger und insbesondere nichtstrukturierte elastische Stempel geeignet.

Im Anschluß an das Aufbringen der Biomoleküle und die damit einhergehende Kopplung organische Oberfläche wird in der Regel ein Waschvorgang durchgeführt. Zweck dieses

Waschvorgangs ist es insbesondere, nicht gekoppelte Biomoleküle zu entfernen. In Anlehnung an die zuvor zum Aufbringen der Biomoleküle verwendete Lösung werden zum Waschen vorzugsweise wäßrige Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische verwendet. Prinzipiell gelten obige Ausführungen hier entsprechend.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform wäscht man mit einem wässrigen Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch, das ein Tensid, vorzugsweise ein nichtionisches Tensid, enthält. Besonders bevorzugt sind polyalkoxylierte, insbesondere polyethoxylierte Fettsäureester von Polyolen, insbesondere von Glycerin oder Sorbitol, beispielsweise die unter dem Handelsnamen Tween® vertriebenen Sorbitanfettsäureester. Insbesondere hat sich die Verwendung von ethoxyliertem Sorbitanhexylaurat als zweckmäßig erwiesen.

Die Konzentration an Tensid in der Waschlösung wird zweckmäßigerweise so gewählt, daß einerseits eine effektive Entfernung nicht gekoppelter Biomoleküle gewährleistet ist, andererseits die Waschlösung mit den immobilisierten Biomolekülen kompatibel ist. Konzentrationen im Bereich von 0,01 Gew.-% bis 10 Gew.-% und vorzugsweise 0,05 Gew.-% bis 2 Gew.-% haben sich als zweckmäßig erwiesen.

Gemäß Variante 2 des erfindungsgemäßen Verfahrens gelingt die Herstellung von Mikroarrays immobilisierter Biomoleküle, die auf ihrer Oberfläche wenigstens zwei, räumlich voneinander getrennte Flächenbereiche aufweisen, die jeweils mehrere räumlich getrennte Plätze P umfassen, auf denen Biomoleküle immobilisiert sind auch, indem man eine Verbindung V, welche mit den Biomolekülen unter Bindungsbildung reagieren kann, in räumlich voneinander getrennten Plätzen P auf die Oberfläche, auf welcher der Array erzeugt werden soll, aufbringt und anschließend die Biomoleküle in mehreren räumlich voneinander getrennten Flächenbereichen so aufbringt, dass jeder Flächenbereich mehrere, vorzugsweise im Mittel wenigstens 10, insbesondere wenigstens 50 und speziell wenigstens 100, z. B. 100 bis 10000 vorzugsweise bis 5000 und insbesondere bis 1000 der Plätze P abdeckt. Mit anderen Worten, zunächst werden auf der Oberfläche, auf welcher der Array generiert werden soll, die Verbindungen V an definierten Plätzen P immobilisiert.

Anschließend werden die Biomoleküle in mehreren räumlich voneinander getrennten Flächenbereichen B auf die so vorbehandelte Oberfläche aufgebracht. Hierbei kommt es zu einer chemischen Anbindung der Biomoleküle und damit zu einer Immobilisierung an denjenigen Plätzen P, die mit der Verbindung V belegt sind, bzw. in denen die Verbindung V

gebunden ist. Anschließend spült man nicht gebundene Biomoleküle in an sich bekannter Weise von der Oberfläche ab beispielsweise durch Waschen mit den o. g. Waschflüssigkeiten. Auf diese Weise erhält man das erfindungsgemäße Array, das mehrere, räumlich voneinander getrennte Flächenbereiche aufweist, die jeweils mehrere, räumlich voneinander getrennte Plätze P umfassen, welche mit Biomolekülen belegt sind, wobei die Plätze P innerhalb eines Bereichs eine gleichartige Belegung aufweisen und die Plätze P verschiedener Flächenbereiche eine gleichartige Belegung oder eine hinsichtlich der Belegungsdichte und/oder der Art des immobilisierten Biomoleküls verschiedene Belegung aufweisen.

Das Aufbringen der Verbindungen V ortslokalisiert in den Plätzen P auf der Oberfläche, auf welcher die Biomoleküle immobilisiert werden sollen, gelingt beispielsweise in der oben beschriebenen μ CP-Technik. Hierzu wird die Verbindung V gleichmäßig auf die Stempelfläche aufgebracht, beispielsweise durch Inkontaktbringen der Stempelfläche mit einer Lösung der Verbindung V. Anschließend wird in der Regel etwaiges Lösungsmittel entfernt und dann die so behandelte Stempelfläche, die nunmehr mit der Verbindung V belegt ist, mit der Oberfläche, auf welcher die Biomoleküle immobilisiert werden sollen, in Kontakt gebracht. Grundsätzlich kann die Verbindung V jedoch auch nach anderen Methoden zur Herstellung von High-Density Arrays auf die Oberfläche aufgebracht werden.

Variante 2 kann grundsätzlich auf beliebigen Oberflächen durchgeführt werden, die oben gemachten Ausführungen hierzu gelten entsprechend. Es hat sich jedoch als besonders vorteilhaft erwiesen, Variante 2 auf einer der oben beschriebenen Hydrogel-Oberflächen, speziell auf einer aus sternförmigen Präpolymeren aufgebauten Hydrogelschicht, durchzuführen, insbesondere wenn Proteine immobilisiert werden. Als Träger mit Hydrogelbildender Oberfläche sind aber auch die oben genannten kommerziellen Produkte, wie sie von XanTec Bioanalytics GmbH und Perkin-Elmer vertrieben werden.

Demnach ist eine besonders bevorzugte Ausführungsform von Variante 2 ein Verfahren, bei dem man:

- in einem ersten Schritt auf einem Träger eine Hydrogel-bildende Oberflächenschicht bereitstellt, die an ihrer Oberfläche eine Vielzahl funktioneller Gruppen aufweist, die mit hierzu komplementären funktionellen Gruppen unter Bindungsbildung reagieren,
- auf eine Stempelfläche, die eine Vielzahl von erhabenen Flächen aufweist, eine Verbindung V aufbringt, die eine oder mehrere funktionelle Gruppen aufweist, die

- mit den funktionellen Gruppen der Oberfläche unter Ausbildung einer kovalenten Bindung reagieren können, und die ausserdem eine oder mehrere davon verschiedene funktionelle Gruppen aufweist, die eine Bindung zu dem zu immobilisierenden Biomolekül ausbilden können;
- die so behandelte Stempelfläche mit der Hydrogel-bildenden Oberflächenschicht in Kontakt bringt, wobei man eine Oberfläche erhält, die eine Vielzahl von räumlich getrennten Plätzen P aufweist, die mit der Verbindung V belegt sind,
 - anschließend eine oder mehrere, voneinander verschiedene Lösungen der zu immobilisierenden Biomoleküle in wenigstens zwei voneinander räumlich getrennten Flächenbereichen B so aufbringt, dass die Flächenbereiche jeweils eine Vielzahl der Plätze, welche mit der Verbindung V belegt sind, abdecken, wobei die Biomoleküle an den Plätzen immobilisiert werden, und
 - anschließend nicht immobilisierte Biomoleküle entfernt.

Das Lösungsmittel und die Konzentration der Verbindung V in der Lösung richtet sich nach der Art der Verbindung V. Die optimalen Lösungsmittel und Konzentrationen können vom Fachmann in einfacher Weise mit wenigen Routineexperimenten ermittelt werden. Bevorzugt sind dabei grundsätzlich solche Lösungsmittel, die einerseits die Verbindung V in der gewünschten Konzentration lösen und sich gleichzeitig leicht entfernen lassen, insbesondere Lösungsmittel mit einer Siedetemperatur unterhalb 120°C. Beispiele für Lösungsmittel sind Wasser, wässrige Lösungsmittelmischungen und organische Lösungsmittel, z.B. die bei der Variante 1 genannten Lösungsmittel und wässrigen Lösungsmittelgemische.

