



(51) Internationale Patentklassifikation:

B01J 19/00 (2006.01) **G01N 33/543** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) **C40B 60/14** (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2013/062373

(22) Internationales Anmeldedatum:
14. Juni 2013 (14.06.2013)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2012 105 165.8 14. Juni 2012 (14.06.2012) DE
13154826.5 11. Februar 2013 (11.02.2013) EP

(71) Anmelder: **ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT
FREIBURG** [DE/DE]; Fahnenbergplatz, 79085 Freiburg
(DE).

(72) Erfinder: **ROTH, Günter**; Eulenberg 26, 79110 Freiburg
(DE).

(74) Anwalt: **LANGE, Sven**; HERTIN Anwaltssozietät,
Kurfürstendamm 54-55, 10707 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

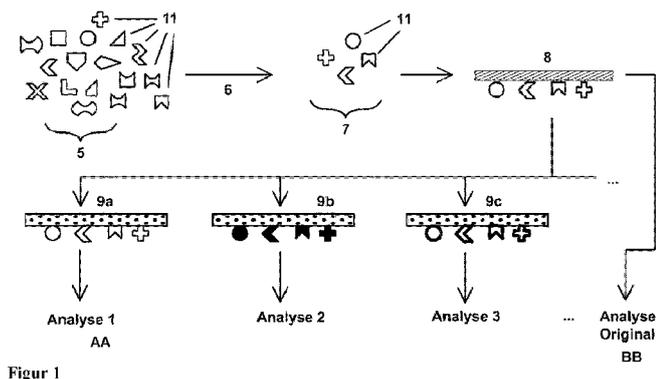
(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ,
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,
SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz
3)

(54) Title: ANALYSIS METHOD ON THE BASIS OF AN ARRAY

(54) Bezeichnung : ANALYSEVERFAHREN AUF BASIS EINES ARRAYS



Figur 1

FIG. 1:
AA Analysis 1
BB Original analysis

(57) Abstract: The invention relates to a method for analyzing molecular properties and/or reaction conditions, comprising a step of providing a first store having a first surface, wherein a specific selection of sample molecules is directly or indirectly bonded to the surface in a defined arrangement, a step of producing at least two transfer stores, wherein at least two additional surfaces are provided, and a reaction step, selected from the group comprising a transfer reaction, an amplification reaction, and/or a derivatization reaction, whereby product molecules can arise and said product molecules and/or the sample molecules bond to the surfaces, wherein there is a clear spatial association between the sample molecules of the first store and the product molecules and/or sample molecules of the transfer stores and the first store, the transfer stores, the sample molecules, the product molecules, the transfer reaction, the amplification reaction, and/or the derivatization reaction is analyzed.

(57) Zusammenfassung:

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]





Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Analyse von molekularen Eigenschaften und/oder Reaktionsbedingungen, umfassend die Bereitstellung eines ersten Speichers, umfassend eine erste Oberfläche, wobei eine gezielte Auswahl von Probemolekülen an die Oberfläche in einer definierten Anordnung direkt oder indirekt gebunden wird, die Herstellung von mindestens zwei Transferspeicher, wobei mindestens zwei weitere Oberflächen bereitgestellt werden, einen Reaktionsschritt, ausgewählt aus der Gruppe Übertragungsreaktion, Amplifikationsreaktion und/oder Derivatisierungsreaktion, wodurch Produktmoleküle entstehen können und diese Produktmoleküle und/oder die Probemoleküle an die Oberflächen binden, wobei eine ein-eindeutige räumliche Zuordnung zwischen den Probemolekülen des ersten Speichers und den Produktmolekülen und/oder Probemolekülen der Transferspeicher besteht und die Analyse des ersten Speichers, der Transferspeicher, der Probemoleküle, der Produktmoleküle, der Übertragungsreaktion, Amplifikationsreaktion und/oder Derivatisierungsreaktion erfolgt.

STAND DER TECHNIK

Die Optimierung biochemischer Prozesse, das Auffinden eines Moleküls mit gewünschten
20 Eigenschaften oder die Ableitung eines modifizierten Moleküls mit verbesserten
Eigenschaften werden oft in einem als „Screening“ bezeichneten Ansatz realisiert.
„Screening“ bedeutet das sehr umfangreiche, mehr oder weniger systematische Austesten
einer Vielzahl von Reaktionsbedingungen mit einer Vielzahl von Reaktanden und
Interaktionspartnern. Ebenso fällt die Verbesserung einer biochemischen Prozessführung,
25 beispielsweise die Konzentration des Enzyms, des Substrates, die Auswahl von Cofaktoren,
deren Konzentration, Einstellen des pH-Wertes etc. ebenfalls unter das „Screening“. Die
Optimierung von Moleküleigenschaften durch geringfügige Modifikation wird oft auch als
„Scan“ oder „Lead Optimisation“ bezeichnet.

Nahezu sämtliche Screening-Verfahren starten mit einem umfangreichen Pool an
30 unterschiedlichen Molekülen. Diese Pools werden oft als „molekulare Bibliothek“ bezeichnet

und können bis zu 10^{15} und mehr unterschiedliche Moleküle enthalten. Bei solch einer hohen Anzahl ist es verständlich, dass nicht jedes Molekül einzeln untersucht wird, sondern über der Pool mehr und mehr eingeschränkt wird, bis eine handhabbare Anzahl, meist einige Zehn bis Tausend, Moleküle verbleiben. Diese Kandidaten besitzen aufgrund der
5 vorangegangenen Selektion meist die gewünschten Eigenschaften. Dies kann nun in einzelnen Tests validiert und eine Rangliste erstellt werden, die angibt, wie gut die einzelnen Moleküle den gewünschten Eigenschaften entsprechen. Die am höchsten gelisteten Kandidaten werden dann detailliert untersucht und im Erfolgsfall weiter optimiert oder direkt verwendet.

Insgesamt sind die Screeningverfahren sehr zeit-, arbeits- und kostenintensiv. Sie starten zwar
10 mit bis zu 10^{15} Molekülen, aufgrund der umfangreichen Nachuntersuchungen der Kandidaten, werden oft nur einige Dutzend bis Hundert ausgewählte Moleküle (meist die mit der höchsten Leistung) final im Detail untersucht. Da viele der Selektionsmethoden einen Bias aufweisen, der neben der gewünschten molekularen Eigenschaft noch weitere andere Nebeneigenschaften bevorzugt oder statistisch ausselektiert, kommt es vor, dass auch
15 interessante Moleküle mit gewünschten Eigenschaften (aber ohne die Nebeneigenschaften), diesem Bias zum Opfer fallen und daher nicht mehr im finalen Pool enthalten sind.

Dieser Bias wird umso größer je öfter eine Selektion wiederholt wird, oder je stärker eine Selektionsbedingung gesetzt ist, da nun sowohl die Eigenschaft als auf die Neben-Eigenschaft für das Weiterkommen des Moleküls stärker ausschlaggebend ist. Eine Selektion mit einem
20 schwachen Selektionsdruck wiederum, lässt sehr viele Moleküle weiter kommen, was wiederum bedingt, dass man mehr Kandidaten untersuchen muss.

Es wäre generell wünschenswert final mehr Kandidaten gleichzeitig und vor allem einfach untersuchen zu können, insbesondere, wenn durch eine schwache Selektion 10^4 bis 10^6 Moleküle im finalen Pool verbleiben.

25 Sofern ein oder mehrere Moleküle mit den gewünschten Eigenschaften identifiziert wurden, kann die Molekülstruktur zufällig oder gezielt an einzelnen oder mehreren Positionen variiert werden. Diese neu erzeugte Mutations-Bibliothek wird dann nochmals nach dem Molekül mit der besten Übereinstimmung zu gewünschten Eigenschaften selektiert. Auch hier unterliegt man dem Bias der Selektion und der geringen Anzahl der final analysierten Kandidaten.

30 Um hier ein besseres Verständnis für die Abhängigkeit von Eigenschaften von den Änderungen am Molekül zu bekommen, werden oft sogenannte „Scans“ durchgeführt.

Hierbei wird stets eine Position des Moleküls gezielt verändert und die
Eigenschaftsänderungen vermessen. Dies findet insbesondere bei DNA, RNA und Proteinen
Anwendung. Besonders bekannt ist bei Proteinen der sogenannte „Alanin-Scan“. Hierbei wird
jede Aminosäureposition des Proteins jeweils durch Alanin ersetzt. Findet an einer
5 biochemisch wichtigen Stelle eine Substitution gegen ein meist unwirksames Alanin statt, so
besitzt das Protein keine Aktivität mehr. So lassen sich insbesondere bei Enzymen wichtige
Positionen feststellen. Allerdings gibt es neben Alanin noch 19 weitere natürliche
Aminosäuren. Sofern man zwei Aminosäure-Positionen verändern will, müssen bereits 400
unterschiedliche Proteine erzeugt werden, für eine Änderung in n Positionen erhält man für
10 alle 20 Aminosäuren 20^n unterschiedliche Varianten eines Proteins. Bereits bei 5
Aminosäurepositionen bedeutet dies 3,2 Millionen unterschiedlicher Proteine. Diese Zahl
wiederum ist weder einzeln herstellbar, noch vermessbar. Daher begnügt man sich meist mit
dem reinen Alanin-Scan, und versucht daraus eine optimierte Molekülsequenz und
Molekülstruktur abzuleiten.

15 Auch hier wäre es wünschenswert, final mehr Kandidaten gleichzeitig und einfach
untersuchen zu können. Insbesondere bei Mutations-Bibliotheken mit 10^4 bis 10^6
Mutanten ist es von hohem Interesse alle Mutanten zu analysieren, da dies dann zum einen
den Alanin-Scan überflüssig macht und zum anderen einen umfassenden Datensatz liefert, da
man alle möglichen Varianten untersucht hat. Dies würde eine breitere Anwendung einer
20 nachfolgenden Simulation oder einer systematischen Analyse von Wirkgruppen erlauben.

Zusammenfassend lässt sich das Screening in drei große Bereiche aufteilen:

1. Die gezielte Optimierung eines biochemischen Prozesses oder einer molekularen
Interaktion, durch Anpassung von Umgebungsbedingung wie Salzgehalt, Temperatur,
pH, Zusatzstoffe, Co-Enzyme etc..
- 25 2. Das Auffinden eines Moleküls mittels Selektion aus einer molekularen Bibliothek mit
bis zu 10^{15} Individuen aufgrund von gewünschten Eigenschaften, die durch die
Selektion bevorzugt werden.
3. Das Optimieren eines Moleküls oder einer molekularen Grundstruktur mittels einer
Selektion aus einer molekularen Bibliothek aufgrund von gewünschten Eigenschaften,
30 die durch die Selektion bevorzugt werden, oder mittels einer systematischen
Untersuchung von Varianten der molekularen Grundstruktur (Scans).

Screeningverfahren sind vor allem für die Pharmazie von extrem hohem Interesse, weshalb es in diesem Bereich eine Vielzahl von Techniken gibt, um eine möglichst hohe Anzahl von Molekülen herzustellen und zu untersuchen.

Im Stand der Technik lassen sich drei Hauptstrategien unterscheiden.

- 5 In der sogenannten Einzelherstellung wird jede Substanz jeweils einzeln hergestellt und vermessen. Dieser Ansatz hat den Vorteil, dass man von Beginn an weiß, um welches Molekül es sich handelt und die genaue Molekülstruktur bekannt ist. Der große Nachteil ist darin zu sehen, dass es technisch nahezu unmöglich und außerdem extrem teuer ist mehr als 10^6 verschiedene Moleküle zu erzeugen oder zu vermessen.
- 10 In der sogenannten kombinatorischen beziehungsweise randomisierten Herstellung werden die Substanzen nicht einzeln, sondern in Gemischen hergestellt. Dies hat den Vorteil, dass so hochparallel Millionen von Substanzen hergestellt werden können. Ein Nachteil ist jedoch, dass eine Mischung der Moleküle erzeugt wird und somit unbekannt ist, welches der Moleküle nun ein Signal erzeugt. Das heißt es muss nachträglich eine Strukturaufklärung des
- 15 gefundenen Moleküls betrieben werden.
- In der kombinatorischen Herstellung und Vermehrung beziehungsweise Display-Methoden handelt es sich um eine spezielle biochemische Prozessführung. Zunächst wird mittels kombinatorischer Herstellung eine Substanzbibliothek auf Basis von DNA oder RNA aufgebaut. Diese DNA oder RNA wird dann in biologisch aktive „Komponenten“ (z.B.
- 20 Phagen, E.coli, Hefezellen, Ribosomen und so weiter) verpackt beziehungsweise angelagert. Durch Aktivierung eines Vermehrungsimpulses lassen sich dann diese Moleküle vermehren und somit amplifizieren. Die Amplifikation kann in biologisch natürlicher Weise, z.B. Wachstum oder Infektion von Bakterien und Pilzen, oder durch artifizielle Systeme, z.B. DNA-Polymerase, RNA-Polymerase, Enzymsysteme, erfolgen. Vorteil dieser
- 25 Substanzbibliotheken ist, dass sie einmalig herzustellen sind und dann „weitergezüchtet“ werden können. Diese Verfahren sind aber zumeist auf DNA, RNA und Proteine limitiert, da synthetische Wirkstoffe einer Biosynthese nicht in diesem Maße zugänglich sind wie DNA, RNA oder Proteine.
- Ist eine hohe Anzahl an Molekülen erwünscht, so besitzt die Synthese in Mikrotiterplatten oft
- 30 nur eine geringe Kapazität und scheidet daher als Mittel der Wahl aus. Für die Einzelherstellung von 10^4 und mehr Molekülen haben sich Mikroarrays bewährt. Hierbei ist

es möglich mittels Drucktechniken oder Lithografie bis zu 10^6 unterschiedliche DNA-Stränge zu erzeugen. Somit stellen die Mikroarrays den Stand der Technik für die Einzelherstellung von Molekülen dar. Allerdings besitzen diese Systeme nur eine begrenzte Synthese-Effizienz (für DNA ~99% pro Base, für Proteine ~96-98,5% pro Aminosäure), was dazu führt, dass bei langen oder komplexen Molekülen mit hohen Verunreinigungen zu rechnen ist beziehungsweise die maximale Länge der erzeugbaren Moleküle ist durch diese Verunreinigungen limitiert wird.

Für die kombinatorische Herstellung hat sich im Stand der Technik die kombinatorische Festphasensynthese bewährt. Hierbei werden die Moleküle auf Partikel gebunden. Der als „Split and mix“ oder „Split and recombine“ bezeichneten Prozess sorgt durch die Reaktionsführung dafür, dass auf jedem Partikel genau eine einzige Molekülsorte aufgebaut wird. Ein Nachteil ist, dass das zufällige Splitten verhindert, dass mehr a priori festgestellt werden kann, auf welchem Partikel welche Substanz aufgebaut wurde.

Im Folgenden bedient man sich dann wahlweise dreier unterschiedlicher Strategien.

In der ersten Strategie trennt man die Partikel voneinander und spaltet, jeweils separat, die Moleküle von dem Partikel ab. So erhält man eine Reinst-Lösung des Moleküls und kann dann in klassischer Weise z.B. einer Mikrotiterplatte Teile dieser Lösung untersuchen. Sofern das Molekül die gewünschten Eigenschaften aufweist, wird die Reinst-Lösung analysiert und damit die Struktur des Moleküls aufgeklärt. Es gibt Bestrebungen die Partikel für die Synthese zu markieren, so dass der Weg jedes einzelnen Partikels während der Synthese verfolgt werden kann. Diese Verfahren bedingen jedoch ein Markierungssystem des Beads und eine Überwachung des Aufenthaltsortes des Beads zwischen den Verteilungsschritten. Aus Gründen der Syntheseeffizienz muss trotzdem nochmals nachgeprüft werden, ob der erzeugte Partikel auch korrekt prozessiert wurde. Diese Verfahren haben jedoch den Vorteil, dass man bei Messungen von 10^4 Komponenten und mehr anhand von chemischen Ähnlichkeiten auf funktionelle Strukturen zurück schließen kann, da davon auszugehen ist, dass die Synthese in der Mehrheit alle Fälle korrekt ist.

Bei der zweiten Strategie werden sämtliche Partikel einer Messung unterzogen und die Signalgenerierung so ausgelegt, dass die Partikel mit den Molekülen, welche die gewünschte Eigenschaft besitzen aussortiert werden können. Dann werden diese Partikel vereinzelt, die Moleküle abgespalten und die Reinst-Lösung dann analysiert. Auch hier werden Verfahren

angestrebt, welche die einzelnen Partikel während ihres Syntheseweges aufzeichnen und so ohne eine nachfolgende Analyse eine Strukturbestimmung zulassen.

Bei der dritten Strategie spaltet man sämtliche Moleküle von allen Partikeln ab und erzeugt so ein Gemisch mit Teils bis zu 10^{15} unterschiedlichen Molekülen. Diese Gemische können
5 auch über andere Reaktionsführungen erzeugt werden, bei denen die Festphase dann nicht „sortenrein“ nur eine Art an Molekül trägt, sondern ein Gemisch an Molekülen. Das erzeugte Gemisch wird dann einer Selektion unterworfen, das heißt einer Prozessführung, die dafür sorgt, dass sich Moleküle mit der gewünschten Eigenschaft anreichern und Moleküle mit unerwünschten Eigenschaften abgereichert werden. Gegebenenfalls werden mehrfach
10 hintereinander Selektionen durchgeführt und so die gewünschten Moleküle mehr und mehr angereichert. Sofern die Anreicherung hoch genug ist, kann eine Detektion und Identifikation der Moleküle erfolgen. Oft ist jedoch eine direkte Identifikation der Moleküle nicht möglich. Einzig im Falle von DNA, RNA und in speziellen Fällen für Proteinen ist es ebenfalls möglich einen Amplifikationsschritt einzufügen, der eine weitere Anreicherung zulässt bis
15 eine Identifikation stattfinden kann.

Mit den aktuellen Methoden aus dem Stand der Technik ist es nicht möglich in einfacher Art und Weise viele, z.B. 10^2 bis 10^6 und mehr, Moleküle hochparallel gekoppelt sowohl in Bezug auf ihrer molekulare Struktur als auch in ihren Eigenschaften zu charakterisieren. Meist findet zunächst eine Selektion statt und aus dem finalen Pool werden dann einzelne
20 Moleküle in ihrer Struktur aufgeklärt, da man davon ausgeht, dass die besten Moleküle am häufigsten im Pool vorkommen sollten. Um den Pool vollständig auszuschöpfen, ist es daher notwendig, alle Moleküle des Pools zu analysieren und möglichst direkt auf ihre Eigenschaft hin zu charakterisieren.

Weiterhin ist es bei den Methoden im Stand der Technik nötig mehr als einen
25 Selektionsschritt durchzuführen, um einen finalen Pool an Molekülen zu erzeugen. Im Falle der Displaymethoden kann es sich dabei um 3 bis 5 Wiederholungen (Phage-Display) bis hin zu 10 bis 20 Wiederholungen (SELEX) handeln. Dies ist zeit- und kostenintensiv. Das Hauptproblem liegt jedoch in dem Bias der Selektion, der dafür sorgt, dass auch optimale Moleküle wegen unpassender Nebeneigenschaften wie z.B. schlechter Amplifizierbarkeit im
30 SELEX unterdrückt werden, auch wenn diese die besten Eigenschaften aufweisen.

Daher war es Aufgabe der Erfindung eine Methode bereitzustellen, welche es erlaubt einen großen Pool von 10^2 bis 10^6 und mehr Molekülen gleichzeitig zu prozessieren und dabei deren Struktur als auch Eigenschaften gekoppelt zu analysieren.

5 BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

Gelöst wird die Aufgabe durch die unabhängigen Ansprüche. Vorteilhafte Ausführungsformen finden sich in den abhängigen Ansprüchen.

In einer ersten bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Analyse von molekularen Eigenschaften und/oder Reaktionsbedingungen, umfassend die
10 folgenden Schritte

a) Bereitstellung eines ersten Speichers, umfassend eine erste Oberfläche, wobei eine Auswahl von Probemolekülen an die Oberfläche in einer definierten Anordnung direkt oder indirekt gebunden wird,

b) Herstellung von mindestens zwei Transferspeicher umfassend

15 die Bereitstellung von mindestens zwei weiteren Oberflächen, und

einen Reaktionsschritt, ausgewählt aus der Gruppe Übertragungsreaktion, Amplifikationsreaktion und/oder Derivatisierungsreaktion, wodurch Produktmoleküle entstehen können und diese Produktmoleküle und/oder die Probemoleküle an die Oberflächen binden, wobei eine ein-eindeutige
20 räumliche Zuordnung zwischen den Probemolekülen des ersten Speichers und den Produktmolekülen und/oder Probemolekülen der Transferspeicher besteht,

c) Analyseschritt, umfassend das Analysieren des ersten Speichers, der Transferspeicher, der Probemoleküle, der Produktmoleküle, der Übertragungsreaktion, Amplifikationsreaktion und/oder
25 Derivatisierungsreaktion.

Bei dem beschriebenen Verfahren wird mit einem gezielt ausgewählten Pool von Probemolekülen, auf einem ersten Speicher ein Original erzeugt. Ein erster Speicher kann daher im Sinne der Erfindung auch als Original bezeichnet werden. Dieser Speicher zeigt eine

räumlich feste Anordnung der Probemoleküle. Jede Position auf dem Original ist dabei in eindeutiger Weise mit einem oder mehreren Probemolekülen verknüpft. Anhand dieses Originals werden dann mindestens zwei, bevorzugt eine Vielzahl, Transferspeicher hergestellt. Dabei sind verschiedene „Kopien“ möglich. Das heißt die hergestellten
5 Transferspeicher können sich unterscheiden. Anschließend können sowohl der erste Speicher als auch die hergestellten Transferspeicher beziehungsweise der Kopierprozess selbst analysiert werden. Dieses erfindungsgemäße Verfahren bietet daher eine Vielzahl von Kopie- und Analysemöglichkeiten die für zahlreiche Anwendungen und Fragestellungen eingesetzt werden können.

10 Es ist dabei besonders bevorzugt, dass die Auswahl (ii) von Probemolekülen durch eine gezielte Selektion erfolgt. Durch geschickte Kombination der Probemoleküle kann somit ein höherer Durchsatz erreicht werden, als es im Stand der Technik möglich ist. Die Auswahl von Probemolekülen kann auf unterschiedliche Art erfolgen. Zum einen ist es mögliche eine gezielte Selektion aus einem großen Pool an Probemolekülen durchzuführen. Zum anderen ist
15 es aber auch im Sinne der Erfindung, dass ausgehend von einem kleinen Pool von Molekülen durch Mutationen ein Pool von Molekülen erzeugt wird, der mit dem erfindungsgemäßen Verfahren untersucht werden kann. Dies kann zum einem durch Mutation oder auch durch Permutationen von einzelnen bis hin zu wenigen Molekülen erzielt werden. Im Stand der Technik ist es unüblich, dass eine Selektion vor den Mikroarray durchgeführt wird, weshalb
20 es nicht zu erwarten war, dass die erfindungsgemäßen Vorteile unter anderem durch diesen Schritt erzielt werden konnten. Es ist dabei auch bevorzugt, dass die Probemoleküle aus einer Mutations-Bibliothek ausgewählt werden. Hierbei handelt es sich bevorzugt um eine molekulare Bibliothek, allerdings leiten sich alle Moleküle von einem Startmolekül ab. D.h. alle Moleküle der Bibliothek sind mit dem Startmolekül nahezu identisch und sind nur an
25 definierten Positionen variiert. Die Anzahl der Gesamtvariationen ist das Produkt der Variationen pro variiertes Position. Wird also ein DNA-Strang mit 100 Basen Länge nur an 20 Positionen variiert und an jede der variierten Stellen 4 verschiedene Basen eingebaut, so existieren 4^{20} Varianten. Je zwei Moleküle dieser DNA-Mutations-Bibliothek stimmen somit in mindestens 80 DNA-Basen miteinander überein.

30

Als Kopie wird im Sinne der Erfindung auch ein Amplifikat eines Probemoleküls, ein Derivat eines Probemoleküls oder ein transferiertes Probemolekül verstanden. Eine Kopie ist im Sinne der Erfindung stellt vor allem ein Produktmolekül beziehungsweise die Gesamtheit der

Produktmoleküle dar. Demnach werden als Kopie nicht nur identische Moleküle bezeichnet, sondern jede Art des Produktmoleküls die durch Schritt iv) entstehen können. Eine Kopie kann daher auch ein Amplifikat oder ein Derivat sein. Somit kann die Kopie eines DNA-Vorlagemoleküls zum Beispiel ein DNA-Produktmolekül aber auch ein RNA- oder ein Protein-Produktmolekül sein.

Es ist besonders bevorzugt, dass der Reaktionsschritt in einem zellfreien Reaktionssystem, besonders bevorzugt in einem zellfreien Expressionssystem stattfindet.

Ein Amplifikat eines Moleküls entsteht bevorzugt durch die Amplifikation eines ursprünglichen Moleküls. Das Amplifikat kann dabei identisch zum ursprünglichen Molekül sein, oder sich in eindeutiger Weise vom Molekül ableiten (z.B. wenn aus DNA entsprechende cDNA erzeugt wird).

Ein Derivat eines Moleküls, ist bevorzugt das oder diejenigen Moleküle, welche entstehen wenn ein Ursprungsmolekül umgewandelt wird oder wenn Amplifikate eines Moleküles erzeugt wurden und diese umgewandelt werden, oder Moleküle erzeugt wurden, die sich in direkter oder indirekter Weise vom ursprünglichen Molekül ableiten (z.B. DNA, die zunächst mittels PCR amplifiziert wurde und dann daraus RNA oder Protein erzeugt wird).

Die Erfindung stellt somit eine einzigartige Anwendung als neuartige Kombination aus Selektion, Mikroarray-Kopiertechnik, Screening und Prozessführung von Einzelmolekülen beziehungsweise Partikeln dar, so dass es möglich ist einen Pool aus Probemolekülen und Partikeln hochparallel räumlich zu separieren, vom Separationsmuster mehrfach Kopien der Moleküle anzufertigen und anhand dieser Kopien beziehungsweise des Kopierprozesses selbst sicher zu stellen, dass

- a) die Moleküle sortenrein vorliegen (eventuell vorliegende Kontaminationen werden im Analyseprozess mit detektiert),
- b) die Moleküle mindestens einmalig, vorzugsweise mehrfach auf eine andere Oberfläche kopiert werden können,
- c) die Moleküle bezüglich ihrer Molekularstruktur analysiert und identifiziert werden können, indem das Original oder eine der Kopien analysiert wird, und/oder
- d) die Eigenschaften der Moleküle während des Kopierprozesses oder durch Analyse der Kopie oder des Originals ermittelt werden.

Ein Vorteil der Erfindung liegt in dem Kopierschritt. Dieser Schritt liefert eine besonders gutes Ergebnis, da die Transferspeichers, bevorzugt „kopierten Mikroarrays“ in einer hohen Qualität bereitgestellt werden. Das heißt, dass unter anderem eine nicht zu erwartende Reinheit erzielt werden konnte. Außerdem ist der Vorgang selbst überraschend schnell. Im Stand der Technik ist das Kopieren von Arrays noch nicht etabliert, da diese Technik mit Schwierigkeiten, einem hohen Zeitaufwand und vor allem hohen Kosten verbunden ist. Durch die Erfindung wird hiermit erstmals ein Verfahren bereitgestellt, mit welchem diese Hindernisse überwunden werden können, sodass das Kopieren eines Arrays nun zu vielen verschiedenen Analyseverfahren, bevorzugt gleichzeitigen Analyseverfahren, eingesetzt werden kann.

Das System besitzt das Potential über mehrere Größenordnungen hinweg, von 10^2 bis 10^6 und mehr, unterschiedliche Probemoleküle zu erfassen und zu analysieren. Weitere Vorteile des Verfahrens sind die hohe Reinheit, mit welcher die Produktmoleküle nach dem Reaktionsschritt vorliegen. Außerdem können kleinere Volumina verwendet werden, was zu einer Ersparnis an Reaktionskomponenten und somit letztlich einer Gesamtkostenersparnis beiträgt. All diese Vorteile bringen somit zum einen eine Kostenreduktion aber auch einer Reduktion des Arbeitsaufwands mit sich, da die Zuverlässigkeit des Verfahrens besonders hoch ist und daher Tests nicht wiederholt werden müssen.

