

(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  
22. Mai 2003 (22.05.2003)

PCT

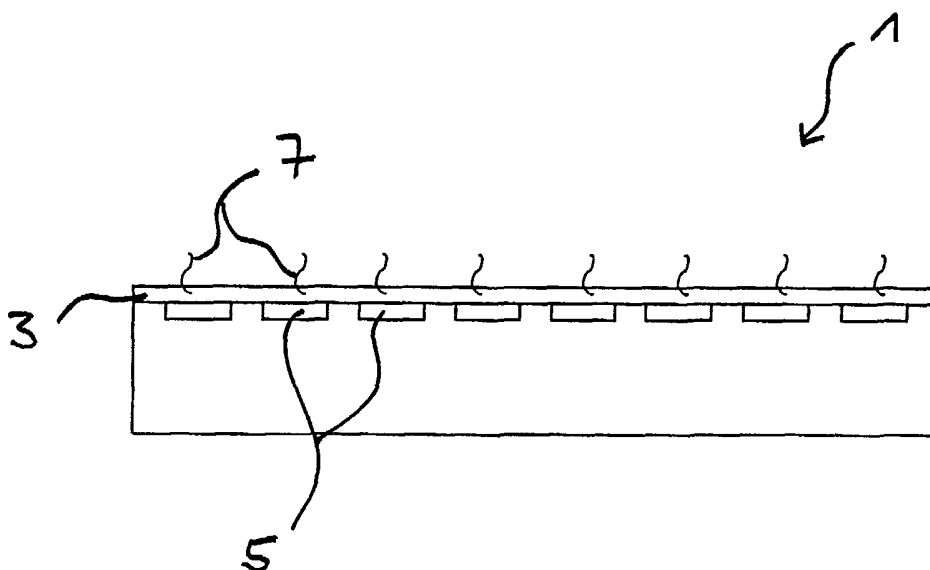
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/041853 A1**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **B01J 19/00** **LEHMANN, Mirko** [DE/DE]; Runzstrasse 71, 79102 Freiburg (DE). **FREUND, Ingo** [DE/DE]; Obermühlenweg 1, 79235 Vogtsburg (DE). **STÜRKEN, Joachim** [DE/DE]; 5, rue du Binsbourg, F-68500 Jungholtz (FR).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/12606
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
12. November 2002 (12.11.2002) (74) **Anwalt: BICKEL, Michael**; Westphal, Mussnug & Partner, Am Riettor 5, 78048 Villingen-Schwenningen (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (81) **Bestimmungsstaaten (national)**: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, 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, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (84) **Bestimmungsstaaten (regional)**: ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (30) Angaben zur Priorität:  
101 56 467.8 16. November 2001 (16.11.2001) DE
- (71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)**: **MICRONAS GMBH** [DE/DE]; Hans-Bunte-Strasse 19, 79108 Freiburg (DE). **BIOCHIP TECHNOLOGIES GMBH** [DE/DE]; Engesserstrasse 4, 79108 Freiburg (DE).
- (72) **Erfinder; und**
- (75) **Erfinder/Anmelder (nur für US)**: **KLAPPROTH, Holger** [DE/DE]; Kehlerstrasse 12, 79108 Freiburg (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title**: BIOPOLYMER SYNTHESIS SUBSTRATE AND METHOD FOR PRODUCING BIOPOLYMERS

(54) **Bezeichnung**: TRÄGER ZUR SYNTHESE SOWIE VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON BIOPOLYMEREN



(57) **Abstract**: The invention concerns a biopolymer synthesis substrate, its use and a method for producing biopolymers

(57) **Zusammenfassung**: Die vorliegende Erfindung betrifft einen Träger zur Synthese von Biopolymeren, seine Verwendung sowie ein Verfahren zur Herstellung der Biopolymere.



WO 03/041853 A1



**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

*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.*

## Beschreibung

TRÄGER ZUR SYNTHESE SOWIE VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG  
VON BIOPOLYMEREN

Die vorliegende Erfindung betrifft einen Träger zur Synthese von organischen Polymeren vorzugsweise Biopolymeren mit einer Matrix, auf deren Oberfläche die Biopolymere synthetisiert werden und einer Energiequelle zur gezielten Aktivierung von Teilbereichen der Matrix, wobei die Biopolymere an den aktivierten Teilbereichen der Matrix synthetisiert werden. Der Träger wird als Sensor-Chip in einem medizinischen, insbesondere diagnostischen oder therapeutischen Instrument verwendet. Darüber hinaus betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Synthese von Biopolymeren, in dem der Träger verwendet wird.

Biologische Systeme beruhen auf der Interaktion von biologisch aktiven Makromolekülen. Für solche Wechselwirkungen ist eine Aktivität der Makromoleküle Voraussetzung, die über ihre räumliche Struktur bedingt ist. Daher spielt die Aufklärung des Verhältnisses zwischen der räumlichen Struktur und der Aktivität von Makromolekülen bei der Erforschung von komplexen biologischen Systemen eine entscheidende Rolle. Die Aufklärung von biologischen Interaktionen ermöglicht das Verständnis wie Zellen im Zellverband miteinander kommunizieren, wie Enzyme ihr Substrat binden und umsetzen und wie zelluläre Kontrollmechanismen funktionieren oder aber, bei der Entstehung von Krebs, blockiert sind. Viele biologische Makromoleküle können andere Moleküle über ihre dreidimensionale Oberflächenstruktur sowie eine spezifische elektronische Ladungsverteilung binden und mit ihnen interagieren. Alle Moleküle mit einer solchen Spezifität werden zusammenfassend als Rezeptoren bezeichnet. Beispiele für bekannte Rezeptoren sind

Enzyme, welche die Hydrolyse eines metabolischen Intermediats katalysieren, Proteine, die den Transport von geladenen Molekülen durch eine Biomembran ermöglichen, Glycoproteine, die den Kontakt zu anderen Zellen erlauben, Antikörper, die in Blut zirkulieren und Bestandteile von Bakterien oder Viren aufspüren, binden und inaktivieren oder DNA, der Träger der Erbinformation, an die sequenzspezifisch Proteine binden und deren biologische Nutzung in der Zelle erlauben. Die Moleküle, die ein Rezeptor spezifisch bindet, werden zusammenfassend als Liganden bezeichnet, wobei viele biologische Moleküle einerseits aktiv binden, andererseits auch von anderen Molekülen gebunden werden, so dass sie sowohl Liganden als auch Rezeptoren sind.

Zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Rezeptoren und Liganden, zur Ermittlung ihrer Bindungsaffinitäten sowie zur Aufklärung von Bindungsstärken und -spezifitäten wurden eine Vielzahl von Testsystemen (Assays) entwickelt. Bei einfachen biologischen Assays, die noch heute in der medizinischen Diagnostik verwendet werden, sind antigene Fragmente von Bakterien oder Viren auf festen Oberflächen fixiert. Anschließend wird eine zu testende (Blut-)probe eines Patienten aufgetropft, und eine Interaktion zwischen spezifischen Antikörpern aus der (Blut-)probe mit den antigenen Fragmenten kann über ein Nachweissystem detektiert werden. Ein solcher Antigen-Antikörper-Nachweis ist jedoch durch die Zahl der antigenen Fragmente, die auf dem Objektträger fixiert werden können, stark limitiert.

Nachdem die vollständigen genomischen DNA-Sequenzen wichtiger Modell- und Forschungsorganismen wie Bakterien (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*) und Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*) bereits seit Jahren in Datenbanken

vorliegen, konnte kürzlich auch die Sequenzierung des menschlichen Genoms im Rahmen des Humangenomprojekts abgeschlossen werden. Die Erforschung der Funktion der einzelnen Gene, die in verschiedenen Geweben und Organen unterschiedlich aktiv sind, gewinnt seither zunehmend an Bedeutung. Die Aufklärung der differentiellen Genexpression ist entscheidend für das Verständnis der Krebsentstehung. Heute ist bereits bekannt, dass manche Individuen aufgrund eines bestimmten Genmusters ein erhöhtes Risiko tragen, Krebs zu entwickeln. Obwohl seit Jahren vielfältige Versuche unternommen werden, eine möglichst große Zahl von DNA-Sequenzen auf kleinstem Raum künstlich zu synthetisieren, um sie bezüglich ihrer Interaktion mit anderen Molekülen zu untersuchen, stellt das Verhältnis von verfügbarem Platz zur Zahl der möglichen DNA-Moleküle nach wie vor ein nicht vollständig gelöstes Problem dar.

Herkömmliche Verfahren beruhen auf automatisierten Festphasenmethoden um DNA-Stränge (DNA-Arrays) durch die aufeinanderfolgende Addition aktiver Monomere an eine wachsende Kette, die an eine unlösliche Matrix gebunden ist, zu synthetisieren. Solche künstlichen biologischen Systeme werden als DNA-Chips bezeichnet. Bei der Herstellung von DNA-Chips wurden zunächst die Monomere (Nukleotide), die den DNA-Array aufbauen, über Mikrodosierung auf die Stellen aufgebracht, an denen ein Oligonukleotid synthetisiert werden sollte. Weil dieses Verfahren in der Praxis sehr aufwändig ist, wurde es durch die lichtgesteuerte (=photolithographische) Synthese zur Herstellung von hochdichten DNA-Chips abgelöst, die bis heute das meist benutzte Verfahren ist.