Das Aufbringen der Biomoleküle in räumlich voneinander getrennten Flächenbereichen kann in an sich bekannter Weise mittels der üblichen Spotting-Techniken, wie bei Variante 1 ausführlich beschrieben, erfolgen. Bezüglich der genauen Verfahrensbedingungen, insbesondere der Temperatur und der Wahl der Lösungsmittel gelten die obigen Ausführungen entsprechend.

Der in der Regel erforderliche Waschschrift erfolgt durch Abspülen mit einer geeigneten Waschlösung. Hier gelten die zu Variante 1 gemachten Ausführungen entsprechend.

Die in Variante 2 eingesetzten Verbindungen V sind in der Regel solche Verbindungen, die einerseits eine Bindung zu der Oberfläche ausbilden, auf der die Biomoleküle immobilisiert werden sollen, und gleichzeitig eine Bindung zu speziellen Bindungszentren in den

Biomolekülen ausbilden können. Die Anbindung der Verbindung V an die Oberfläche erfolgt üblicherweise durch kovalente Bindungen, beispielsweise über Ester-, Amid-, Amino-, Sulfonamid-, Urethan-, Harnstoff- oder Thiourethan-Gruppen. Dementsprechend weisen die Verbindungen V in der Regel wenigstens eine der vorgenannten Gruppen R' auf, welche mit den reaktiven Gruppen R der Oberfläche, insbesondere der Hydrogel-bildenden Oberfläche unter Ausbildung einer kovalenten Bindung reagieren können. Weiterhin weisen die Verbindungen V wenigstens ein weiteres Bindungszentrum auf, das eine Bindung mit dem Biomolekül eingehen kann.

Bei der Bindung an das Biomolekül kann es sich um kovalente, ionische, koordinative, hydrophobe Wechselwirkung, eine Wechselwirkung über Wasserstoffbrücken-Bindungen oder eine Mischform der vorgenannten Bindungen (affinitive Bindung, wie sie beispielsweise bei Protein-Ligand oder Protein-Protein-Wechselwirkungen auftreten). In einer ersten bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei diesem Bindungszentrum um ein Zentrum, das eine koordinative Bindung zum Biomolekül ausbilden kann, die über ein Übergangsmetallatom vermittelt wird. Bezüglich der Art der Übergangsmetallatome gilt das oben gesagte. Insbesondere handelt es sich um Übergangsmetallatome der dritten Periode und speziell solche, die zweiwertige Ionen ausbilden können, wie in Kupfer(II), Nickel(II), Zink(II), Kobalt(II) und Eisen(II). Vorzugsweise binden derartige Verbindungen V das Metallatom als Chelat, d. h. die Verbindungen V weisen wenigstens 2, vorzugsweise wenigstens 3, z. B. 3, 4 oder 5 funktionelle Gruppen auf, die eine koordinative Bindung zu den oben genannten Metallionen ausbilden können. Die räumliche Anordnung der funktionellen Gruppen ist dabei vorzugsweise so gewählt, dass die Anbindung in Form eines Chelats über alle funktionellen Gruppen der Verbindung erfolgt. Beispiele für geeignete Verbindungen V, welche Metallatome koordinativ zu binden vermögen und die gleichzeitig eine reaktive Gruppe R' aufweisen, umfassen beispielsweise aromatische Orthohydroxy-Aldehyde wie Salicylaldehyd, funktionalisierte Pyridin- und Chinolin-Verbindungen, wie 8-Hydroxychinolin, Dipicolylamin, N-2-Pyridylmethylaminoacetat, weiterhin Polycarbonsäuren mit vorzugsweise wenigstens 2, z.B. 2, 3, 4, 5 oder 6 Carboxylgruppen, insbesondere Verbindungen, die wenigstens 2, z. B. 2, 3, 4, 5 oder 6 Carboxymethyl-Gruppen und gegebenenfalls eine weitere funktionelle Gruppe R' aufweisen, wie in Iminodiessigsäure, Nitrilotriessigsäure und ihre Derivate, wie sie von Liu et al., Synthesis, 2002, 10, 1398, beschrieben werden, carboxymethylierte Asparaginsäure, N,N,N-Tris(carboxymethyl)ethylendiamin, N,N,N,N-Tetra(carboxymethyl)ethylendiamin (EDTA) und dergleichen, weiterhin ortho-Phosphoserin und dergleichen. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung setzt man ein Amino-funktionalisiertes Derivat einer Ver-

bindung ein, die wenigstens zwei Carboxymethyl-Gruppen aufweist, insbesondere ein Amino-funktionalisiertes Derivat der Nitrilotriessigsäure wie Lysin-NTA (= 6-Amino-2-(N,N-bis(carboxymethyl)amino)-hexansäure). Die Verbindungen V, die mit Übergangsmetallionen Komplexe bilden können, können in komplexierter Form oder vorzugsweise in unkomplizierter Form auf die Oberfläche aufgebracht werden. Bei Einsatz unkomplexierter Verbindungen V wird man dann im Anschluss eine Komplexierung durch Spülen mit einer Metallionen-haltigen Lösung durchführen. Gegebenenfalls wird man im Anschluss an das Aufbringen der Verbindung V bzw. im Anschluss an das Komplexieren der an die Oberfläche gebundenen Verbindung V einen Waschschrift einführen, um überschüssige Verbindung V und/oder überschüssige Metallionen zu entfernen.

Im Falle von Carbonsäuren als Verbindungen V kann man diese auch in Carboxyl-geschützter Form, d. h. als Ester einsetzen. Geeignete Schutzgruppen für Carboxylgruppen sind dem Fachmann aus der einschlägigen Literatur bekannt, wobei solche Gruppen bevorzugt werden, die sich unter Bedingungen abspalten lassen, die die Oberfläche, z. B. die Hydrogel-Schicht nicht beeinträchtigen oder gar zerstören. Beispiel hierfür ist die tert.-Butylgruppe, die sich thermisch, z. B. durch Erhitzen auf 150-220°C, vorzugsweise bei vermindertem Druck, entfernen lässt.

Bei den zur Komplexierung eingesetzten Lösungen handelt es sich üblicherweise um wässrige Lösungen wasserlöslicher Salze der Metallionen, z.B. Lösungen der Chloride, Nitrate, Sulfate, Acetate etc. Die Konzentration der Metallionen in der Lösung liegt in der Regel im Bereich von 1 mM bis 1 M. Je nach Art des Liganden und der Natur des Metallions beträgt der pH-Wert der Lösung in der Regel 5 bis 12, insbesondere 6 bis 11. Die Lösungen können gegebenenfalls noch schwache Komplexbildner enthalten, z.B. Ammoniak, um die Löslichkeit der Metallionen bei höheren pH-Werten zu gewährleisten.

In einer anderen Ausführungsform des Verfahrens 2 weisen die Verbindungen V neben der zur Anbindung der Verbindung V erforderlichen reaktiven Gruppe R' eine Gruppe auf, die über wenigstens 2 und vorzugsweise über wenigstens 3 Wasserstoffbrücken-Bindungen an das Biomolekül binden kann. Derartige Gruppen sind beispielsweise Oligonukleotid-Gruppen mit wenigstens 2, vorzugsweise wenigstens 3, z. B. 3 bis 100 und insbesondere 3 bis 20 Nukleotidbasen aufweisen. An diese Gruppen können solche Biomoleküle binden, die eine hierzu komplementäre Oligonukleotid-Sequenz aufweisen, wobei der Anteil komplementärer Basen wenigstens 50% betragen sollte.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung setzt man als Verbindungen V solche Substanzen ein, die bekannterweise mit Biomolekülen eine affinitive Wechselwirkung eingehen. Beispiele für geeignete Verbindungen V sind Liganden, z.B. Haptene und Antikörper, die so funktionalisiert sind, d.h. eine Gruppe R' aufweisen, dass die mit der Oberfläche unter Ausbildung einer kovalenten Bindung reagieren können. Hierzu zählen auch chemische Verbindungen V, die neben wenigstens einer reaktiven Gruppe R' eine weitere Molekülgruppe oder Aminosäure-Sequenz aufweisen, die mit dem Biomolekül im Sinne einer affinitiven Wechselwirkung, beispielsweise einer Protein-Ligand oder Protein-Protein-Wechselwirkung binden können. Beispiele hierfür sind Biotin-Derivate, die mit einer Gruppe R' modifiziert sind und somit einen Anker für Biomoleküle bilden, die ein Streptavidin- oder Avidin-Sequenz aufweisen, sowie Streptavidin- und Avidin-Derivate, die mit einer Gruppe R' modifiziert sind, so dass sie einen Anker für biotinylierte Biomoleküle darstellen.