Besonders vorteilhaft ist die Flexibilität und Vielseitigkeit des Verfahrens. Es gibt zahlreiche Ausführungsformen und Anwendungsbereiche für das erfindungsgemäße Verfahren, sodass viele verschiedene Fragestellungen durch das Verfahren bearbeitet werden können.

Die Kernschritte der Methode können auch als

- Auswahl der Probemoleküle
- Erzeugung des Originals
- Erzeugung der Kopie(n)
- Durchführung der Analyse(n)

zusammengefasst werden.

Ein besonderer Vorteil der Erfindung ist, dass durch das erfindungsgemäße Verfahren möglich ist, besonders lange Probemoleküle wie Nukleinsäureabschnitte, zum Beispiel

genomische DNA, als Probemoleküle einzusetzen. Dies stellt einen enormen Vorteil gegenüber dem Stand der Technik dar. So wird in einem Artikel über Mikroarrays von Monya Baker („Microarrays, megasynthesis“, Nature Methods, 2011, vol. 8, pp. 457) zum Beispiel ausgeführt, dass Wissenschaftler unabhängig von der Verwendung einer

5 Oligonukleotidbibliothek immer danach streben mehr und längere Oligonukleotide bei einer geringeren Fehlerrate einsetzen oder untersuchen zu können („No matter how researchers intend to use libraries of oligonucleotides, they usually want more oligonucleotides, longer oligonucleotides and lower error rates.“). Außerdem wird in diesem Artikel der

10 Wissenschaftler Jay Shendure zitiert, der erklärt, dass sich bei einer möglichen Länge von 300 Basenpaaren oder sogar 1000 Basenpaaren eine Vielzahl von Möglichkeiten ergeben würden, die derzeit nicht umgesetzt werden können (“If [the achievable length] was 300 base pairs or even a kilobase, there are a lot of things one could do that one can’t do now.”). Genau dieses Problem kann durch die Erfindung gelöst werden. So können zum Beispiel erste Speicher und Transferspeicher mit DNA-Längen von bis zu 1500 Basenpaaren und auch deutlich mehr

15 problemlos ohne Qualitätsverlust hergestellt werden. Dies verdeutlicht, dass die Erfindung dazu beiträgt ein Problem zu lösen, welches die Fachwelt bis zum Prioritätszeitpunkt nicht befriedigend lösen konnte. Es bestand demnach ein dringendes Bedürfnis eine geeignete Lösung für diese Problem zu finden.

Als „erste Speicher“ können bevorzugt diverse Mikroarrays oder mikroarrayartige

20 Oberflächen dienen und es können mehrere, teils unterschiedlich geartete Kopien erzeugt und mittels unterschiedlicher Methoden analysiert werden. Die unterschiedlichen Ausführungsformen der einzelnen Schritte lassen sich nun frei kombinieren und erlauben somit eine Vielzahl von erzeugbaren Kopien und/oder Anwendungen. Im Folgenden werden die unterschiedlichen Ausführungsformen der Schritte beschrieben.

25 Bei der Erzeugung des ersten Speichers – im Sinne der Erfindung auch als Original bezeichnet – kann sowohl eine molekulare Bibliothek, ein davon abgeleiteter Pool oder aber auch eine Mischung aus Molekülen, verwendet werden. Die Moleküle können dabei frei in Lösung vorliegen, oder auch an Partikel oder Oberflächen gebunden sein. Oder die Molekülsorten können bereits einzeln voneinander getrennt vorliegen und werden dann auf

30 das Original verbracht. In Lösung können die Moleküle einzeln vorliegen oder zwei und mehr Sorten an Moleküle aneinander gekoppelt sein. Sofern mindestens zwei Molekülsorten aneinander gekoppelt sind, kann aus der Anwesenheit bzw. Analyse der einen Molekülsorte

auf die Anwesenheit und Struktur der zweiten Molekülsorte geschlossen werden (molekulares Tagging).

Eine Molekulare Bibliothek stellt bevorzugt ein Gemisch aus bis zu 10^{15} oder mehr unterschiedlichen Molekülen dar, die z.B. mittels kombinatorischer Chemie erzeugt wurden.

5 Meist haben die Moleküle einer Bibliothek ähnliche Grundstrukturen oder Strukturmuster, die zufällig miteinander kombiniert wurden. Die Anzahl der möglichen Moleküle berechnet sich als Produkt der einzelnen Variationsmöglichkeiten. Beispielsweise kann ein DNA-Strang pro Position 4 natürliche Bausteine enthalten. Dies bedeutet, dass eine kombinatorische Bibliothek eines 100 Basen langen DNA-Strangs bereits 4^{100} unterschiedliche DNA-
10 Moleküle enthält.

Es ist außerdem bevorzugt, dass die Probemoleküle an Partikel gebunden sind. Durch diese Ausführungsform kann eine besser und vor allem gezielte „Beladung“ des ersten Speichers erfolgen.

15 Um nun den ersten Speicher zu erzeugen, werden mittels geeigneter Restriktionen die Probemoleküle oder Partikel voneinander getrennt und orts aufgelöst an die Oberfläche des Speichers verbracht. Die Probemoleküle werden dabei so angelagert, dass diese ihre Ortsposition im Folgenden nicht mehr in einfacher Art und Weise verlassen können. Das Original stellt somit einen orts aufgelösten molekularen Speicher dar.

20 Beim Partikelspeicher wird der Speicher dadurch erzeugt, dass Partikel auf der Oberfläche angelagert werden. Jeder Partikel trägt dabei genau ein oder mehrere Molekülsorten. Die Trägeroberfläche kann dabei strukturiert sein und die Partikel auf der Strukturierung unterschiedlich positioniert werden. Sofern sich mindestens zwei Molekülsorten auf einem Partikel befinden, kann aus der Anwesenheit bzw. Analyse der einen Molekülsorte auf die Anwesenheit und Struktur der zweiten Molekülsorte geschlossen werden (molekulares
25 Tagging).

Es ist auch bevorzugt, dass der erste Speicher ein Partikel-Transferspeicher ist. Bei einem solchen Speicher werden die Partikel auf der Oberfläche angelagert. Jeder Partikel trägt dabei eine oder mehrere Molekülsorten. Die Trägeroberfläche kann dabei strukturiert sein und die Partikel auf der Strukturierung unterschiedlich positioniert werden. Es wird zumindest eine
30 Sorte Moleküle vom Partikel gelöst oder Derivate oder Amplifikate mindestens einer Sorte Moleküle des Partikels erzeugt und diese dann auf die Oberfläche des Transferspeichers

übertragen. Somit stellt der Transferspeicher eine Eigenkopie dar, da einige Moleküle der Partikel in den Speicher kopiert werden. Dabei ist es bevorzugt, wenn die Ortsinformation der Probemoleküle zum Partikel erhalten bleiben, das heißt die Position des Partikels und die Position der Probemoleküle können einander zugeordnet werden. Wahlweise kann der Partikel entfernt oder für einen späteren Molekültransfer oder die Erzeugung von Amplifikaten oder Derivaten von Molekülen verwendet werden.

Es ist auch bevorzugt, dass der erste Speicher ein Molekülspeicher ist. Beim Molekülspeicher als Original werden Moleküle wahlweise einzeln, in gekoppelter Form oder als Gemisch auf der Oberfläche angelagert. Die Trägeroberfläche kann dabei strukturiert sein, bevorzugte Positionen für die Anlagerung der Moleküle bieten und die Anlagerung auf der Strukturierung unterschiedlich positioniert werden. Die Moleküle verbleiben anfänglich im Molekülspeicher. Mittels einer Amplifikation und/oder Derivatisierung ist es zudem möglich den Molekülspeicher mit Amplifikaten oder Derivaten des oder der Moleküle, die anfänglich im ersten Speicher enthalten sind, zu belegen. Somit stellt der Molekülspeicher sozusagen eine Eigenkopie der originalen Moleküle dar und erlaubt damit eine Signalverstärkung. Es bleibt die Ortsinformation der Moleküle erhalten.

Es ist auch bevorzugt, dass der erste Speicher ein Eigenschaftsspeicher ist. Beim Eigenschaftsspeicher als Original werden bevorzugt identische Moleküle oder Partikel auf der Oberfläche angelagert. Die Trägeroberfläche kann dabei strukturiert sein und die Anlagerung auf der Strukturierung unterschiedlich positioniert werden. Der Eigenschaftsspeicher kann inhärent oder aufgrund eines äußeren Einflusses in jeder Speicherposition über unterschiedliche Eigenschaften verfügen. Dies kann aufgrund enthaltener Mikrofluidik, Mikroelektronik, der Oberflächen (Struktur, Beschichtung, Material etc.), oder Zugabe von Molekülen oder Partikeln oder einer Kombination dieser Möglichkeiten zu unterschiedlichen Eigenschaften führen. Diese Eigenschaften können Unterschiede diverser Natur sein (physikalisch, chemisch, biochemisch) und beispielsweise unterschiedliche Volumen, Oberfläche, Benetzbarkeit, pH-Wert, Salzgehalte, biochemische Inhaltsstoffe, elektrische Ladungen, elektrische, magnetische oder dielektrische Eigenschaften, osmotische Drücke oder Zusatzstoffe enthalten. Der Eigenschaftsspeicher wird vorzugsweise für die Optimierung einer biochemischen oder chemischen Reaktion eingesetzt und soll unterschiedliche Reaktionsbedingungen realisieren. Im üblichen Falle werden alle Speicherpositionen eines Eigenschaftsspeichers mit identischen Molekülen beladen.

Ein Fachmann ist in der Lage einen geeigneten ersten Speicher auszuwählen ohne dabei selbst erfinderisch tätig zu werden.

Sämtliche zuvor genannte erste Speicher können einen Mechanismus enthalten, der es erlaubt gezielt an einer Position innerhalb des Speichers die Moleküle freizusetzen. Dies kann über
5 Freisetzen der Moleküle mittels chemischer, elektrochemischer, photochemischer oder rein elektrischer/magnetischer, thermischer Mechanismen erfolgen. Im Falle von Partikelspeichern kann auch der komplette Partikel oder Teile desselben freigesetzt werden. Die so gewonnenen Moleküle stehen dann für eine weitere Untersuchung oder Modifikation bereit. Wahlweise kann auch vom Speicher eine Kopie angefertigt werden und von der Kopie die Moleküle
10 gezielt freigesetzt werden.

Folgende Mechanismen sind dabei bevorzugt:

- Ortsaufgelöste Zugabe von Säure oder Base, die eine molekulare Umlagerung bewirkt, die die Moleküle freisetzt
- Ortsaufgelöste Erzeugung von Säure oder Base mittels Licht oder Elektrizität, durch
15 Elektrolyse oder Photolyse
- Spaltung einer chemischen Gruppe durch lokales Erzeugen von Ladungen mittels Elektrizität oder Licht
- Umlagerung einer chemischen Gruppe durch Einstrahlung von Licht
- Ablösen von elektrostatisch angebundenen Molekülen an geladenen Oberflächen durch lokale Änderung des elektrischen Feldes oder des Redoxpotentials mittels
20 Elektrizität oder Licht
- Umlagerung einer chemischen Gruppe durch lokales Erhitzen oder Abkühlen
- Umlagerung der chemischen Gruppen aufgrund von Zusatzstoffen oder einer Kombination der oben genannten Effekte
- Zersetzung eines Partikels und damit Freisetzung der Moleküle mittels Wärme, Schmelzen, Zerschneiden durch Laserlicht oder Auslösen eines Zerfallsprozesses
25 mittels Licht, Chemie oder Elektromagnetischer Effekte

- Erzeugen von physikalischen Kräften auf einen Partikel mittels elektrischer, magnetischer, elektromagnetischer oder dielektrischer Felder oder durch gezieltes Überhitzen von Flüssigkeit in der Nähe des Partikels um durch entstehende Expansion ein Kraft zu erzeugen
- 5
- Mechanisches Abtragen der Oberflächen auf denen die Moleküle aufgebracht sind oder mechanisches Greifen des Partikels, um diesen aus dem Original zu entfernen

Bei der Erzeugung der Kopie können unterschiedliche Reaktionen genutzt werden, um eine molekulare Kopie des Originals zu erzeugen. In allen folgenden beschriebenen Ausführungsformen zur Erzeugung einer Kopie, wird die bevorzugte Ausführungsform des ersten Speichers in Form des Speichers mit Kavitäten dargestellt. Die Erzeugung der Kopie für andere Speicher geschieht in ähnlicher Art und Weise.

10

Zur Erzeugung einer Kopie im Sinne der Erfindung können wahlweise die Probemoleküle aus dem Speicher herausgelöst und übertragen werden, oder die beinhaltenden Moleküle werden amplifiziert und übertragen oder amplifiziert und derivatisiert und bestimmte erzeugte Derivate oder Amplifikate werden auf die Kopie übertragen. Die Derivate können dabei identisch zu den ursprünglichen Molekülen sein, oder in direkter oder indirekter Form davon abgeleitet und sind damit dem ursprünglichen Molekül eindeutig zuordenbar. Beispielsweise kann von einer DNA, zunächst eine identische DNA erzeugt werden, diese dann mittels eines Enzymsystems an einer bestimmten Sequenzposition einen Austausch einer Base erfahren und dann diese modifizierte DNA in RNA oder gar Protein derivatisiert werden. Da die ursprüngliche Sequenz der DNA bekannt ist, ist auch die Sequenz der veränderten DNA bekannt und damit auch der entstehenden RNA beziehungsweise des Proteins. Somit hat eine Kopie folgende Eigenschaften:

15

20

- Es gibt eine ein-eindeutige räumliche Zuordnung zwischen Original und Kopie, so dass aufgrund der Kenntnis des Ortes auf der Kopie der Ort auf dem Original zugeordnet werden kann und ein Ort auf dem Original kann einem Ort auf der Kopie in eindeutiger Art und Weise zugeordnet werden.
- 25
- Es lassen sich ein-eindeutige molekulare Verwandtschaften zuordnen, so dass aus der Analyse eines Moleküls auf einer der Kopien oder dem Original abgeleitet werden kann, um welches Molekül es sich auf jeder der Kopien und dem Original handelt.
- 30

Des Weiteren kann die Oberfläche einer Kopie planar oder strukturiert sein und selbst wieder ein Original darstellen, von dem weitere Kopien erzeugt werden können. Folgende Übertragungstechniken für die Originale sind denkbar.

5 Es ist bevorzugt, dass der Transferspeicher durch eine Übertragungs-Kopie entsteht. Bei einer Übertragungs-Kopie werden die Moleküle des ersten Speichers direkt auf die Oberfläche des Transferspeichers übertragen. Dies bedingt, dass die Moleküle von der Oberfläche des Originals freigesetzt, übertragen und auf der Kopie angebunden werden.

10 Es ist auch bevorzugt, dass der Transferspeicher durch eine Derivatisierungs-Kopie entsteht. Bei der Derivatisierungs-Kopie werden die Probemoleküle des Originals derivatisiert und diese Derivate dann auf die Kopie übertragen. Derivate können zum Beispiel eine Umwandlungen der ursprünglichen Moleküle darstellen, weshalb hier eine Verarmung stattfindet, bis keinerlei Derivate mehr erzeugt werden können, da dann alle Moleküle aufgebraucht wurden.

15 Es ist auch bevorzugt, dass der Transferspeicher durch eine Eigenerzeugungs-Kopie entsteht. Bei der Eigenerzeugungs-Kopie besitzen die Moleküle des Originals eine katalytische, enzymatische und/oder chemische Aktivität, die dafür sorgt, dass zugegebene Moleküle amplifiziert und/oder derivatisiert werden. Diese selbsterzeugten Moleküle werden dann wahlweise direkt, oder mittels einer weiteren Derivatisierung oder Amplifikation auf die Kopie übertragen.

20 Es ist auch bevorzugt, dass der Transferspeicher durch eine Kombinations-Kopie entsteht. Bei der Kombinations-Kopie stellt eine parallele oder serielle Verkettung aus Derivatisierung, Amplifikation oder Selbsterzeugung zur Erzeugung der Kopie dar. Es werden mindestens zwei Prozesse verschaltet, die wahlweise Amplifikation oder Derivatisierung oder Selbsterzeugung sein können. Im bevorzugten Falle erfolgt zunächst eine Amplifikation, da
25 hier dann die originalen Moleküle erhalten bleiben, und dann eine Derivatisierung der Amplifikate oder eine weitere Amplifikation der Amplifikate. Diese können dann im Folgenden weiter derivatisiert und/oder amplifiziert werden, um so die gewünschten Moleküle zu erzeugen. Im Falle einer anfänglichen Derivatisierung und einer folgenden Amplifikation wird das Original langsam aufgebraucht. Dieses Aufbrauchen ist dann jedoch
30 deutlich langsamer als bei der reinen Derivatisierungskopie und erlaubt demgegenüber eine Erzeugung von mehr Kopien bevor das Original aufgebraucht wurde.

Prinzipiell lassen sich beliebig viele Amplifikations-, Derivatisierungs- und Selbsterzeugungsschritte koppeln bevor eine Kopie erzeugt wird.

Es ist auch bevorzugt, dass der Transferspeicher durch eine Mehr-Molekül-Kopie entsteht. Bei der Mehr-Molekül-Kopie werden mindestens zwei Sorten an Molekülen von einer
5 Position kopiert. Dabei wird für jede der Molekülsorten mindestens eine der zuvor genannten Kopieerzeugungen (direkter Transfer, Amplifikation, Derivatisierung, Selbsterzeugung, Kombination) verwendet oder miteinander kombiniert.

Es ist auch bevorzugt, dass der Transferspeicher durch eine Flüssigkeitskopie entsteht. Die Flüssigkeitskopie wird auf den ersten Speicher ein umsetzbares Molekül gegeben, das durch
10 oder im Vorhandensein geeigneter Moleküle auf dem Original selbst derivatisiert oder amplifiziert wird. D.h. es entsteht eine räumliche Zuordnung zwischen Entstehen der Derivate beziehungsweise Amplifikate und den darunterliegenden Molekülen. Diese Derivate und Amplifikate der zugegebenen Moleküle müssen nicht notwendiger Weise auf eine Kopie übertragen werden. In dieser bevorzugten Ausführungsform ist bereits die Aussage
15 ausreichend, dass die Moleküle des Originals, die erzeugende Eigenschaft für Derivate und Amplifikate für andere Moleküle besitzen. Dieser Fall liegt vor, wenn z.B. verschiedene Enzyme auf dem Original vorliegen.

Es ist auch bevorzugt, dass der Transferspeicher durch eine DNA-zu-DNA-Kopie entsteht. Die Die DNA-zu-DNA-Kopie entspricht einer Amplifikationskopie. Hierbei befindet sich im
20 Original DNA, die mittels einer DNA-Polymerase nochmals zu DNA amplifiziert wird. Die entstandenen Amplifikate können dann direkt auf die Kopie gebunden werden, oder mittels einer Fest-Phasen-Polymerasereaktion auf die Oberfläche nochmals amplifiziert werden.

Bei ersten Versuchen wurden DNA-Moleküle als Probemoleküle ausgewählt. Durch die Reaktionsschritte sollte eine Protein-“Kopie” erzeugt werden. Es zeigte sich überraschend,
25 dass die Produktmoleküle (hier Proteine) im miniaturisierten System deutlich schneller als erwartet ablief. Insbesondere im Vergleich zum DAPA-System wurde eine 3 bis 10-fach schnellere Reaktionszeit erreicht, so dass zukünftig eine Protein-Kopie nicht mehr nach etwa 90 min, sondern schon nach etwa 15 min beendet werden kann.

Bei der DNA-zu-DNA-Kopie (Probemolekül ist DNA und Produktmolekül ist DNA), konnte
30 ein DNA-Mikroarray als Transferspeicher von bisher nicht bekannter Reinheit erzeugt werden. Die Reinheit ist so hoch, dass sie voraussichtlich nicht ein Mal mit einem

Sequenzierprozess erfasst werden kann, da dieser starker fehlerbehaftet ist, als der verwendete Kopierprozess.

Somit erlaubt der das Verfahren in einem ersten Teilabschnitt eine schnellere, synthetisch reinere, weniger material- und arbeitsintensive Herstellung von Mirkoarrays (in Form von Transferspeichern), die zu einer drastischen Kostenersparnis führt und zudem die Erzeugung von Mikroarrays erlaubt, wie sie mit bisherigen Verfahren nicht herstellbar sind, oder nur unter hohem Zeit-, Kosten- und Arbeitsaufwand zu realisieren wären, der jedoch nicht rentable ist. Dadurch werden im zweiten Teilabschnitts des Verfahrens Analysen möglich, welche im Stand der Technik so nicht realisiert werden können.

10 Weiterhin reichte vorteilhafterweise bereits eine DNA aus, um eine Kopie einer kompletten Volumeneinheit zu erreichen.

Es ist auch bevorzugt, dass der Transferspeicher durch eine DNA-zu-RNA-Kopie entsteht.

Die DNA-zu-RNA-Kopie entspricht in einer bevorzugten Ausführungsform einer

Amplifikationskopie. Hierbei befindet sich im Original DNA, die mittels einer RNA-

15 Polymerase direkt zu RNA amplifiziert wird. Die entstandenen Amplifikate können dann direkt auf die Kopie gebunden werden. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform kann die DNA-zu-RNA-Kopie als Kombinationskopie stattfinden. Hierbei wird die DNA des Originals zunächst als DNA mittels einer DNA-Polymerase amplifiziert und dann in einer Festphasenreaktion die DNA nochmals mittels einer RNA-Polymerase zu

20 oberflächengebundener RNA amplifiziert.

Es ist auch bevorzugt, dass der Transferspeicher durch eine DNA-zu-Protein-Kopie entsteht.

Die DNA-zu-Protein-Kopie entspricht in einer bevorzugten Ausführungsform einer

Kombinationskopie, bei der mehrere Reaktionsschritte hintereinandergeschaltet sind. Die

DNA des Originals wird zunächst mittels einer RNA-Polymerase in RNA und diese RNA

25 dann mittels Ribosome in ein entsprechendes Protein umgeschrieben. Das entstehende Protein bindet dann an die Oberfläche. In einer anderen vorteilhaften Ausführungsform ist es aber auch möglich die Reaktion in zwei Teilschritte zu zerlegen. Zunächst wird anhand der DNA des Originals mittels einer RNA-Polymerase RNA hergestellt, welche dann an die

Kopieroberfläche angebonden wird. In diesem Zwischenzustand kann die Kopie verbleiben,

30 bis ein Enzymgemisch hinzugegeben wird, welches die RNA als Template nutzt und daraus dann ein entsprechendes Protein erzeugt, welches sich in der direkten Umgebung der RNA niederschlägt.

Es ist auch bevorzugt, dass der Transferspeicher durch eine RNA-zu-Protein-Kopie entsteht. Die RNA-zu-Protein-Kopie entspricht in einer bevorzugten Ausführungsform einer Kombinationskopie, da mit der RNA mittels eines Enzymgemisches ein entsprechendes Protein hergestellt wird. Das erzeugte Protein wird auf die Kopie übertragen.

5 Es ist auch bevorzugt, dass der Transferspeicher durch eine RNA-zu-DNA-Kopie entsteht. Die RNA-zu-DNA-Kopie entspricht in einer bevorzugten Ausführungsform einer Kombinationskopie, aus der RNA mittels Reverse Transkriptase ein entsprechendes DNA erzeugt wird. Dann kann die DNA wahlweise direkt auf die Kopie übertragen werden oder
10 zusätzlich mittels einer DNA-Polymerase amplifiziert und dann erst übertragen werden. Bei einer solche Ausführungsform kann vorteilhafterweise die RNA wie auch die entstandene DNA analysiert werden.

Es ist auch bevorzugt, dass der Transferspeicher durch eine RNA-zu-RNA-Kopie entsteht. Die RNA-zu-RNA-Kopie entspricht in einer bevorzugten Ausführungsform einer Kombinationskopie, da die RNA mittels Reverse Transkriptase zu DNA derivatisiert wird.
15 Danach kann dann die DNA wieder in RNA mittels einer RNA-Polymerase amplifiziert werden, oder zunächst mittels einer DNA-Polymerase in DNA amplifiziert werden, die dann von einer RNA-Polymerase in RNA amplifiziert wird. Die RNA wird dann auf die Kopie übertragen.

Anschließend werden Analysen durchgeführt. Dabei können sowohl die Analyse der Struktur
20 der Moleküle, als auch deren Eigenschaften abdecken und zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfinden:

- Der erste Speicher kann bereits vor der Kopie analysiert werden.
- Der erste Speicher, der Transferspeicher und/oder das Medium zwischen Transferspeicher und erstem Speicher können während des Kopierprozesses analysiert
25 werden.
- Der erste Speicher, der Transferspeicher und/oder das Medium zwischen Transferspeicher und erstem Speicher können nach dem Kopierprozess analysiert werden.
- Von dem ersten Speicher oder dem Transferspeicher werden einzelne oder mehrere
30 Molekülsorten herausgelöst und analysiert.

- Teilschritte des Kopiervorganges wie Amplifikation, Derivatisierung oder Selbsterzeugung werden analysiert.

Die Analyse ist sehr stark von der Zielsetzung der Anwendung abhängig. Es können gängige Analysemethoden aus dem Stand der Technik verwendet werden. Bevorzugt sind etablierte Methoden wie Fluoreszenz, Luminiszenz, labelfreie Detektion, Erzeugung von Farbstoffen welche optisch erfasst werden können, oder redoxreaktiven Spezies, welche elektronisch erfasst werden können. Aufgrund der räumlichen Zuordbarkeit der Kopien und des Originals lässt sich diese Zuordnung von allen Analysen untereinander ebenfalls erreichen, so dass jedem Molekül, seinen Derivaten und Amplifikaten, die jeweilige Struktur und Eigenschaften aus den Analysen der Kopien und des Originals zuordenbar sind.

Es lassen sich nun mit der Erfindung folgende Punkte kombinieren, um gezielt besondere Arrays herzustellen. Die hergestellten Transferspeicher können anschließend auch für bestimmte Zwecke des Screenings eingesetzt werden.

Prinzipiell benötigt jede Methode der Erfindung bevorzugt die folgenden 4 Bestandteile

- Verschiedene gezielt ausgewählte Probemoleküle werden als Quelle zur Erzeugung des ersten Speichers, auch Original genannt, verwenden,
- die Herstellung der Originale kann wie beschrieben auf unterschiedliche Weise erfolgen
- davon werden dann unterschiedliche Kopien in Form der Transferspeicher gefertigt,
- im Anschluss oder bereits während der bisherigen Methode finden dann die Analysereaktionen statt

Bevorzugt wird die Methode der Erfindung zur Random-Library oder Pool-Kopie verwendet. Hierbei handelt es sich um eine beliebige Ansammlung (einen Pool) von Molekülen, die entweder zur Gruppe der DNA oder RNA gehören oder RNA oder DNA tragen und wahlweise künstlichen oder natürlichen Ursprungs sind oder anhand eines Selektions- oder Mutationsprozesses erzeugt wurden. Diese Moleküle können sich auch aus chemischen Bibliotheken oder Display-Pools ableiten. Eine gezielte Auswahl dieser Probemoleküle kann in jeder beschriebenen Methode eingebracht und kopiert werden. Wahlweise kann daraus eine Kopie in Form von DNA, RNA oder Protein erzeugt werden. Danach kann jede der Kopien

dazu verwendet werden um wahlweise eine Bindung, eine Interaktion, eine enzymatische Aktivität oder eine Änderung einer der genannten Eigenschaften zu untersuchen.