30

Bei der lichtgesteuerten DNA-Chip Synthese werden individuelle Maskensätze, wie sie aus der Halbleiterindustrie bekannt sind, zur selektiven Belichtung verwendet. Dabei wird die O-

berfläche eines festen Trägers mit lichtempfindlichen (=photolabilen) Schutzgruppen modifiziert, danach wird durch eine aufgelegte photolithographische Maske belichtet. Die Belichtung führt zur selektiven Entfernung der Schutzgruppen an den belichteten Stellen, wodurch reaktive Hydroxylgruppen (OH-Gruppen) ausschließlich an den belichteten Regionen freigelegt werden. Anschließend wird ein aktiviertes Deoxynukleotid, das seinerseits eine mit einer Schutzgruppe versehene OH-Gruppe aufweist, zugeführt, so dass eine Kopplung des Deoxynukleotids an den zuvor belichteten Stellen erfolgt. Nach einer Oxidationsreaktion wird der Träger gespült, und die Oberfläche wird durch eine zweite Maske beleuchtet, wodurch die Schutzgruppen an anderen Stellen entfernt und für eine erneute Kopplung aktiviert werden. Danach wird ein zweites, wiederum mit geschützten Hydroxylgruppen versehenes Deoxynukleotid hinzugefügt. Die Zyklen aus Belichtung zur Entfernung der Schutzgruppen und Ankoppeln der Deoxynukleotide wird solange fortgesetzt, bis die gewünschten Oligonukleotide auf dem festen Träger entstanden sind. Auf diese Weise ist es möglich, hochdichte DNA-Arrays zu erzeugen (Pease et al., (1994), PNAS, USA, Vol. 91, S. 5022 - 5026).

Ebenso beschreibt die EP 476 014 B1 ein Verfahren zur Herstellung von Polymerbibliotheken auf festen Trägern, wobei ebenfalls photolabile Schutzgruppen und deren Abspaltung durch entsprechende Belichtungstechniken verwendet werden. Für jede der monomeren Basen, (Deoxy-)adenin, (Deoxy-)cytosin, (Deoxy-)guanin und (Deoxy-)thymine müssen jedoch verschiedene photolithographische Masken vorhanden sein, so dass sich die Zahl der benötigten unterschiedlichen Masken auf die vierfache Länge der zu synthetisierenden DNA-Sequenzen beläuft. Verglichen mit der Synthese von künstlichen DNA-Sequenzen ist die maskenbasierte Synthese von Pepti-

den noch aufwändiger, weil für den Aufbau von Peptiden 20 natürliche Aminosäuren zur Verfügung stehen, so dass die Zahl der Masken 20 x die Länge der Peptide beträgt. Der erforderliche Maskensatz muss nicht nur bereits vor Beginn der Synthesen bereitgestellt werden, sondern er muss auch bei jeder  
5 Belichtung sehr exakt justiert werden, um Fehlbelichtungen und damit Verunreinigungen zu vermeiden. Aus der US 5,143,854 ist zwar eine Lichtquelle bekannt, die eine Verschiebbarkeit des Objektträgers erlaubt, jedoch bleibt das Maskierungsverfahren aufgrund des ganz erheblichen technischen Aufwands  
10 insbesondere für kleine Serien ungeeignet, weil für jede neue Synthese ein neuer Maskensatz bereitgestellt werden muss.

Um den teuren und aufwändigen Prozess der Maskenherstellung  
15 zu umgehen, wurden maskenfreie Systeme entwickelt. Aus der WO 99/42813 ist bekannt, Biopolymere wie DNA-Arrays oder Polypeptide aufzubauen, in dem sie durch einzeln ansteuerbare Mikrospiegel belichtet werden. Die Mikrospiegel bilden ein  
zusammenhängendes Feld, das aus elektronisch ansteuerbaren  
20 einzelnen Mikrospiegeln zusammengesetzt ist (Digital Mirror Devices). Dem Mikrospiegelfeld ist eine gemeinsame Lichtquelle zugeordnet. Die Biopolymere, die sich auf einem Objektträger befinden, werden in bestimmten Mustern aktiviert, wobei  
an die angesteuerten Bereiche die jeweils angebotenen Monomere  
25 (z.B. die vier verschiedenen Basen) angekoppelt werden. Dieser Vorgang wird so lange fortgesetzt, bis alle die Biopolymere der gewünschten Länge aufgebaut sind.

Bei den dargestellten Belichtungsverfahren werden monomere  
30 Bausteine, die zunächst mit Schutzgruppen versehene reaktive Gruppen aufweisen, verwendet, um eine ortsgerichtete Synthese zu ermöglichen. Die Einwirkung von Licht dient dazu, die photolabilen Schutzgruppen der monomeren Bausteine zu entfernen,

um anschließend an diesen Stellen der Lichteinwirkung eine Synthese erfolgen zu lassen. Photolabile Schutzgruppen sind beispielsweise aus der DE 44 44 996 A1 bekannt, die Nukleotid-Derivate mit photolabilen Schutzgruppen für die 5'-OH-Funktion im Zuckeranteil der Basen beschreibt. Nach Erzeugung einer reaktiven OH-Gruppe kann im anschließenden Reaktionsschritt das nächste Monomer an die reaktive Gruppe angekop-pelt werden. Auf diese Weise ist es möglich, durch alternie-rende Entfernung der Schutzgruppe und eine Kopplungsreaktion ein beliebiges Polymer aufzubauen.

Die DE 199 62 803 A1 beschreibt ein Verfahren, bei dem unter Verwendung von planaren Trägern eine Vielzahl verschiedener voneinander räumlich getrennter Polymere gleichzeitig synthe-tisiert wird. Hierfür werden zur selektiven Belichtung mehre-re Leuchtdioden (Diodenarray) verwendet. Diese Verfahren nützt elektrisch ansteuerbare Leuchtdioden zur selektiven Entfernung von Schutzgruppen und kommt daher ebenfalls ohne teure Masken aus. Die Monomere für die zu synthetisierenden Biopolymere befinden sich in einer eigenen Einrichtung unterhalb des lichtdurchlässigen Bereichs. In dieser Einrichtung lassen sich die für die durchzuführende Synthese benötigten Chemikalien einzeln und sequentiell anbieten. Mit einem ent-sprechenden Programm steuert ein Computer die einzelnen Leuchtdioden im Diodenarray korreliert zu der sequentiellen und zyklischen Zufuhr der einzelnen Monomere an. Um äußere störende Einflüsse während der Belichtung auszuschließen sind die Orte der chemischen Synthese und die Belichtungseinrich-tung räumlich streng voneinander getrennt. Daher leidet auch dieses Verfahren, ebenso wie die Maskentechnik und die Be-lichtung mittels Mikrofeldspiegeln aufgrund der räumlichen Trennung zwischen Synthese und Belichtung vor allem unter der Unschärfe der Belichtung. Auf den Chips existieren nach abge-



schlossener Synthese keine wirklich diskreten Bereiche sondern es bilden sich Übergänge zwischen zwei oder mehreren definierten Produkten. Die unscharfen Übergänge werden dabei insbesondere durch Beugungseffekte des Lichtes an den Masken  
5 sowie durch die Unschärfe von Abbildungen hervorgerufen.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, einen Träger zur Synthese von Biopolymeren zur Verfügung zu stellen, bei dem Beugungseffekte des Lichtes sowie Unschärfen  
10 bei der Abbildung vermieden werden und exakte vorher definierte Bereiche auf dem Träger ausgewählt werden können, an denen anschließend die Synthese der Biopolymere stattfindet. Die Entstehung von unspezifischen Übergängen durch fehlende, zusätzliche oder Randbelichtung soll vermieden werden.

15

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch einen Träger zur Synthese von Biopolymeren gelöst, der eine Matrix, auf deren Oberfläche die Biopolymere synthetisiert werden und eine Energiequelle zur gezielten Aktivierung von Teilbereichen der  
20 Matrix aufweist, wobei die Biopolymere an den aktivierten Teilbereichen der Matrix synthetisiert werden und die Matrix und die Energiequelle eine Einheit bilden. Durch die Einheit von Matrix und Energiequelle können Streu- und Beugungseffekte des Lichtes wirksam verhindert werden. So lassen sich Arrays von Biopolymeren wie z.B. Oligonukleotide oder Peptide  
25 auf der gesamten Oberfläche des Trägers synthetisieren. Die störenden Übergänge zwischen zwei oder mehreren definierten Produkten entfallen vollständig, so dass spezielle Kontrollen zum Auffinden von "falschen", durch Fehlbelichtungen entstandenen Biopolymere entfallen können. Auf diese Weise lassen  
30 sich bei gleichbleibender Fläche eine höhere Anzahl von Biopolymeren auf dem Träger synthetisieren.

Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung betreffen einen Sensor-Chip sowie ein medizinisches, insbesondere diagnostisches oder therapeutisches Instrument, die den Träger umfassen.

5

Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Synthese von Biopolymeren, bei dem der erfindungsgemäße Träger verwendet wird. Weitere Schritte des erfindungsgemäßen Verfahrens betreffen das gezielte Aktivieren von Teilbereichen der Matrix durch Abspalten der Schutzgruppen in ausgewählten Teilbereichen, das Zuführen von Biomonomeren die ihrerseits Schutzgruppen aufweisen sowie das Interagieren der Biomonomere mit den gezielt aktivierten Teilbereichen der Matrix. Die Energie zur gezielten Aktivierung von Teilbereichen der Matrix wodurch die Schutzgruppen in den ausgewählten Teilbereichen abgespalten werden, wird dabei innerhalb des Trägers emittiert.

20

Durch den Träger sowie das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung wird jede Art der Abbildungsoptik entbehrlich, die Herstellung der Biopolymere erfordert einen geringeren synthesespezifischen Aufwand und führt zugleich zu einer wesentlichen Verbesserung der Synthesequalität, weil unspezifische Übergänge zwischen einzelnen Biopolymeren, die Kontaminationen der synthetisierten Endprodukte darstellen, vermieden werden. Daher können Biopolymerarrays schnell, individuell und flexibel erzeugt werden. Außerdem ist eine einfache gezielte und selektive Synthese von Biopolymeren kosten- und zeitgünstig möglich.

30

Im folgenden werden Begriffe definiert, die in der Beschreibung und Darstellung der Erfindung verwendet werden.

### 1. Ligand

Ein Ligand ist ein Molekül das durch einen bestimmten Rezeptor erkannt wird. Liganden können natürlich vorkommen oder künstlich erzeugt sein. Beispiele für Liganden sind Agonisten und Antagonisten zellulärer Membranrezeptoren, Toxine, virale und bakterielle Epitope, Hormone (Opiate, Steroide, etc.), Peptide, Enzyme, Enzymsubstrate, Cofaktoren, Arzneistoffe, Zuckermoleküle, Lecithin, Oligonukleotide, Nukleinsäuren, Oligosaccharide, Proteine, Peptide und Lipide.

### 2. Rezeptor

Ein Rezeptor ist ein Molekül mit einer Bindungsaffinität für einen bestimmten Liganden. Rezeptoren können natürlich vorkommend oder künstlich erzeugt sein. Sie können ebenso in ihrem natürlichen Zustand oder als Aggregate mit anderen Molekülen vorliegen. Rezeptoren binden direkt oder indirekt über spezifische Bindungssubstanzen oder Bindungsmoleküle kovalent oder nichtkovalent an den Liganden. Beispiele für Rezeptoren sind Antikörper, insbesondere monoklonale und polyklonale Antikörper, Antiseren, Zellmembranrezeptoren, Polynukleotide, Nukleinsäuren, Cofaktoren, Lecithin, Zuckermoleküle, Polysaccharide, Zellen, zelluläre Membrane und Organelle. Rezeptoren bilden mit den korrespondierenden Liganden durch ihre molekulare Erkennung einen "Liganden-Rezeptor-Komplex".

### 3. Organische Polymere

30

Organische Polymere werden aus kleinen organischen Verbindungen (Monomeren) durch Reaktion mit sich selbst oder mit anderen kleinen organischen Verbindungen durch den Reaktionspro-

zess der Polymerisation gebildet, wobei das entstehende Produkt (Polymer) eine Verbindung mit hoher relativer Molekülmasse darstellt. Beispiele für organische Polymere sind Polymere der Alkene wie Polyethylen, Polypropylen oder auch modifizierte Polymere wie Polyvinylchlorid, Teflon, Polystyrol und Polyamide (Nylon).

#### 4. Biomonomer

Ein Biomonomer ist ein einzelner Baustein oder ein Satz bzw. eine Gruppe von einzelnen kleinen Bausteinen, die ihrerseits miteinander verbunden werden können und dadurch ein Biopolymer bilden. Beispiele für Biomonomere sind die 20 natürlich vorkommenden L-Aminosäuren, D-Aminosäuren, künstlich synthetisierte Aminosäuren, Nukleotide, Nukleoside, Zuckermoleküle wie Pentosen oder Hexosen sowie kurzkettige Peptide wie Tetramere oder Pentamere. Der Ausdruck Biomonomere, so wie er im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet wird, bezieht sich auf alle Bausteine, die für die Synthese eines Biopolymers verwendet werden. Falls für den Aufbau eines Proteins als Biopolymer nicht einzelne Aminosäuren sondern kurze Peptidsequenzen wie Tetramere, Pentamere oder Hexamere verwendet werden, so werden die Bausteine bestehend aus vier, fünf, bzw. sechs Aminosäuren ebenfalls als Biomonomere bezeichnet.

25

#### 5. Biopolymer

Ein Biopolymer ist jedes aus Biomonomeren synthetisierte Produkt, unabhängig von seiner Länge und seinen Einzelbestandteilen. Werden als Biomonomere drei verschiedene Aminosäuren verwendet, so wird das resultierende Trimere als Biopolymer bezeichnet. Ein Biopolymer kann aus gleichen oder voneinander verschiedenen Biomonomeren aufgebaut sein.

30

## 6. Schutzgruppen:

5 Als Schutzgruppe wird jedes Material bezeichnet, das an ein  
Monomer gebunden ist und zu dessen Modifikation verwendet  
wird. Die Schutzgruppe kann durch die Einwirkung einer Ener-  
giequelle, wie beispielsweise Belichtung, selektiv abgespal-  
ten werden. Durch die Abspaltung der Schutzgruppe wird eine  
10 reaktive Gruppe wie beispielsweise eine Hydroxylgruppe frei-  
gelegt. Beispiele für Schutzgruppen sind Nitroveratryloxycar-  
bonyl-, Nitrobenzyloxycarbonyl-, Dimethyldimethoxybenzoyloxy-  
carbonyl-, 5-Bromo-7-nitroindolinyl-, Hydroxy- $\alpha$ -  
methylcinnamo-yl-, 2-Oxymethylenantrachinon- und p-  
15 Nitrophenylethoxycarbonyl-.

## 7. Analoge bzw. Derivate:

Unter Analogen bzw. Derivaten werden alle natürlich vorkom-  
20 menden und künstlich synthetisierten Abwandlungen von Biomo-  
nomenen und Biopolymeren verstanden. Bekannte Analoga von  
Nukleinsäuren sind beispielsweise PNA oder LNA.

Im folgenden werden vorteilhafte Ausgestaltungen des erfin-  
25 dungsgemäßen Trägers sowie des Verfahrens beschrieben.

Für eine effiziente Synthese von Biopolymeren wird als Matrix  
eine dreidimensionale Matrix (3D-Matrix) aus einer Polymer-  
schicht verwendet. Es kann ein unvernetztes oder vernetztes  
30 Polymer verwendet werden, wobei ein kreuzvernetztes Polymer  
mit einem geringen Kreuzvernetzungsgrad besonders geeignet  
ist. Eine geeignete Polymerschicht weist eine Vielzahl von  
einzelnen Polymerketten auf, die mit einer festen Oberfläche

verbunden sind. Zwischen den Polymerketten und der festen Oberfläche besteht bevorzugt eine kovalente Bindung. Neben linearen Polymerketten können auch verzweigte Polymere eingesetzt werden. Aufgrund der großen Oberfläche der dreidimensionalen Polymerschicht entstehen beliebig viele Orte an denen die Synthese der Biopolymere beginnen kann. Beispiele für Polymere, die für den Aufbau der 3D-Matrix geeignet sind, können außerdem der EP 1 035 218 A1 entnommen werden.

10 Wenn eine dünne Polymerschicht als Matrix verwendet wird, die insbesondere eine Stärke bzw. Dicke von 30 bis 3000 nm aufweist, wird die Synthese der Biopolymere durch die dreidimensionale Polymerschicht nicht beeinflusst. Es hat sich als besonders vorteilhaft erwiesen, wenn als Matrix wenigstens eine in Teilbereichen quellbare Polymerschicht verwendet wird. Die Quellbarkeit in Wasser wird durch Komponenten wie Acrylsäure, Methacrylsäure, Dimethylacrylamid oder Vinylpyrrolidon gewährleistet. Die Polymerschicht weist an ihrem gequollenen Zustand vorzugsweise eine Stärke von 50 bis 500 nm auf.

20

Die dreidimensionale Polymerschicht weist außerdem reaktive Startergruppen auf. Die reaktiven Startergruppen sind bevorzugt Hydroxylgruppen (OH-Gruppen), die direkt mit der dreidimensionalen Polymerschicht verbunden sind. Alternativ dazu können die reaktiven Startergruppen auch über weitere funktionelle Gruppen, insbesondere über niedermolekulare chemische Verbindungen mit der Polymerschicht verbunden sein. Für die Verbindung zwischen Polymerschicht und reaktiver Startergruppe eignet sich insbesondere eine kovalente Bindung, die ein dauerhaftes Anheften der reaktiven Startergruppe gewährleistet.