Die zu immobilisierenden Biomoleküle weisen naturgemäß wenigstens eine Bindungsstelle auf, die an die auf der Oberfläche fixierte Substanz V eine Bindung, beispielsweise eine kovalente Bindung, eine koordinative Bindung, eine Wasserstoffbrücken-Bindung oder eine affinitive Bindung ausbilden kann. Beispiele für derartige Gruppen wurden teilweise bereits oben bei den Verbindungen V abgehandelt.

Biomoleküle, die unter Ausbildung einer kovalenten Bindung an die Substanz V binden, weisen beispielsweise eine hierzu komplementär reaktive Gruppe auf (siehe oben). Diese Biomoleküle, die an eine Oligonukleotid-Sequenz binden, weisen naturgemäß eine hierzu zumindest teilweise komplementäre Sequenz auf, wobei vorzugsweise wenigstens zwei benachbarte Basenpaare in der Oligonukleotid-Sequenz des Biomoleküls komplementär zu zwei benachbarten Basenpaaren der Oligonukleotid-Sequenz der Substanz V sind. Vorzugsweise beträgt die Übereinstimmung wenigstens 50%.

Bei einer Anbindung des Biomoleküls über affinitive Wechselwirkungen weist das Biomolekül naturgemäß wenigstens eine Gruppe auf, die mit der Substanz V im Sinne einer Protein-Ligand oder Protein-Protein-Wechselwirkung binden kann, beispielsweise bei einer Streptavidin-modifizierten Verbindung V, eine Biotin-Einheit oder bei einer Biotin-modifizierten Substanz als Verbindung V eine Streptavidin-Einheit.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei der Substanz V um eine Substanz, welche ein Übergangsmetallion der oben bezeichneten Art koordiniert.

In diesem Fall weist das Biomolekül eine Molekülgruppe auf, die seinerseits als Ligand, vorzugsweise als chelatisierender Ligand mit dem Übergangsmetall-Ion eine koordinierende Bindung eingehen kann. Vorzugsweise ist jedoch die chelatisierende Wirkung dieser Gruppe nicht so stark, dass es zu einer vollständigen Verdrängung des chelatisierenden Teils der Verbindung V kommt. Chelatisierende Liganden in den Biomolekülen sind insbesondere solche, die wenigstens zwei, insbesondere 2 oder 3 zur Koordination an ein Metallatom geeignete Gruppen aufweisen, beispielsweise 1, 2 oder 3 Carboxylatgruppen und/oder 1, 2 oder 3 Aminogruppen und/oder 1, 2 oder 3 Iminogruppen. Hierunter bevorzugt sind insbesondere Gruppen, die wenigstens eine oder vorzugsweise 2 oder 3, räumlich benachbarte Imidazolgruppen aufweisen. Hierunter bevorzugt sind insbesondere solche Gruppen, die von Histidin oder Oligohistidin-Sequenzen abgeleitet sind. Derartige Gruppen werden auch als Histidin-Tag oder His tag bezeichnet.

Derartig funktionalisierte Biomoleküle und Verfahren zur Funktionalisierung nicht funktionalisierter Biomoleküle sind aus der Literatur bekannt, beispielsweise aus J. Chromat. 411 (1987) 177-184 (Histidin-Tag), Casey et al., J. Immunol Methods, 1995, 179, 105-116 (Histidin-Tag), Stiborova et al., Biotechnology and Bioengineering, 2003, 82, 605-611 sowie dort zitierten Literatur (Metallkomplexierung vermittelnde Tags), Christian Jakob, Dissertation der Universität Göttingen, 2001 und darin zitierte Literatur (Neuere Methoden und Übersicht zu Biotinylierung).

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Variante 2 des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Hydrogel-bildende Oberflächenschicht aus den oben beschriebenen, miteinander vernetzten sternförmigen Präpolymeren aufgebaut, welche im Mittel wenigstens 4 Polymerarme A aufweisen, die für sich gesehen wasserlöslich sind. Das Aufbringen der Substanz V kann dabei vor, vorzugsweise jedoch während oder im Anschluss an die Vernetzung der Präpolymere erfolgen. Vorzugsweise weist die Hydrogel-bildende Oberflächenschicht eine Vielzahl der oben in Tabelle 1 genannten Funktionellen Gruppen R und insbesondere Isocyanat-Gruppen und/oder Aminogruppen auf.

Bei der besonders bevorzugten Ausgestaltung der Variante 2 mit Hydrogel-bildender Oberflächenschicht haben sich insbesondere solche Verbindungen V bewährt, die eine Immobilisierung des Biomoleküls durch eine über ein Übergangsmetall vermittelte koordinative Bindung bewirken. Dementsprechend sind die Verbindungen V vorzugsweise unter den oben erwähnten chelatisierenden Verbindungen ausgewählt, insbesondere unter den oben erwähnten Polycarbonsäuren mit wenigstens 2 Carboxylgruppen, z.B. 2, 3, 4, 5 o-

der 6 Carboxylgruppen, die noch eine funktionelle Gruppe aufweisen, welche mit den funktionellen Gruppen der Hydrogel-Bildenden Oberflächenschicht unter Ausbildung einer kovalenten Bindung reagiert. Beispiele hierfür sind insbesondere die bereits erwähnten Verbindungen mit wenigstens zwei, z.B. 2, 3, 4, 5 oder 6 Carboxymethyl-Gruppen, insbesondere Amino-funktionalisierte Derivate der Nitrilotriessigsäure wie Lysin-NTA (= 6-Amino-2-(biscarboxymethylamino)-hexansäure).

Variante 2 in Verbindung mit einer Hydrogel-bildenden Oberflächenschicht hat sich insbesondere zur Immobilisierung von komplexen Biomolekülen bewährt, die leicht denaturieren, speziell zur Immobilisierung von Proteinen. Eine ganz besonders bevorzugte Ausführungsform von Variante 2 mit Hydrogel-bildender Oberflächenschicht betrifft somit die Immobilisierung von Proteinen, von Proteinen, die vermittels einer koordinativen Bindung an die Oberfläche binden und speziell von Proteinen mit Histidin-Tags oder vergleichbaren Tags, wie sie von Stiborova et al., *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 82, 605-611 sowie in der dort zitierten Literatur beschrieben werden.

Bezüglich des Aufbringens der Bereiche der Biomoleküle auf die mit der Verbindung V strukturierte Oberfläche gilt grundsätzlich das oben für das Aufbringen von Biomolekülen auf Stempelflächen gesagte, wobei das direkte Spotting (kontaktfrei oder mit Kontakt) bevorzugt wird. Dabei kann das Biomolekül in Reinform oder als Rohprodukt einer Funktionalisierung eingesetzt werden, da das mit der Bindungsstelle versehene Biomolekül selektiv an die mit der Substanz V belegten Plätze P bindet.

In der Regel schließt sich dem Aufbringen des Biomoleküls ein Waschschriff an. Dieser Waschschriff dient dazu, nicht gebundenes Biomolekül von der Oberfläche des Arrays zu entfernen. Als Waschflüssigkeiten kommen grundsätzlich solche Flüssigkeiten in Betracht, welche das Biomolekül lösen und gleichzeitig die Oberfläche nicht beschädigen. Insbesondere geeignet sind wässrige Lösungsmittel, die neben Wasser auch geringe Anteile, vorzugsweise nicht mehr als 40 und insbesondere nicht mehr als 10% organische, mit Wasser mischbare Lösungsmittel, beispielsweise Alkohole wie Methanol, Ethanol und dergleichen enthalten können. Diese Waschflüssigkeiten können auch oberflächenaktive Substanzen wie oben genannt enthalten. Der Anteil an oberflächenaktiven Substanzen wird in der Regel nicht mehr als 5 Gew.-%, bezogen auf die Waschflüssigkeit betragen. Weiterhin können die Waschflüssigkeiten auch die in der Biotechnologie üblichen Puffer, insbesondere PBS-Puffer SSC-Puffer und vergleichbare enthalten, in den hierfür üblichen Konzentrationen. Die Art der zusätzlichen Bestandteile richtet sich in an

sich bekannter Weise nach der Art des auf der Oberfläche immobilisierten Biomoleküls.