Außerdem ist die Verwendung für eine Display-Kopie bevorzugt. Anhand von etablierten Displaymethoden (Yeast2Hybrid, Ribosome-Display, Phage-Display, SELEX, etc.) wird
5 bezüglich eines molekularen Targets (Bindungspartner, Substrat, Antikörper, Antigen, ect.) zunächst eine Anreicherung getroffen. Dieser Schritt entspricht dem Stand der Technik in der jeweiligen Display-Methode. Nach dem ersten Anreicherungsschritt kann allerdings bereits der erzeugte Pool komplett entsprechend der beschriebenen Methoden in ein Original überführt werden und dieses Original dann mehrfach in Form von DNA, RNA oder Protein
10 kopiert werden und so die Moleküle, die im ersten Schritt des Displays angereichert wurden in ihrer vollen Anzahl als Mikroarray abbilden. Auf diesen kopierten Mikroarrays kann dann nochmals eine Messung gegen das Target stattfinden. Dies erlaubt dann, im Vergleich zu herkömmlichen Displays, einen deutlich höheren Durchsatz an untersuchten Molekülen und vor allen deckt es den gesamten Pool ab. Bei Bedarf kann nochmals eine Anreicherung
15 durchgeführt werden.

Außerdem ist die Verwendung in der Ribosome-Kopie bevorzugt. Diese Anwendung (vgl. auch Fig. 13) leitet sich vom Ribosome-Display ab. Hierzu wird wie beim Ribosome-Display zunächst eine Bindung gegen das gewünschte Target erzeugt und die Binder angereichert. Die angereicherten Binder werden dann nach einer der beschriebenen Methoden in ein Original
20 überführt. Die bevorzugte Ausführung ist hierbei der Molekülspeicher, so dass initial in jeder Speicherposition genau ein Ribosome mit dem anhängenden RNA-Strang oder nur der RNA-Strang oder der daraus abgeleitete DNA- oder cDNA-Strang angelagert wird. Vorzugsweise wird dann eine Amplifikation vorgenommen, so dass der Speicher vorzugsweise mit DNA belegt ist. Dies stellt sicher, dass das Original langzeitstabil ist und der Abbau einzelner
25 Stränge keinen Verlust von molekularer Information mit sich bringt. Danach kann das Original wahlweise in DNA, RNA oder Protein-Arrays kopiert werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine Proteinkopie erzeugt, die dann nochmals gegen Bindung an das Target untersucht wird. Das Original oder eine DNA-Kopie wird sequenziert, so dass jeder Bindung auf der Protein-Kopie eindeutig eine DNA-Sequenz zugeordnet werden kann.

30 Auch bevorzugt ist die Verwendung der Methode in der Phage-Kopie. Diese Anwendung (vergleiche auch Figur 14) leitet sich vom Phage-Display ab. Analog zur Ribosome-Kopie wird einmalig der Phagen-Pool gegen das gewünschte Target angereichert und die Phagen dann direkt in ein Original überführt. Danach erfolgen die Schritte wie bei der Ribosome-

Kopie. Vorzugsweise wird dann eine Amplifikation vorgenommen, so dass der Speicher vorzugsweise mit DNA belegt ist. Dies stellt sicher, dass das Original langzeitstabil ist und der Abbau einzelner Stränge keinen Verlust von molekularer Information mit sich bringt. Danach kann das Original wahlweise in DNA, RNA oder Protein-Arrays kopiert werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine Proteinkopie erzeugt, die dann nochmals gegen Bindung an das Target untersucht wird. Das Original oder eine DNA-Kopie wird sequenziert, so dass jeder Bindung auf der Protein-Kopie eindeutig eine DNA-Sequenz zugeordnet werden kann.

Außerdem ist die Verwendung der Methode in der Antikörper- oder ScFv-Kopie bevorzugt. In einer speziellen bevorzugten Ausführungsform der Display-Kopie tragen die Phagen oder Ribosome nicht einfache Proteine, sondern Antikörper oder Teile von Antikörpern oder artifizielle Antikörper-artige Konstrukte wie z.B. ScFv (single chain antibodies). Mit diesen wird wie in Phage-Kopie verfahren. Die erzeugten Proteinarrays tragen dann Antikörper, Antikörperteile bzw. ScFv und stellen damit Binder gegen ein Target dar. Diese Methode kann zur Optimierung von Antikörperbindungen verwendet werden.

Außerdem ist eine Populations-Kopie bevorzugt. Bei dieser Anwendung wird eine Population an Organismen (Zelle, Virus, Bakterium) oder Makromolekülen (Vektor, Plasmid, Chromosom etc.) oder molekulare Komplexe (z.B. Interaktionen eines Gemisches zweier Ribosome-Displays, bei denen beispielsweise eines Antikörper und das andere Antigene präsentiert und somit zwei DNA-Tags pro Protein-Komplex tragen) in das Original eingebracht. Ebenfalls wieder bevorzugt als Molekülspeicher. Dabei werden gezielt ein oder mehrere Moleküle pro Speicher amplifiziert und in Form von DNA oder RNA gespeichert. Somit enthält jede Speicherzeile mindestens ein Molekül, das auf einen Ursprung zurückzuführen ist. Es können nun wahlweise Kopien in Form von DNA, RNA oder Protein erzeugt werden und eine Sequenzierung des Originals oder einer DNA-Kopie durchgeführt werden.

Folgende Anwendungen sind ebenfalls bevorzugt:

- Der Anfangspool an Probemolekülen wird auf die Anzahl und Art der enthaltenen Mutationen eines oder mehrerer Gene untersucht

- Der Anfangspool an Probemolekülen enthält B- oder T-Zellen und es werden die Variationen und Kombinationen der leichten und schweren Kette der B- bzw. T-Zell-Rezeptoren untersucht
- 5 • Der Anfangspool an Probemolekülen enthält polyploide Organismen und es wird die genetische Varianz eines oder mehrerer Genabschnitte untersucht
- Der Anfangspool an Probemolekülen enthält Interaktionspartner (jeweils mit einem DNA-Tag versehen) und aus der gemeinsamen Analyse von zwei DNA-Sequenzen kann auf die molekulare Struktur der Bindungspartner geschlossen werden (z.B. die zuvor beschriebene Mischung zweier Ribosome-Displays aus Antikörpern und
10 Antigen-Displays)
- Der Anfangspool an Probemolekülen enthält eine Art von Organismus und die Analyse gibt Aufschluss über die enzymatische oder Bindeaktivität von eines oder mehreren enthaltenen Proteinen.
- Der Anfangspool an Probemolekülen enthält eine Art von Organismus und die
15 Analyse gibt Aufschluss über die enzymatische Aktivität oder Bindungseigenschaften eines oder mehrerer RNA- oder DNA-Abschnitte.

Es ist auch bevorzugt die Methode zur Genom-Kopie zu verwenden. Aus einem oder mehreren Organismen wird genomische DNA gewonnen, fragmentiert und dann in das Original eingebracht. Dies geschieht ebenfalls vorzugsweise im Molekülspeicher. Im Falle
20 einer vorgeschalteten Amplifikation, z.B. einer Emulsions-PCR, welche die DNA auf Partikel amplifiziert, wird ein Partikelspeicher verwendet. Die DNA im Original wird dann zur Erzeugung von DNA-Kopien verwendet. Das erhaltene Array stellt damit ein Genom-Array des eingefüllten Organismus dar. Solcherlei Arrays sind bisher nicht direkt aus dem Organismus herstellbar.

25 Auch die Transkriptom-Kopie ist bevorzugt. Aus einem oder mehreren Organismen wird die RNA, vorzugsweise mRNA, gewonnen und dann in das Original eingebracht. Dies geschieht ebenfalls vorzugsweise im Molekülspeicher. Im Falle einer vorgeschalteten Amplifikation, z.B. einer Emulsions-PCR, welche die RNA zunächst in cDNA umwandelt und dann auf Partikel amplifiziert, wird ein Partikelspeicher verwendet. Die RNA wird bevorzugt zunächst
30 in cDNA im Original gespeichert. Diese hat eine deutlich höhere Stabilität als die RNA. Danach werden Kopien in Form von RNA oder cDNA erzeugt. Die erhaltene Arrays stellen

damit Transkriptom-Arrays des eingefüllten Organismus dar. Solcherlei Arrays sind bisher nicht direkt aus dem Ursprungsorganismus herzustellen. Weiterhin erlauben die erzeugten cDNA-Arrays eine Anwendung im Bereich der Expressionsanalyse, wohingegen die erzeugten RNA-Arrays für Bindungsanalysen von Promotern oder Transkriptionsfaktoren

5 Auch die Proteom-Kopie ist bevorzugt. Aus einem oder mehreren Organismen wird hier die RNA, vorzugsweise mRNA, oder die DNA gewonnen und dann in das Original eingebracht. Die dort gespeicherten Moleküle bestehen dann vorzugsweise aus DNA oder von RNA abgeleiteter cDNA. Dabei ist die bevorzugte Ausführungsform ein Molekülspeicher. Im Falle einer vorgeschalteten Amplifikation, z.B. einer Emulsions-PCR, welche die RNA zunächst in
10 cDNA umwandelt oder DNA als solche belässt, und dann auf Partikel amplifiziert, wird ein Partikelspeicher verwendet. Danach werden Kopien in Form von Protein erzeugt, die dann auf Aktivität in Form von Bindung, Interaktion oder enzymatischer Reaktivität untersucht werden. Weiterhin stellt dieses Array das Proteom der eingebrachten Organismen dar, sofern mRNA verwendet wurde. Sofern DNA direkt verwendet wurde, bildet die Kopie mehr
15 Proteine ab, als im Proteom enthalten sind. Ein komplettes Proteom-Array ist bis dato nicht ohne weiteres herstellbar ist. Das ProtoArray 5.0 von Invitrogen deckt beispielsweise nur 9.000 Proteine des Menschen ab, der über mehr als 100.000 Proteine verfügt.

Die Protein-Kopie ist ebenfalls bevorzugt. Aus einem Pool von Probemolekülen wird DNA, welche das Protein bzw. Mutationen des Proteins codiert, in das Original eingebracht. Die
20 dort gespeicherten Moleküle bestehen dann vorzugsweise aus DNA. Die bevorzugte Ausführungsform ist dabei der Molekülspeicher. Im Falle einer vorgeschalteten Amplifikation, z.B. einer Emulsions-PCR, die dann die DNA auf Partikel amplifiziert, wird ein Partikelspeicher verwendet. Danach werden Kopien in Form von Protein erzeugt, die dann auf Aktivität in Form von Bindung, Interaktion oder enzymatischer Reaktivität untersucht
25 werden. Somit stellt das erzeugte Array einen allgemeinen Aminosäure-„Scan“ des originalen Proteins dar. Solcherlei Arrays sind bisher nicht herstellbar, da bereits für einen Mutationsscan an nur 4 Aminosäurepositionen 160.000 Mutanten zu erzeugen sind. Dies ist mit bisherigen Techniken nicht umsetzbar.

Im Zusammenhang mit Moleküloptimierung wird unter Scan bevorzugt das systematische
30 Variieren einzelner molekularer Bausteine verstanden. Beim Alanin-Scan, wie er bei Proteinen und Peptiden Anwendung findet, wird gezielt jeweils eine Aminosäure gegen das meist inaktive Alanin ersetzt und das entstehende Produkt getestet. Sofern eine biochemisch wichtige Aminosäure ersetzt wurde, zeigt das Biomolekül eine deutlich reduzierte Aktivität.

Mittels des Scans können so wichtige und unwichtige Positionen für die Aktivität bzw. Eigenschaften eines Moleküls bestimmt werden bzw. abgeschätzt werden. Es kann z.B. keine Aussage darüber getroffen werden, ob anstelle des Alanins eine andere Aminosäure eine höhere Aktivität oder verbesserte Eigenschaft gegenüber dem originalen Molekül aufweist.

5 Die bevorzugte Anwendung auf dem Gebiet der Kombinatorische-Chemie-Kopie stellt eine sehr spezielle Kombination (siehe auch Figur 15) dar. Bereits während der Synthese der chemischen Bibliothek, die bevorzugt auf Partikeln stattfindet, wird mit jedem Syntheseschritt neben dem eigentlichen Molekül noch ein weiteres „Informationsmolekül“ in Form von DNA oder RNA aufgebaut. Dabei korreliert die Sequenz der DNA bzw. RNA in eindeutiger Weise
10 mit dem aufgebauten Molekül. Nach Fertigung dieser kombinatorischen Bibliothek werden die Partikel einer Anreicherung gegen ein Target unterzogen, d.h. es verbleibt ein Pool an Partikeln der mit dem Target interagiert. Diese ausgewählten Partikel werden dann bevorzugt in einen Partikelspeicher bzw. Partikel-Transferspeicher als Original eingebracht. Nun können optional wahlweise die DNA oder die Moleküle in den Partikel-Transferspeicher transferiert
15 werden. In der Ausführungsform des Partikelspeichers wird zunächst kein Transfer vorgenommen. Es werden dann mehrere Kopien erzeugt, die wahlweise die DNA und/oder das Molekül tragen. Die DNA kann hierzu amplifiziert werden. Die Moleküle werden im üblichen Falle vom Partikel freigesetzt. Vorzugsweise trägt ein Partikel deutlich mehr Moleküle als zum Erzeugen einer Kopie notwendig sind, sodass mehrere Kopien der
20 Moleküle erzeugt werden können. Anhand der Molekül-Mikroarrays kann nochmals die Bindung gegen das Target oder dem Target ähnliche Strukturen validiert werden, wohingegen die DNA-Kopie dazu verwendet wird, um die Sequenz zu decodieren. Aufgrund der Korrelation zwischen Sequenz und Struktur kann für jeden Spot des Molekül-Arrays dann die molekulare Struktur angegeben werden. Dies ist bei bisherigen kombinatorischen Split-und-
25 Mix Bibliotheken nicht möglich.

Weiterhin ist bevorzugt, dass unterschiedliche Sorten von Probemolekülen an einen Partikel gebunden sind.

Es ist bevorzugt, dass die Oberfläche des ersten Speichers und/oder der Transferspeicher strukturiert ist.

30 Bevorzugt ist, dass die Probemoleküle und/oder Produktmoleküle ausgewählt sind aus der Gruppe umfassend Proteine, Enzyme, Aptamere, Antikörper oder Teile davon, Rezeptoren oder Teile davon, Liganden oder Teile davon, Nukleinsäuren, nukleinsäureartige Derivate,

Transkriptionsfaktoren und/oder Teile davon, Moleküle die mit kombinatorischer Chemie erzeugt wurden.

Es ist weiterhin bevorzugt, dass der Reaktionsschritt mittels DNA- Polymerase, RNA - Polymerase und/oder eines zellfreien Reaktionsmixes durchgeführt wird.

- 5 Es ist bevorzugt, dass die Strukturierung der Oberflächen ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Kavitäten, Erhebungen, Kavitäten die Partikel enthalten und/oder Erhebungen die Partikel umfassen.

- 10 Dabei ist bevorzugt, dass die Kavitäten in etwa die Größe einer biologischen Zelle aufweisen. Besonders bevorzugt sind Kavitäten mit einem Durchmesser von 5 bis 250 μm , ganz besonders bevorzugt 10 bis 50 μm . Es hat sich gezeigt, dass der Reaktionsschritt besonders gut in Kavitäten dieser Größenordnung abläuft. Überraschenderweise ist die Ausbeute umso besser, je kleiner die Kavitäten sind.

- 15 Es ist weiterhin bevorzugt, dass der erste Speicher in unterschiedlichen Bereichen unterschiedliche physikalische, chemische und/oder biochemische Eigenschaften umfasst, bevorzugt unterschiedliches Volumen der Kavitäten, pH-Unterschiede, Unterschiede im Salzgehalt, Temperaturunterscheide, unterschiedliche Oberflächen, unterschiedliche Benetzbarkeit, Unterschiede in der elektrischen Ladung, Unterschiede in elektrischen, magnetischen und/oder dielektrischen Eigenschaften, Unterschiede bezüglich osmotischer Drücke, unterschiedliche Zusatzstoffe, unterschiedliche biochemische Inhaltsstoffe.

- 20 Es ist bevorzugt, dass während des Reaktionsschrittes mindestens eine Sorte von Probemolekülen von den Partikeln und/oder der Oberfläche gelöst werden

- 25 Es ist außerdem bevorzugt, dass der Analyseschritt e) ein labelfreies Verfahren umfasst, bevorzugt eine RfS-Detektion, iRfS-Detektion, Biacore-Detektion, Surface-Plasom-Resonanz-Detektion, Ellipsometrie, Massenspektroskopie, Detektion des Massezuwachs, Detektion der Änderung des Brechungsindex, Detektion der Änderung von optischen, magnetischen, elektrischen und/oder elektromagnetischen Eigenschaften.

Es ist weiterhin bevorzugt, dass der Analyseschritt e) ein Verfahren umfasst, das ein Label verwendet, bevorzugt Fluoreszenzmessung, Detektion über einen absorbierenden und/oder streuenden Farbstoff, Massenspektroskopie über die Detektion eines Isotopenlabels,

Detektion über ein Molekül, welches den Brechungsindex und/oder die optischen Eigenschaften der Oberfläche und/oder der Lösung ändert.

Es ist außerdem bevorzugt, dass der Analyseschritt e) ein Verfahren umfasst, das die Lösung oberhalb der Oberfläche des ersten Speichers und/oder eines der Transferspeichers analysiert, bevorzugt Trübungsmessung, Fluoreszenzmessung, Detektion eines absorbierenden Farbstoffs und/oder Luminiszenzmessung.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung eine Verwendung eines der genannten Verfahren, in einem Screeningverfahren zur Identifikation von, Transkriptionsfaktoren, Transkriptionseffizienz, Transkriptionsoptimierung, Promotoreffizienz, Splicisomen, Restriktions-Substraten, Amplifikationssystem, Codon-Optimierung, Proteinfunktionalität, Enzymfunktionalität, Enzymoptimierung, Isoenzymen, Ribozymen, Reaktionsoptimierungen und/oder Bindungsoptimierung

Das bevorzugte „Gesamt Genom-Interaktions-Screening“ erlaubt die Identifikation von Wechselwirkungen auf Ebene des Genoms. Es wird eine Genomkopie eines Organismus erzeugt. Da nun sämtliche DNA dieses Organismus abgebildet ist, können nun beliebige Interaktionspartner oder Moleküle als Probemoleküle auf diesen ersten Speicher gegeben werden. Folgende Anwendungen sind dabei bevorzugt:

- Es wird DNA eines nahe verwandten Organismus oder einer Mutante hinzugegeben. Bereiche mit Bindung, weisen auf identische DNA hin, Bereiche ohne Bindung weisen auf klare Unterschiede zwischen diesen Spezies hin. Diese Unterschiede können dann als Marker für die Speziesunterscheidung verwendet werden.
- Es wird RNA oder cDNA desselben Organismus hinzugegeben. Die Intensität der einzelnen Spots zeigt an, dass es sich um ein Gen handelt und wie stark es exprimiert ist.
- Es wird cDNA einer Referenz in mit einer Fluoreszenzfarbe 1 und einer behandelten Probe mit einer Fluoreszenzfarbe 2 gemischt und dann auf das Array verbracht. Anhand der Färbung kann ermittelt werden, welches Gen wie stark aktiviert wurde.
- Es werden Proteine auf das Array gegeben. Findet eine Wechselwirkung oder eine Bindung statt, so kann diese der DNA-Sequenz zugeordnet werden. Damit lassen sich Protein als DNA-Binder identifizieren.

Auch die Verwendung zum Transkriptionsfaktor-Screening auf Genomebene ist bevorzugt. Diese Methode erlaubt die Identifikation von Transkriptionsfaktoren auf Ebene des kompletten Genoms. Auf ein Gesamt-Genom-Array wird ein Transkriptionsfaktor gegeben. Durch Bindung an einzelne Spots lässt sich die Sequenzabhängigkeit des Transkriptionsfaktors
5 ermitteln. Zudem lassen sich z.B. durch Kinetikmessungen zusätzliche Parameter wie Bindungsgeschwindigkeit und Bindungsstärke ermitteln. Somit kann für jeden Transkriptionsfaktor ein genomweites Profil seiner Interaktionen ermitteln.

- Wird nur ein Transkriptionsfaktor hinzugegeben, so kann dessen Profil ermittelt werden. Durch Variation der Bedingungen wie z.B. Temperatur, pH oder Salzgehalt
10 können auch diese Abhängigkeiten genomweit ermittelt werden.
- Werden zwei Transkriptionsfaktoren mit unterschiedlichem Label z.B. Farbe im gleichen Verhältnis gemischt und dann auf das Array kann man anhand der Intensität der einzelnen Spots und deren Färbung auf das Zusammenspiel der
15 Transkriptionsfaktoren geschlossen werden. Es können Sequenzen identifiziert werden, die nur von einem, keinem oder beiden Transkriptionsfaktoren angesprochen werden. Ebenfalls ist eine Variation von Temperatur, pH, Salzgehalt etc. möglich, so dass gezielt ein Transkriptionsfaktor verstärkt oder abgeschwächt werden kann.
- Eine Mutationsanalyse kann durchgeführt werden, wenn für einen
20 Transkriptionsfaktor eine Mutation bekannt ist. Dann werden ebenfalls der Wildtyp und die Mutation mit unterschiedlichen Labeln auf dem Array eingesetzt. Aus Farbunterschieden lässt sich unterschiedliches Bindungsverhalten und damit Genaktivierung analysieren.

Außerdem ist die Verwendung zum Amplifikations-Screening auf Genomebene bevorzugt. Diese Methode erlaubt ein tieferes Verständnis von Amplifikationssystemen für DNA und
25 RNA. Auf ein Gesamt-Genom-Array werden einzelne Moleküle oder Molekülkomplexe von Amplifikationssystemen (z.B. DNA-Amplifikation wie DNA-Polymerase, Gyrase, Helikase oder RNA-Amplifikation) gegeben. Diese Moleküle binden dann bevorzugt an die Positionen, welche bei der Amplifikation notwendig sind. Diese sind beispielsweise die TATAA-Box für die RNA-Polymerase oder Replikationsgabeln für die DNA-Polymerase ebenso wie
30 Bindungsbereiche für Helikasen, Gyrasen etc.

- Durch die Zugabe der einzelnen Cofaktoren des Amplifikationssystems kann Schritt für Schritt entschlüsselt werden, wo (an welcher Sequenz) und in Gegenwart welcher Moleküle sich der Amplifikationskomplex assembliert.
- Durch Zugabe eines Cofaktors mit einer Farbe und eines Iso-Cofaktors oder einer Mutation mit einer anderen Farbe lässt sich anhand von Farbunterschieden feststellen, welche Gene bevorzugt amplifiziert werden. Somit kann eine Aussage über die Expression von Genen getroffen werden.

Weiterhin ist die Verwendung zum Antibiotika-Screening auf Genomebene bevorzugt. Dies ist eine spezielle Form des Amplifikationsscreenings, die dazu dient neue Antibiotika zu identifizieren und bereits bekannte genauer zu charakterisieren. Die identifizierten Antibiotika dienen als DNA- oder RNA-Amplifikations-Inhibitoren und sind daher als Bakterioostatika einzuordnen. Hierzu wird ein humanes Genom oder ein bakterielles Genom in Form von DNA erzeugt. Die DNA ist vorzugsweise sehr lang, beziehungsweise an ihren Enden so verbunden sein, dass ein „Entrollen“ der DNA nur erschwert möglich ist. Es werden etliche DNA-Kopien erzeugt. Jede DNA-Kopie wird nun mit einem anderen Antibiotikum versetzt, welches die Assemblierung des DNA- oder des RNA-Amplifikationskomplexes oder das Anbinden eines Cofaktors für die DNA- oder die RNA-Polymerase unterbindet oder einschränkt.

- Zur Charakterisierung von bekannten Antibiotika wie z.B. den Gyraseinhibitoren Nalidixinsäure und Ciprofloxacin gegen Topoisomerase II wird die bakterielle Topoisomerase mit einer Farbe markiert und das humane Gegenstück mit einer anderen. Diese Proteine werden gemischt, mit dem Antibiotikum versetzt und auf das Array gegeben. Aus Farbunterschieden erkennt man umgehend, wo die bakterielle und wo die humane Amplifikation eingeschränkt ist. Anhand der Sequenzen lässt sich auf die Störung der Amplifikation bzw. der späteren Expression der Proteine schließen. So können diverse Antibiotika aufeinander abgestimmt werden, um möglichst minimal das humane System und möglichst maximal das bakterielle System zu hemmen.
- Zur Untersuchung neuer oder unbekannter Wirkstoffe werden die humanen Bestandteile des Amplifikationssystems mit einem Farbstoff und die das bakteriellen Systems mit einem anderen Farbstoff markiert. Diese Systeme werden gemischt. Zunächst wird eine Mischung direkt auf ein Genom-Array gegeben. Dies stellt als Referenz das ungestörte System dar. Nun wird in jede Mischung ein Wirkstoff

zugeben und untersucht, wann das humane System ungestört und das bakterielle System gestört ist. In diesem Falle kann es sich um ein neues Antibiotikum handeln. Weiterhin kann aber auch jeder Bestandteil des Amplifikationssystems einzeln mit dem neuen Wirkstoff getestet werden. So ist es möglich bereits die Untereinheit zu identifiziert, an die der Wirkstoff angreift und es kann gezeigt werden, sodass diese Untereinheit dann nicht mehr an die DNA bindet.

Außerdem ist die Verwendung der Methode zum Splicosome-Screening auf Genomebene bevorzugt. Diese Methode erlaubt die Identifikation von Splicevarianten. Ein Gesamt-Genom-Array wird als RNA abgebildet. Diese RNA entspricht damit der prä-mRNA. Nun werden einzelne Bestandteile oder komplette Splicosome-Komplexe auf die RNA-Kopie gegeben werden. Somit lassen sich einzelne Sequenzen identifizieren, die vom Splicosome erkannt werden. Zudem ist es möglich jedem Splicosome seine genomweite Wechselwirkung zuzuordnen. Sofern von der RNA-Kopie nach Behandlung mit den Splicosomen eine DNA-Kopie angefertigt wird, ist zudem eine weitere Sequenzierung möglich. Aus Kenntnis der ursprünglichen DNA und der DNA nach der Behandlung mit dem Splicosome lassen sich tiefere Kenntnisse über die Sequenzabhängigkeit und die Splicevarianten ermitteln. Weiterhin ist es möglich durch gezielte Mutationen bzw. Zugabe von Cofaktoren bestimmte Splicevarianten zu bevorzugen. Diese Erkenntnis kann dann z.B. bei der Kultivierung von Organismen oder der Differenzierung von Stammzellen gezielt verwendet werden, um bevorzugte Splice-Varianten zu realisieren oder favorisieren.

Außerdem ist die Verwendung der Methode zum „Gesamt Transkriptom-Interaktions-Screening“ bevorzugt. Diese Methode erlaubt die Identifikation von Wechselwirkungen auf Ebene des Transkriptoms. Es wird eine Transkriptomkopie eines Organismus erzeugt. Es werden Kopien in Form von DNA, cDNA als auch RNA erzeugt. Da nun sämtliche cDNA als auch RNA dieses Organismus abgebildet ist, können nun beliebige Interaktionspartner oder Moleküle auf dieses Array gegeben werden. Folgende Anwendungen sind dabei bevorzugt:

- cDNA und DNA/RNA-Kopie: Es wird DNA eines nahe verwandten Organismus oder einer Mutante hinzugegeben. Bereiche mit Bindung, weisen auf identische DNA hin, Bereiche ohne Bindung weisen auf klare Unterschiede zwischen diesen Spezies hin. Diese Unterschiede können dann als Marker für die Speziesunterscheidung verwendet werden. Zudem weiß man hierdurch, dass diese Spezies identische oder verwandte Gene besitzen.