30

Die reaktiven Startergruppen sind durch Schutzgruppen geschützt. Solange die Schutzgruppe an bzw. mit der Startergruppe verbunden ist, ist diese inaktiv. Sie erlangt ihre Aktivität erst durch die Abspaltung der Schutzgruppe.

5

Biopolymere, die mit Hilfe des Trägers synthetisiert werden können, sind Rezeptoren oder Liganden, Nukleinsäuren, Oligonukleotide, Proteine, Peptide, Polysaccharide, Lipide sowie deren Derivate bzw. Analoga. Bei der Synthese längerer Biopolymere hat es sich als sinnvoll erwiesen, Teilstrukturen des Biopolymers als Monomer zu verwenden. Hierbei sind besonders Tetramere geeignet. Die länger-kettigen Monomere werden zu Biopolymeren zusammengefügt. Dadurch wird eine Reduktion der Reaktionsschritte erreicht, was mit einer wesentlichen Verbesserung der Reinheit und einer höheren Ausbeute an fertigen synthetisierten Biopolymeren einhergeht. Auf diese Weise lässt sich bei Verwendung von 256 Tetrameren Oligonukleotiden ein beliebiges Dodecamer durch nur fünf Kopplungsschritte herstellen, wofür bisher 20 Kopplungsschritte benötigt wurden. Die Verwendung von Tetrameren als Biomonomere ist besonders bei der Synthese von hochgradig homologer DNA-Sequenz von Vorteil, weil hierfür nur wenige Oligomere als Biomonomere benötigt werden. Durch die Verwendung von Oligomeren als Biomonomere lassen sich insbesondere auch Polymersequenzen herstellen, die bisher aufgrund ihrer Länge bzw. der Anzahl der benötigten Kopplungsschritte nicht in ausreichender Qualität und Ausbeute in einer herkömmlichen Festphasensynthese hergestellt werden konnten.

30 Als Energiequelle, die für die Abspaltung der Schutzgruppen und die damit verbundene Aktivierung der reaktiven OH-Gruppen benötigt wird, eignen sich elektrisch ansteuerbare Leuchtdioden (LED) oder Laser Dioden (LD) . Wenn Leuchtdioden verwenden

det werden, so ist es vorteilhaft wenn sie energiereiche Strahlung im UV-Bereich abstrahlen. UV-Licht hat sich für die Abspaltung von Schutzgruppen als besonders geeignet erwiesen. Als UV-Leuchtdioden sind z.B. bestimmte Verbindungen aus III-V Halbleiter zu nennen. So emittiert z.B. eine LED aus Galliumnitrid (GaN) Licht der Wellenlänge 380nm. (siehe u.a. Rep. Prog. Phys. 61 (1998) 1-75; Group III nitride semiconductors for short wavelength -light-emitting devices). Durch die Verwendung von AlGaN Verbindungen können darüber hinaus Wellenlängen zwischen 200 und 360 nm erreicht werden. Besonders bevorzugt sind mehrere LEDs und/oder die Signalverarbeitung/Ansteuerung in einem Substrat monolithisch integriert.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform besteht der Träger nicht nur aus einer Anordnung von lichtemittierenden Dioden, sondern er weist zusätzlich Detektoren auf. Durch die Verbindung der Synthese der Biomoleküle mit einem Detektor, der als Kamera ausgebildet ist, kann auf jeden externen Nachweis verzichtet werden. Der Detektor selbst weist Interaktionen zwischen den auf der Oberfläche der Matrix synthetisierten Biopolymeren und Testproben nach. Unter Interaktionen werden dabei alle Wechselwirkungen zwischen Biopolymeren und weiteren Molekülen verstanden, insbesondere die Bildung von kovalenten Bindungen, ionischen Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräften und Wasserstoffbrücken-bindungen. Als Testproben kommen alle Arten von biologischen oder künstlichen Proben in Frage, insbesondere Blutproben, Patientenmaterial, Abstriche, Nasen- und Rachenspülungen, Hautschuppen und Speichelproben. Diese Testproben weisen ihrerseits Rezeptoren oder Liganden auf, die mit den Biopolymeren (ihrerseits Liganden oder Rezeptoren) wechselwirken. Wird beispielsweise als Biopolymer



eine einzelsträngige Nukleinsäure (einzelsträngige DNA, RNA, einzelsträngige cDNA) verwendet, so kann der zu diesem Nukleinsäurestrang komplementäre Einzelstrang aus der Testprobe durch Hybridisierung der beiden komplementären Stränge nachgewiesen werden. Eine derartige Hybridisierung stellt eine Rezeptor/Liganden Reaktion im Sinne der Erfindung dar. Der Nachweis der Interaktionen zwischen Biopolymeren und Testproben erfolgt über chemische bzw. biochemische Reaktionen. Hierfür ist insbesondere die Lumineszenz geeignet. Jedoch können auch andere Nachweisverfahren über Streptavidin oder über radioaktive Markierung aber auch markierungsfreie Methoden (siehe z.B. Souteyrand, E., Cloarec, J.P., Martin, J.R., Wilson, C., Lawrence, I., Mikkelsen S., Lawrence, M.F. 1997. Direct detection of the hybridisation of synthetic homo-oligomer DNA sequences by field effect. J. Phys. Chem. B, 1001, 2980 sowie DE 4318519 C2 „Elektrochemischer Sensor“) verwendet werden. Besonders bevorzugt sind diese Sensoren und deren Signalverarbeitung in das Substrat monolithisch integriert.

20

Es hat sich als besonders vorteilhaft erwiesen, wenn die Einheit aus Matrix und Energiequelle sehr kompakt ist und der mittlere Abstand zwischen Matrix und Energiequelle weniger als 10  $\mu\text{m}$  beträgt.

25

Durch diesen geringen Abstand findet die Biopolymersynthese in unmittelbarer Nähe zur Energiequelle statt. Die Startergruppen bzw. die wachsenden Biopolymere befinden sich so in räumlicher Nähe zu den Leuchtdioden, die das zur Abspaltung der Schutzgruppen benötigte UV-Licht emittieren. Durch die räumliche Nähe zwischen Startergruppen und Leuchtdioden können Streulichteffekte sowie Beugungseffekte des Lichtes effizient vermieden werden. Der geringe Abstand zwischen Matrix

30

und Energiequelle kann insbesondere durch die direkte Beschichtung der UV-emittierenden Lichtdioden mit der Matrix erreicht werden. Als Matrix eignet sich in einem solchen Fall Glycidoxypropyltrimethoxysilan, das in einem Beschichtungs-  
5 vorgang auf die Leuchtdioden aufgebracht werden kann.

Diese Ausführungsform der Erfindung ist zusätzlich in Fig. 1 dargestellt. Der Träger 1 weist eine Energiequelle 5 und eine Matrix 3 auf, auf deren Oberfläche die Biopolymere 7 synthetisiert werden. Die Energiequelle 5 ist als LED ausgebildet.  
10 Die LED weist einen pn-Übergang mit einem Isolator 9 auf. An diesem pn-Übergang werden Photonen erzeugt und ist deshalb die Energiequelle 5. Der mittlere Abstand zwischen der Matrix 3 und der Energiequelle 5 von weniger als 10  $\mu\text{m}$  ist durch den  
15 Isolator 9 bedingt.

Eine alternative Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist in Fig. 3 dargestellt. Der Träger 1 weist wiederum die Matrix 3 und die Energiequelle 5 auf. Die Energiequelle 5 besteht in dieser Ausführungsform in einer Vielzahl von LEDs,  
20 so dass auf der Matrix 3 gleichzeitig eine Vielzahl von Biopolymeren 7 synthetisiert werden können (Arrayanordnung).

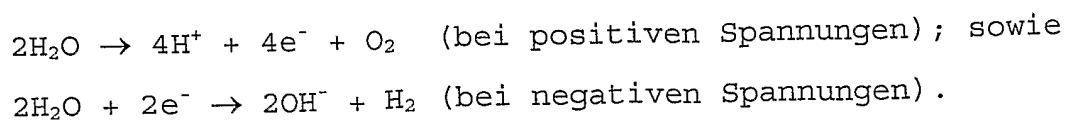
Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein  
25 Verfahren zur Synthese von Biopolymeren, in dem der erfindungsgemäße Träger verwendet wird. Dieser Träger wird bereitgestellt, anschließend werden Teilbereiche der Matrix durch Abspalten der Schutzgruppen in den ausgewählten Teilbereichen gezielt aktiviert. Daran anschließend werden Biomonomere, die  
30 ihrerseits Schutzgruppen aufweisen zugeführt, wobei die Biomonomere mit den gezielt aktivierten Teilbereichen der Matrix interagieren. Die aufeinanderfolgenden Zyklen von gezieltem Aktivieren von Teilbereichen der Matrix, dem Zuführen von ge-

geschützten Biomonomeren sowie dem Interagieren der Biomomere mit den gezielt aktivierten Teilbereichen der Matrix wird solange wiederholt, bis das gewünschte Biopolymer entstanden ist. Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens wird stets die Energie, die zur gezielten Aktivierung von Teilbereichen der Matrix benötigt wird, innerhalb des Trägers emittiert. Hierfür eignet sich besonders die kompakte Einheit aus Energiequelle und Matrix.