Sind in einem oder mehreren Bereichen die immobilisierten Biomoleküle mit einer Markierung versehen, so kann sich nun eine Qualitätskontrolle des Arrays anschließen. Dazu kann der Array mit einem der Markierung entsprechenden Detektionssystem vermessen werden. Über die gemessene Menge an immobilisierter Markierung lassen sich insbesondere die Kopplungseffizienz und damit die Immobilisierung der Biomoleküle in Bezug auf Fläche, Homogenität und Dichte beurteilen.

Grundsätzlich sind alle Markierungsarten geeignet. Vorzugsweise wird die Markierung so gewählt, daß sie nicht oder nur minimal mit der nachfolgenden Analytik interferiert, die Verwendung der Arrays also nicht oder nur unwesentlich beeinflusst. Dazu sind vor allem gegebenenfalls erforderliche Markierungen der Probe, also insbesondere von Nukleinsäure-Targets zu beachten. Andererseits kann die Markierung so gewählt werden, daß sie mit der Markierung der Probe wechselwirkt. Das von wechselwirkenden Markierungen ausgehende Signal kann unterscheidbar sein von demjenigen, das von den entsprechenden nicht wechselwirkenden Markierungen ausgeht. Die Wechselwirkung kann beispielsweise die Signalintensität beeinflussen, z.B. verstärken oder quenchen, oder das Signal modifizieren, z.B. die Wellenlänge absorbierten oder emittierten Lichts verändern.

Erfindungsgemäß geeignet sind Markierungssysteme, die sich z.B. spektroskopisch, photochemisch, biochemisch, immunochemisch, elektrisch, optisch oder chemisch erkennen lassen. Dazu gehören sowohl direkte Markierungssysteme, wie radioaktive Marker (z.B. ^{32}P , ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C), magnetische Marker, Chromophore, beispielsweise UV-, VIS-, oder IR-absorbierende Verbindungen, Fluorophore, chemi- oder biolumineszierende Marker, Übergangsmetalle, die in der Regel chelatgebunden sind, oder Enzyme, z.B. Meerrettich-Peroxidase oder alkalische Phosphatase und die daran gekoppelten Nachweisreaktionen, als auch indirekte Markierungssysteme, beispielsweise Haptene, wie Biotin oder Digoxigenin, die über entsprechende Nachweissysteme erkannt werden können.

Vorteilhafte Chromophore besitzen eine intensive Farbe, die von den umgebenden Molekülen nur geringfügig absorbiert wird. Farbstoffklassen, wie Chinoline, Triarylmethane, Acridine, Alizarine, Phthaleine, Azoverbindungen, Anthrachinone, Cyanine, Phenazathioniumverbindungen oder Phenazoxoniumverbindungen, seien hier stellvertretend für das breite Spektrum erfindungsgemäß geeigneter Chromophore genannt.

Fluoreszierende Markierungen werden bevorzugt. Man erhält starke Signale mit wenig Hintergrund, hoher Auflösung und hoher Sensitivität. Erfindungsgemäß von Vorteil ist, daß ein und derselbe Fluorophor je nach Anregung und Detektionsprinzip mehrere unterscheidbare Strahlungen emittieren kann. Fluorophore können allein oder in Kombination mit einem Quencher (z.B. Molecular Beacons) verwendet werden. Geeignete Fluorophore sind beispielsweise Aminomethylcoumarinessigsäure (AMCA, blau), EDANS, BODIPY 493/503; FL; FL Br2; R6G; 530/550; 558/568; TMR 542/574; TR 589/617; 630/650; 650/665, 6-FAM Fluorescein (grün), 6-OREGON green 488, TET, Cy3 (rot), Rhodamine (rot), 6-JOE, HEX, 5-TAMRA, NED, 6-ROX, TEXAS Red7 (rot), Cy5, Cy5.5, LaJolla Blue, Cy7, Alexa Fluor-Carbonsäuren, insbesondere des Typs 647 und 532, z.B. als Succinimidylder, und IRD41.

Gegenstand der Erfindung ist auch eine Vorrichtung auf Basis einer erfindungsgemäßen Arrays, die beispielsweise als Chip, Microfluid-Vorrichtung oder als Dipstick ausgestaltet sein kann. Vorrichtungen auf Basis von Bioarrays sind dem Fachmann grundsätzlich aus dem eingangs zitierten Stand der Technik bekannt, und können in an sich bekannter Weise mit den erfindungsgemäßen Mikrobioarrays ausgerüstet werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung erfindungsgemäßer Arrays für analytische und insbesondere diagnostische Zwecke.

Beispielhaft seien folgende Anwendungen genannt:

Diagnostik, Therapiewahl und Therapiekontrolle von Tumor- und Stoffwechselerkrankungen; Untersuchung der genetischen Prädisposition (SNPs), insbesondere die Detektion von Mutationen, auch im forensischen Bereich; Nachweis von Promotormethylierungen (Epigenetics); Genexpressionskontrolle; Sequenzierung, insbesondere Sequenzierung durch Hybridisierung; Mikrobiologische Anwendungen wie in Bakteriologie und Virologie, beispielsweise zur Differenzierung verschiedener Stämme; ELISA-Anwendungen mit immobilisierten Antikörpern, Antigenen, Rezeptoren und Liganden in der klinischen Chemie bis hin zur Lebensmittelchemie und Umweltanalytik; Allergiediagnostik mit immobilisierten Allergenen; High Throughput Screening von Substanzbibliotheken; Toxicogenomics.

Prinzipiell eignen sich erfindungsgemäße Arrays sowohl für nichtkompetitive als auch für kompetitive analytische Verfahren (Assays).

Bei nichtkompetitiven Assays tritt die zu analysierende Substanz (Analyt) mit den auf der

Oberfläche immobilisierten Biomolekülen in Wechselwirkung. In der Regel wird der Analyt zuvor markiert, möglich ist aber auch eine Markierung, nachdem der Analyt bereits mit den immobilisierten Biomolekülen in Wechselwirkung getreten ist, z.B. mittels Primer Extension oder Rolling-Cycle-PCR. In diesen Fällen erhält man ein Meßsignal, das um so größer ist, je mehr Analyt vorhanden ist. Es ist auch möglich, daß durch die Wechselwirkung der Probe mit den auf der Oberfläche immobilisierten Substanzen die Fluoreszenz der immobilisierten Substanzen verändert wird (Abschwächung, Verstärkung, z.B. Molecular Beacons) oder die Aktivität eines Enzyms verändert wird und diese Änderung als Meßsignal registriert wird. Beispiele für nichtkompetitive Assays sind Hybridisierungsreaktionen von PCR-Produkten oder markierter DNA/RNA an auf der Oberfläche immobilisierte Nukleinsäuren, insbesondere Oligonukleotide oder cDNA, sowie Sandwichimmunoassays.

Bei kompetitiven Verfahren wird der Probe eine markierte Substanz (Marker) zugesetzt, die ähnliche Bindungseigenschaften zu den auf der Oberfläche immobilisierten Biomolekülen hat wie der Analyt selbst. Es findet eine Konkurrenzreaktion zwischen Analyt und Marker um die begrenzte Anzahl von Bindungsplätzen auf der Oberfläche statt. Man erhält ein Signal, das um so niedriger ist, je mehr Analyt vorhanden ist. Beispiele für kompetitive Assays sind Immunoassays (ELISA) und Rezeptorassays).

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele und Figuren veranschaulicht.