- cDNA und DNA/RNA-Kopie: Es wird RNA bzw. cDNA desselben Organismus hinzugegeben. Die Intensität der einzelnen Spots zeigt an, dass es sich um ein Gen handelt und wie stark es exprimiert ist.
- 5 • cDNA und DNA/RNA-Kopie: Es wird RNA bzw. cDNA eines anderen Organismus hinzugegeben. Bindungen weisen auf verwandte Gene und damit Proteine hin, Spots ohne Bindungen bedeuten, dass der andere Organismus nicht über die entsprechenden Gene verfügt, oder diese aktuell inaktiviert sind.
- 10 • DNA/RNA-Kopie: Es wird cDNA einer Referenz in mit einer Fluoreszenzfarbe 1 und einer behandelten Probe mit einer Fluoreszenzfarbe 2 gemischt und dann auf das Array verbracht. Anhand der Färbung kann ermittelt werden, welches Gen wie stark aktiviert wurde.
- 15 • DNA-Kopie: Es werden Proteine auf das Array gegeben. Findet eine Wechselwirkung oder eine Bindung statt, so kann diese der DNA-Sequenz zugeordnet werden. Damit lassen sich Protein als DNA-Binder identifizieren und ist potentiell als Interaktionspartner in einer Form des Signalings beteiligt, indem es mit diesem Genabschnitt interagiert.
- 20 • RNA-Kopie: Es werden Proteine auf das Array gegeben. Sofern Interaktionen stattfinden handelt es sich damit um RNA-interagierende Proteine. Diese Proteine können z.B. Speicher für RNA sein, die zunächst angelagert ist und bei Bedarf freigesetzt wird oder innerhalb des Signalings eine Regelfunktion einnehmen.
- 25 • RNA-Kopie: Es werden siRNA auf das Array gegeben. Interagierende Punkte weisen auf siRNA-basierte Regulationsmechanismen. Durch Zugabe einzelner siRNAs oder einer 2-Farb-markrten Probe aus siRNA von stimulierten Zellen (Farbe 1) und unstimulierten Zellen (Farbe 2) lassen sich anhand der Unterschiede Regelmechanismen ableiten.

Außerdem ist die Verwendung zum „Gesamt Proteom-Interaktions-Screening“ bevorzugt. Diese Methode erlaubt die Identifikation von Wechselwirkungen auf Ebene des Proteoms. Es wird eine Proteomkopie eines Organismus erzeugt. Sofern mRNA zur Erzeugung des Originals verwendet wurde, spiegelt die Protein-Kopie das Proteom des Organismus wider. 30 Sofern DNA zur Erzeugung des Originals verwendet wurde, sind mehr Proteine abgebildet, als im Proteom vorhanden sind. Da nun sämtliche Proteine dieses Organismus abgebildet

sind, können nun beliebige Interaktionspartner oder Moleküle auf dieses Array gegeben werden. Folgende Anwendungen sind dabei bevorzugt:

- Es wird DNA des Organismus oder einer Mutante hinzugegeben. Bereiche mit Bindung, stellen Proteine dar, die mit DNA wechselwirken. Dies können
5 beispielsweise Histone, Transkriptionsfaktoren oder DNA-reparierende Proteine etc. sein.
- Es wird DNA, RNA oder das Protein des Organismus in einer Farbe und die DNA, RNA oder Protein eines anderen Organismus oder eines Mutanten dieses Organismus einer anderen Farbe hinzugegeben. Anhand des Farbmusters lassen sich
10 Gemeinsamkeiten und Unterschiede klar hervorheben. Es lassen sich Verwandtschaften ableiten. Unterschiede erlauben die Entwicklung von Markern zur klaren Identifikation der jeweiligen Spezies als auch Entwicklung von Wirkstoffen, die dann Speziespezifisch anwendbar sind.

Weiterhin ist die Verwendung der Methode zum Wirkstoff-Screening durch Zugabe des
15 Wirkstoffes bevorzugt. Diese Methode erlaubt die Identifikation von Wirkstoffen anhand von Bindung. Für diese Anwendungen werden Genom-, Transkriptom- und Proteom-Kopien in Form von DNA, RNA und Protein-Mikroarrays erzeugt. Ein neuer oder bereits bekannter Wirkstoff wird nun auf diese Arrays gegeben. Spots an die dieser Wirkstoff anbindet, sind potentielle Interaktionspartner dieses Wirkstoffes. Somit kann über einen kompletten
20 Organismus hinweg das Wirk-Profil eines Wirkstoffes erstellt werden. In Kombination mit einer Meßmethode, die eine Kinetikmessung z.B. iRiFS oder Biacore ermöglicht, kann zudem auf die Bindungsstärke geschlossen werden.

- Sofern nur ein Wirkstoff hinzugegeben wird, kann von diesem das Wirkprofil bestimmt werden.
- Sofern zwei Wirkstoffe mit unterschiedlichen Markierungen wie z.B. Farbe, zugegeben werden, kann man durch die Farbtöne auf kooperative Effekte schliessen. Durch Kontrollexperimente mit jeweils nur einem Wirkstoff kann man auf
25 Konkurrenz schließen. Dies erlaubt dann z.B. zwei Wirkstoffe als Kombipräparat zu entwickeln bzw. festzustellen, ob beide Wirkstoffe identische Targets und
30 Bindungstaschen adressieren und damit nicht in Kombination verabreicht werden sollten.

- Durch Zugabe zweier Wirkstoffe mit unterschiedlichem Label lassen sich Nebenwirkungen anhand von Wechselwirkungen mit nicht vorgesehenen Partnern auf Ebene der DNA, RNA oder Proteinen identifizieren und so kombinieren, dass eine möglichst große Wirkung bei möglichst kleiner Interaktion mit anderen Partnern und damit Nebenwirkungen realisieren.

5

Ganz besonders bevorzugt ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Methode zum Promotor-Screening. Diese Anwendung ist einzigartig. Im Stand der Technik sind bisher nur Aussagen möglich, ob ein Promotor stark oder schwach wirkt. Eine echte Quantifizierung ist nun erstmals durch die Erfindung möglich. Diese Methode erlaubt eine Untersuchung der Auswirkung der Promotorsequenz auf die Menge an erzeugtem Protein. Es wird ein DNA-Pool erzeugt. Jede DNA enthält dabei eine Promotorsequenz und codiert zudem ein Protein. Im Falle des Promotor-Screening liegt eine Variabilität in der Promotorsequenz vor. Diese Variabilität kann den natürlichen Promotoren eines oder mehreren Organismen entsprechen, artifiziell oder randomisiert sein. Sämtliche DNA-Stränge tragen eine identische Sequenzen bezüglich des codierten Proteins, d.h. beim Erzeugen einer Protein-Kopie entsteht von jeder Sequenz das identische Protein. Da die proteincodierende Sequenz identisch ist, bedeutet dies, dass die Geschwindigkeit der Proteinerzeugung einzig von der Initiierungsgeschwindigkeit der RNA-Polymerase und nicht von den Ribosomen abhängt. Dies kann bevorzugt als Molekülspeicher erfolgen, das als Sequenzierchip oder als klassisches DNA-Mikroarray ausgelegt ist. Es wird nun eine Protein-Kopie initiiert und die Menge der entstehenden Proteine direkt in Echtzeit analysiert (z.B. durch iRiFS oder Biacore). Aus diesen Echtzeitdaten lässt sich nun ableiten, wie schnell die einzelnen Promotoren einen Start der RNA-Polymerase erlauben.

10

15

20

25

- Wird nur eine RNA-Polymerase verwendet, kann ein Profil der Induktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Promotorsequenz ermittelt werden.
- Werden für weitere Kopien z.B. andere Polymerasen eingesetzt kann ein Sequenzprofil für diese RNA-Polymerasen erstellt werden.
- Weiterhin können Co-Faktoren zugegeben werden und Änderungen in den Erzeugungsgeschwindigkeiten ermittelt werden.

Ein Sequenzierchip ist bevorzugt eine Oberfläche mit der eine Sequenzierung durchgeführt wird. Besonders bevorzugt ist die Verwendung des FLX 454 Chip von Roche, da er aufgrund seines Aufbaus bereits Kavitäten aufweist, die für die Kopiertechnik vorteilhaft sind.

Außerdem besonders bevorzugt ist die Verwendung der Methode zum Transkriptionsfaktor-Effizienz-Screening. Eine solche Anwendung ist mit den bekannten Methoden aus dem Stand

der Technik nicht möglich. Diese Methode dient der systematischen Untersuchung der Auswirkung von Transkriptionsfaktoren auf die Erzeugung von RNA bzw. Proteinen.

Identisch zu Promotor-Screening wird ein DNA-Pool verwendet, der sich nicht im Bereich der Protein-codierenden DNA, jedoch im Bereich des Promotors und des Bereichs in dem

Transkriptionsfaktoren anbinden können unterscheidet. D.h. es entsteht stets das identische Protein. Da die proteincodierende Sequenz identisch ist, bedeutet dies, dass die

Geschwindigkeit der Proteinerzeugung einzig von der Initiierungsgeschwindigkeit der RNA-

Polymerase und nicht von den Ribosomen abhängt. Zunächst wird ein Original in Form eines DNA-Arrays erzeugt. Dies kann bevorzugt als Molekülspeicher erfolgen, das als

Sequenzierchip oder als klassisches DNA-Mikroarray ausgelegt ist. Es wird nun eine Proteinkopie initiiert und die Menge der entstehenden Proteine direkt in Echtzeit analysiert (z.B. durch iRiFS oder Biacore). Aus diesen Echtzeitdaten lässt sich nun ableiten, wie schnell die einzelnen Promotoren einen Start der RNA-Polymerase erlauben.

- Zunächst erhält man für die erste Kopie identische Daten wie in dem Promotor-

Screening. Nun werden jedoch weitere Kopien erzeugt, die durch Zugabe von

Transkriptionsfaktoren (inhibierend, als auch aktivierend) das Enzymsystem

verändern. Durch die Änderungen in den Erzeugungsgeschwindigkeiten der Proteine

kann nun eine Zuordnung zwischen Promotorsequenz und Stärke des

Transkriptionsfaktors erfolgen. Es ist davon auszugehen, dass in diesem Aufbau sehr

klar Sequenzabhängigkeiten zu erkennen und diese genau zu quantifizieren sind. Diese

Messung ist bisher in keinem anderen System möglich.

- Es lassen sich auch Transkriptionsfaktoren anderer Spezies verwenden und so die

Interspezies-Kompatibilität der einzelnen biochemischen Mechanismen in-vitro

untersuchen. Dies ist insbesondere von Interesse für die Erzeugung von zellfreien

Misch-Systemen, die wiederum zur zellfreien Erzeugung von Proteinen aus DNA

eingesetzt werden (unter anderem auch für die Erzeugung der Proteinkopie).

Außerdem ist es bevorzugt, die erfindungsgemäße Methode zur Codon-Optimierung zu verwenden. Im Stand der Technik ist dies bisher nur mit extrem hohem Aufwand möglich. Die erfindungsgemäße Verwendung dient der Optimierung einer DNA Sequenz zur verbesserten Biosynthese. Analog zum Promotor-Screening und Transkriptionsfaktor-Effizienz-Screening wird ein DNA-Pool aufgebaut, bei dem jeder DNA-Strang eine identische Promotorsequenz trägt. Die Unterschiede zwischen den DNA-Strängen bestehen in der Protein-codierenden Sequenz. Sie codieren zwar dieselbe Aminosäuresequenz, unterscheiden sich allerdings in den Codons. D.h. es wird stets dasselbe Protein erzeugt, für die Erzeugung jedoch unterschiedliche tRNA-Pools herangezogen. Da für die Initiierung der RNA-Polymerase stets derselbe Promotor vorgelegt wird identisch und für alle DNA-Sequenzen gleich schnell. Allerdings bedeutet die Nutzung unterschiedlicher tRNA-Pools eine unterschiedliche Synthesegeschwindigkeit. Somit hängt der Unterschied der Erzeugungsgeschwindigkeit nur von der Codon-Sequenz ab. Zunächst wird ein Original in Form eines DNA-Arrays erzeugt. Dies kann bevorzugt als Molekülspeicher erfolgen, das als Sequenzierchip oder als klassisches DNA-Mikroarray ausgelegt ist. Es wird nun eine Protein-Kopie initiiert und die Menge der entstehenden Proteine direkt in Echtzeit analysiert (z.B. durch iRiFS oder Biacore). Aus diesen Echtzeitdaten lässt sich nun ableiten, welche Codonwahl für eine schnelle Synthese optimal sind. Diese Ergebnisse sind insbesondere von Interesse, wenn es um Optimierung von „Codon Usage“ bei der Erzeugung rekombinanter Proteine in Zellen geht.

Außerdem ist es bevorzugt die Methode der Erfindung zum globalen Antibiotika-Screening durch direkte Inhibition einzusetzen. Diese Methode dient ebenfalls der Identifikation von Antibiotika. Anstatt wie bei dem beschriebenen Antibiotika-Screening auf Genomebene die Assemblierung der humanen und bakteriellen Amplifikationskomplexe in Gegenwart der Antibiotika untersuchen werden, wird ein Original verwendet, welches humane und bakterielle DNA enthält (inkl. Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren und Promotorsequenzen). Von diesem DNA-Original werden zunächst identische DNA-Kopien erzeugt. Dann werden zellfreie Expressionssysteme (humane und bakterielle) jeweils mit einem Wirkstoff versetzt und eine Protein-Kopie von der DNA-Kopie erzeugt. Es wird dabei quantitativ analysiert, wie viel von welchem Protein entsteht. Sofern einer der Wirkstoff in irgendeiner Weise die Erzeugung von Protein oder die vorgelagerte Amplifikation von RNA stört, wird sich dies durch Verringerung oder Ausbleiben des entsprechenden Protein-Spots bemerkbar machen. Wirkstoffe, die Sequenzabhängig und/oder Expressionssystemabhängig die Protein-Erzeugung hemmen oder unterbinden zeigen sich durch Ausbleiben oder

Abschwächen einzelner Spots bzw. Ausbleiben oder Abschwächen der kompletten Protein-Kopie. Wirkstoffe, die das bakteriellen System hemmen und das humane nicht beeinflussen, sind somit potentielle Antibiotika, die in direkter Weise die Proteinerzeugung in Bakterien hemmen. Die so identifizierten Wirkstoffe können dann detailliert in einem

5 Wirkstoffscreening unterzogen werden.

Auch bevorzugt ist die Verwendung der Methode zum globalen Antibiotika-Screening durch Substrat-Inhibition. Diese Methode dient ebenfalls der Identifikation von Antibiotika. Anstatt wie beim Antibiotika-Screening auf Genomebene die Assemblierung der humanen und bakteriellen Amplifikationskomplexe in Gegenwart der Antibiotika zu untersuchen, wird ein

10 Original verwendet, welches humane und bakterielle DNA enthält (inkl. Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren und Promotorsequenzen). Nun werden wahlweise DNA, RNA und Protein-Kopien erzeugt. Für die Erzeugung der jeweiligen Kopie werden in die jeweiligen Enzymmische substituierende Moleküle für die originalen Monomere „zugesetzt“. Diese Substituenten werden dann potentiell anstelle originaler Monomere in die DNA, RNA oder

15 Proteine eingebaut. Von den erzeugten Kopien auf Ebene der RNA bzw. DNA werden dann nochmals Proteinkopien erzeugt. Sofern einer der eingesetzten Substituenten eine inhibierende Wirkung besitzt, wird sich dies dadurch zeigen, dass kein oder weniger Protein erzeugt wird, als im Vergleich zu den unsubstituierten Enzymgemischen. Sofern an einzelnen Positionen weniger Protein entsteht kann auf ein sequenzspezifisches Inhibieren geschlossen

20 werden. Sofern generell weniger oder kein Protein entsteht, ist von einer systematischen Inhibierung der Protein-Synthese auszugehen. Die so identifizierten Substituenten können dann nochmals in-vitro und in-vivo auf ihre Wirkung untersucht werden. Sofern die Inhibierung verstärkt beim bakteriellen System auftritt, handelt es sich um potentielle Antibiotika.

25 Besonders bevorzugt ist weiterhin die Verwendung der Methode zum Substituenten-Screening. Auch diese Anwendung ist im Vergleich zum Stand der Technik einzigartig, da man bisher jeden Substituent einzeln herstellen musste. Ein Kopierprozess wurde in diesem Zusammenhang noch nicht beschrieben. Diese Methode erlaubt es Aktivatoren, Inhibitoren und gleichwertige Ersatzstoffe aufzufinden. Hierzu werden für einen Rezeptor oder

30 Bindungspartner die entsprechenden molekularen Domänen auf Ebene der DNA codiert und die diese DNA-Sequenzen in Form eines DNA-Arrays als erster Speicher vorgelegt. Vorzugsweise als Molekülspeicher. Dann werden von diesem Original Kopien in Form von DNA, RNA oder Protein erzeugt. Bei den entsprechenden Enzymsystemen werden

Monomere vorzugsweise komplett substituieret. Dies führt dazu, dass anstelle des ursprünglichen Monomers nur noch die Substitution eingebaut wird. Es werden mehrere Kopien mit jeweils anderen Substituenten erzeugt. Danach wird der Rezeptor auf die einzelnen Kopien gegeben und sowohl die Bindung, als auch dessen Aktivierung vermessen. Spots, die keinerlei Bindung mehr aufweisen haben keinerlei Wirkung. Spots mit Bindung, aber ohne Änderung der Aktivität beinhalten ein Molekül, welches als Ersatzstoff verwendet werden kann. Spots mit erhöhter bzw. erniedrigter Aktivität beinhalten Moleküle, die als Aktivatoren bzw. Inhibitoren verwendet werden können. Folgende Anwendungen der Substitution sind dabei bevorzugt:

- 10 • Durch Einbau von unnatürlichen DNA, RNA oder Aminosäure-Bausteinen kann die Aktivität des Moleküls verbessert/gemindert werden oder ein Ersatzstoff für das bisherige Molekül gefunden werden.
- Durch den Einbau der Substituenten können molekulare Eigenschaften verändert werden. Dies bezieht sich vor allem auf Löslichkeit, Toxizität, pH- und
15 Temperaturstabilität, Ladung, Stabilität gegen Proteasen, DNasen oder RNasen.
- Bei gleicher Aktivität, aber verlangsamtem Abbau oder Metabolismus kann der gefundene Wirkstoff in geringerer Dosis verabreicht werden.
- Nebenwirkungen lassen sich dadurch reduzieren, dass zusätzliche Interaktionen, welche für die Nebenwirkungen ursächlich sind ebenfalls mit getestet werden und die
20 Substituenten so gewählt werden, dass diese Interaktionen bei gleichbleibender Aktivität geringer werden.

Außerdem bevorzugt ist die Verwendung in einem Wachstumsfaktor-Substituenten-Screening. Diese Methode stellt einen Spezialfall des Substituenten-Screenings dar. Wachstumsfaktoren insbesondere EGF und VEGF sind im Falle von Tumorzellen meist
25 hochaktivierend. Dahingehend ist es von besonderem Interesse, Moleküle zu finden, welche an den EFG- bzw. den VEGF-Rezeptor binden. In diesem besonderen Falle darf der Rezeptor sogar anfänglich aktiviert werden, da ein weiteres Enzymsystem einen längere Zeit aktiven Rezeptor deaktiviert. Sofern durch das Verbleiben des Binders im oder am Rezeptor keine erneute Aktivierung stattfindet, bleibt dieser permanent deaktiviert. Dies bedeutet, dass sich
30 das Wachstum des Tumors verlangsamt und in Kombination mit einer Therapie die Heilungsaussicht deutlich verbessert.

Hierzu werden auf DNA-Ebene bekannte und vermutete Interaktionspartnern des EGF-, des VEGF- und sonstiger Wachstumsfaktor-Rezeptoren codiert. Diese Interaktionspartner sind hauptsächlich Proteine. Daher wird zunächst ein DNA-Array als Original, vorzugsweise in Form eines Molekülspeichers, hergestellt. Dann werden Enzymgemische zur Erzeugung einer Proteinkopie hergestellt, bei denen mindestens eine Aminosäure abgereichert und durch eine

5
artifizielle andere Aminosäure ersetzt wurde oder bei denen ein Codon mit einer anderen artifiziellen Aminosäure ersetzt wird. Dies bedeutet, dass die Proteinkopie anstelle der ursprünglichen Aminosäure nun überall die artifizielle Aminosäure trägt. Diese Moleküle haben prinzipiell die gleiche oder eine ähnliche 3D-Struktur und sind somit potentiell

10
Interaktionspartner der Rezeptoren. Nun wird auf die Proteinkopie der Rezeptor gegeben und geprüft ob eine Bindung stattfindet. Dies kann direkt durch eine Echtzeitmessung wie iRiFS oder Biacore erfolgen. Nach der Bindung wird die Aktivität des gebundenen Rezeptors vermessen. Im Falle des EGF- bzw. des VEGF-Rezeptors kann dies durch eine Phosphorylierungsreaktion nachgewiesen werden. Hierzu wird auf die Kopie, an die der

15
Rezeptor bereits gebunden ist radioaktives ATP gegeben. Aktive Rezeptoren setzen dieses um und binden die Radioaktivität an sich. Mittels Autoradiografie (Auflegen eines Fotofilmes, nachfolgende Entwicklung und Analyse der Schwärzung des Filmes) kann quantifiziert werden, wie viel ATP angebunden wurde und wie aktiv der Rezeptor ist. Somit kann beurteilt werden, ob eine Bindung stattfand und wie sich dies auf die Aktivität des Rezeptors

20
auswirkte. Anhand des DNA-Originals kann die zugehörige Protein-Sequenz und anhand des Zusatzes in der Proteinkopie kann die zugehörige artifizielle Aminosäure ermittelt werden. Somit ist bekannt welcher Substituent eine aktivierende oder inhibierende Wirkung hat und kann potentiell als Tumormedikament oder Wachstumsmittel eingesetzt werden.

Auch die Verwendung zum Enzym-Screening zeigte besondere Vorteile und ist daher

25
bevorzugt. Diese Anwendung erlaubt aus einer Vielzahl von Enzymen, jene auszuwählen, welche die vorteilhaftesten Eigenschaften besitzen. Hierzu werden sämtliche in Frage kommenden Enzyme auf Ebene der DNA codiert und ein DNA-Array, bevorzugt als Molekül-Speicher, als Original erzeugt. Dies entspricht einer Pool-Kopie, wie zuvor beschrieben. Es können aber auch Zellkulturen oder Mikroorganismen gezielt mit einem

30
Substrat angezogen werden, welches umgesetzt werden muss, damit diese überleben. Hierzu kennt man meist das originäre Enzym und erlegt den Organismen einen kombinierten Mutations-Selektionsdruck auf. Die DNA-Sequenz des fraglichen Enzyms wird so durch Mutationen verändert. Diese Mutationen sind jedoch meist nur geringfügig und die DNA bleibt einer gezielten PCR zugänglich, so dass ein DNA-Original entsprechend der

Populations-Kopie einer Population an Organismen erzeugt werden kann, welche Mutationen im fraglichen Protein/Enzym aufweisen. Mittels einer Proteinkopie werden nun die Enzyme als Array erzeugt. Durch Zugabe des gewünschten Substrates des Enzyms und unter Verwendung einer Nachweisreaktion, welche mit der Enzymaktivität bzw. dem Umsatz des Substrates korreliert kann die Aktivität jedes Enzyms festgestellt werden. Folgende Anwendungen sind dabei besonders bevorzugt:

- Es werden unterschiedliche Substrate zu den einzelnen Kopien gegeben und der Stoffumsatz des Substrates an den jeweiligen Spots erfasst. Hierdurch erhält man für jedes der erzeugten Enzyme ein Profil über die Substratspezifität sowie die Aktivität.
- Es wird innerhalb eines Eigenschaftsspeicher überall dasselbe Enzym eingesetzt. Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften an den unterschiedlichen Positionen z.B. unterschiedlicher pH-Wert, Salzgehalt oder Temperatur kann erfasst werden, bei welchen Bedingungen das Enzym optimal arbeitet.

Auch die Verwendung zur Enzym-Optimierung ist bevorzugt. Sofern ein Enzym bereits bekannt ist, kann dieses nun optimiert werden. Hierzu wird die codierende DNA des Enzymes an einzelnen Positionen systematisch oder zufällig verändert, so dass einzelne oder mehrere Aminosäuren ausgetauscht werden. Dieser erzeugte DNA-Pool wird dann entsprechend der Pool-Kopie als DNA-Original erzeugt und dann mittels der Proteinkopie entsprechende Protein-Mikroarrays erzeugt, die dann sämtliche gewünschten Mutationen des Enzymes beinhalten. Dann wird die Kopie mit dem Substrat des Enzymes inkubiert. Enzym-Varianten mit hoher Aktivität setzen dieses Substrat dann um und erzeugen so schneller ein Signal als weniger aktive Enzyme. Anhand der Sequenzierung des Originals oder einer DNA-Kopie kann dann das aktivste Enzym ausgewählt werden. Des Weiteren ist es möglich diverse Kopien unter unterschiedlichen Bedingungen zu testen, so dass auch hier wiederum ein Profil jedes Enzyms erstellt werden kann.

Außerdem ist es bevorzugt die Methode der Erfindung zum Stabilitäts-Screening zu verwenden. Diese Methode dient zu verbesserten „Haltbarkeit“ von Molekülen bzw. höherer Beständigkeit gegen äußere Einflüsse sowie zersetzenden Umgebungsbedingungen wie auch enzymatischer Aktivität. Hierzu können vier Strategien verfolgt werden:

- Das ursprüngliche Molekül wird systematisch oder zufällig an einzelnen oder mehreren Positionen mutiert, so dass ein monomer ausgetauscht wird.

- Einzelne der natürlichen Monomere werden gezielt durch artifizielle Monomere ersetzt.
 - Ein chemischer Bestandteil der Monomere wird so verändert, dass er das gesamte Molekül stabilisiert.
- 5
- Das ursprüngliche Molekül wird verkürzt bzw. mit flankierenden Sequenzen verlängert, um dadurch eine höhere Stabilität zu erreichen.

Unabhängig ob es sich bei dem Molekül um DNA, RNA oder Protein handelt lassen sich alle drei Strategien getrennt oder gemeinsam anwenden. Sofern sich die Stabilität durch eine Bindung nachweisen läßt, kann ein Pool von bis zu 10^{15} oder mehr diversen Molekülen
10 dazu verwendet werden, um noch bindende Moleküle anzureichern. Es ist davon auszugehen, dass stabilere Moleküle ihre Bindungsfähigkeit länger aufrecht erhalten können. Der verbleibende Pool sollte so viele Moleküle enthalten, dass eine Pool-Kopie erzeugt werden kann. Diese wird zunächst auf Ebene der DNA realisiert. Je nach gewünschtem Molekül werden dann DNA, RNA oder Protein-Kopien erzeugt. Diese Kopien können dann
15 unterschiedlichen zersetzenden Einflüssen wie hoher/tiefer pH, aggressiven Chemikalien, hohen Temperaturen, enzymatischen Aktivitäten etc. ausgesetzt werden. Dabei wird jeder Spot des kopierten Mikroarrays analysiert und dessen Zersetzung in Echtzeit vermessen. Stabile Moleküle zeichnen sich durch eine deutlich langsamere Zersetzung aus.

Auch die Verwendung zur DNase/RNase-Stabilisierung ist bevorzugt. Diese Methode dient
20 zur Erhöhung der Haltbarkeit von DNA und RNA. Hierzu können folgenden Strategien angewandt werden:

- Das ursprüngliche Molekül wird mit flankierenden Sequenzen verlängert, um dadurch eine höhere Stabilität zu erreichen. Durch die flankierenden Sequenzen bilden sich Sekundär- und Tertiärstrukturen aus, die von RNasen und DNasen nicht mehr
25 angreifbar sind.
- Einzelne der natürlichen Monomere werden gezielt durch artifizielle Monomere ersetzt. Hierbei kann eines der vier Bausteine durch eine artifizielle DNA- oder RNA-Base ersetzt werden.
- Ein chemischer Bestandteil der Monomere wird so verändert, dass er das gesamte
30 Molekül stabilisiert. Im Falle von RNA- und DNA- sind sogenannte PNAs sehr

bekannt. Hierbei kann das Phosphat gegen eine Aminosäure ausgetauscht. Dieser Austausch schützt vor Zersetzung durch RNasen und DNasen, erlaubt aber noch volle Funktionalität. Aber auch andere Modifikationen der Zucker, der Phosphate oder der Basen sind anwendbar.