Um eine Vielzahl von unterschiedlichen Polymeren gleichzeitig zu synthetisieren, werden die Teilbereiche mit Hilfe eines Computers ausgewählt und aktiviert.

Zur Abspaltung der Schutzgruppen zur Aktivierung der reaktiven Startergruppen, die bevorzugt OH-Gruppen sind, kann eine lokale pH-Wert Änderung verwendet werden. Hierfür weist der erfindungsgemäße Träger als Energiequelle eine Elektrodenstruktur auf. Durch Anlegen von Spannungen und Strömen können lokal sehr starke pH-Wert Änderungen erzeugt werden. Dabei können zwischen den einzelnen Elektroden pH-Wert Unterschiede von ca. 5 erreicht werden. Eine Entfernung der Schutzgruppen kann beispielsweise bei einem pH-Wert von 2 erfolgen. Durch die Elektrolyse von Wasser an der Elektrode wird eine basische Umgebung geschaffen, wenn an die Elektrode eine negative Spannung angelegt wird. Eine saure Umgebung kann durch das Anlegen einer positiven Spannung an die Elektrode geschaffen werden. Chemisch laufen folgende Reaktionen bei der Elektrolyse von Wasser an der Elektrode ab:

30



Bei einem neutralen pH-Wert von 7 sind die reaktiven Startergruppen durch intakte Schutzgruppen geschützt. Die Schutzgruppen werden selektiv durch eine positive Spannung an Mikroelektroden, die sich durch die Einheit aus Energiequelle und Matrix in unmittelbarer Nähe zu den Schutzgruppen befinden, entfernt, weil durch die positive Spannung ein lokaler pH-Wert Abfall erzeugt wird. Besonders vorteilhaft ist es weiterhin, wenn sich in unmittelbarer Nähe der Elektroden eine pH-Wert Messeinrichtung (pH-ISFET) befindet, mit deren Hilfe einerseits der bestehende pH-Wert detektiert werden kann und andererseits eine elektronische Ansteuerung der Elektrode erfolgen kann, wodurch eine lokale pH-Wert Änderung induziert wird.

Diese Anordnung ist zusätzlich in Fig. 4 gezeigt. Der Träger 1 weist eine Matrix 3 und eine Energiequelle auf, die als Elektroden 51 sowie 53 ausgebildet ist. Auf der linken Seite in Fig.4 sind Elektroden 51 gezeigt, die mit einer Spannung/Strom beaufschlagt sind. Der pH-Wert beträgt 7. Auf der rechten Seite sind Elektroden 53 gezeigt, die nicht mit einer Spannung/Strom beaufschlagt sind. Der pH-Wert beträgt 2. Die Nachweiseinrichtung 13, die als pH-ISFET ausgestaltet ist, dient der Detektion des von der Elektrode erzeugten lokalen pH-Wertes.

25

Für die Herstellung von Biopolymeren können im Rahmen der vorliegenden Erfindung beliebige Biomonomere verwendet werden. Insbesondere sind Nukleotide, Oligonukleotide insbesondere Tetramere, Aminosäuren, Peptide, Saccharide, insbesondere Mono- und Disaccharide und/oder deren Derivate bzw. Analoga geeignet.

30

Die Biomomere können für verschiedene Screening-Verfahren von einer cDNA-, RNA-, genomischen DNA-library und/oder einer Peptid-library abgeleitet sein.

5 Es hat sich als besonders vorteilhaft erwiesen, die Biomomere in einer Speiseeinrichtung zuzuführen. Weitere, für den Aufbau der Biopolymere vorteilhafte Reaktionsschritte wie Waschschritte können ebenfalls in der Speiseeinrichtung stattfinden. In der Speiseeinrichtung wird die Oberfläche mit  
10 den entsprechenden Reaktionslösungen, insbesondere den Biomomeren benetzt bzw. beschichtet. Die Speiseeinrichtung kann als Mikrofluidikküvette bzw. Mikrofluidikkammer ausgebildet sein. Um Verunreinigungen zu vermeiden, hat sich wenigstens eine Zuführeinrichtung für Reaktionslösungen bzw. Biomomere  
15 sowie mindestens eine, von der Zuführeinrichtung räumlich getrennte Abführeinrichtung, als vorteilhaft erwiesen. Die Oberseite der Mikrofluidikküvette dient dabei gleichzeitig als Lichtfalle, so dass Fehlbelichtungen des Trägers, die durch Streulicht induziert wurden, ausgeschlossen werden können.  
20 Besonders vorteilhaft ist es, wenn auf den Chip Kanäle entweder monolithisch oder hybrid aufgebracht sind, so daß Streulicht von anderen LEDs oder ähnlichem verhindert werden.

Diese Ausführungsform ist zusätzlich in Fig. 2 gezeigt. Der  
25 Träger 1 weist eine Matrix 3, eine Energiequelle 5 sowie einen Isolator 9 auf. Die Synthese der Biopolymere 7 findet in Vertiefungen der Matrix 3 statt, die als Kanäle 11 ausgebildet sind.

30 Darüber hinaus hat es sich als vorteilhaft erwiesen, elektrische Felder zu verwenden, um geladene Biomomere zu den aktivierten Teilbereichen der Matrix zu bringen. Die Teilbereiche der Matrix werden durch Anlegen von mindestens einem e-

lektrischen Feld ausgewählt. Hierfür werden die Schutzgruppen vollständig entfernt, anschließend die geladenen Biomomere sequentiell zugeführt. Die geladenen Biomomere werden an den ausgewählten Stellen durch das elektrische Feld angezogen, während sie an unerwünschten Stellen elektrisch abgestoßen werden. So kann ein Biopolymer durch sequentielle Zugabe der vier verschiedenen, mit Schutzgruppen modifizierten Basen Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin aufgebaut werden. Durch eine entsprechende Anziehung bzw. Abstoßung der geladenen Nukleotide im elektrischen Feld werden sie an die gewünschte Position auf der Matrix gebracht. Nach Entfernung der Schutzgruppen der gebundenen Nukleotide wird erneut ein elektrisches Feld angelegt, und neue Nukleotide werden zugeführt bis die gewünschte Länge der Biopolymere erreicht ist.

15

Wenn im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens ein Träger mit einem Detektor, wie oben beschrieben, verwendet wird so kann das erfindungsgemäße Verfahren zusätzliche Schritte aufweisen. Die synthetisierten Biopolymere reagieren mit Testproben und die Rezeptor-Liganden-Komplexe werden über eine biochemische Reaktion insbesondere über eine Bio- und/oder Chemolumineszenz nachgewiesen.

20

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft einen Sensor-Chip, der den erfindungsgemäßen Träger aufweist. Darüber hinaus betrifft die Erfindung ein medizinisches, insbesondere ein diagnostisches oder therapeutisches Instrument, das ebenfalls den erfindungsgemäßen Träger umfasst. Werden beispielsweise rezeptive Elemente auf dem Sensor-Chip verwendet, insbesondere einem DNA-Sensor-Chip, so erlaubt die Erfindung eine ortsungebundene, tragbare DNA-Analytik unter der Verwendung von Probenmolekülen, deren Verwendungsmöglichkeit sich im Laufe der vorhergehenden Analysen ergeben hat. Ein

30

solcher Sensor-Chip bzw. medizinisches Instrument kann verwendet werden, um beim Ausbruch von Seuchen den bakteriellen oder viralen Erreger vor Ort zu identifizieren und infizierte von nicht infizierten Personen zu unterscheiden. Durch den  
5 Einbau logischer Schaltelemente können darüber hinaus komplexe Fragestellungen zur DNA-Analytik wie z.B. das Biopolymerdesign von dem Instrument selbst bearbeitet werden. Das medizinische Instrument kann daher aufgrund der vorgegebenen Problematik den entsprechenden Sensor-Chip selbst entwickeln,  
10 danach synthetisiert es die benötigten Biopolymere und wertet abschließend die Ergebnisse aus.

Die Figuren 1 bis 4 (Fig. 1 - 4) dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung. In ihnen zeigt:

15

Fig. 1 eine erste Ausführungsform der Erfindung, in der die Einheit zwischen Matrix und Energiequelle auf einfache Weise dargestellt ist;

20

Fig. 2 eine zweite Ausführungsform der Erfindung, in der die Biopolymere in Vertiefungen (Kanälen) der Matrix entstehen;

25

Fig. 3 eine weitere Ausführungsform der Erfindung, wobei eine Vielzahl von LED zur gleichzeitigen Synthese einer Vielzahl von Biopolymeren verwendet werden; sowie

30

Fig. 4 eine alternative Ausführungsform der Erfindung, in der die Entfernung der Schutzgruppen durch lokale pH-Wert Änderungen schematisch dargestellt ist.

Das folgende Beispiel dient der näheren Erläuterung der Erfindung und stellt ein einfaches Ausführungsbeispiel dar.