Figuren:

Figur 1: Es wird eine schematische Darstellung der Variante 1 des erfindungsgemäßen Verfahrens gezeigt. In Figur 1a wird die Aufsicht auf einen üblichen Polydimethylsiloxan-Stempel, der eine Vielzahl säulenförmiger Erhebungen aufweist, gezeigt. Figur 1 b zeigt einen Querschnitt durch den in Figur 1 a in der Aufsicht gezeigten Polydimethylsiloxan-Stempel. In Figur 1 c wird schematisch das Aufbringen verschiedener Lösungen der Biomoleküle auf unterschiedliche Bereiche der Stempelfläche und ein Querschnitt durch den so behandelten Stempel gezeigt. Figur 1 d zeigt eine Aufsicht auf die so erhaltene Stempelfläche. Figur 1 e ist eine schematische Darstellung des Inkontaktbringens der behandelten Stempelfläche mit der Substrat-Oberfläche. Figur 1 f zeigt eine schematisierte Aufsicht auf die gestempelte Oberfläche und eine schematisierte Seitenansicht der gestempelten Oberfläche

Figur 2: Dargestellt wird in schematisierter Weise die Variante 2 des erfindungsgemäßen Verfahrens. Figur 2 a zeigt einen Querschnitt des verwendeten Stempels. Figur 2 b zeigt schematisiert das Aufdrucken der Substanz V auf eine mit einer Hydrogel-Schicht (1) beschichtete Substratoberfläche. Figur 2 c zeigt die mit der Substanz V (2) bestempelte Oberfläche in der Aufsicht und Figur 2d als Querschnitt. Figur 2 e stellt in schematisierter Weise die Aufsicht auf eine Oberfläche und Figur 2 f deren Querschnitt dar, auf die nach Aufbringen der Substanz V mehrere Spots (3) unterschiedlicher Protein-Lösungen aufgebracht wurden.

Figur 3: Figuren 3a und 3b zeigen eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines nach Variante 1 hergestellten Arrays von immobilisiertem Fluorescein in unterschiedlichen Vergrößerungen.

Figur 4: Teilansicht einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme eines nach Variante 2 hergestellten Bereichs mit einer Vielzahl von Plätzen, auf denen via Biotin fluoreszenz-markiertes Streptavidin immobilisiert wurde.

Figur 5: Teilansicht einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme eines nach Variante 2 hergestellten Arrays mit einer Vielzahl von Plätzen, auf denen Green-Fluorescent-Protein mit Histidin-Tag mittels Lysin-NTA-Nickel(II) immobilisiert war.

Beispiele

I. Aminofunktionalisierung des Trägers:

Die Substratoberflächen (Glasplättchen, Mikroskopieträger, Siliziumträger) wurden zunächst vorbehandelt. Hierzu wurden die Substrate 1h bei 60°C in einer Mischung aus konzentriertem wässrigem Ammoniak, Wasserstoffperoxid (25 Gew.-%ig) und Wasser in einem Volumenverhältnis 1:1:5 gelagert. Danach wurden sie mehrmals mit Wasser abgespült. Die so behandelten Substrate wurden anschließend in entsalztem Wasser aufbewahrt. Alternativ können die durch Wasser und Aceton vorgereinigten Substrate in einer Plasmaanlage des Typs TePla 100-E der Firma Plasma Systeme 2 Minuten im Sauerstoffplasma behandelt (Druck: 1 mbar, 50W) und anschließend mit Wasser und Aceton nachgewaschen werden. Alternativ können die vorgereinigten Substrate auch unter einer 40 W UV-Lampe mit Wellenlänge von 185 nm für 10 min mit Sauerstoff behandelt (Abstand zwischen Substratoberfläche und Lichtquelle 2 mm), und anschließend mit Wasser und Aceton nachgewaschen

werden.

Zur Aminofunktionalisierung wurden die vorbehandelten Substrate mit einer Aminosilan-Monolage beschichtet. Hierzu wurde die aus dem Wasser entnommene und mit Stickstoff trockengeblasene Probe in eine Glovebox transferiert. Dort wurden die Substrate in einer 0,5%igen (v/v) Lösung von (3-Aminopropyl)trimethoxysilan in trockenem Toluol 16 h gelagert, anschließend mit Toluol gründlich gewaschen und darin gelagert und vor Benutzung unter Stickstoffatmosphäre in einer Glovebox mittels eines gefilterten Stickstoffstroms getrocknet.

- II. Herstellung eines Trägers mit einer Hydrogel-Schicht, die auf ihrer Oberfläche funktionelle Gruppen R aufweist.

Herstellungsbeispiel 1:

Ein 6-armiges statistisches Poly(ethylen/propylenoxid) mit einem EO/PO-Verhältnis von 80/20 mit einem Molekulargewicht von 3100 g/mol, das an den Enden der Polymerarme mit Isophorondiisocyanat modifiziert worden war (hergestellt analog Beispiel 11 der DE 10216639.0), wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in einer Mischung aus Tetrahydrofuran und Wasser (1:9 v/v) gelöst. Dann wurde ein aminofunktionalisierter Glasträger, hergestellt nach I, in diese Lösung getaucht und mit einer Geschwindigkeit von 5 mm/sec senkrecht zur Flüssigkeitsoberfläche herausgezogen. Auf diese Weise erhielt man eine nahezu monomolekulare Beschichtung des Glasträgers mit dem Präpolymeren, die herstellungsbedingt an ihrer Oberfläche Isocyanatgruppen aufweist.

Herstellungsbeispiel 2:

Ein 6-armiges statistisches Poly(ethylen/propylenoxid) mit einem EO/PO-Verhältnis von 80/20 mit einem Molekulargewicht von 18000 g/mol, das an den Enden der Polymerarme mit Isophorondiisocyanat modifiziert worden war (hergestellt analog Beispiel 11 der DE 10216639.0), wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in trockenem Tetrahydrofuran gelöst. Dann wurde ein aminofunktionalisierter Siliziumträger, hergestellt nach I, mittels Spincoating beschichtet. Hierzu wurde zunächst das nicht rotierende, getrocknete Substrat mit der Präpolymerlösung vollständig benetzt, bevor die Lösung bei einer Endgeschwindigkeit von 4000 U/min für 40 Sekunden ab-

geschleudert wurde. Das so beschichtete Substrat wurde dann über Nacht in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre aufbewahrt, wobei man eine Oberfläche mit NH_2 -Gruppen erhielt.

III. Herstellung der Bioarrays

Beispiel 1: Herstellung eines Fluorescein-Arrays:

Eine Lösung eines mit Isothiocyanat modifizierten Fluorescein-Derivats (FITC von der Fa. Aldrich) wurde in einer Mischung aus Ethanol/Dimethylsulfoxid 50:1 v/v in einer Konzentration von 100 μM gelöst. Auf einen rechteckigen Polydimethyldisiloxanstempel, hergestellt nach Tan et al., Langmuir 2002, 18, S. 519-523 mit einer Fläche von 15 mm x 15 mm mit einer regelmäßigen Anordnung zylindrischer Säulen (Durchmesser 10 μm , Höhe 2 μm , mittlerer Abstand 20 μm) wurden mit einer Mikroliterpipette ein sehr kleine Flüssigkeitsmenge ($< 0,5 \mu\text{l}$) dieser Lösung aufgebracht und anschließend getrocknet, wobei man einen Spot mit einem Durchmesser $< 500 \mu\text{m}$ erhielt. Der so vorbereitete Stempel wurde 2 min mit dem in I hergestellten aminofunktionalisierten Glasträger in Kontakt gebracht. Anschließend wurde die Oberfläche fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Auf diese Weise erhält man das in den Abbildungen 3 und 3a gezeigte Muster.