5 Hierzu wird die originale DNA-Sequenz bzw. RNA-Sequenz mit flankierenden Sequenzen versehen. Diese werden systematisch oder einem zufallsbedingten Prozess generiert. Die
entstandenen Varianten werden als Pool-Kopie in Form eines DNA-Arrays als Original
erzeugt. Dann werden mehrere Kopien in Form von DNA- oder RNA-Mikroarrays erzeugt.
Bereits bei der Erzeugung der Kopien kann jeweils andere artifizielle Monomere zugesetzt,
10 oder nach Erzeugung der Kopie chemische Modifikationen vorgenommen werden. Optional
kann bereits während der Erzeugung noch ein Label eingebracht werden, welches die
Intaktheit des kompletten DNA- bzw. RNA-Stranges nachweist (z.B. Fluorophore oder ein
Fluorophor-Quencher-Paar). Die erzeugten Kopien werden nun dem zersetzenden Einfluss
ausgesetzt. Im Falle von RNasen bzw. DNasen werden diese direkt auf die Mikroarrays
15 gegeben. DNA- bzw. RNA-Stränge von geringer Stabilität zersetzen sich, was sich im Falle
von eingebauten Fluorophoren durch eine Fluoreszenzabnahme bemerkbar macht (im Falle
eines Fluorophor-Quencher-Paares durch Fluoreszenz-Zunahme). Innerhalb eines Arrays
kann so sequenzspezifisch die Stabilität der einzelnen flankierenden Sequenzen ermittelt
werden. Werden Spots mit gleicher Sequenz auf verschiedenen Arrays miteinander
20 verglichen, so kann über die stabilisierende Wirkung der einzelnen Monomere oder
chemischen Modifikationen eine Aussage getroffen werden. Aus der Kombination von
Sequenzabhängigkeit, Substitution einzelner Monomere und chemischer Modifikation kann
ein möglichst stabiler DNA- bzw. RNA-Strang abgeleitet werden.

Auch die Protein-Stabilisierung ist ein bevorzugtes Anwendungsgebiet. Diese Methode dient
25 zur Erhöhung der Haltbarkeit von Proteinen. Hierzu können folgenden Strategien bevorzugt
angewandt werden:

- Das ursprüngliche Protein wird mit flankierenden Sequenzen verlängert, um dadurch
eine höhere Stabilität zu erreichen. Durch die flankierenden Sequenzen bilden sich
Sekundär- und Tertiärstrukturen aus, die von Proteasen nicht mehr angreifbar sind
30 oder Bereiche des Proteins abdecken, die sonst angreifbar sind.
- Einzelne der natürlichen Aminosäuren werden gezielt durch artifizielle Aminosäuren
ersetzt, die dann von Proteasen nicht mehr abbaubar sind.

- Ein chemischer Bestandteil der Aminosäuren wird so verändert, dass er das gesamte Molekül stabilisiert. Beispielsweise ist hier eine chemische Modifikation der Peptidbindung denkbar.

Hierzu wird die originale Protein-Sequenz in Form von codierender DNA angefertigt und bei Bedarf mit flankierenden Sequenzen versehen, bzw. einzelne oder mehrere Aminosäuren ausgetauscht. Diese Variationen werden systematisch oder einem zufallsbedingten Prozess generiert. Die entstandenen Varianten werden als Pool-Kopie in Form eines DNA-Arrays als Original erzeugt. Dann werden mehrere Kopien in Form von Protein-Mikroarrays erzeugt. Bereits bei der Erzeugung der Kopien kann jeweils artifizielle Aminosäuren zugesetzt, oder nach Erzeugung der Kopie chemische Modifikationen vorgenommen werden. Optional kann bereits während der Erzeugung noch ein Label eingebracht werden, welches die Intaktheit des Proteins nachweist (z.B. Fluorophore oder ein Fluorophor-Quencher-Paar). Innerhalb eines Arrays kann so sequenzspezifisch die Stabilität der einzelnen flankierenden Sequenzen oder Aminosäure-Austausch-Positionen ermittelt werden. Werden Spots mit gleicher Sequenz auf verschiedenen Arrays miteinander verglichen, so kann über die stabilisierende Wirkung der einzelnen Monomere oder chemischen Modifikationen eine Aussage getroffen werden. Aus der Kombination von Sequenzabhängigkeit, Substitution einzelner Aminosäuren und chemischer Modifikation kann ein möglichst stabiles Protein abgeleitet werden.

Außerdem ist die Verwendung zur Antikörper-Stabilisierung bevorzugt. Diese Methode erlaubt die Stabilisierung von Antikörpern. Antikörper werden zunehmend im therapeutischen und diagnostischen Bereich eingesetzt. Hierzu ist eine Langzeitlagerbarkeit von Vorteil. Daher wird die originale DNA-Sequenz, die den Antikörper codiert in den Positionen variiert, die nicht für die Bindungsfähigkeit des Antikörpers gegen das Antigen ausschlaggebend sind. Die Variationen können gezielt oder zufallsbedingt eingefügt werden. Danach wird der so erzeugte DNA-Pool als DNA-Original erzeugt. Davon werden dann Protein-Kopien angefertigt. Diese Protein-Mikroarrays stellen eine Mutations-Bibliothek des originalen Antikörpers dar. Eine der Kopien wird zur Bindungsanalyse eingesetzt, um nachzuweisen, dass die verwendeten Mutationen keinen Einfluss auf die Bindefähigkeit des Antikörpers haben. Dann werden die Kopien eingelagert und in regelmäßigen Zeitabständen je ein Satz Kopien auf Bindung getestet. Somit kann ermittelt werden, welche Variante des Antikörpers auch nach langer Lagerzeit noch hohe Aktivität aufweist. Parallel hierzu kann auch das Antikörper-Array verschiedenen Proteasen ausgesetzt werden, um festzustellen wie stabil

welche Variante gegen Zersetzung durch Proteasen ist. Aus den Ergebnissen kann eine optimierte langzeitstabile Antikörpersequenz abgeleitet werden.

Auch die Verwendung der Methode zum Substrat-Screening ist besonders bevorzugt. Mittels dieser Anwendung kann für ein vorgegebenes Enzym festgestellt werden, welche Art von Substrat es auf Ebene von DNA, RNA oder Protein umsetzen kann. Hierzu werden zunächst
5 sämtliche bekannten Substrate auf Ebene der DNA codiert und zusätzlich noch Mutationen in diese Substrate eingebracht. Der entstehende DNA-Pool als DNA-Original gefertigt. Dann werden je nach benötigtem Substrat Kopien in Form von DNA, RNA oder Protein-Arrays gefertigt. Bereits hier kann bei der Herstellung eine Signalerzeugung integriert werden.
10 Beispielsweise können zufällig, oder endständig, Fluorophore eingebaut werden oder ein Fluorophor-Quencherpaar erzeugt werden. Dies kann beispielsweise durch ganzflächiges Anbringen eines Fluorophors an der Oberfläche realisiert werden. Die erzeugten Moleküle tragen dann den Quencher endständig, mit möglichst großer Distanz zur Oberfläche. Auf die erzeugte Kopie kann dann das Enzym gegeben werden. Je nach Klasse des Enzyms kann ein
15 entsprechendes Signal generiert werden, welches die Enzymaktivität dadurch nachweist, dass der jeweilige Spot des Mikroarrays verändert wurde. Bei einer Aufspaltung des Substrates kann beispielsweise ein Fluorophor oder ein Quencher abgespalten werden, bei einer Redoxreaktion kann ein Farbstoff verändert werden oder bei einer Ligation kann ein Fluorophor oder ein Quencher eingefügt und damit die Fluoreszenz verändert werden. Spots,
20 die sich verändern sind somit ein Substrat des jeweiligen Enzyms. Da anhand des Originals oder einer DNA-Kopie die Sequenz festgestellt werden kann, kann man auf die jeweilige DNA, RNA oder Protein-Sequenz zurück schließen. Somit kann die Bandbreite der Substrate für ein Enzym ermittelt werden.

Auch die Verwendung der Methode zum Protease-Screening ist bevorzugt. Mit dieser
25 Methode lassen sich für unterschiedliche Proteasen die entsprechenden Proteine finden, die von diesen zerschnitten werden. Insbesondere die Sequenzabhängigkeit von flankierenden Sequenzen kann ermittelt werden. Hierzu kann wahlweise ein DNA-Pool an Substratcodierender DNA erzeugt werden, oder es kann ein Gesamt-Genom, ein Gesamt-Transkriptom oder ein Gesamt-Proteom-Array hierzu verwendet werden. In jedem Falle liegt
30 zunächst auf DNA-Ebene ein Original vor. Von diesem werden dann mittels Proteinkopie entsprechende Kopien in Form von Protein erzeugt. Die Kopie wird dann mit der Protease inkubiert. Sofern ein Spot ein Protein enthält, welches von der Protease zersetzt wird, wird dort ein Signal generiert. Dies kann beispielsweise durch Zunahme der Fluoreszenz erfolgen,

wenn ein Quencher abgespalten wird oder durch Abnahme von Fluoreszenz, wenn eingebaute oder endständige Fluorophore abgespalten werden, da die Proteinkette abgebaut wird. Anhand der Vergleiche der DNA-Sequenz und die daraus abgeleitete Protein-Sequenz läßt sich dann ermitteln, welche Proteine von der Protease zersetzt werden. Sofern eine Detektion der Kinetik möglich ist lassen sich zudem Aussagen treffen, wie stark flankierende Sequenzen oder eine Ersetzung einer Aminosäure durch eine andere die katalytische Aktivität der Protease beeinflusst. Sofern eine Gesamt Proteom-Kopie verwendet wurde, kann man eine Aussage treffen welche Proteine des Proteoms von dieser Protease zersetzt werden.

Außerdem ist die Verwendung der Methode zum Kinase-Substrat-Screening bevorzugt. Mit dieser Methode läßt sich ein Substratprofil für Kinasen anfertigen. Insbesondere die Sequenzabhängigkeit kann ermittelt werden. Hierzu kann wahlweise ein DNA-Pool an Protein-codierender DNA erzeugt werden, oder es kann ein Gesamt-Genom, ein Gesamt-Transkriptom oder ein Gesamt-Proteom-Array hierzu verwendet werden. In jedem Falle liegt zunächst auf DNA-Ebene ein Original vor. Von diesem werden dann mittels Proteinkopie entsprechende Kopien in Form von Protein erzeugt. Die Kopie wird dann mit Kinase und in einer bevorzugten Ausführungsform mit radioaktiv markiertem ATP versetzt. In anderen bevorzugten Ausführungsformen sind andere Signalgenierungen denkbar (beispielsweise durch Fluoreszenzmarkierung, oder elektrische Detektion der pH-Veränderung während einer Phosphorylierung). Sofern ein Spot als Substrat der eingesetzten Kinase dient, wird das radioaktive Phosphat direkt an das Protein gebunden. Mittels Autoradiografie kann dann die Radioaktivität in jedem Spot quantifiziert werden. Besonders gut akzeptierte Substrate der Kinase weisen eine besonders hohe Radioaktivität auf. Somit kann für den Pool an ausgewählten Proteinen oder Proteom-weit sämtliche Substrate der Kinase erfasst werden. Sofern bei der Erzeugung der Protein-Kopien zusätzlich artifizielle Aminosäuren eingesetzt wurden kann auch hier über die Akzeptanz der Kinase für solche Substrate eine Aussage getroffen werden. Somit kann für die Kinase eine Zuordnung von Protein-Sequenz und Kinase-Aktivität getroffen werden.

Auch die Verwendung zum Phosphatase-Substrat-Screening ist besonders bevorzugt. Mit dieser Methode läßt sich ein Substratprofil für Phosphatasen anfertigen. Insbesondere die Sequenzabhängigkeit kann ermittelt werden. Prinzipiell stellt diese Methode eine Umkehrung des Kinase-Substrat-Screenings dar. Hierzu wird wahlweise ein DNA-Pool an Protein-codierender DNA erzeugt, oder es kann ein Gesamt-Genom, ein Gesamt-Transkriptom oder ein Gesamt-Proteom-Array hierzu verwendet werden. In jedem Falle liegt zunächst auf DNA-

Ebene ein Original vor. Von diesem werden dann mittels Proteinkopie entsprechende Kopien in Form von Protein erzeugt. Die Kopie wird in einer bevorzugten Ausführungsform mit radioaktivem Phosphat markiert. In anderen Ausführungsform sind andere Signalgenierungen denkbar (beispielsweise durch Fluoreszenzmarkierung, oder elektrische Detektion der pH-Veränderung während einer De-Phosphorylierung). Somit trägt jeder Spot eine anfänglich hohe Radioaktivität. Sofern ein Spot als Substrat der eingesetzten Phosphatase dient, wird das radioaktive Phosphat vom Protein abgespalten. Mittels Autoradiografie kann dann die Radioaktivität in jedem Spot quantifiziert werden. Besonders gut akzeptierte Substrate der Phosphatase weisen eine besonders niedrige Radioaktivität auf. Somit kann für den Pool an ausgewählten Proteinen oder Proteom-weit sämtliche Substrate der Phosphatase erfasst werden. Sofern bei der Erzeugung der Protein-Kopien zusätzlich artifizielle Aminosäuren eingesetzt wurden kann auch hier über die Akzeptanz der Phosphatase für solche Substrate eine Aussage getroffen werden. Somit kann für die Phosphatase eine Zuordnung von Protein-Sequenz und Phosphatase-Aktivität getroffen werden.

Auch das Restriktions-Substrat-Screening stellt eine bevorzugte Anwendung dar. Mit dieser Methode kann über ein Genom hinweg geprüft werden, wo ein Restriktionsenzym entsprechende zersetzende Aktivität entfaltet. Hierzu wird eine Gesamt-Genom-Kopie als DNA-Original erzeugt. Dieses Original wird in Form von DNA-Mikroarrays kopiert. Somit liegen sämtliche DNA-Sequenzen des Genoms vor. Spots, die vom Restriktionsenzym zersetzt werden, können mittels Zunahme von Fluoreszenz (bei Abspalten eines endständigen Quenchers) oder durch Abnahme von Fluoreszenz (durch Abspalten eines endständigen Fluorophors) erfasst werden. So kann über das gesamte Genom hinweg erfasst werden, welche Sequenzen durch das Restriktionsenzym zersetzt werden.

Außerdem bevorzugt ist die Verwendung zur Isoenzym-Differenzierung. Sofern von einem Enzym mehrere Isoenzyme vorliegen kann eine Differenzierung der Substratabhängigkeit dahingehend erfolgen, dass mittels der für das Substrat-Screening, Protease-Screening, Kinase-Substrat-Screening, Phosphatase-Substrat-Screening und/oder Restriktions-Substrat-Screening beschriebenen Methoden identische Mikroarraykopien mit jeweils einem der Isoenzyme inkubiert werden und ein Substratprofil erstellt wird. Ein Vergleich dieser Profile miteinander erlaubt es so gezielt jene Spots aufzufinden, die von einem der Isoenzyme besonders gut und von einem anderen besonders schlecht umgesetzt wird. Diese DNA-Sequenz wird dann nochmals gezielt oder zufällig an einzelnen Positionen verändert. Der entstehende DNA-Pool wird dann wiederum als DNA-Original hinterlegt und entsprechende

Mikroarray-Kopien gefertigt. Diese werden nochmals je einzeln den Isoenzymen ausgesetzt. Aufgrund der erneuten Mutationen des Substrates, welches bereits die beste Unterscheidung zwischen den Isoenzymen geliefert hat, besteht rein statistisch eine gute Chance ein noch besseres Substrat zu finden, welches von einem der Isoenzymen gut und vom anderen schlecht akzeptiert wird. Somit kann man ein Substrat speziell nur für ein Isoenzym generieren.

Durch den Einbau von artifiziellen Monomeren während der Erzeugung der Kopie ist es zudem möglich nicht umsetzbare Substrate zu generieren, die nur von einem der Isoenzyme akzeptiert werden. Bei entsprechend hoher Affinität stellt dieses nicht umsetzbare Substrat einen Inhibitor für dieses Enzym dar. Dieses Auffinden von Isoenzyminhibitoren ist insbesondere bei der Medikamentenentwicklung von hohem Interesse.

Außerdem kann die Methode Ribozym-Kopie verwendet werden. Diese Methode erlaubt die Erfassung von katalytischen Aktivitäten von RNA. Ribozyme weisen katalytische Aktivität auf und besitzen Eigenschaften wie Enzyme, bestehen jedoch aus RNA. Es wird zunächst ein DNA-Pool erzeugt, der potentielle Ribozyme codiert. Dieser DNA-Pool wird in ein DNA-Original umgewandelt und dann RNA-Kopien gefertigt. Nun können auf jedes dieser Arrays je ein Substrat gegeben werden. Spots, die eine katalytische Aktivität gegenüber dem Substrat zeigen generieren ein Signal, welches in der Umsetzung des Substrates begründet ist. Dies kann z.B. die Abspaltung einer chemischen Gruppe sein, welche die Farbe des Moleküls ändert. Anhand der Sequenzierung des DNA-Originals oder einer DNA-Kopie lässt sich die Sequenz der RNA ableiten und daraus auch, welche Sequenz welche katalytische Aktivität besitzt.

Ganz besonders bevorzugt ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Methode zum Display-Screening. Ein besonderer Vorteil ist, dass dieses Screening sozusagen als „Endstufe“ für alle gängigen Displays verwendet werden kann. Diese Methode stellt eine Erweiterung des Durchsatzes an analysierten Molekülen für jegliche Display-, Selektions- oder Anreicherungsverfahren für DNA, RNA oder Proteine dar. Mittels der jeweiligen Methodik, welche zumeist mit einem Pool an Molekülen startet die 10^9 und mehr diverse Moleküle enthält, kann ein angereicherter Pool von 10^6 oder weniger Moleküle erzeugt werden, welche die gewünschten Eigenschaften enthalten. Dieser Pool an Molekülen mit angereicherten Eigenschaften wird zu einem DNA-Pool umgeformt (RNA mittels Reverser Transkriptase zu DNA, Proteine eines Displays hängen stets mit der generierenden DNA zusammen, diese kann mittels PCR zu einem DNA-Pool arrangiert werden). Dieser DNA-

Pool wird dann als Pool-Kopie gemäß bzw. Display-Kopie und/oder deren Untervarianten als
DNA-Original erzeugt. Von diesem DNA-Original werden dann entsprechende Kopien in
Form der benötigten Moleküle erzeugt. Diese können DNA, RNA oder Protein sein. Jede
Kopie kann dann bezüglich einer anderen molekularen Eigenschaft untersucht werden. Aus
5 der Zuordnung jedes Punktes jeder Kopie zur originären DNA-Sequenz lässt sich für jedes
Individuum des DNA-Pools bzw. des ursprünglich angereicherten Pools das jeweilige Set an
Eigenschaften zuordnen. Aus dieser Menge kann dann das Molekül ermittelt werden, welches
die beste Kombination an gewünschten Eigenschaften aufweist. Da mittels der Kopien viele
diverse Eigenschaften erfasst werden können und da eine Kopie viele einzelne individuelle
10 Moleküle trägt, wird mit dieser Methode ein deutlich höherer Umsatz an untersuchten
Molekülen generieren, als es bei bisherigen Methoden möglich ist.

Es ist auch bevorzugt, die Methode der Erfindung zum Antikörper-Screening aus artifiziellen
Quellen zu verwenden. Diese Methode erleichtert das Display-Screening von Antikörper-
Bibliotheken, insbesondere das Phage-Display mit Antikörpern. Aus einer Phage-Display-
15 Bibliothek mit artifiziellen randomisierten Antikörpern oder Antikörperfragmenten wird
zunächst eine Anreicherung der Phagen gegen das Antigen vorgenommen, so dass von den
anfänglich oft bis zu 10^{15} verschiedenen Antikörpern nur noch weniger als 10^6
unterschiedliche Antikörper und zugehörige DNA-Stränge verbleiben. Aus diesem
angereicherten DNA-Pool wird ein DNA-Original erzeugt. Das DNA-Original wird dann in
20 Form von DNA, RNA bzw. Protein-Kopien abgebildet. Mittels Transfektionsmethoden ist es
nun möglich, die DNA oder die RNA in Zellen zu transfizieren und damit diese zur
Produktion von Antikörpern anzuregen. Parallel dazu kann die Protein-Kopie, welche die
Antikörper enthält auf Bindung gegen das Antigen untersucht werden. Spots, die ein
besonders starkes Signal zeigen, weisen eine besonders starke Bindung gegen das Antigen
25 auf. Aufgrund der Sequenzierung des DNA-Originals oder einer DNA-Kopie, kann auf die
Aminosäuresequenz des Antikörpers geschlossen werden. Sofern DNA oder RNA
wiedergewonnen wurde, kann diese direkt zur Transfektion eingesetzt werden. Somit ist es
dann möglich die identifizierten, gut bindenden Antikörper direkt wieder in Zellen zu
erzeugen. Diese Methode erlaubt es, wie bei allen Displaymethoden, eine Verbesserung des
30 Durchsatzes der analysierten Moleküle zu erreichen. In diesem Falle handelt es sich um
Antikörper. Vorteilhafter Weise muss nur eine einzige Anreicherung gegen das Antigen
vorgenommen werden, anstelle der sonst üblichen 3 bis 4 Runden eine Phage-Displays.
Zudem erhält man zum Ende der Analyse Daten von bis zu 10^6 Antikörpern anstelle der

üblichen 10^2 bis 10^3 . Somit stellt diese Ausführungsform eine Verbesserung des bisherigen Phage-Displays mit Antikörpern dar.

Es ist auch bevorzugt, die Methode zum Antikörper-Sampling aus organischen Proben zu verwenden. Mit dieser Methode lassen sich aus Organismen gezielt Antikörper gegen Antigene identifizieren. Aus einem Organismus, der einem Antigen ausgesetzt war, werden B-Zellen gewonnen. Jede B-Zelle trägt dabei einen anderen Antikörper in sich codiert. Hierzu ist es notwendig, den variablen Sequenzteil der mRNA der leichten und die schwere Kette jeder Zelle miteinander zu verbinden. Die B-Zell-Population kann direkt als Populations-Kopie als DNA-Original erzeugt werden. Die DNA ist dann die cDNA, die sich von der mRNA des Antikörpers ableitet. Es ist aber auch denkbar, dass die Zellen zunächst physikalisch vereinzelt und aufgearbeitet werden z.B. in einer Tropfen-Emulsion und in jedem dieser Kompartimente die mRNA in cDNA umgeschrieben und dann jeweils die cDNA der leichten und der schweren Kette miteinander zu einem DNA-Strang verknüpft wird. Der so erzeugte DNA-Pool kann dann in ein DNA-Original überführt werden. In den bevorzugten Ausführungsformen sind entweder die leichte und die schwere Kette in voller Länge vorhanden (Auslegung 1) oder das erzeugte Konstrukt entspricht einem ScFv (Auslegung 2), in dem die variablen Bereiche der leichten und der schweren Kette über einen kurzen Spacer miteinander verbunden sind. In beiden Fällen wird das DNA-Original oder eine DNA-Kopie sequenziert und Protein-Kopien gefertigt. Die erzeugten Protein-Arrays enthalten die Antikörper (in Auslegung 1) oder die ScFv-Antikörper (Auslegung 2). Diese Antikörper-Arrays werden dann mit dem Antigen inkubiert, dem der Organismus ausgesetzt war. Antikörper gegen dieses Antigen weisen dann eine Bindung zum Antigen auf. Hierdurch kann für dieses Antigen die jeweilige Sequenz der bindenden Antikörper identifiziert und sogar eine ScFv-Bibliothek gewonnen werden.

- Des Weiteren können die erzeugten Antikörper-Arrays mit unterschiedlichen Antigenen inkubiert und geprüft werden, ob weitere Bindungsaktivitäten vorliegen.
- Ebenso kann vom infizierenden Antigen oder Organismus ein Lysat auf die Antikörper-Arrays gebracht werden und damit sämtliche Antikörper gegen das Antigen bestimmt werden.

Diese Methode besonders vorteilhaft, da sie erlaubt systematisch eine Vielzahl an Antikörpern zu gewinnen, zu charakterisieren und für eine spätere Verwendung die DNA-Sequenz aufzuklären.

Außerdem ist die Verwendung zur Antikörper-Optimierung bevorzugt. Sofern ein Antikörper gegen ein Antigen bekannt ist, kann nun dieser Antikörper in Hinblick auf seine Eigenschaften und Bindungsfähigkeiten nochmals optimiert werden. Hierzu wird basierend auf der codierenden DNA, ein DNA-Pool erzeugt, der an bestimmten oder an zufälligen Positionen Mutationen oder Austausch enthält. Dieser DNA-Pool kann dann entsprechend einer Display-Methode bezüglich der gewünschten Eigenschaften des Antikörpers (höhere Löslichkeit, bessere Stabilität bei geänderter pH oder Salzgehalt etc.) angereichert werden und wird dann zu einem DNA-Original verarbeitet, welches dann wiederum mittels der Protein-Kopie in Antikörper-Arrays abgebildet wird. Die so erzeugten Antikörper-Arrays werden dann mit dem Antigen unter den gewünschten Bedingungen (konzentrierte Lösung, geänderter pH oder Salzgehalt etc.) inkubiert und detektiert. Der Spot mit der stärksten Bindung stellt den Antikörper mit der besten gewünschten Eigenschaft dar. Anhand der Sequenzierung lassen sich die DNA-Sequenz und damit die Aminosäuresequenz des Antikörpers entschlüsseln. Mit dieser Methode ist es dann möglich eine große Anzahl an Antikörpern direkt miteinander zu vergleichen und somit aus einer großen Auswahl den besten zu selektieren. Bisherige Display-Methoden sind insbesondere in der Anzahl der charakterisierten Antikörper stark limitiert, wodurch es oft dazu kommt, dass der beste Antikörper nicht erfasst wird. Durch einen höheren Durchsatz ist die Chance den besten Antikörper zu erfassen deutlich verbessert. Diese Methode erlaubt die Optimierung von Antikörpern, Antikörper-Bestandteilen oder artifiziellen Antikörpern.

Auch bevorzugt ist die Verwendung der Methode zur Antikörper-Optimierung von ScFv. Mit dieser Methode kann ein bereits existierender ScFv (single chain antibody) bezüglich seiner Verbindungskette optimiert werden. Bei ScFv liegen nur die beiden variablen bindenden Bereiche eines Antikörpers vor, welche über eine sehr kurze Verbindungskette miteinander verbunden sind. Ohne diese Verbindungskette ist die Affinität der kurzen variablen Ketten zu gering, wodurch der Komplex einfach zerfällt. Die Verbindungskette dient somit zu Stabilisierung. Dahingehend ist es von hohem Interesse, diese Verbindungskette so zu optimieren, dass eine möglichst hohe Affinität zum Antigen erzielt wird. Daher wird ein DNA-Pool erzeugt, welcher das ScFv codiert. Die DNA ist im Bereich der variablen Regionen stets identisch, einzig im Bereich der Verbindungskette werden in einzelnen oder mehreren Positionen gezielt oder zufällig Mutationen eingefügt. Der DNA-Pool kann wahlweise mittels einer Display-Methode angereichert werden, so dass möglichst affine ScFv codiert werden, oder direkt verwendet werden. Es wird ein DNA-Original erstellt und daraus Protein-Kopien erzeugt. Die so erhaltenen ScFv-Arrays enthalten dann sämtliche Mutationen.

Auf diese Arrays wird dann das Antigen gegeben und die Bindung vermessen. Spots mit einer besonders hohen Bindung sind besonders affin gegen das Antigen. Aufgrund der Sequenzierung des DNA-Originals oder einer DNA-Kopie kann die Aminosäuresequenz der Verbindungskette mit der höchsten Affinität ermittelt werden. Ebenso lässt sich eine
5 Rangliste der Affinität erstellen und diese den Sequenzen zuordnen. Aus Ähnlichkeitsvergleichen lässt sich eine Systematik ableiten, die der jeweiligen Sequenz eine Affinität zuordnet. Diese Systematik kann für Vorhersagen von Bindungsaffinitäten von ScFv gegen andere Antigene verwendet werden. Insgesamt erlaubt die Methode eine Optimierung der Verbindungskette, indem eine Vielzahl an Varianten untersucht und eine Systematik
10 abgeleitet wird.