## Beispiel

### 1. Beschichten des Sensors

5

Ein CMOS-Sensor wird für 2 Stunden mit Silan beschichtet, indem er in eine Lösung aus 1 % Glycidoxypropyltrimethoxysilan (= 1 % GOPS) und 0,1 % Triethylamin in Toluol getaucht wird. Anschließend wird der Chip abgetropft und bei 120°C für ca. 2  
10 Stunden im Trockenschrank fixiert. Bis zur Beschichtung mit Schutzgruppen kann der vorbereitete Chip unter Feuchtigkeitsausschluss gelagert werden.

### 2. Funktionalisieren des silanbeschichteten Chips mit Hydroxylgruppen

15

Der vorbehandelte Chip wird für 1 Stunde in heißem (70°C) Ethylenglycol, das eine katalytische Menge an konzentrierter Schwefelsäure aufweist, inkubiert. Anschließend wird der Chip  
20 in Ethanol gewaschen und getrocknet. Nach dieser Behandlung weist der Chip eine hydroxyfunktionalisierte Oberfläche auf, wobei die OH-Gruppen die reaktiven Startergruppen darstellen.

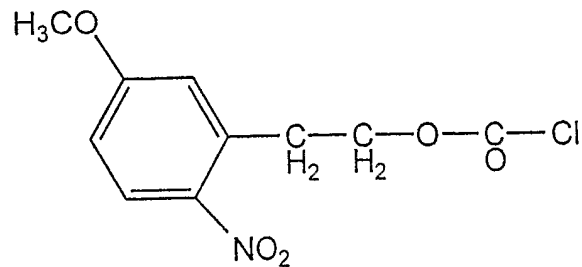
### 3. Aufbringen von Schutzgruppen auf die Startergruppen

25

Die Startergruppen auf der Oberfläche des Chips werden durch das Aufbringen einer pNPEOC-Gruppe geschützt. Hierfür wird der vorbehandelte Chip in einer Lösung aus 2-(5-Methoxy-2-nitrophenyl)-ethoxycarbonylchlorid in Dichlormethan für 4  
30 Stunden bei -15°C unter Lichtausschluss inkubiert. Die Schutzgruppe weist die folgende chemische Formel auf:



5



10 Anschließend wird der Chip in kaltem Dichlormethan gespült.  
 Bis zur Verwendung wird der Chip trocken und lichtgeschützt  
 aufbewahrt.

4. Synthese von Biopolymeren auf dem vorbehandelten Chip un-  
 ter Verwendung von UV-Licht

15

Der vorbehandelte Chip wird in eine Speisekammer eingesetzt  
 und die Schutzgruppen werden an den vorbestimmten Bereichen  
 durch Aktivieren von UV-Leuchtdioden für 2 Minuten selektiv  
 abgespalten. Anschließend wird der Chip in wasserfreiem Ace-  
 20 tonitril gespült und mit einem ersten Nukleotid, das in Ace-  
 tonitril gelöst ist, inkubiert. Hierfür werden handelsübliche  
 Nukleotide mit pNEPOC-Schutzgruppen verwendet. Anschließend  
 wird der Chip nochmals mit Acetonitril gewaschen, und durch  
 erneute selektive Belichtung werden andere bzw. weitere  
 25 Schutzgruppen entfernt. Auf diese Weise können alle Positio-  
 nen, an denen Adenin-, Guanin-, Cytosin- oder Thymidin-  
 modifizierte Nukleotide eingebaut werden sollen, selektiv  
 entschützt werden. Nach Kopplung aller vier Nukleotide befin-  
 det sich wieder eine pNPEOC-Schutzschicht auf allen Positio-  
 30 nen auf dem Chip, und es kann anschließend durch gezieltes  
 Entschützen und Zugabe der Nukleotide die nächste Nukleotid-  
 schicht an aufgebaut werden.

Beispiele für handelsübliche Thymidin bzw. Cytosinderivate:

- 5'-O-(2-(2-Chlor-6-nitrophenyl)ethoxycarbonylthymidin-3'-O(( $\beta$ -cyanoethoxy)(N,N-diisopropylamino)phosphoramidit)

5

- 5'-O-(2-(2-Chlor-6-nitrophenyl)ethoxycarbonyl)-N-4-(4-nitrophenyl)ethoxycarbonyl)-2'-desoxycytidin-3'-O(( $\beta$ -cyanoethoxy)(N,N-diisopropylamino)phosphoramidit)

## Bezugszeichenliste

	1	Träger
	3	Matrix
5	5	Energiequelle
	51	Elektroden - pH = 7
	53	Elektroden - pH = 2
	7	Biopolymer
	9	Isolator
10	11	Kanäle
	13	Nachweiseinrichtung

Patentansprüche

- 5 1. Träger zur Synthese von organischen Polymeren, insbesondere Biopolymeren mit einer Matrix, auf deren Oberfläche die Biopolymere synthetisiert werden und einer Energiequelle zur gezielten Aktivierung von Teilbereichen der Matrix, wobei die Biopolymere an den aktivierten Teilbereichen der Matrix synthetisiert werden, dadurch gekennzeichnet, dass die Matrix und die Energiequelle eine Einheit bilden.
- 10 2. Träger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Matrix eine quellbare, dreidimensionale Polymerschicht mit reaktiven Startergruppen ist.
- 15 3. Träger nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerschicht aus unvernetzten oder vernetzten, insbesondere kreuzvernetzten Polymeren mit einem geringen Kreuzvernetzungsgrad besteht.
- 20 4. Träger nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerschicht eine Stärke zwischen 30 und 3000 nm aufweist.
5. Träger nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die gequollene Polymerschicht eine Stärke von 50 bis 500 nm aufweist.
- 25 6. Träger nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die reaktiven Startergruppen direkt oder über weitere funktionelle Gruppen kovalent mit der Polymerschicht verbunden sind.

7. Träger nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die reaktiven Startergruppen OH-Gruppen sind.
8. Träger nach einem der Ansprüche 2 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die reaktiven Startergruppen durch nicht-reaktive Schutzgruppen geschützt sind.
9. Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Biopolymere Rezeptoren, Liganden, Nucleinsäuren, Oligonukleotide, Proteine, Peptide, Polysaccharide, Lipide und/oder deren Derivate bzw. Analoga sind.
10. Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Energiequelle mindestens eine elektrisch ansteuerbare Leuchtdiode (LED) oder mindestens eine Laser Diode (LD) ist.
11. Träger nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Leuchtdioden energiereiche Strahlung im UV-Bereich emittieren.
12. Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger weiterhin mindestens einen Detektor aufweist.
13. Träger nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Detektor als Kamera ausgebildet ist.
14. Träger nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass der Detektor Interaktionen zwischen den auf der Oberfläche der Matrix synthetisierten Biopolymeren und Testproben nachweist.

15. Träger nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Testproben Liganden, Rezeptoren, Proteine, Antikörper, Peptide, Nukleinsäuren und/oder deren Derivate bzw. Analoga aufweisen.
- 5 16. Träger nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass der Nachweis der Interaktionen über eine (bio-)chemische Reaktion, insbesondere über Lumineszenz, radioaktive und/oder nicht radioaktive Markierungsverfahren, insbesondere über Biotinylierungsreaktionen mit  
10 Streptavidin erfolgt.
17. Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass der mittlere Abstand in der Matrix immobilisierter Biomoleküle und der Energiequelle weniger als 10  $\mu\text{m}$  beträgt.
- 15 18. Träger nach einem der Ansprüche 10 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die UV-emittierenden Leuchtdioden mit der Matrix, insbesondere mit einem Glycidoxypropyltrimethoxysilan beschichtet sind.
19. Träger nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch  
20 gekennzeichnet, dass die Energiequelle monolithisch in dem Träger integriert ist.
20. Verfahren zur Synthese von Biopolymeren, das die Schritte umfasst:
- (a) Bereitstellen eines Trägers nach einem der Ansprüche  
25 1 bis 19;
- (b) Gezieltes Aktivieren von Teilbereichen der Matrix durch Abspalten der Schutzgruppen in den ausgewählten Teilbereichen;

- (c) Zuführen von Biomonomeren, die ihrerseits Schutzgruppen aufweisen;
- (d) Interagieren der Biomonomere mit den gezielt aktivierten Teilbereichen der Matrix aus Schritt (b);
- 5 (e) ggf. Wiederholen der Schritte (b) bis (d); dadurch gekennzeichnet, dass
- die Energie zur Aktivierung in Schritt (b) innerhalb des Trägers emittiert.
21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass
- 10 die Teilbereiche mit Hilfe eines Computers ausgewählt und aktiviert werden.
22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Schutzgruppen durch lokale pH-Wert Änderungen abgespalten werden.
- 15 23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, der lokale pH-Wert durch mindestens eine Elektrode, die mit einer positiven Spannung beaufschlagt ist, geändert wird.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Biomonomere Nukleotide, Oligonukleotide, insbesondere Tetramere, Aminosäuren, Peptide,
- 20 Saccharide, insbesondere Mono- und Disaccharide und/oder deren Derivate bzw. Analoga sind.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Biomonomere von einer cDNA-, RNA-, genomischen DNA-library und/oder einer Peptid-library abgeleitet sind.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Biomonomere in einer Speiseeinrichtung zugeführt werden.
27. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Speiseeinrichtung als Mikrofluidikküvette bzw. -kammer ausgebildet ist, die wenigstens eine Zuführeinrichtung für Biomonomere sowie mindestens eine von der Zuführeinrichtung räumlich getrennte Abführeinrichtung aufweist.
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass die Biomonomere geladen sind und die Teilbereiche der Matrix durch das Anlegen von mindestens einem elektrischen Feld ausgewählt werden.
29. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren zusätzlich die Schritte umfasst:
- (f) Reagieren der synthetisierten Biopolymere mit Testproben; und
  - (g) Nachweisen von Interaktionen zwischen über eine (bio-)chemische Reaktion, insbesondere über Lumineszenz, radioaktive und/oder nicht-radioaktive Markierungsverfahren, insbesondere über Biotinylierungsreaktionen mit Streptavidin erfolgt.
30. Sensor-Chip umfassend einen Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 19.
31. Medizinisches, insbesondere diagnostisches oder therapeutisches Instrument, umfassend einen Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 19.