In analoger Weise können auch Protein-Arrays und Nucleotid-Arrays hergestellt werden:

Beispiel 2: Herstellung eines Oligonucleotid-Arrays

Ein rechteckiger Polydimethyldisiloxanstempel, hergestellt z.B. nach Tan et al., Langmuir 2002, 18, S. 519-523, mit einer Fläche von 15 mm x 15 mm mit einer regelmäßigen Anordnung von Säulen (Durchmesser 5 μm , Höhe 2 μm , mittlerer Abstand 20 μm), wird gemäß der Vorschrift von Donzel et al., Adv. Mater. 2001, 13, 1164, im Sauerstoffplasma hydrophil modifiziert. Auf diesen Stempel werden mittels Mikropipette 2 Spots á 0,1 μl einer Lösung von 3'-aminoterminiertem-5'-fluoreszenzmarkiertem Oligonucleotid in PBS-Puffer mit einer Konzentration von 100 pmol/ μl aufgebracht. Nach Trocknen im Inertgasstrom wird der so vorbereitete Stempel mit einer nach II Beispiel 1 frisch hergestellten Oberfläche 2 min in Kontakt gebracht. Anschließend wird mit PBS gewaschen. Man erhält auf diese Weise ein nahezu fehlerfreies Abbild des Stempels, das 2 getrennte Bereiche aufweist, in denen die Nucleotide eine sehr große Anzahl von räumlich getrennten Plätzen belegen, wie sich Fluoreszenzmikroskopisch nachweisen lässt.

Beispiel 3 Herstellung eines Biotin-Streptavidin-Arrays:

Der in Beispiel 2 verwendete Polydimethyldisiloxanstempel wird mit einer Lösung von Biotinamidocaprinsäure-N-hydroxysuccinimid-Ester in Dimethylformamid (10 µg/ml) benetzt und anschließend getrocknet. Der so erhaltene Stempel wird 2 min. mit der II Beispiel 2 hergestellten Beschichtung in Kontakt gebracht. Anschließend wird die so erhaltene Beschichtung zum Entfernen von nicht-gebundenem Ester nacheinander mit Dimethylformamid und Wasser gewaschen und im Argonstrom getrocknet. Auf diese Weise erhielt man ein Array mit kreisförmigen Bereichen immobilisiertem Biotins.

Auf das so hergestellte Biotin-Array werden mittels Mikropipette 2 Spots á 1-2 µl einer Lösung von fluoreszenzmarkiertem Streptavidin (Molecular Probes) in PBS-Puffer (0,04 mg/ml) aufgebracht und 4 h bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wird der Array mit PBS-Puffer nachgewaschen, im Argonstrom getrocknet. Auf diese Weise erhält man einen Array der zwei räumlich voneinander getrennte Bereiche aufweist, die eine Vielzahl von mit Streptavidin belegten Plätzen aufweisen, wie sich fluoreszenzmikroskopisch nachweisen lässt (siehe Abbildung 4).

Beispiel 4: Herstellung eines Protein-Arrays über Komplexbildung

Der in Beispiel 1 verwendete Polydimethylsiloxanstempel, mit einer Fläche von etwa 15 mm x 15 mm, mit einer regelmäßigen Anordnung von Säulen (Durchmesser 10 µm, Höhe 2 µm mittlerer Abstand 20 µm) wird mit einer Lösung von Lysino-NTA-tert-Butylester, hergestellt nach J. Groll, Diplomarbeit der Universität Ulm, 2001, in Toluol (20 mg/ml) benetzt und anschließend getrocknet. Der so erhaltene Stempel wird 15 min. mit der gemäß II Beispiel 1 frisch hergestellten Beschichtung in Kontakt gebracht. Anschließend wird der so erhaltende Träger über Nacht in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre aufbewahrt und mit Toluol gewaschen. Der erhaltene Träger wird 10 min. bei 200 °C unter Vakuum (0,02 mbar) gelagert und nach dem Abkühlen für 5 min. in eine Lösung von NiCl₂ in Wasser (5 mg/ml) getaucht und mit Wasser gewaschen. Anschließend wird auf den so behandelten Träger eine Lösung eines mit His-Tags versehenen Green-Fluorescent-Proteins in PBS-Puffer (0,03 mg/ml) aufgebracht, 10 min. gelagert und anschließend mit PBS-Puffer gewaschen. Der erhaltene Array wird fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Man erhält das in der Abbildung 5 gezeigte Muster.

Patentansprüche

1. Mikroarray immobilisierter Biomoleküle, der wenigstens zwei auf einer Oberfläche räumlich voneinander getrennt angeordnete Flächenbereiche B aufweist, die jeweils mehrere, räumlich voneinander getrennte Plätze P umfassen, auf denen Biomoleküle immobilisiert sind, worin der mittlere Abstand der Begrenzungslinie eines Bereichs B zu seinem Flächenmittelpunkt in den Bereich von 10 µm bis 250 µm liegt.
2. Mikroarray nach Anspruch 1, worin der mittlere Abstand benachbarter Plätze P innerhalb der Bereiche B wenigstens doppelt so groß ist wie der mittlere Abstand der Begrenzungslinie eines Platzes P zu seinem Flächenmittelpunkt.
3. Mikroarray nach Anspruch 1 oder 2, worin der mittlere Abstand der Begrenzungslinie eines Platzes P zu seinem Flächenmittelpunkt im Mittel 50 nm bis 50 µm beträgt.
4. Mikroarray nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin der mittlere Abstand benachbarter Plätze im Bereich von 200 nm bis 200 µm beträgt.
5. Mikroarray nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin die Plätze P durch eine kreisförmige, ellipsoide oder rechteckige Fläche beschrieben werden.
6. Mikroarray nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin die Plätze P innerhalb der Bereiche B regelmäßig angeordnet sind.
7. Mikroarray nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin die Bereiche B wenigstens 10 voneinander räumlich getrennte, flächige Plätze P umfassen.
8. Mikroarray nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin wenigstens zwei der Flächenbereiche B sich in der Art und/oder der Flächendichte der immobilisierten Biomoleküle unterscheiden.
9. Mikroarray nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin die Bereiche B eine kreisförmige Geometrie aufweisen.

10. Mikroarray nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin der mittlere Abstand benachbarter Bereiche wenigstens 50 μm beträgt.
11. Mikroarray nach einem der vorhergehenden Ansprüche, umfassend eine auf einem Träger angeordnete organische Oberflächenschicht, auf welcher die Biomoleküle immobilisiert sind.
12. Mikroarray nach Anspruch 11, worin die Oberflächenschicht wenigstens eine hydrogelbildende Schicht umfasst.
13. Mikroarray nach Anspruch 12, worin die hydrogelbildende Oberflächenschicht im wesentlichen aus miteinander vernetzten sternförmigen Präpolymeren aufgebaut ist, welche im Mittel wenigstens 4 Polymerarme A aufweisen, die für sich gesehen wasserlöslich sind.
14. Mikroarray nach Anspruch 12 oder 13, worin die hydrogelbildende Oberflächenschicht im Mittel eine Dicke von 1 nm bis 100 μm im trockenen Zustand aufweist.
15. Verfahren zur Herstellung eines Mikroarrays immobilisierter Biomoleküle, der wenigstens zwei auf einer Oberfläche räumlich voneinander getrennt angeordnete Flächenbereiche B aufweist, die jeweils mehrere, räumlich voneinander getrennte Plätze P umfassen, auf denen Biomoleküle immobilisiert sind, indem man auf einer Stempelfläche, welche eine Vielzahl von erhabenen Flächen aufweist, ein oder mehrere voneinander verschiedene Biomoleküle in wenigstens zwei, vorzugsweise wenigstens zehn und insbesondere wenigstens einhundert voneinander räumlich getrennten Flächenbereichen B so aufbringt, dass die Biomoleküle in den Flächenbereichen B jeweils eine Vielzahl der erhabenen Bereiche der Stempelfläche abdecken und anschließend die Stempelfläche mit der Oberfläche, auf der die Biomoleküle immobilisiert werden sollen, in Kontakt bringt und gegebenenfalls nicht immobilisierte Biomoleküle entfernt.
16. Verfahren zur Herstellung eines Mikroarrays immobilisierter Biomoleküle, der wenigstens zwei auf einer Oberfläche räumlich voneinander getrennt angeordnete Flächenbereiche B aufweist, die jeweils mehrere, räumlich voneinander getrennte Plätze P umfassen, auf denen Biomoleküle immobilisiert sind, indem man auf eine Stempelfläche, die eine Vielzahl von erhabenen Flächen aufweist, eine Verbindung