Es ist außerdem besonders bevorzugt, die Methode der Erfindung zum Epitop-Screening zur Impfstoffentwicklung einzusetzen. Bevorzugt kann das Verfahren zur Gewinnung aller Peptid-Impfstoffe angewendet werden. Hierdurch ist es erstmals möglich die
15 Impfstoffproduktion innerhalb weniger Tage durchzuführen. Mit dieser Methode lassen sich Epitope auf Eben der DNA, RNA oder Proteine ableiten, welche als Immunogene dienen und somit zum Einsatz als Impfstoffe tauglich sind. Hierzu wird ein Organismus benötigt, welcher über ein Immunsystem verfügt. Dieser Organismus wird einem Parasiten, Bakterium, Virus (Immunogen) ausgesetzt. Im Falle, dass der Organismus überlebt, befinden sich
20 entsprechende Antikörper in dessen Blutbahn, die mittels einer Immunabwehr generiert wurden und den Organismus nun immun gegen das Immunogen machen. Von diesem Organismus wird nun eine Gewebeprobe und eine Blutprobe gewonnen. Aus der Blutprobe werden die Antikörper und die B-Zellen aufgereinigt. Die Gewebeprobe wird in eine Zellkultur überführt und nochmals mit dem Immunogen infiziert. Diese infizierte
25 Gewebeprobe wird dann geerntet und daraus dann ein Gesamt-Genom, Gesamt-Transkriptom und Gesamt-Proteom hergestellt. Somit enthalten die Arrays neben den für den Organismus üblichen Molekülen auch die durch Infektion entstandenen Moleküle. Auf diese Infektions-Arrays werden dann die aufgereinigten Antikörper gegeben. Sofern, auf Ebene von DNA, RNA oder Protein, Immunogene vorhanden sind, werden sich die Antikörper an diese binden. Somit stellt jeder Spot, an den die Antikörper binden ein potentielles Epitop eines
30 Immunogens dar. Durch Sequenzierung des DNA-Originals kann die DNA, RNA oder Proteinsequenz des Immunogens aufgeklärt werden. Zudem ist es möglich vom DNA-Original oder einer der Kopien gezielt die identifizierten Immunogene oder deren DNA freizusetzen. Daraus können dann die Immunogene aufgereinigt oder erzeugt werden. Diese Immunogene können dann auf die erhaltenen B-Zellen gegeben werden. B-Zellen, die das

Immunogen binden, werden aktiviert und beginnen sich zu teilen. So kann eine Zellkultur angelegt werden, welche speziell die Antikörper produziert, welche das Immunogen abwehrt. Somit stehen für eine Impfstoffentwicklung sowohl das Immunogen selbst zur aktiven Immunisierung, als auch passende Antikörper zur passiven Immunisierung, zur Verfügung.
5 Diese Kombination ist einmalig und erlaubt eine Impfstoffentwicklung innerhalb einer Woche.

Auch bevorzugt ist das Epitop-Screening zur Autoimmunaufklärung. Mit dieser Methode lässt sich abklären, ob es auf Ebene der DNA, RNA oder Proteine Epitope gibt, welche eine Autoimmunantwort auslösen. Das Verfahren entspricht weitgehend dem Epitop-Screening für
10 Impfstoffe. Der Organismus, welcher über ein Immunsystem verfügt, ist der zu untersuchende Organismus selbst, der an einer Autoimmunreaktion leidet. In jedem Falle besitzt der Organismus entsprechende Antikörper in seiner Blutbahn, die mittels einer Immunabwehr generiert wurden und den Organismus zu einer Autoimmunität induzieren. Von diesem Organismus werden nun eine Gewebeprobe und eine Blutprobe gewonnen. Aus der Blutprobe
15 werden die Antikörper und die B-Zellen aufgereinigt. Die Gewebeprobe wird in eine Zellkultur überführt und daraus dann ein Gesamt-Genom, Gesamt-Transkriptom und Gesamt-Proteom hergestellt. Diese Arrays enthalten sämtliche DNA, RNA und Proteine, gegen die der Organismus eine Reaktivität entwickeln kann. Auf diese Arrays werden dann die aufgereinigten Antikörper gegeben. Sofern, auf Ebene von DNA, RNA oder Protein,
20 Immunogene vorhanden sind, werden sich die Antikörper an diese binden. Somit stellt jeder Spot, an den die Antikörper binden ein Auto-Immunogen dar. Durch Gewinnung der Immunogene von den Kopien kann geprüft werden, ob sich die B-Zellen damit aktivieren lassen und damit eine Autoimmunität gegen diese Auto-Immunogene vorliegt. Sofern diese Auto-Immunogene identifiziert sind, kann eine entsprechende Therapie erarbeitet werden, so
25 dass die Autoimmunität abgeschwächt, verlangsamt, oder gar aufgehoben wird. Diese Methode dient jedoch nur dazu die Auto-Immunogene zu identifizieren und nicht zur Etablierung einer Therapie.

Es ist außerdem bevorzugt, die Methode der Erfindung zum Epitop-Screening zur Allergieforschung zu verwenden. Mit dieser Methode lässt sich abklären, ob es auf Ebene
30 der DNA, RNA oder Proteine bereits bekannte Epitope gibt, welche eine Allergie auslösen. Das Verfahren entspricht weitgehend dem Epitop-Screening für Impfstoffe. Der Organismus, welcher über ein Immunsystem verfügt, ist der zu untersuchende Organismus selbst, der an einer Allergie leidet. In jedem Falle besitzt der Organismus entsprechende Antikörper in

seiner Blutbahn, die mittels einer Immunabwehr generiert wurden und den Organismus nun reaktiv gegen das Allergen machen. Von diesem Organismus wird eine Blutprobe gewonnen. Aus der Blutprobe werden die Antikörper und die B-Zellen aufgereinigt. Weiterhin wird ein DNA-Pool erzeugt, der bekannte Epitope auf Ebene von DNA, RNA oder Protein codiert.

5 Dieser Pool wird zur Erzeugung eines DNA-Originals genutzt und davon Kopien in Form von DNA, RNA und Protein erzeugt. Da der Pool bekannte Allergene in codierter Form enthält, bestehen die Arrays aus bekannten Allergenen. Auf diese Allergen-Arrays werden dann die aufgereinigten Antikörper gegeben. Sofern, auf Ebene von DNA, RNA oder Protein, Allergene vorhanden sind, werden sich die Antikörper an diese binden. Aufgrund der

10 Position, an welche die Antikörper binden kann dann eine Sequenz und damit die auslösende Spezies der Allergie zugeordnet werden. Dann kann zu den B-Zellen sowohl die Allergene als auch die Spezies selbst hinzugegeben und geprüft werden, ob die B-Zellen auf die Gegenwart der Spezies reagieren. Somit kann mit diesem Verfahren mit einer sehr hohen Anzahl an molekularen Antigenen getestet werden, ob eine Allergie vorliegt und dann nochmals mittels

15 der B-Zellen eine Gegenprüfung gemacht wird. Allerdings entgehen dieser Methode Allergene, die bisher nicht beschrieben oder charakterisiert wurden.

Es ist außerdem bevorzugt die Methode zum Epitop-Screening zur Allergenaufklärung zu verwenden. Mit dieser Methode lässt sich abklären, ob es auf Ebene der DNA, RNA oder Proteine Epitope gibt, welche eine Allergie auslösen. Das Verfahren entspricht weitgehend

20 dem Epitop-Screening für Impfstoffe. Hierzu wird ein Organismus benötigt, der über ein Immunsystem verfügt und von dem bekannt ist, dass dieser eine Allergie gegenüber einer bestimmten Spezies entwickelt hat. Vom Organismus wird eine Blutprobe entnommen und daraus Antikörper und B-Zellen gewonnen. Von der Spezies gegen welche die Allergie vorliegt werden Proben entnommen und daraus Gesamt-Genom-, Gesamt-Transkriptom- und

25 Gesamt-Proteom-Arrays erzeugt. Sofern auf DNA, RNA oder Protein-Ebene Allergene existieren, sind diese in den erzeugten Arrays enthalten. Die aufgereinigten Antikörper werden nun auf die Arrays gegeben. Befindet sich darauf ein Allergen, binden die Antikörper darauf. Aufgrund der Position und der Sequenzierung lässt sich die Sequenz des Allergens ableiten. Wiedergewonnene Allergene werden dann zu den B-Zellen gegeben. Sofern die B-

30 Zellen eine Reaktion zeigen und damit das Allergen bestätigen, kann anhand dieser Methode noch unbekannte Allergene auf Ebene von DNA, RNA oder Proteinen identifiziert werden.

Außerdem ist es bevorzugt die Methode zur Bindungs-Optimierung mittels Displays zu verwenden. Diese Methode erlaubt die Optimierung und die Ableitung einer Systematik zur

Optimierung einer Interaktion zwischen einem Molekül und dessen Binder. Sofern zu einem Molekül ein DNA, RNA oder Protein-Binder bekannt ist, kann dieser in Form einer kombinatorischen DNA-Bibliothek variiert werden. Dieser DNA-Pool kann bis zu 10^{15} unterschiedliche Moleküle enthalten und wird daher mittels einer Display-Methode auf weniger als 10^6 Binder mit hoher Affinität eingeschränkt. Dieser DNA-Pool kann dann zur Erzeugung eines DNA-Originals herangezogen werden. Entsprechende Kopien in Form von DNA, RNA oder Protein werden dann erzeugt und das Molekül auf diese Arrays gegeben. Spot, die einen besonders starken Binder tragen, werden besonders viel Molekül binden und damit ein sehr hohes Signal erzeugen. Da sich alle Spots des Arrays Binder-Mutanten enthalten ist zu erwarten, dass eine sehr hohe Anzahl an Bindern detektiert wird. Anhand der Sequenzierung des DNA-Originals oder einer DNA-Kopie lassen sich dann die Sequenzinformationen mit den Affinitäten der Bindung korrelieren und Sequenzmuster ableiten, die eine Vorhersage von Affinitäten bei Veränderungen der Sequenzen zulassen. Somit ist es dann möglich einzelne Binder gezielt so zu entwerfen, dass sie exakt definierte Affinitäten oder Eigenschaften besitzen. Diese Methode erlaubt somit ein Optimierung der Bindungseigenschaften als auch eine Ableitung einer Systematik zur Vorhersage von Affinitäten für diesen Binder.

Außerdem ist es bevorzugt, die Methode zur Bindungs-Optimierung mittels Scan zu verwenden. Diese Methode erlaubt die Optimierung und die Ableitung einer Systematik zur Optimierung einer Interaktion zwischen einem Molekül und dessen Binder. Sofern zu einem Molekül ein DNA, RNA oder Protein-Binder bekannt ist, kann dieser in DNA in codierender Form systematisch oder zufällig in einer oder mehreren Positionen auf Ebene der DNA variiert werden. Die Anzahl der unterschiedlicher Bindermutanten wird dabei unter 10^6 gehalten, so dass sämtliche erzeugten Mutanten des DNA-Pools direkt in ein DNA-Original gemäß 2.2.1 übertragen werden können. Das DNA-Original wird dann je nach Binder in DNA, RNA oder Protein kopiert und die erhaltenen Binder-Mutations-Arrays werden dann mit dem Molekül inkubiert. Es ist davon auszugehen, dass sehr viele Bindungen stattfinden werden. Die Sequenzen der jeweiligen Spots werden den Affinitäten zugeordnet und daraus eine Systematik abgeleitet. Dieses Vorgehen entspricht dem Alanin-Scan bei Proteinen, der jedoch in diesem Falle mit jedem möglichen Austausch durchgeführt werden kann. Somit ist eine deutlich größere Anzahl an Mutationen abgedeckt und die abgeleitete Systematik besitzt damit eine deutlich höhere Aussagekraft.

- Es ist außerdem bevorzugt, die Methode zum Proteinfunktions-Screening zu verwenden. Mit dieser Methode lässt sich auf molekularer Ebene, durch Austausch einzelner Aminosäuren abklären, welche Aminosäureposition für die Funktionalität des Proteins von Wichtigkeit ist. Sofern von einem Protein eine Funktion in Form einer Bindung oder einer Aktivität bekannt ist wird dieses in Form von codierender DNA variiert. Dabei werden systematisch oder
- 5 zufällig in einer oder mehreren Positionen auf Ebene der DNA Variationen eingefügt. Die Anzahl der unterschiedlicher Mutationen wird dabei unter 10^6 gehalten, so dass sämtliche erzeugten Mutanten des DNA-Pools direkt in ein DNA-Original übertragen werden können. Das DNA-Original wird dann zu Protein kopiert. Die erhaltenen Protein-Mutationen werden
- 10 dann auf Bindung oder Aktivität getestet und charakterisiert. Es ist davon auszugehen, dass sämtliche Mutanten eine Bindung oder Aktivität zeigen, die jedoch sehr stark variieren kann. Die Sequenzen der jeweiligen Spots werden der jeweiligen Aktivität der Mutante zugeordnet und daraus eine Systematik abgeleitet. Dieses Vorgehen entspricht dem Alanin-Scan bei Proteinen, der jedoch in diesem Falle mit jedem möglichen Austausch durchgeführt werden
- 15 kann. Somit ist eine deutlich größere Anzahl an Mutationen abgedeckt und die abgeleitete Systematik besitzt damit eine deutlich höhere Aussagekraft. Somit lässt sich nicht nur die Aussage treffen, welche Aminosäure eine hohe Wichtigkeit besitzt und nicht durch Alanin ausgetauscht werden darf, sondern auch welche Substituenten für die bisherige Aminosäure möglich sind um die Funktionalität des Proteins zu erhalten.
- 20 Auch bevorzugt ist die Verwendung zur Reaktions-Optimierung von Enzymen. Diese Methode zielt darauf ab Enzyme bezüglich ihres Umsatzes zu optimieren, indem die Reaktionsbedingungen und Cofaktoren angepasst werden. Hierzu wird die Oberfläche eines Eigenschaftsspeichers komplett mit einem einzigen Enzym beschichtet und dann Substrat hinzugefügt. Über den kompletten Speicher hinweg wird, für jede Position die Menge des
- 25 erzeugten Substrates analysiert. Anhand der Position im Speicher kann dann die optimale Reaktionsbedingung ermittelt werden. Somit ist es möglich in nur einem einzigen Versuch bis zu 10^6 unterschiedliche Reaktionsbedingungen zu untersuchen. Dieses System wird bevorzugt dazu eingesetzt für Optimierungen von Konzentrationen an Substrat sowie bekannten Cofaktoren wie Salze, Substrat, pH und Temperatur.
- 30 Sobald die optimale Reaktionsbedingung gefunden ist kann nun ein Screening mit unbekanntem Cofaktoren bzw. Mutationen der Cofaktoren stattfinden. Hierzu wird ein Partikeltransferspeicher mit Partikeln befüllt, welche jeweils eine Mutante eines Co-Faktors enthalten ist. Diese Co-Faktoren sind als kombinatorisch chemische Bibliothek erzeugt

worden. Es nun eine DNA-Kopie erzeugt, welche anhand ihrer Sequenzinformation eine Entschlüsselung der molekularen Struktur des Co-Faktors zulässt. Dann wird der Speicher mit dem Enzym und Substrat unter optimierten Bedingungen befüllt. Es wird nun vermessen welcher Cofaktor nun zu einem verbesserten Umsatz führt. Anhand der Sequenzierung kann dann dieser Cofaktor bestimmt werden. Dieses System erlaubt also zunächst eine Optimierung der enzymatischen Reaktion und dann noch das Screenen von bisher Mutationen eines oder mehrerer Cofaktoren. Dahingehend kann die Reaktion nochmals optimiert werden.

Auch bevorzugt ist die Verwendung zum Wirkstoff-Screening durch Zugabe des Wechselwirkungspartners. Diese Methode erlaubt das Auffinden eines Wirkstoffes zu einem gegebenen Molekül, mit dem der Wirkstoff wechselwirken soll. Hierzu werden Partikel einer chemischen Bibliothek bereits bei der Synthese mit einem molekularen Tag versehen, welches es erlaubt jedem Partikel nach einer Sequenzierung die molekulare Struktur des darauf synthetisierten Wirkstoffes zuzuordnen. Die Partikel werden nun in einen Partikel-Transfer-Speicher überführt und es werden einige Kopien hergestellt. Die erzeugten Mikroarrays tragen dabei entweder die Wirkstoffe oder die codierende DNA bzw. RNA. Mittels Sequenzierung wird nun für jeden Spot des Arrays die DNA Sequenz bestimmt und damit die molekulare Struktur der Wirkstoffe berechnet. Folgende Ausführungen sind nun bevorzugt:

- Auf einzelne Wirkstoff-Arrays werden nun verschiedene Wechselwirkungspartner beispielsweise ein Binder gegeben und die Interaktion vermessen. Spots mit besonders starkem Signal interagieren besonders stark und stellen damit potentiell stark wirkende Wirkstoffe dar. Nach einer Identifikation solch einer starken Interaktion wird der Wirkstoff wiedergewonnen oder erneut synthetisiert und dann nochmals die Interaktion mit klassischen Methoden validiert.
- Der Wechselwirkungspartner kann jedoch auch zuvor mit seinem natürlichen Interaktionsmolekül oder dem bisherigen Wirkstoff versetzt werden. Wird nun dieses Gemisch auf das Wirkstoff-Array gebracht, so findet eine Konkurrenz statt. Nur Wirkstoffe, die eine stärkere Bindung als der Wirkstoff oder der natürliche Interaktionspartner besitzen, können nun noch ein Signal generieren. Somit können besonders potente Wirkstoffe identifiziert werden.

Die Verwendung eines DNA- bzw. eines RNA-Tags ermöglicht aufgrund der Sequenzierung eine einfache Identifikation der molekularen Struktur. Diese ist oft von den Partikeln nur

unter großem Aufwand möglich. Somit stellt diese Methode eine deutliche Vereinfachung dar. Alternative Markierungsmethoden wie Massenspektrometrie- oder NMR-Tags sind ebenfalls denkbar. Hierbei wird dann eine Kopie in Form eines Massenspektrometrie- oder NMR-tauglichen Mikroarrays erzeugt. Ebenfalls ist eine Ausführungsform bevorzugt, bei der die Partikel in Form von enthaltenen Chips oder Fluorophoren markiert und damit zuordenbar sind. Somit ist es mit dieser Methode möglich eine große Anzahl an Wirkstoff-Varianten zu untersuchen und aufgrund der DNA-Kopie in einfacher Weise die molekulare Struktur zuzuordnen.

Es ist außerdem bevorzugt, die Methode zur Optimierung von Wirkstoffen zu verwenden.

Diese Methode entspricht prinzipiell dem bereits beschriebenen Auffinden von Wirkstoffen entsprechend dem Wirkstoff-Screening durch Zugabe des Wechselwirkungspartners.

Allerdings ist hier bereits der Wirkstoff bekannt und es wird eine kombinatorische chemische Bibliothek erzeugt, welche in sehr hohem Maße Ähnlichkeiten zum bisher identifizierten Wirkstoff besitzt. Die Partikel der chemischen Bibliothek sind entsprechend 2.2.8 mit einem molekularen Tag versehen, welches es erlaubt jedem Partikel nach einer Sequenzierung die molekulare Struktur des darauf synthetisierten Wirkstoffes zuzuordnen. Die Partikel werden nun in einen Partikel-Transfer-Speicher überführt und es werden einige Kopien hergestellt. Die erzeugten Mikroarrays tragen dabei entweder die Wirkstoffe oder die codierende DNA bzw. RNA. Mittels Sequenzierung wird nun für jeden Spot des Arrays die DNA Sequenz bestimmt und damit die molekulare Struktur der Wirkstoffe berechnet. Folgende

Ausführungen sind nun bevorzugt:

- Auf das Wirkstoff-Array wird nun der Wechselwirkungspartner beispielsweise ein Binder gegeben und die Interaktion vermessen. Spots mit besonders starkem Signal interagieren besonders stark und stellen damit stark wirkende Wirkstoffe dar.
- Der Wechselwirkungspartner kann jedoch auch zuvor mit seinem natürlichen Interaktionsmolekül oder dem bisherigen Wirkstoff versetzt werden. Wird nun dieses Gemisch auf das Wirkstoff-Array gebracht, so findet eine Konkurrenz statt. Nur Wirkstoffe, die eine stärkere Bindung als der Wirkstoff oder der natürliche Interaktionspartner besitzen, können nun noch ein Signal generieren. Somit können besonders potente Wirkstoffe identifiziert werden.

Die Verwendung eines DNA- bzw. eines RNA-Tags ermöglicht aufgrund der Sequenzierung eine einfache Identifikation der molekularen Struktur. Diese ist oft von den Partikeln nur

unter großem Aufwand möglich. Somit stellt diese Methode eine deutliche Vereinfachung dar. Alternative Markierungsmethoden wie Massenspektrometrie- oder NMR-Tags sind ebenfalls denkbar. Hierbei wird dann eine Kopie in Form eines Massenspektrometrie- oder NMR-tauglichen Mikroarrays erzeugt. Ebenfalls ist eine Ausführungsform bevorzugt, bei der die Partikel in Form von enthaltenen Chips oder Fluorophoren markiert und damit zuordenbar sind. Somit ist es mit dieser Methode möglich eine große Anzahl an Wirkstoff-Varianten zu untersuchen und aufgrund der DNA-Kopie in einfacher Weise die molekulare Struktur zuzuordnen.

Außerdem ist bevorzugt, dass die Methode zum Virus-Angriffspunkt-Screening verwendet wird. Von einer Spezies, dem Wirt, wird die DNA und die mRNA gewonnen und daraus ein Gesamt-Genom, Gesamt-Transkriptom und ein Gesamt-Proteom erzeugt. Dann werden aus einer Gewebeprobe des Wirtes und von einem Parasiten des Wirtes die DNA, die RNA und das Protein gewonnen bzw. aufgereinigt. Die jeweiligen Proben werden mit verschiedenen Farben markiert, gemischt und jeweils auf die einzelnen Arrays gegeben. Da ein Parasit über den Wirt in irgendeiner Form molekular dominieren muss, muss es Spots geben an denen die DNA, die RNA oder das Protein besser (hoch affiner) bindet, als es beim Wirt selbst der Fall ist. Dies sind sozusagen die molekularen Angriffspunkte des Parasiten. Dies gilt insbesondere, wenn es sich dabei um einen Virus handelt. Entsprechende Spots auf Ebene der DNA, RNA oder Protein-Arrays weisen dann eine verstärkte Färbung des Parasiten auf. Diese Wechselwirkungen zwischen Parasit und Wirt stellen die initialen Interaktionen dar, mit denen vor allem Viren eine Zelle übernehmen können, indem sie in diese eindringen oder molekulare Funktionen übernehmen bzw. ersetzen. Sofern diese Angriffspunkte genau bekannt sind, kann man exakt für diese Interaktionen nach Wirkstoffen suchen, welche die Interaktion zwischen parasitärer DNA, RNA oder Protein mit der DNA, RNA oder den Proteinen des Wirtes unterbinden oder zumindest stören. Solcherlei Wirkstoffe können dann als „Anti-Parasitikum“ eingesetzt werden. Insbesondere für antivirale Wirkstoffe kann damit die Wirksamkeit einer molekularen Wechselwirkung zugeordnet werden, indem mit diesem System die Wechselwirkungspaare erstmals Genom-, Proteom- und Transkriptom-weit in einem Ansatz identifiziert werden können.

Es ist bevorzugt, dass die Verwendung in einem Screeningverfahren zur Identifikation von Antibiotika, Inhibitoren von Antibiotika, Antikörperoptimierung, Antikörperstabilisierung, Antikörperisolierungen, Epitopen für Autoimmunerkrankungen, Epitopen für Allergien, Epitopen für Allergene, Epitopen für Impfungen, Wirkstoffe, Wechselwirkungspartner für

Wirkstoffe, Optimierungen für Wirkstoffe, Wachstumsfaktoren, Substituenten für Wachstumsfaktoren, Optimierung von Wachstumsfaktoren und/oder Virusangriffspunkten erfolgt.

5 Es ist außerdem bevorzugt, dass die Verwendung in einem Screeningverfahren zur Identifikation von Molekülstabilität, bevorzugt von DNAsen, RNAsen, Proteinen, Kinasen und/oder Phosphatasen erfolgt.

10 Die Vorteile der Erfindung zeigen sich vor allem in der Kombination aus erhöhtem Durchsatz aufgrund der Verwendung der Reaktionsschritte, anwendungsorientierter Erzeugung des ersten Speichers und Erzeugung von einer oder mehrerer gleichartiger oder unterschiedlicher Kopien und Zuordnung der Analysen einzelner Kopien und/oder des Originals erlauben eine Strukturaufklärung der originalen Moleküle als auch deren Derivate und Amplifikate, sowie die Zuordnung der Eigenschaften derselben. Da der Reaktionsschritt, bevorzugt der Kopierprozess ebenfalls zur Analyse herangezogen werden kann, verbreitert sich das Spektrum der Analysemöglichkeiten. Mit der Erfindung ist es möglich gezielt viele Moleküle
15 zu untersuchen (von 10^2 bis 10^6 und mehr), deren Struktur zu ermitteln und Ähnlichkeiten wie Unterschiede in Struktur als auch Eigenschaft miteinander zu vergleichen. Der erhöhte Durchsatz verbessert bisher bestehende Screening- und Display-Methoden, erlaubt aber auch gänzlich neue Anwendungen.

20 Besondere Vorteile sind die getrennte Erfassung einzelner oder mehrerer Eigenschaften und der Struktur von Molekülen auf getrennten Mikroarrays, die voneinander durch Kopieren abgeleitet sind und damit eine „Verwandtschaft“ zueinander haben. Außerdem ist die Korrelation dieser Eigenschaften anhand der Ortsinformationen auf den Mikroarray-Kopien, so dass jedem originalen Molekül, seinen Amplifikaten und Derivaten auf den Kopien die jeweiligen Eigenschaften zugeordnet und miteinander verglichen werden können, besonders
25 vorteilhaft. Die optionale Nutzung des Reaktions- und Transferschrittes als Analysemethode, um zusätzliche Eigenschaften von Molekülen oder biochemischen Prozessen zu erfassen, bringt weitere besondere Vorteile mit sich.

30 Durch die Erfindung konnte überraschenderweise ein Verfahren bereitgestellt werden, welches zur Analyse von molekularen Eigenschaften und/oder Reaktionsbedingungen eingesetzt werden kann, wobei das Verfahren besonders schnell abläuft und kleinere Volumina an Reaktionslösungen eingesetzt werden müssen. Somit können Zeit und Kosten gespart werden. Außerdem ist es durch das Verfahren möglich, einen automatisierten Prozess

durchzuführen, was zusätzlich eine Kostenersparnis und eine Erhöhung der Effizienz mit sich bringt.

BEISPIELE

5 Im Folgenden wird die Erfindung an einem Beispiel illustriert, ohne auf diese beschränkt zu sein.

In **Figur 1** wird eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung gezeigt. Zunächst liegt ein Ausgangs-Pool **5** an Probemolekülen **11** vor. Ist die Anzahl der Moleküle in diesem Pool deutlich größer als die Menge an „Pixel“, die in einem Transferspeicher bewältigt werden
10 kann, so ist die Anzahl der Moleküle zu reduzieren. Dies kann durch eine geeignete Selektion **6** erfolgen, wie sie z.B. bei den Display-Methoden verwendet wird. Aus diesem Kopier-Pool **7**, wird dann der erste Speicher **8** erzeugt (Schritt 1). Das Original ist eine räumlich feste Anordnung der Moleküle des Kopierpools. Jeder Position auf dem Original ist dabei in eindeutiger Weise mit einem oder mehreren Molekülen verknüpft. Dieses Original wird in
15 geeigneter Form „kopiert“ (Schritt 2). Dabei sind verschiedene Kopien **9a, 9b, 9c,...** möglich. Anschließend können sowohl Original als auch Kopie beziehungsweise der Kopierprozess selbst analysiert werden (Schritt 3).

In **Figur 2** ist ein Partikelspeicher **10 a – d** als erster Speicher **8** gezeigt. Partikel **4** mit Molekülen **11** werden an die Oberfläche angelagert und verbleiben dort. Dabei können die
20 Partikel auf einer planaren Oberfläche **10a**, in einer Struktur **10b**, zwischen Strukturen **10c** oder auf Strukturen **10d** angelagert werden.