Fig. 1

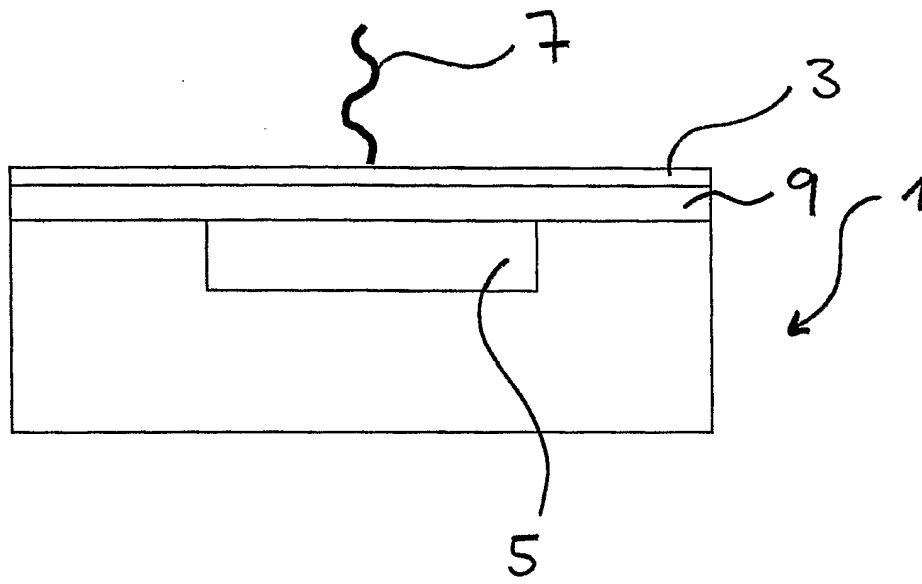


Fig. 2

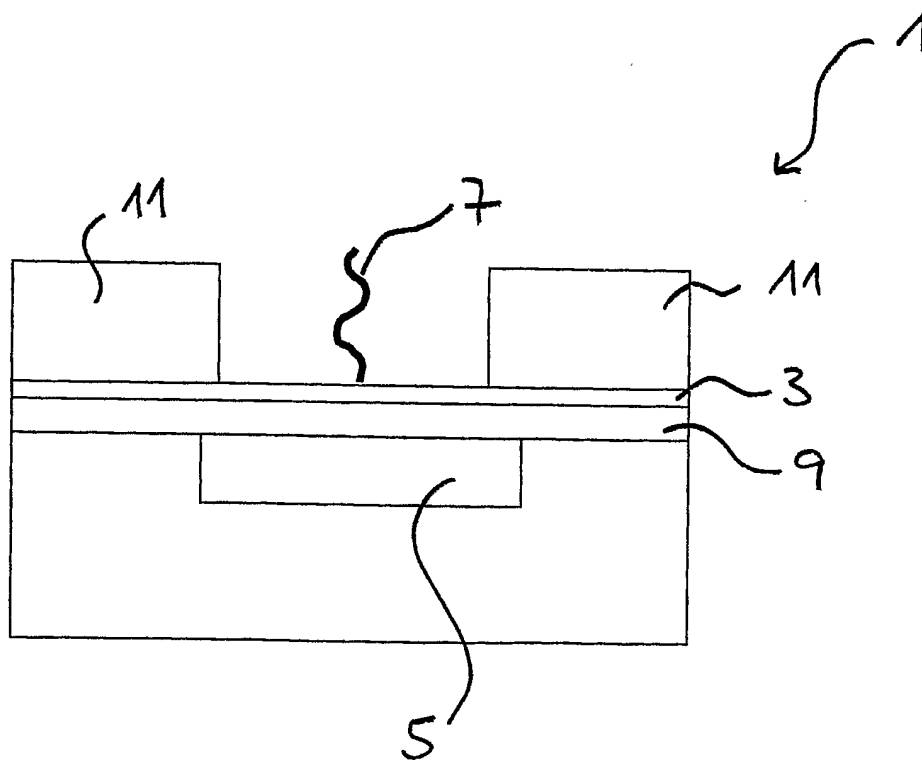


Fig. 3

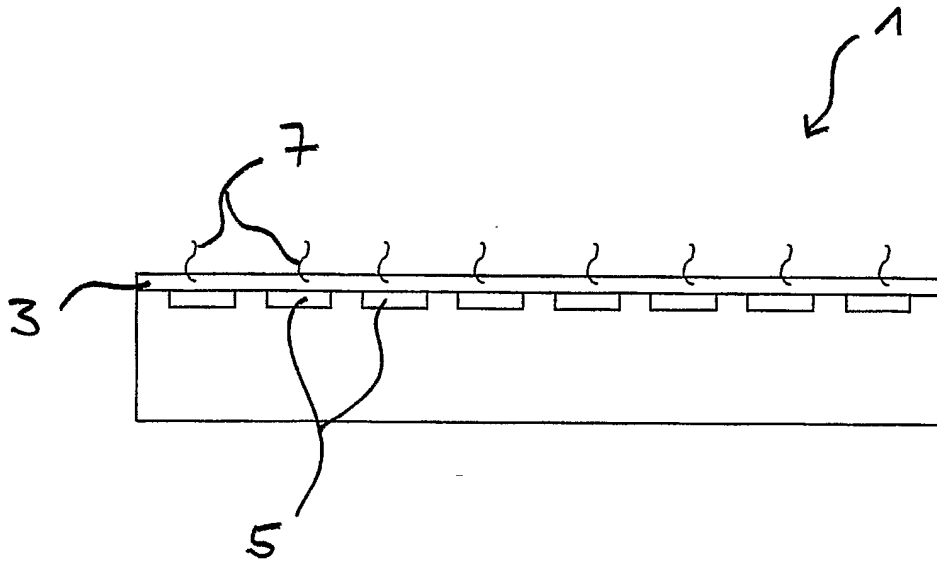
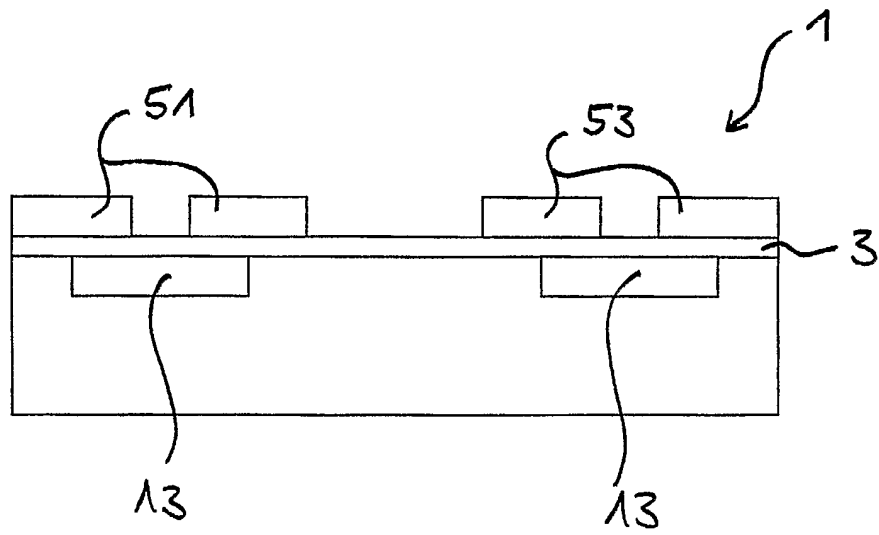


Fig. 4



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International Application No  
PCT/EP 02/12606