V, die eine Immobilisierung der Biomoleküle bewirkt, aufbringt, die so behandelte Stempelfläche mit Oberfläche, auf der die Biomoleküle immobilisiert werden sollen, in Kontakt bringt, wobei man eine Oberfläche erhält, die eine Vielzahl von räumlich getrennten Plätzen P aufweist, die mit der Verbindung V belegt sind, und anschließend eine oder mehrere voneinander verschiedene Lösungen der zu immobilisierenden Biomoleküle in wenigstens zwei voneinander räumlich getrennten Flächenbereichen B so aufbringt, dass die Flächenbereiche jeweils eine Vielzahl der Plätze, welche mit der Verbindung V belegt sind, abdecken, wobei die Biomoleküle an den Plätzen P immobilisiert werden, und anschließend nicht immobilisierte Biomoleküle entfernt.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei die Verbindung, welche die Immobilisierung der Biomoleküle bewirkt, ausgewählt ist unter Verbindungen, die mit der Oberfläche eine kovalente oder ionische Bindung bilden und die eine, kovalente, ionische, koordinative oder affinitive Bindung mit dem zu immobilisierenden Biomolekül ausbilden.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 17, wobei der mittlere Abstand benachbarter Erhebungen auf der Stempelfläche wenigstens doppelt so groß ist wie der mittlere Abstand der Begrenzungslinie der Stirnfläche einer Erhebung zu dem Flächenmittelpunkt der Stirnfläche.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18, wobei der mittlere Abstand der Begrenzungslinie der Stirnfläche der Erhebungen zu dem Flächenmittelpunkt der Stirnfläche im Mittel 50 nm bis 50 µm beträgt.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 19, wobei der mittlere Abstand benachbarter Erhebungen auf der Stempelfläche im Bereich von 200 nm bis 200 µm liegt.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 20, wobei die Stirnflächen der Erhebungen auf der Stempelfläche kreisförmig, ellipsoid oder rechteckig sind.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 21, wobei Erhebungen auf der Stempeloberfläche regelmäßig angeordnet sind.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 22, wobei Erhebungen auf der Stempeloberfläche im Mittel eine Höhe im Bereich von 0,5 bis 500 μm aufweisen und das Verhältnis $H:A$ von mittlerer Höhe H zum mittlere Abstand A zwischen den Begrenzungslinien der Stirnflächen der Erhebungen und den Flächenmittelpunkten der Stirnflächen nicht mehr als 10 beträgt.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 23, wobei die Erhebungen des Stempel von einem elastomeren Material gebildet werden.
25. Verfahren nach Anspruch 24, wobei das elastomere Material Polydimethylsiloxan ist.
26. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 25, wobei die Konzentration der Biomoleküle in der Lösung im Bereich von 0,1 nM bis 10 mM liegt.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 26, wobei die Oberfläche, auf welcher die Biomoleküle bzw. die Verbindung, welche die Immobilisierung der zu immobilisierenden Biomoleküle bewirkt, von einer hydrogelbildenden Oberflächenschicht gebildet wird.
28. Verfahren nach Anspruch nach Anspruch 27, wobei man
 - in einem ersten Schritt auf einem Träger eine Hydrogel-bildende Oberflächenschicht bereitstellt, die an ihrer Oberfläche eine Vielzahl funktioneller Gruppen aufweist, die mit hierzu komplementären funktionellen Gruppen unter Bindungsbildung reagieren,
 - auf eine Stempelfläche, die eine Vielzahl von erhabenen Flächen aufweist, eine Verbindung V aufbringt, die eine oder mehrere funktionelle Gruppen aufweist, die mit den funktionellen Gruppen der Oberfläche unter Ausbildung einer kovalenten Bindung reagieren können, und die ausserdem eine oder mehrere davon verschiedene funktionelle Gruppen aufweist, die eine Bindung zu dem zu immobilisierenden Biomolekül ausbilden können;
 - die so behandelte Stempelfläche mit der Hydrogel-bildenden Oberflächenschicht in Kontakt bringt, wobei man eine Oberfläche erhält, die eine Vielzahl von räumlich getrennten Plätzen P aufweist, die mit der Verbindung V belegt sind,
 - anschließend eine oder mehrere, voneinander verschiedene Lösungen der zu

- immobilisierenden Biomoleküle in wenigstens zwei voneinander räumlich getrennten Flächenbereichen B so aufbringt, dass die Flächenbereiche jeweils eine Vielzahl der Plätze, welche mit der Verbindung V belegt sind, abdecken, wobei die Biomoleküle an den Plätzen immobilisiert werden, und
- anschließend nicht immobilisierte Biomoleküle entfernt.
29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die Hydrogel-bildende Oberflächenschicht aus miteinander vernetzten sternförmigen Präpolymeren aufgebaut ist, welche im Mittel wenigstens 4 Polymerarme A aufweisen, die für sich gesehen wasserlöslich sind.
30. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29, wobei die funktionellen Gruppen auf der Oberflächenschicht unter Isocyanat-Gruppen und Aminogruppen ausgewählt sind.
31. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 bis 30, wobei die Bindung der Verbindung V an das Biomolekül eine über ein Übergangsmetall vermittelte koordinative Bindung ist.
32. Verfahren nach Anspruch 31, worin die Verbindung V ein Derivat der Polycarbonsäure mit wenigstens 2 Carboxylgruppen ist, das eine funktionelle Gruppe aufweist, die mit den funktionellen Gruppen der Hydrogel-Bildenden Oberflächenschicht unter Ausbildung einer kovalenten Bindung reagiert.
33. Verfahren nach Anspruch 31 oder 32, wobei das zu immobilisierende Biomolekül ein Protein mit einem His-Tag ist.
34. Vorrichtung auf Basis eines Mikroarrays nach einem der Ansprüche 1 bis 14 in Form eines Chips, einer Microfluid-Vorrichtung oder eines Dipsticks.
35. Verwendung eines Mikroarrays nach einem der Ansprüche 1 bis 14 oder einer Vorrichtung nach Anspruch 34 für diagnostische und für analytische Zwecke.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/007473

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68 B01J19/00 B05D1/28

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)

IPC 7 C12Q B05D G03F B01J C07K

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, BIOSIS, INSPEC, COMPENDEX, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/91855 A (UNIV NORTHWESTERN ; HONG SEUNGHUN (US); MIRKIN CHAD A (US); PINER RICH) 6 December 2001 (2001-12-06) the whole document in particular Example 7; Figure 25; page 25, lines 11-17; -----	1-7, 10, 34, 35
X	US 6 548 263 B1 (ADAMS TERRI ET AL) 15 April 2003 (2003-04-15) figures 20, 25, 33 column 15, lines 28-38 column 14, lines 1-55 column 26, lines 53-60 column 37, line 38 - column 38, line 50 column 48, lines 10-21 ----- -/--	1-7, 10, 34, 35



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in 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

22 November 2004

Date of mailing of the international search report

09/12/2004

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

Thumb, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP2004/007473

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIN S C ET AL: "Microsized 2D protein arrays immobilized by micro-stamps and micro-wells for disease diagnosis and drug screening" FRESENIUS' JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 371, no. 2, September 2001 (2001-09), pages 202-208, XP002306869 ISSN: 0937-0633 the whole document	15,18-26
Y	-----	11-14, 16,17, 27-33
Y	US 2003/044546 A1 (LAHANN JORG ET AL) 6 March 2003 (2003-03-06) abstract figures 2,3 example 2	11-14, 16,17, 27-33
Y	US 2003/049435 A1 (HADDAD LOUIS C ET AL) 13 March 2003 (2003-03-13) the whole document	11-14, 27-33
X	MACBEATH G ET AL: "Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 289, 2000, pages 1760-1763, XP002267367 ISSN: 0036-8075 abstract figures 1,3,5	1,4-6,8, 10
A	US 6 180 239 B1 (BIEBUYCK HANS ET AL) 30 January 2001 (2001-01-30) see in particular figure 6b the whole document	1-35
A	WHITESIDES G M ET AL: "Soft lithography in biology and biochemistry" ANNUAL REVIEW OF BIOMEDICAL ENGINEERING, ANNUAL REVIEW INCO., PALO ALTO, CA, US, vol. 3, 2001, pages 335-373, XP002961528 the whole document	1-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/007473