Figur 3 zeigt die schematische Zeichnung eines Partikel-Transferspeichers. Es wird gezeigt, wie Partikel **9** mit Molekülen **11** an die Oberfläche angelagert werden und dort verbleiben. Dabei können die Partikel auf einer planaren Oberfläche **12a**, in einer Struktur **12b**, zwischen
25 Strukturen **12c** oder auf Strukturen **12d** angelagert werden. Dann wird mindestens eine Sorte Moleküle mittels einer Abspaltung, einer Amplifikation oder einer Derivatisierung auf die Oberfläche des Speichers übertragen.

Figur 4 zeigt die schematische Zeichnung eines bevorzugten Molekülspeichers. Moleküle **11** werden auf den Speicher verbracht. Dies kann durch einen Dispensiervorgang erfolgen und so
30 zu einer räumlichen Anordnung der Moleküle führen **13a-c**. Weiterhin können durch einen

Flüssigkeitskontakt oder eine Befüllung die Moleküle auf die Oberfläche **14a**, in Strukturen **14b** oder auf Strukturen **14c** verbracht werden, insbesondere wenn Bindungsbereiche **17** der Oberflächen bevorzugte Bindungsstellen für die Moleküle darstellen. In der gezeigten bevorzugten Ausführungsform befindet sich ein Molekül auf solch einem Bindungsbereich **17**. Mittels einer anschließenden Amplifikation **15a-c** und einer optional nachfolgenden Derivatisierung **16a-c**, kann das ursprüngliche Molekül **11** ortsaufgelöst vervielfacht werden, insbesondere dann, wenn die Bereiche **17** der Oberfläche für die Amplifikation oder Derivatisierung förderlich oder essentiell sind. Je nach Ausführungsform sind dann identische Moleküle **11** bei **13a-c**, **14a-c** sowie **15a-c**) oder Derivate **18** bei **16a-c** auf der Oberfläche verankert. Jede dieser Ausführungsformen **13 bis 16** kann dabei als Molekülspeicher dienen und in einer späteren Amplifikations- und/oder Derivatisierungsreaktion Moleküle für die Erzeugung einer Kopie freisetzen oder erzeugen.

Figur 5 zeigt eine schematische Zeichnung des Eigenschaftsspeichers. Jede Ortsposition des Eigenschaftsspeichers verfügt über unterschiedliche Eigenschaften. Diese Unterschiede können durch Geometrie **19a & 19b**, Materialwahl **20**, Oberflächenbeschichtung **21**, integrierte Mikrofluidik **22** oder Mikroelektronik **23**, durch Unterschiede in der Flüssigkeit, die durch den Befüllvorgang **24** selbst entstehen können oder durch zusätzlich eingefüllte Partikel/Moleküle **25/26** erzeugt werden, welche die chemische oder physikalische Umgebung verändern.

Figur 6 zeigt eine schematische Zeichnung der Übertragungskopie. Vom Original **8** werden Moleküle **11** freigesetzt und auf die Kopieroberfläche **9** übertragen. Dadurch nimmt die Anzahl der Moleküle im Original ab.

Figur 7 zeigt eine schematische Zeichnung der Amplifikationskopie. Von den Molekülen **11** des Originals werden Amplifikate **20a** erzeugt und diese dann auf die Kopie übertragen.

Figur 8 zeigt eine schematische Zeichnung der Derivatisierungskopie. Die Moleküle **11** des Originals werden derivatisiert **18** und dann auf die Kopieroberfläche **9** übertragen.

Figur 9 zeigt eine schematische Zeichnung der Eigenerzeugungskopie. Die Moleküle **11** des Originals weisen unter geeigneten Bedingungen eine Reaktivität auf, die dazu genutzt werden kann, um Amplifikate **22b** oder Derivate **22c** von zugegebenen Molekülen **22a** zu erzeugen. Die erzeugten Moleküle können dann übertragen werden.

Figur 10a zeigt eine schematische Zeichnung der Kombinationskopie (unter Erhalt des originalen ersten Speichers). In den bevorzugten Prozessführungen werden zuerst Amplifikate **20a** erzeugt, die dann wahlweise direkt übertragen oder derivatisiert **18** und dann übertragen werden.

5 **Figur 10b** zeigt eine schematische Zeichnung der Kombinationskopie (unter Aufbrauchen der originalen Probemoleküle). Es können aber auch zunächst Derivate **18** erzeugt werden, die dann amplifiziert **21b** und übertragen werden.

Figur 11 zeigt eine schematische Zeichnung der Mehr-Molekül-Kopie. Durch eine geeignete Wahl der Prozessführung, werden von zwei Sorten Molekülen **11** des Originals **40** eine Kopie mit mind. zwei Sorten davon abgeleiteter Moleküle z.B. direkte Amplifikate **20a**, Derivate **18**,
10 derivatisierte Amplifikate **18** oder amplifizierte Derivate **21b** erzeugt.

Figur 12 zeigt den schematischen Ablauf der Flüssigkeitskopie. Durch Zugabe von umsetzbaren Molekülen **22a** direkt auf das Original, entstehen Derivate **22c** oder Amplifikate **22b** dieser zugegebenen Moleküle. Im Gegensatz zu vorherigen Ausführungsformen
15 verbleiben die erzeugten Derivate bzw. Amplifikate in der Lösung und werden nicht auf eine Kopie übertragen. Diese Ausführungsform weist dann die erzeugten Amplifikate bzw. Derivate in Lösung nach (hier dargestellt als Grauton).

Figur 13 zeigt den schematischen Ablauf der Ribosome-Kopie. Zunächst wird das Ribosome-Display nach dem Stand der Technik durchgeführt. Die RNA (**30**) wird mit Ribosomen **31**
20 zusammengebracht, diese erzeugen die entsprechenden Proteine **32**. Dann wird das gewünschte Target **33** hinzugegeben und die Ribosomen selektiert, deren angehängtes Protein, das Target gebunden hat. Diese Selektion erlaubt eine Anreicherung von Ribosomen bzw. RNA, welche mit einem interagierenden Protein gekoppelt sind. Diese RNA **30a**, die ein bindendes Protein codiert, kann dann als in ein Original, entsprechend 2.1.1, eingebracht
25 werden, so dass ein RNA-Original **34** bzw. ein DNA-Original **35** erzeugt wird. Eine bevorzugte Ausführungsform ist ein DNA-Original, in welchem die DNA amplifiziert ist **36**. Es erfolgen Mikroarray-Kopien mit denen DNA; RNA und Protein erzeugt wird. Die DNA-Kopie **37** oder das Original selbst kann sequenziert werden, wodurch man die Sequenzinformation erhält, die RNA-Kopie **38** nochmals mit Ribosomen verwendet werden
30 und die Protein-Kopie **39** nochmals auf Bindung gegen das Target getestet werden. Dies alles bestätigt nochmals die Bindung gegen das Target und dient zur Aufklärung der Sequenz.

Figur 14 zeigt den schematischen Ablauf der Phagen-Kopie. Zunächst wird das Phagen-Display nach dem Stand der Technik durchgeführt. Die Phagen **40** tragen Proteine **41**, die mit der DNA **42** in ihrem Inneren korreliert. Durch Anbinden an ein Target **33**, kann über gezielte Selektion jene Phagen **40a** angereichert werden, die ein Protein tragen welches an das Target bindet. Die DNA **42a** welche ein bindendes Protein codiert, kann dann in ein Original eingebracht werden und wird vorzugsweise aus DNA **34** oder amplifizierter DNA **35** besteht. Es ist aber auch ein RNA-Original denkbar **36**. Es erfolgen Mikroarray-Kopien in Form von DNA, RNA und Protein. Die DNA-Kopie **37** oder das Original selbst kann sequenziert werden, wodurch man die Sequenzinformation erhält. Die RNA-Kopie **38** kann für ein Ribosome-Display eingesetzt werden und die Protein-Kopie **39** kann nochmals auf Bindung gegen das Target getestet werden, um somit die Interaktion mit dem Target zu validieren.

Figur 15 zeigt die Synthese und Anwendung der Kombinatorischen-Chemie-Kopie. Bereits während der Synthese (entsprechend Figur 1) wird in jedem Schritt in dem ein chemischer Baustein eingebaut wird parallel eine DNA (oder wahlweise eine RNA) hinzugefügt. Jeder Partikel **4** trägt neben den Molekülen **11** somit auch DNA **52**. Aufgrund der Synthesestrategie kann aus der Sequenz der DNA in eindeutiger Weise zurückgeschlossen werden, in welchem der „Splits“ sich der Partikel jeweils befunden hat. Nun werden die Partikel der Bibliothek auf Bindung gegen ein Target **33** untersucht und Partikel mit bindenden Molekülen **51a** angereichert. Die erhaltenen bindenden Partikel **50a** werden in ein Original eingefügt. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich dabei um einen Partikelspeicher **10a**. Mittels des Partikelspeichers lassen sich nun sowohl DNA-Kopien **37**, als auch Molekül-Kopien durch Derivatisierung **56** oder Amplifikation **57** erzeugen. Anhand der DNA-Kopie werden die Sequenz und damit die chemische Struktur der Moleküle auf der Molekülkopie ermittelt. Mit den Molekül-Kopien kann nochmals eine Bindungsmessung gegen das Target durchgeführt werden.

Bezugszeichenliste

- 4 Partikel
- 5 Ausgangspool von Probemolekülen
- 6 Selektion
- 5 7 Ausgewählte Probemoleküle
- 8 erster Speicher
- 9a Transferspeicher I
- 9b Transferspeicher II
- 9c Transferspeicher III
- 10 10a Partikelspeicher mit planarer Oberfläche
- 10b Partikelspeicher mit strukturierter Oberfläche, wobei Partikel sich in der Struktur befinden
- 10c Partikelspeicher mit strukturierter Oberfläche, wobei Partikel sich zwischen den Strukturen befinden
- 15 10d) Partikelspeicher mit strukturierter Oberfläche, wobei Partikel sich auf der Struktur befinden
- 11 einzelne Probemoleküle
- 12a Partikel-Transferspeicher mit planarer Oberfläche
- 12b Partikel-Transferspeicher mit strukturierter Oberfläche, wobei Partikel sich in der Struktur befinden
- 20 12c Partikel-Transferspeicher mit strukturierter Oberfläche, wobei Partikel sich zwischen den Strukturen befinden
- 12d Partikel-Transferspeicher drei mit strukturierter Oberfläche, wobei Partikel sich auf der Struktur befinden

- 13a Molekülspeicher mit planarer Oberfläche
- 13b Molekülspeicher mit strukturierter Oberfläche, wobei Probemoleküle sich in der Struktur befinden
- 5 13c Molekülspeicher mit strukturierter Oberfläche, wobei Probemoleküle sich auf der Struktur befinden
- 14a Molekülspeicher mit planarer Oberfläche und Flüssigkeit
- 14b Molekülspeicher mit strukturierter Oberfläche und Flüssigkeit, wobei Probemoleküle sich in der Struktur befinden
- 10 14c Molekülspeicher mit strukturierter Oberfläche und Flüssigkeit, wobei Probemoleküle sich auf der Struktur befinden
- 15a Molekülspeicher mit planarer Oberfläche nach Amplifikation
- 15b Molekülspeicher mit strukturierter Oberfläche und Flüssigkeit, wobei Probemoleküle sich in der Struktur befinden, nach Amplifikation
- 15 15c Molekülspeicher mit strukturierter Oberfläche und Flüssigkeit, wobei Probemoleküle sich auf der Struktur befinden, nach Amplifikation
- 16a Molekülspeicher mit planarer Oberfläche nach Derivatisierung
- 16b Molekülspeicher mit strukturierter Oberfläche und Flüssigkeit, wobei Probemoleküle sich in der Struktur befinden, nach Derivatisierung
- 20 16c Molekülspeicher mit strukturierter Oberfläche und Flüssigkeit, wobei Probemoleküle sich auf der Struktur befinden, nach Derivatisierung
- 17 Bindungsbereich auf der Oberfläche
- 18 Derivate
- 19a Eigenschaftsspeicher I mit Kavitäten
- 19b Eigenschaftsspeicher II mit Kavitäten
- 25 20 Eigenschaftsspeicher mit unterschiedlichen Materialien

- 20a Amplifikate
- 21 Eigenschaftsspeicher mit unterschiedlichen Oberflächenbeschichtungen
- 21b Amplifikat eines Derivats
- 22 Eigenschaftsspeicher mit integrierter Mikrofluidik
- 5 22a zusätzlich zugegebene Moleküle
- 22b Amplifikate von zusätzlich zugegebenen Molekülen
- 22c Derivate von zusätzlich zugegebenen Molekülen
- 23 Eigenschaftsspeicher mit integrierter Mikroelektronik
- 24 Befüllungsvorgang
- 10 25 Partikel, die die chemische oder physische Umgebung verändern
- 26 Moleküle, die die chemische oder physische Umgebung verändern
- 30 RNA
- 30a RNA, die ein bindendes Protein codiert
- 31 Ribosom
- 15 32 erzeugtes Protein
- 33 Target
- 34 erster Speicher mit RNA
- 35 erster Speicher mit DNA
- 36 erster Speicher mit bereits amplifizierter DNA
- 20 37 Transferspeicher mit DNA-Kopie
- 38 Transferspeicher mit RNA-Kopie
- 39 Transferspeicher mit Protein-Kopie

- 40 Phagen
- 40a Phagen die 41 tragen
- 41 Protein das mit DNA im Inneren der Phagen korrelieren
- 42 DNA im Inneren der Phagen
- 5 42a DNA die 41 codiert
- 50a Partikel mit 51a
- 51a Target-bindendes Molekül
- 52 zusätzliche DNA auf Partikeln
- 56 Transferspeicher mit Derivaten
- 10 57 Transferspeicher mit Amplifikaten

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Analyse von molekularen Eigenschaften und/oder Reaktionsbedingungen, umfassend die folgenden Schritte
- 5 a) Bereitstellung eines ersten Speichers, umfassend eine erste Oberfläche, wobei eine Auswahl von Probemolekülen an die Oberfläche in einer definierten Anordnung direkt oder indirekt gebunden wird,
- b) Herstellung von mindestens zwei Transferspeichern, wobei mindestens zwei weitere Oberflächen bereitgestellt werden, und
- 10 ein Reaktionsschritt erfolgt, ausgewählt aus der Gruppe Übertragungsreaktion, Amplifikationsreaktion und/oder Derivatisierungsreaktion, wodurch Produktmoleküle entstehen können und diese Produktmoleküle und/oder die Probemoleküle an die Oberflächen binden, wobei
- 15 eine ein-eindeutige räumliche Zuordnung zwischen den Probemolekülen des ersten Speichers und den Produktmolekülen und/oder Probemolekülen der Transferspeicher besteht,
- c) Analyseschritt, umfassend das Analysieren des ersten Speichers, der Transferspeicher, der Probemoleküle, der Produktmoleküle, der Übertragungsreaktion, Amplifikationsreaktion und/oder
- 20 Derivatisierungsreaktion.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Auswahl von Probemolekülen aus einem Pool von Probemolekülen selektiert wird.
- 25 3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Auswahl von Probemolekülen durch Mutationen und/oder Permutationen von einem Ausgangsmolekül hergestellt wird.

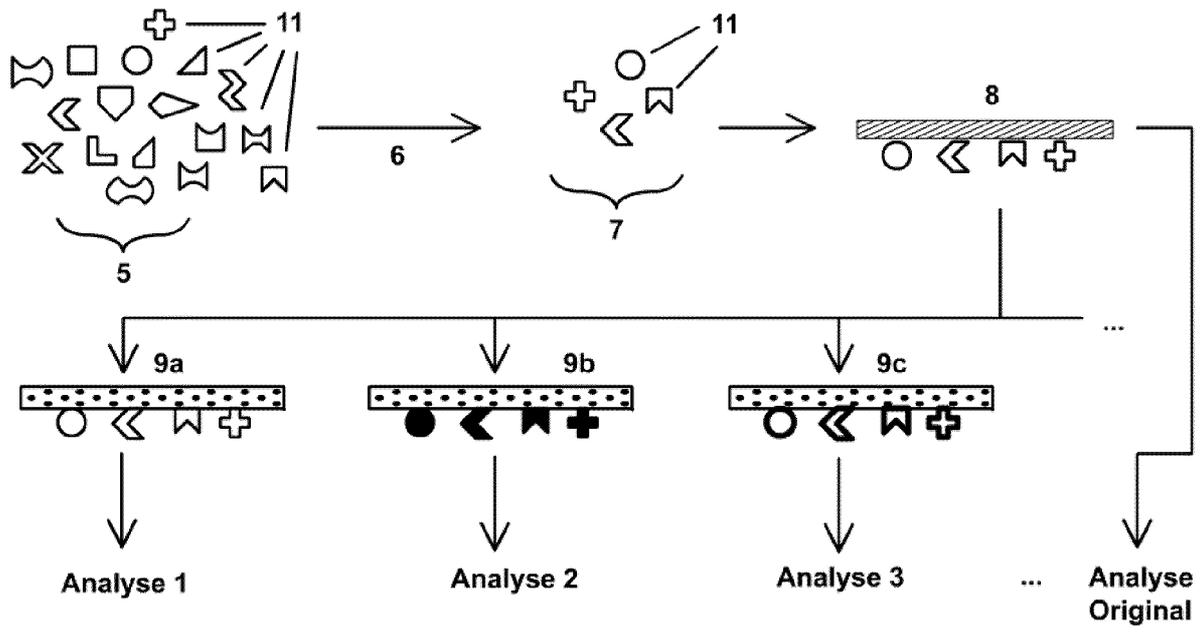
4. Verfahren nach mindesten einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Probemoleküle an Partikel gebunden sind.
5. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei unterschiedliche Sorten von Probemolekülen an einen Partikel gebunden sind.
6. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Oberfläche des ersten Speichers und/oder der Transferspeicher strukturiert ist.
7. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Probemoleküle und/oder Produktmoleküle ausgewählt sind aus der Gruppe umfassend Proteine, Enzyme, Aptamere, Antikörper oder Teile davon, Rezeptoren oder Teile davon, Liganden oder Teile davon, Nukleinsäuren, nukleinsäureartige Derivate, Transkriptionsfaktoren und/oder Teile davon, Moleküle die mit kombinatorischer Chemie erzeugt wurden.
8. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Reaktionsschritt mittels DNA- Polymerase, RNA - Polymerase und/oder eines zellfreien Reaktionsmixes durchgeführt wird.
9. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Strukturierung der Oberflächen ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Kavitäten, Erhebungen, Kavitäten die Partikel enthalten und/oder Erhebungen die Partikel umfassen.
10. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der erste Speicher in unterschiedlichen Bereichen unterschiedliche physikalische, chemische und/oder biochemische Eigenschaften umfasst, bevorzugt unterschiedliches Volumen der Kavitäten, pH-Unterschiede, Unterschiede im Salzgehalt, Temperaturunterscheide, unterschiedliche Oberflächen, unterschiedliche Benetzbarkeit, Unterschiede in der elektrischen Ladung, Unterschiede in elektrischen, magnetischen und/oder dielektrischen Eigenschaften, Unterschiede bezüglich osmotischer Drücke, unterschiedliche Zusatzstoffe, unterschiedliche biochemische Inhaltsstoffe.
11. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei

während des Reaktionsschrittes mindestens eine Sorte von Probemolekülen von den Partikeln und/oder der Oberfläche gelöst werden

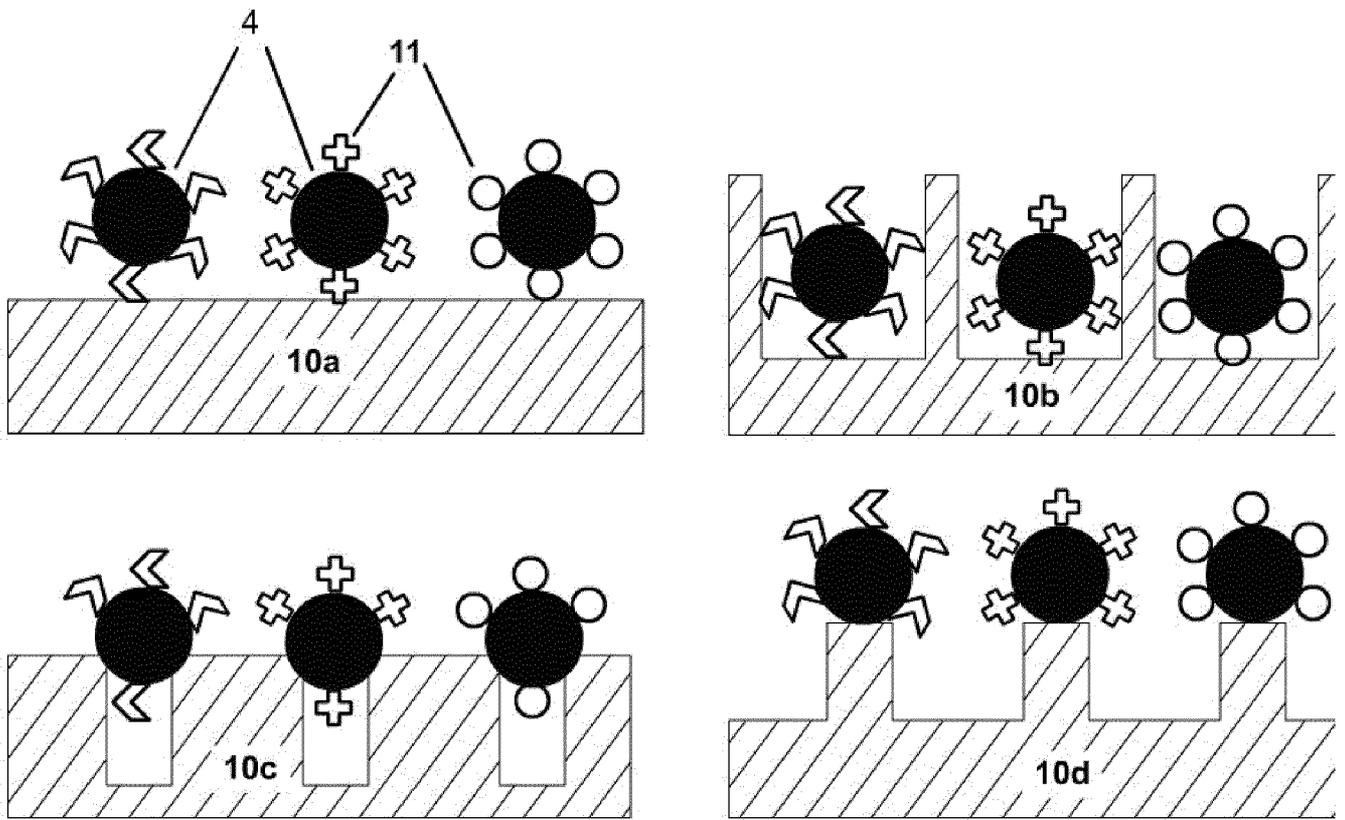
12. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Analyseschritt ein labelfreies Verfahren umfasst, bevorzugt eine RIfS-Detektion, iRIfS-Detektion, Biacore-Detektion, Surface-Plasom-Resonanz-Detektion, Ellipsometrie, Massenspektroskopie, Detektion des Massezuwachs, Detektion der Änderung des Brechungsindex, Detektion der Änderung von optischen, magnetischen, elektrischen und/oder elektromagnetischen Eigenschaften.
- 5
13. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Analyseschritt ein Verfahren umfasst, das ein Label verwendet, bevorzugt Fluoreszenzmessung, Detektion über einen absorbierenden und/oder streuenden Farbstoff, Massenspektroskopie über die Detektion eines Isotopenlabels, Detektion über ein Molekül, welches den Brechungsindex und/oder die optischen Eigenschaften der Oberfläche und/oder der Lösung ändert.
- 10
14. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Analyseschritt ein Verfahren umfasst, das die Lösung oberhalb der Oberfläche des ersten Speichers und/oder eines der Transferspeichers analysiert, bevorzugt Trübungsmessung, Fluoreszenzmessung, Detektion eines absorbierenden Farbstoffs und/oder Lumineszenzmessung.
- 15
15. Verwendung des Verfahrens nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 14, in einem Screeningverfahren zur Identifikation von, Transkriptionsfaktoren, Transkriptionseffizienz, Transkriptionsoptimierung, Promotoreffizienz, Splicisomen, Restriktions-Substraten, Amplifikationssystem, Codon-Optimierung, Proteinfunktionalität, Enzymfunktionalität, Enzymoptimierung, Isoenzymen, Ribozymen, Reaktionsoptimierungen und/oder Bindungsoptimierung
- 20
16. Verwendung des Verfahrens nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 14 in einem Screeningverfahren zur Identifikation von Antibiotika, Inhibitoren von Antibiotika, Antikörperoptimierung, Antikörperstabilisierung, Antikörperisolierungen, Epitopen für Autoimmunerkrankungen, Epitopen für Allergien, Epitopen für Allergene, Epitopen für Impfungen, Wirkstoffe, Wechselwirkungspartner für Wirkstoffe, Optimierungen für Wirkstoffe, Wachstumsfaktoren, Substituenten für
- 25
- 30

Wachstumsfaktoren, Optimierung von Wachstumsfaktoren und/oder Virusangriffspunkten.