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 B01J19/00				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 B01J				
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				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	DE 199 40 752 A (FEBIT FERRARIUS BIOTECHNOLOGY) 27 April 2000 (2000-04-27)  column 7, line 64-66; claims 7,31-35,40; figure 6 column 11, line 11-29 column 6, line 13-18 column 5, line 11-18 column 6, line 34-41 column 7, line 15-19 column 3, line 37-53  --- -/--	1,9-11, 15,20, 21,24, 25,29-31		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.				
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.				
° Special categories of cited documents :				
<table style="width:100%; border: none;"> <tr> <td style="width:50%; border: none; vertical-align: top;">                     *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                 </td> <td style="width:50%; border: none; vertical-align: top;">                     *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.                      *&amp;* document member of the same patent family                 </td> </tr> </table>			*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
*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  <p align="center">3 February 2003</p>		Date of mailing of the international search report  <p align="center">11/02/2003</p>		
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  <p align="center">Jourdan, A</p>		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 02/12606

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>US 6 280 595 B1 (MONTGOMERY DONALD D) 28 August 2001 (2001-08-28)</p> <p>claims 1,5,8-17; figure 6; example 2 column 22, line 53,54 column 15, line 51-56 column 11, line 2-16 column 15, line 40-46 column 29, line 50-54 column 24, line 37 -column 25, line 9</p>	<p>1-3,6-9, 17,19, 20, 22-24, 28,30,31</p>
X	<p>US 5 936 730 A (YU HUINAN ET AL) 10 August 1999 (1999-08-10) column 4, line 45-47; claims 1,2,8; figure 2 column 3, line 13-47</p>	<p>1,10,19, 30,31</p>
X	<p>US 5 965 452 A (KOVACS GREGORY T A) 12 October 1999 (1999-10-12)</p> <p>column 8, line 30-65; claims 1,5,6,14,17,19,20,31; figure 7</p>	<p>1,9, 12-16, 30,31</p>
A	<p>WO 93 22480 A (ISIS INNOVATION ;SOUTHERN EDWIN (GB)) 11 November 1993 (1993-11-11)</p>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP 02/12606

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19940752	A	27-04-2000	DE 19940752 A1	27-04-2000
			AU 3157000 A	04-09-2000
			WO 0049142 A1	24-08-2000
			EP 1153127 A1	14-11-2001
			JP 2002536977 T	05-11-2002
			AU 5625399 A	21-03-2000
			AU 749884 B2	04-07-2002
			AU 5742499 A	21-03-2000
			AU 5971399 A	21-03-2000
			CA 2341894 A1	09-03-2000
			CA 2341896 A1	09-03-2000
			DE 19940749 A1	18-05-2000
			DE 19940750 A1	21-06-2000
			DE 19940751 A1	02-03-2000
			DE 19940810 A1	11-05-2000
			WO 0012123 A2	09-03-2000
			WO 0013017 A2	09-03-2000
			WO 0013018 A2	09-03-2000
			EP 1115424 A1	18-07-2001
			EP 1117478 A2	25-07-2001
			EP 1117996 A2	25-07-2001
			JP 2002523781 T	30-07-2002
			JP 2002525587 T	13-08-2002
			JP 2002525590 T	13-08-2002
US 6280595	B1	28-08-2001	US 6093302 A	25-07-2000
			AU 2221699 A	26-07-1999
			CA 2317537 A1	15-07-1999
			CN 1291350 T	11-04-2001
			EP 1048072 A1	02-11-2000
			JP 2002501307 T	15-01-2002
			WO 9935688 A1	15-07-1999
US 5936730	A	10-08-1999	WO 0014514 A1	16-03-2000
US 5965452	A	12-10-1999	AU 722148 B2	20-07-2000
			AU 3717697 A	02-02-1998
			BR 9710271 A	10-08-1999
			CA 2259406 A1	15-01-1998
			CN 1255197 A	31-05-2000
			EP 0920624 A1	09-06-1999
			JP 2001525921 T	11-12-2001
			KR 2000023659 A	25-04-2000
			NZ 333947 A	24-11-2000
			WO 9801758 A1	15-01-1998
			US 2002131899 A1	19-09-2002
			US 2002127733 A1	12-09-2002
			US 6225059 B1	01-05-2001
			US 6254827 B1	03-07-2001
			US 6258606 B1	10-07-2001
			US 2002029971 A1	14-03-2002
WO 9322480	A	11-11-1993	DE 69316203 D1	12-02-1998
			DE 69316203 T2	16-04-1998
			EP 0637344 A1	08-02-1995
			WO 9322480 A1	11-11-1993
			JP 2693645 B2	24-12-1997
			JP 7508071 T	07-09-1995

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP 02/12606

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9322480	A	US 5667667 A	16-09-1997

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

International Aktenzeichen

PCT/EP 02/12606

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 7 B01J19/00

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

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 B01J

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

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 199 40 752 A (FEBIT FERRARIUS BIOTECHNOLOGY) 27. April 2000 (2000-04-27)  Spalte 7, Zeile 64-66; Ansprüche 7,31-35,40; Abbildung 6 Spalte 11, Zeile 11-29 Spalte 6, Zeile 13-18 Spalte 5, Zeile 11-18 Spalte 6, Zeile 34-41 Spalte 7, Zeile 15-19 Spalte 3, Zeile 37-53  ---  -/-	1,9-11, 15,20, 21,24, 25,29-31

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

3. Februar 2003

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

11/02/2003

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

Jourdan, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationaler Aktenzeichen  
PCT/EP 02/12606

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>US 6 280 595 B1 (MONTGOMERY DONALD D) 28. August 2001 (2001-08-28)</p> <p>-----</p> <p>Ansprüche 1,5,8-17; Abbildung 6; Beispiel 2 Spalte 22, Zeile 53,54 Spalte 15, Zeile 51-56 Spalte 11, Zeile 2-16 Spalte 15, Zeile 40-46 Spalte 29, Zeile 50-54 Spalte 24, Zeile 37 -Spalte 25, Zeile 9</p> <p>-----</p>	<p>1-3,6-9, 17,19, 20, 22-24, 28,30,31</p>
X	<p>US 5 936 730 A (YU HUINAN ET AL) 10. August 1999 (1999-08-10) Spalte 4, Zeile 45-47; Ansprüche 1,2,8; Abbildung 2 Spalte 3, Zeile 13-47</p> <p>-----</p>	<p>1,10,19, 30,31</p>
X	<p>US 5 965 452 A (KOVACS GREGORY T A) 12. Oktober 1999 (1999-10-12)</p> <p>-----</p> <p>Spalte 8, Zeile 30-65; Ansprüche 1,5,6,14,17,19,20,31; Abbildung 7</p> <p>-----</p>	<p>1,9, 12-16, 30,31</p>
A	<p>WO 93 22480 A (ISIS INNOVATION ;SOUTHERN EDWIN (GB)) 11. November 1993 (1993-11-11)</p> <p>-----</p>	



**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 02/12606

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19940752	A	27-04-2000	DE 19940752 A1	27-04-2000
			AU 3157000 A	04-09-2000
			WO 0049142 A1	24-08-2000
			EP 1153127 A1	14-11-2001
			JP 2002536977 T	05-11-2002
			AU 5625399 A	21-03-2000
			AU 749884 B2	04-07-2002
			AU 5742499 A	21-03-2000
			AU 5971399 A	21-03-2000
			CA 2341894 A1	09-03-2000
			CA 2341896 A1	09-03-2000
			DE 19940749 A1	18-05-2000
			DE 19940750 A1	21-06-2000
			DE 19940751 A1	02-03-2000
			DE 19940810 A1	11-05-2000
			WO 0012123 A2	09-03-2000
			WO 0013017 A2	09-03-2000
			WO 0013018 A2	09-03-2000
			EP 1115424 A1	18-07-2001
			EP 1117478 A2	25-07-2001
			EP 1117996 A2	25-07-2001
			JP 2002523781 T	30-07-2002
			JP 2002525587 T	13-08-2002
JP 2002525590 T	13-08-2002			
US 6280595	B1	28-08-2001	US 6093302 A	25-07-2000
			AU 2221699 A	26-07-1999
			CA 2317537 A1	15-07-1999
			CN 1291350 T	11-04-2001
			EP 1048072 A1	02-11-2000
			JP 2002501307 T	15-01-2002
			WO 9935688 A1	15-07-1999
US 5936730	A	10-08-1999	WO 0014514 A1	16-03-2000
US 5965452	A	12-10-1999	AU 722148 B2	20-07-2000
			AU 3717697 A	02-02-1998
			BR 9710271 A	10-08-1999
			CA 2259406 A1	15-01-1998
			CN 1255197 A	31-05-2000
			EP 0920624 A1	09-06-1999
			JP 2001525921 T	11-12-2001
			KR 2000023659 A	25-04-2000
			NZ 333947 A	24-11-2000
			WO 9801758 A1	15-01-1998
			US 2002131899 A1	19-09-2002
			US 2002127733 A1	12-09-2002
			US 6225059 B1	01-05-2001
			US 6254827 B1	03-07-2001
			US 6258606 B1	10-07-2001
			US 2002029971 A1	14-03-2002
WO 9322480	A	11-11-1993	DE 69316203 D1	12-02-1998
			DE 69316203 T2	16-04-1998
			EP 0637344 A1	08-02-1995
			WO 9322480 A1	11-11-1993
			JP 2693645 B2	24-12-1997
			JP 7508071 T	07-09-1995

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/12606

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9322480 A		US 5667667 A	16-09-1997