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0191855	A	06-12-2001	US 2002063212 A1	30-05-2002
			AU 6500301 A	11-12-2001
			CA 2411198 A1	06-12-2001
			CN 1444494 T	24-09-2003
			EP 1292361 A1	19-03-2003
			JP 2003534141 T	18-11-2003
			TW 563168 B	21-11-2003
			WO 0191855 A1	06-12-2001
			US 2003049381 A1	13-03-2003
			US 2004037959 A1	26-02-2004
			US 2003157254 A1	21-08-2003
US 6548263	B1	15-04-2003	US 6103479 A	15-08-2000
			AU 6366200 A	13-02-2001
			AU 6381100 A	13-02-2001
			EP 1196774 A2	17-04-2002
			WO 0107889 A2	01-02-2001
			WO 0107891 A2	01-02-2001
			AT 268008 T	15-06-2004
			AU 730100 B2	22-02-2001
			AU 6667898 A	18-09-1998
			CA 2282658 A1	03-09-1998
			CA 2410688 A1	03-09-1998
			DE 69824174 D1	01-07-2004
			DK 983498 T3	16-08-2004
			EP 1439384 A2	21-07-2004
			EP 0983498 A1	08-03-2000
			JP 2000509827 T	02-08-2000
			JP 2002355090 A	10-12-2002
			WO 9838490 A1	03-09-1998
			US 6671624 B1	30-12-2003
			AT 242486 T	15-06-2003
			AU 4063700 A	23-10-2000
			CA 2368773 A1	12-10-2000
			DE 60003171 D1	10-07-2003
			DE 60003171 T2	08-04-2004
			EP 1166116 A1	02-01-2002
			JP 2002541458 T	03-12-2002
			WO 0060356 A1	12-10-2000
			AU 752677 B2	26-09-2002
			AU 6052199 A	10-04-2000
			CA 2345151 A1	30-03-2000
			EP 1123499 A2	16-08-2001
			JP 2002525600 T	13-08-2002
			WO 0017624 A2	30-03-2000
US 2003044546	A1	06-03-2003	EP 1476255 A2	17-11-2004
			WO 03010354 A2	06-02-2003
US 2003049435	A1	13-03-2003	CA 2445758 A1	28-11-2002
			EP 1387857 A1	11-02-2004
			WO 02094890 A1	28-11-2002
US 6180239	B1	30-01-2001	US 5512131 A	30-04-1996
			US 6776094 B1	17-08-2004
			US 5900160 A	04-05-1999
			US 2004159633 A1	19-08-2004
			EP 0812434 A2	17-12-1997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/007473

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6180239	B1	WO 9629629 A2	26-09-1996

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C12Q1/68 B01J19/00 B05D1/28

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 C12Q B05D G03F B01J C07K

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, BIOSIS, INSPEC, COMPENDEX, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 01/91855 A (UNIV NORTHWESTERN ; HONG SEUNGHUN (US); MIRKIN CHAD A (US); PINER RICH) 6. Dezember 2001 (2001-12-06) das ganze Dokument in particular Example 7; Figure 25; page 25, lines 11-17; -----	1-7,10, 34,35
X	US 6 548 263 B1 (ADAMS TERRI ET AL) 15. April 2003 (2003-04-15) Abbildungen 20,25,33 Spalte 15, Zeilen 28-38 Spalte 14, Zeilen 1-55 Spalte 26, Zeilen 53-60 Spalte 37, Zeile 38 - Spalte 38, Zeile 50 Spalte 48, Zeilen 10-21 ----- -/--	1-7,10, 34,35



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

22. November 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

09/12/2004

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

Thumb, W

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LIN S C ET AL: "Microsized 2D protein arrays immobilized by micro-stamps and micro-wells for disease diagnosis and drug screening" FRESENIUS' JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY, Bd. 371, Nr. 2, September 2001 (2001-09), Seiten 202-208, XP002306869 ISSN: 0937-0633 das ganze Dokument	15,18-26
Y	----- US 2003/044546 A1 (LAHANN JORG ET AL) 6. März 2003 (2003-03-06) Zusammenfassung Abbildungen 2,3 Beispiel 2	11-14, 16,17, 27-33
Y	----- US 2003/049435 A1 (HADDAD LOUIS C ET AL) 13. März 2003 (2003-03-13) das ganze Dokument	11-14, 27-33
X	----- MACBEATH G ET AL: "Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, Bd. 289, 2000, Seiten 1760-1763, XP002267367 ISSN: 0036-8075 Zusammenfassung Abbildungen 1,3,5	1,4-6,8, 10
A	----- US 6 180 239 B1 (BIEBUYCK HANS ET AL) 30. Januar 2001 (2001-01-30) see in particular figure 6b das ganze Dokument	1-35
A	----- WHITESIDES G M ET AL: "Soft lithography in biology and biochemistry" ANNUAL REVIEW OF BIOMEDICAL ENGINEERING, ANNUAL REVIEW INCO., PALO ALTO, CA, US, Bd. 3, 2001, Seiten 335-373, XP002961528 das ganze Dokument	1-35

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0191855	A	06-12-2001	US	2002063212 A1	30-05-2002
			AU	6500301 A	11-12-2001
			CA	2411198 A1	06-12-2001
			CN	1444494 T	24-09-2003
			EP	1292361 A1	19-03-2003
			JP	2003534141 T	18-11-2003
			TW	563168 B	21-11-2003
			WO	0191855 A1	06-12-2001
			US	2003049381 A1	13-03-2003
			US	2004037959 A1	26-02-2004
			US	2003157254 A1	21-08-2003
US 6548263	B1	15-04-2003	US	6103479 A	15-08-2000
			AU	6366200 A	13-02-2001
			AU	6381100 A	13-02-2001
			EP	1196774 A2	17-04-2002
			WO	0107889 A2	01-02-2001
			WO	0107891 A2	01-02-2001
			AT	268008 T	15-06-2004
			AU	730100 B2	22-02-2001
			AU	6667898 A	18-09-1998
			CA	2282658 A1	03-09-1998
			CA	2410688 A1	03-09-1998
			DE	69824174 D1	01-07-2004
			DK	983498 T3	16-08-2004
			EP	1439384 A2	21-07-2004
			EP	0983498 A1	08-03-2000
			JP	2000509827 T	02-08-2000
			JP	2002355090 A	10-12-2002
			WO	9838490 A1	03-09-1998
			US	6671624 B1	30-12-2003
			AT	242486 T	15-06-2003
			AU	4063700 A	23-10-2000
			CA	2368773 A1	12-10-2000
			DE	60003171 D1	10-07-2003
			DE	60003171 T2	08-04-2004
			EP	1166116 A1	02-01-2002
			JP	2002541458 T	03-12-2002
			WO	0060356 A1	12-10-2000
			AU	752677 B2	26-09-2002
			AU	6052199 A	10-04-2000
			CA	2345151 A1	30-03-2000
			EP	1123499 A2	16-08-2001
			JP	2002525600 T	13-08-2002
			WO	0017624 A2	30-03-2000
US 2003044546	A1	06-03-2003	EP	1476255 A2	17-11-2004
			WO	03010354 A2	06-02-2003
US 2003049435	A1	13-03-2003	CA	2445758 A1	28-11-2002
			EP	1387857 A1	11-02-2004
			WO	02094890 A1	28-11-2002
US 6180239	B1	30-01-2001	US	5512131 A	30-04-1996
			US	6776094 B1	17-08-2004
			US	5900160 A	04-05-1999
			US	2004159633 A1	19-08-2004
			EP	0812434 A2	17-12-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/007473

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 6180239	B1	W0 9629629 A2	26-09-1996