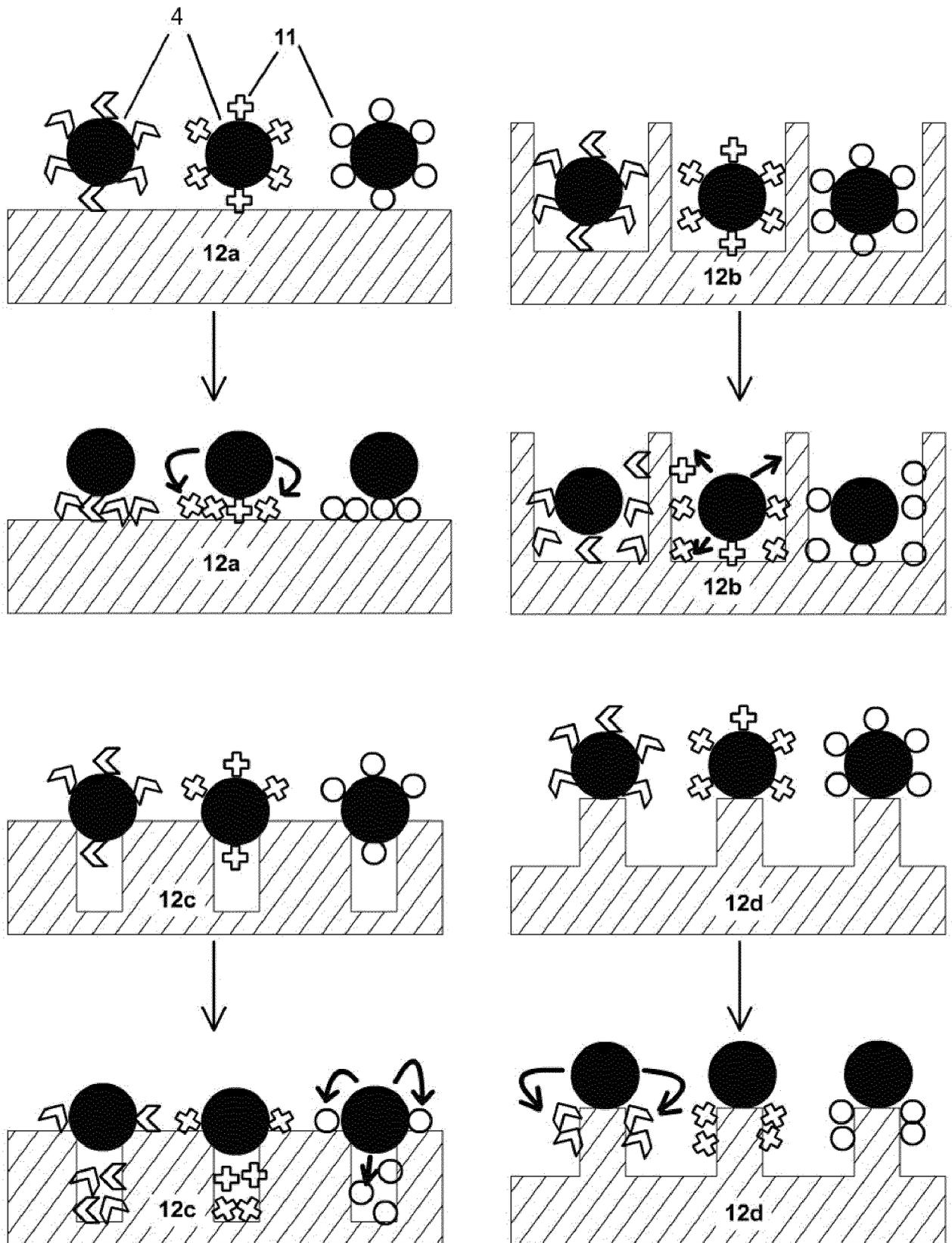
17. Verwendung des Verfahrens nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 14 in einem Screeningverfahren zur Identifikation von Molekülstabilität, bevorzugt von DNAsen, RNAsen, Proteinen, Kinasen und/oder Phosphatasen.
- 5



Figur 1



Figur 2



Figur 3

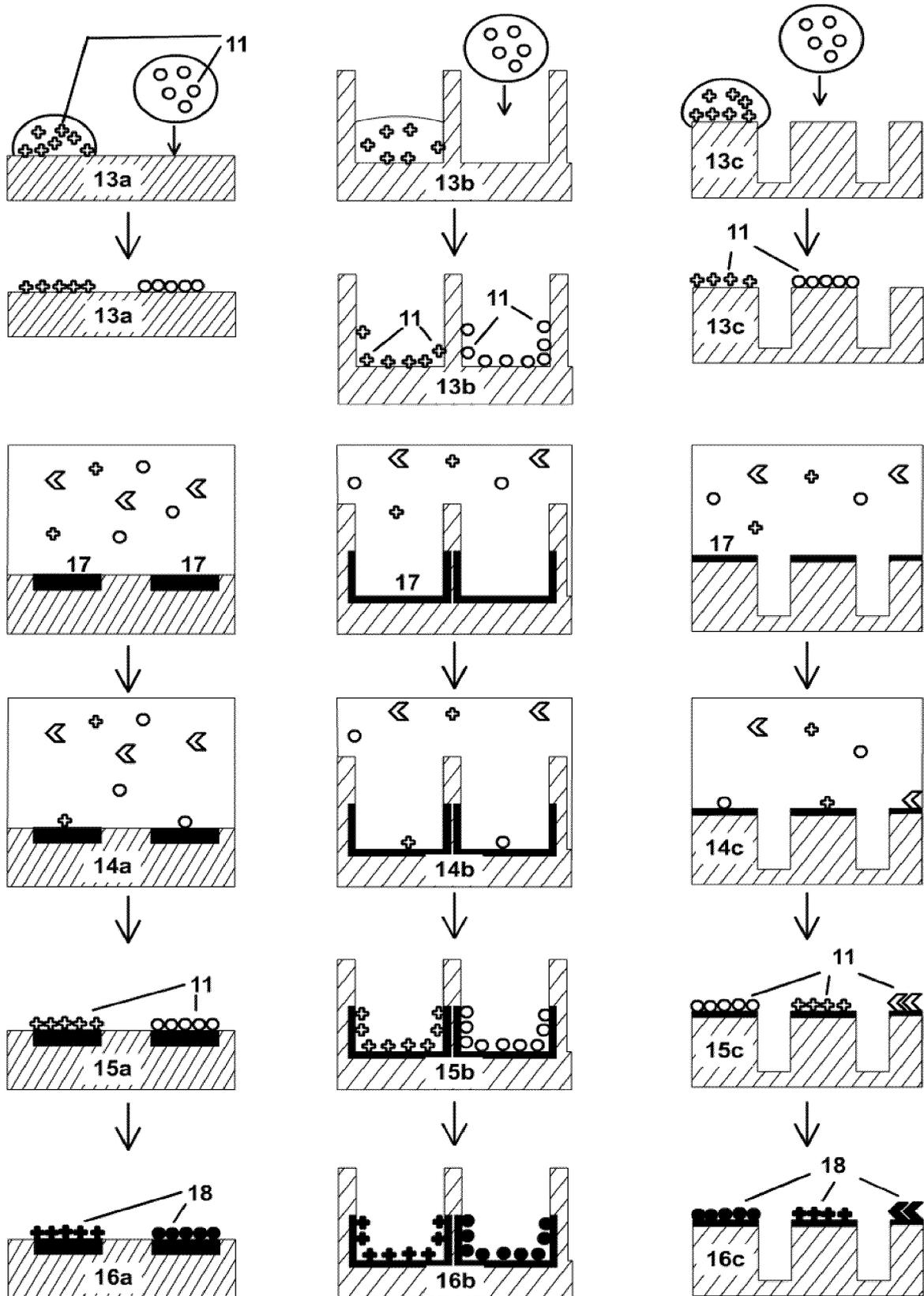
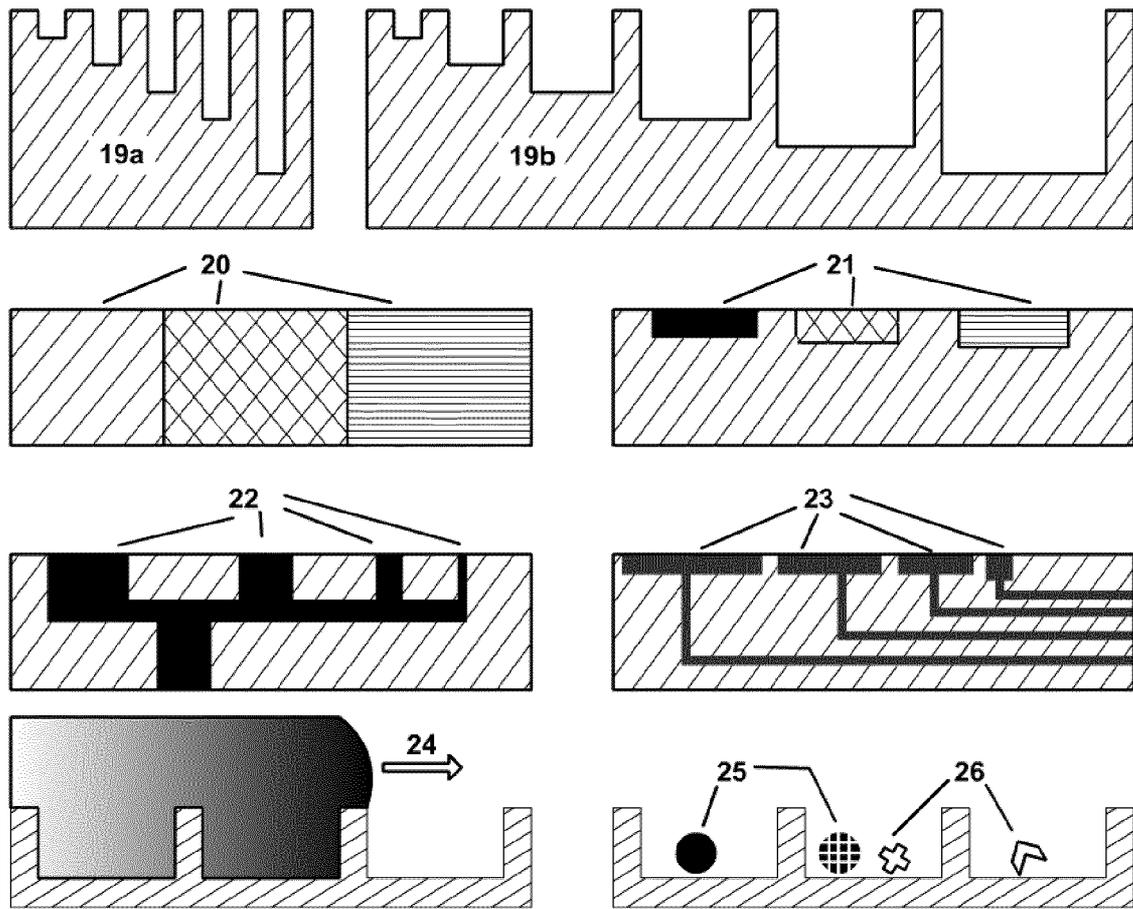


Figure 4



Figur 5

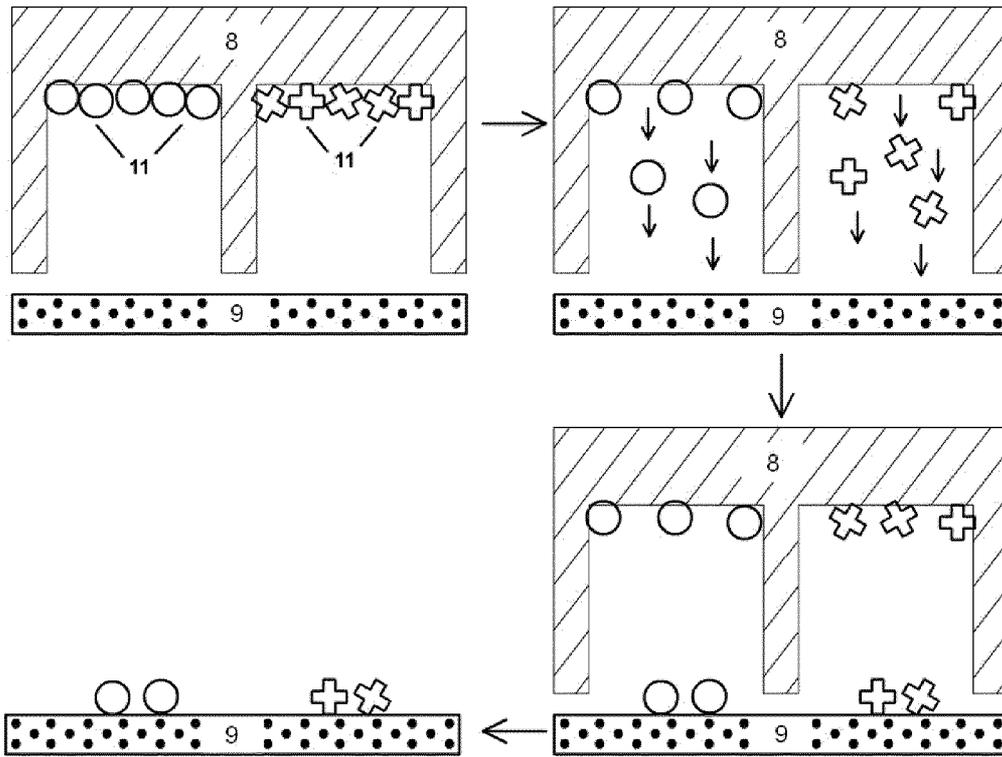
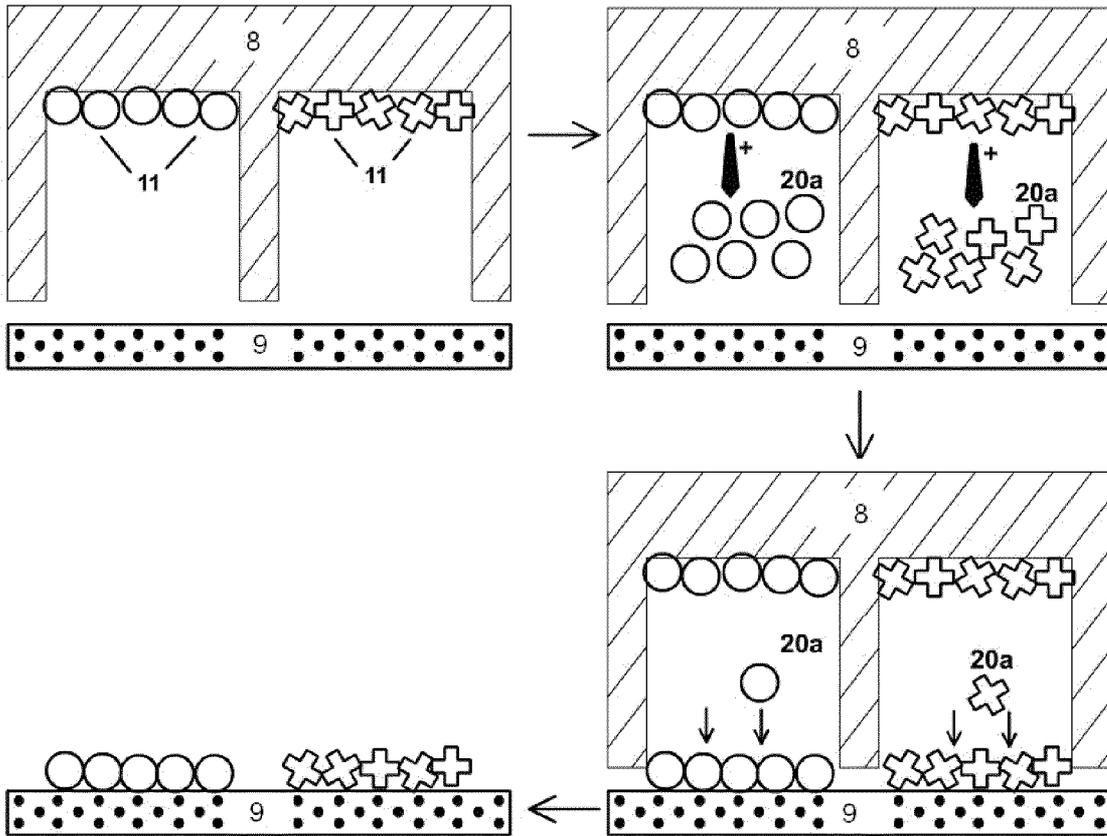
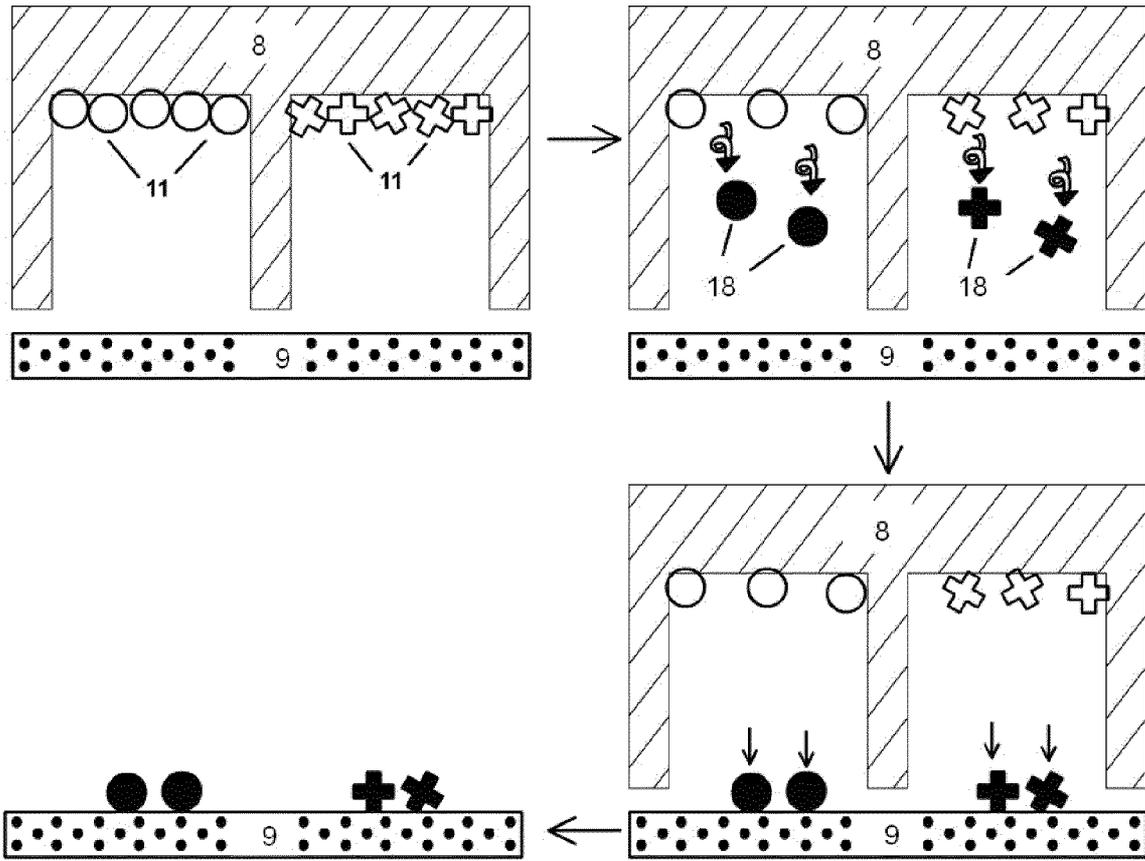


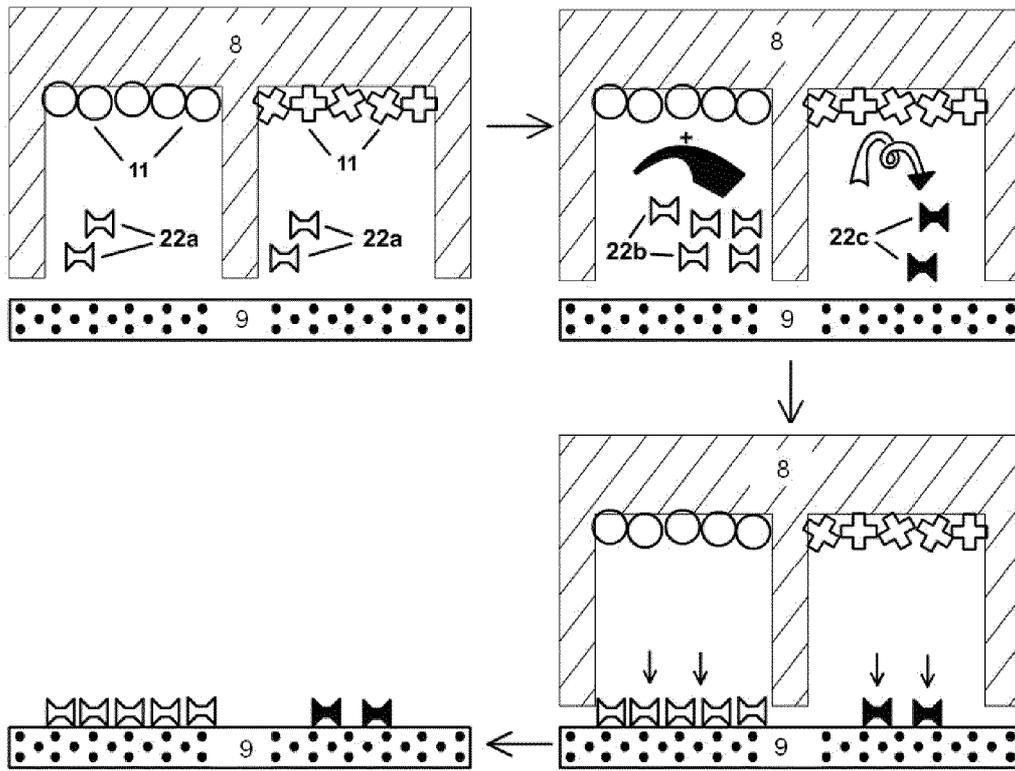
Figure 6



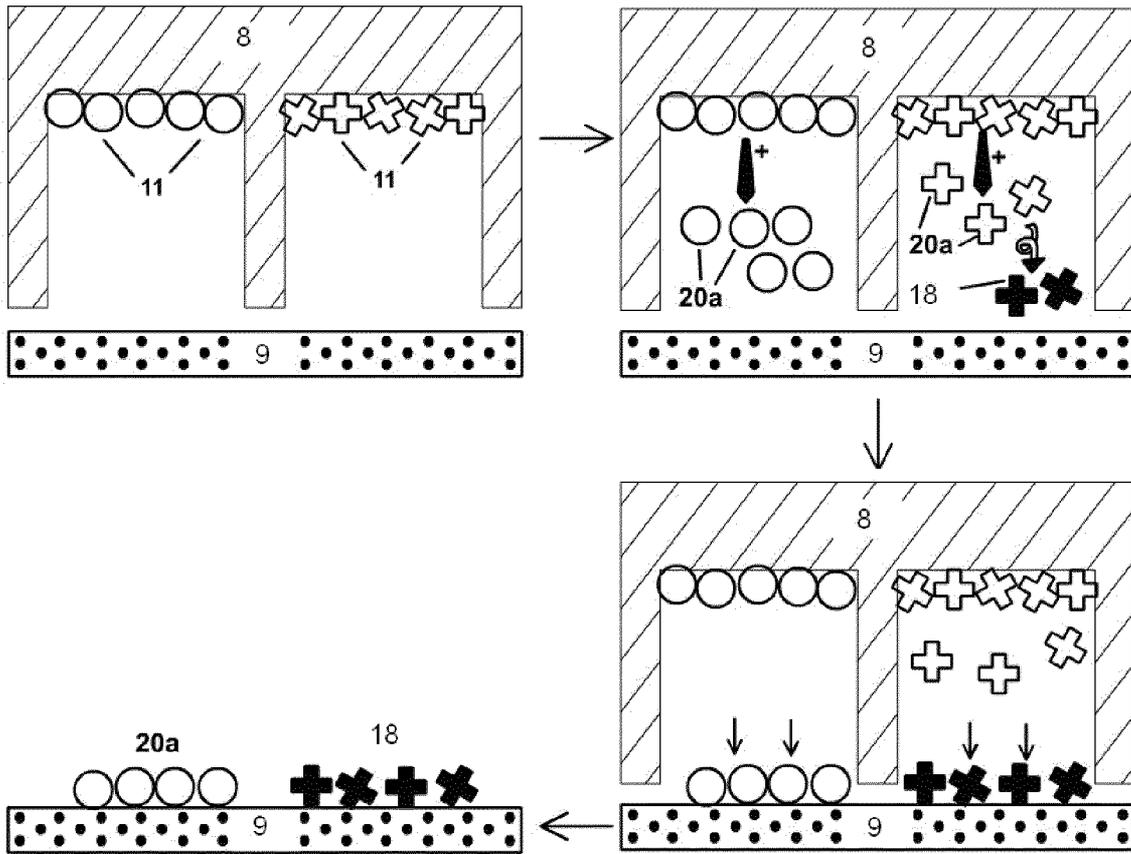
Figur 7



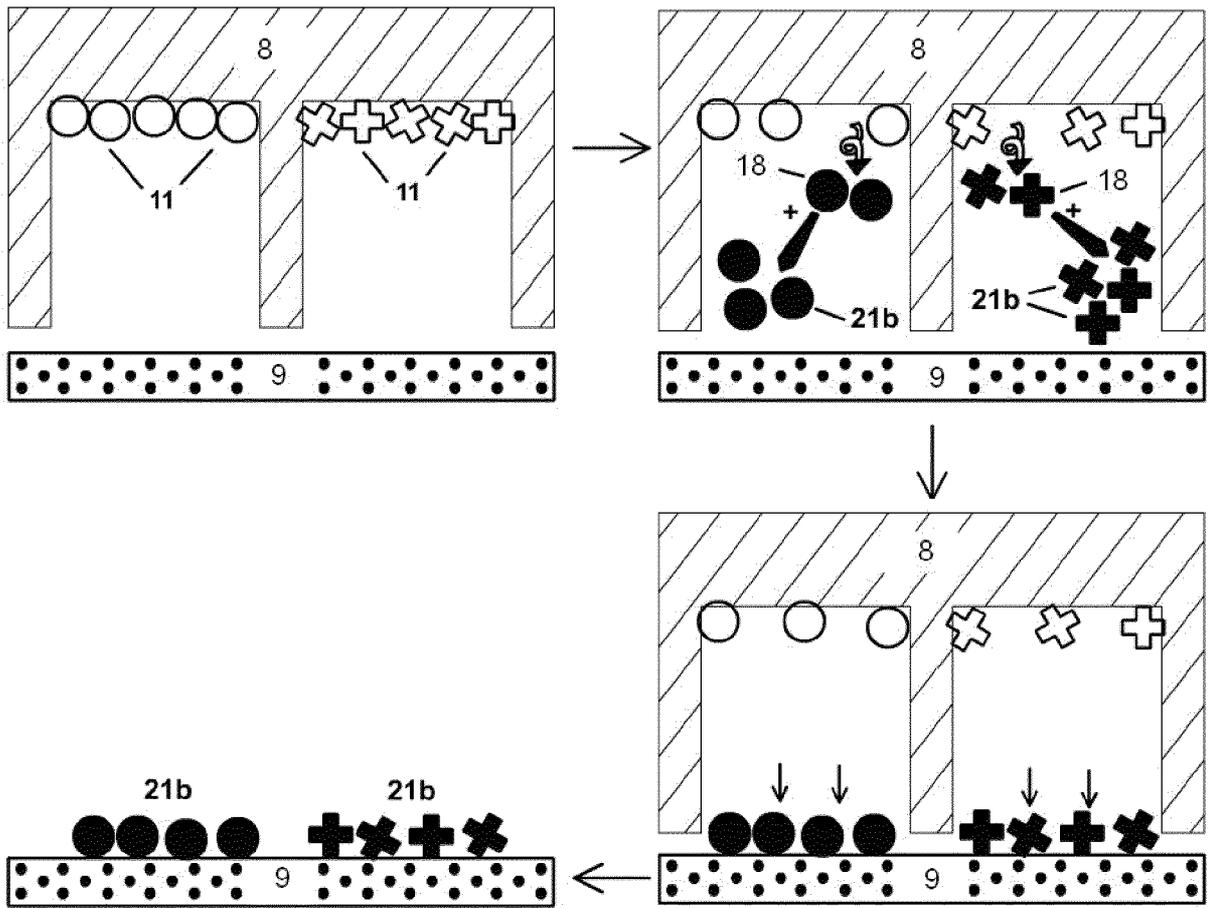
Figur 8



Figur 9



Figur 10a



Figur 10b

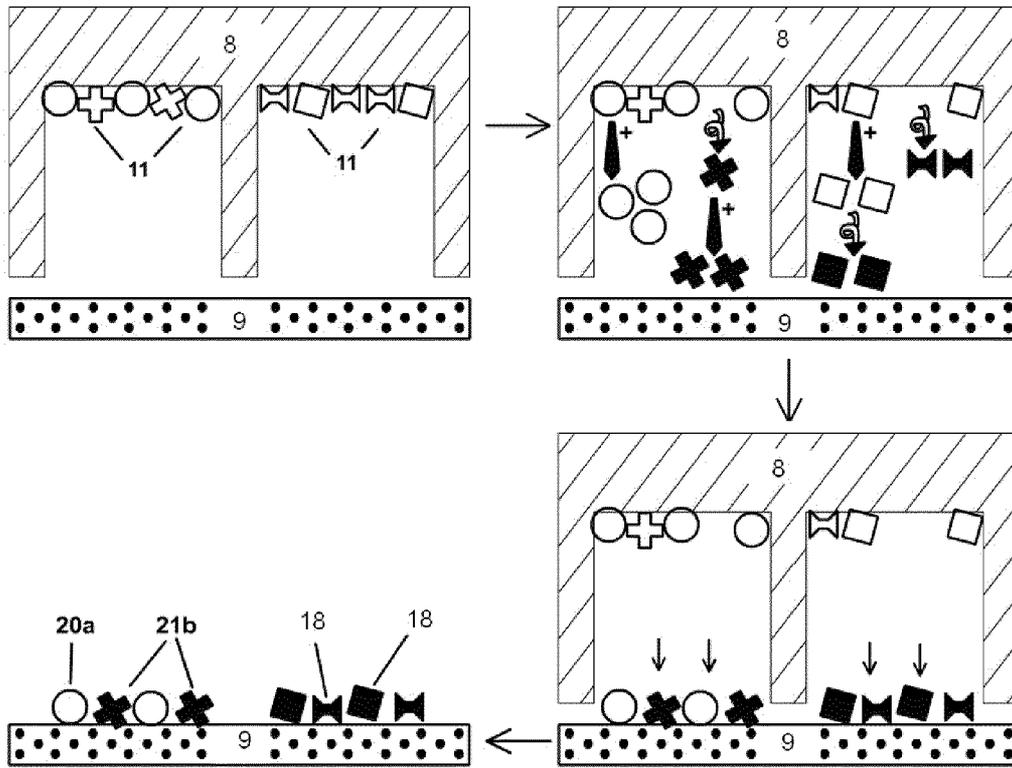
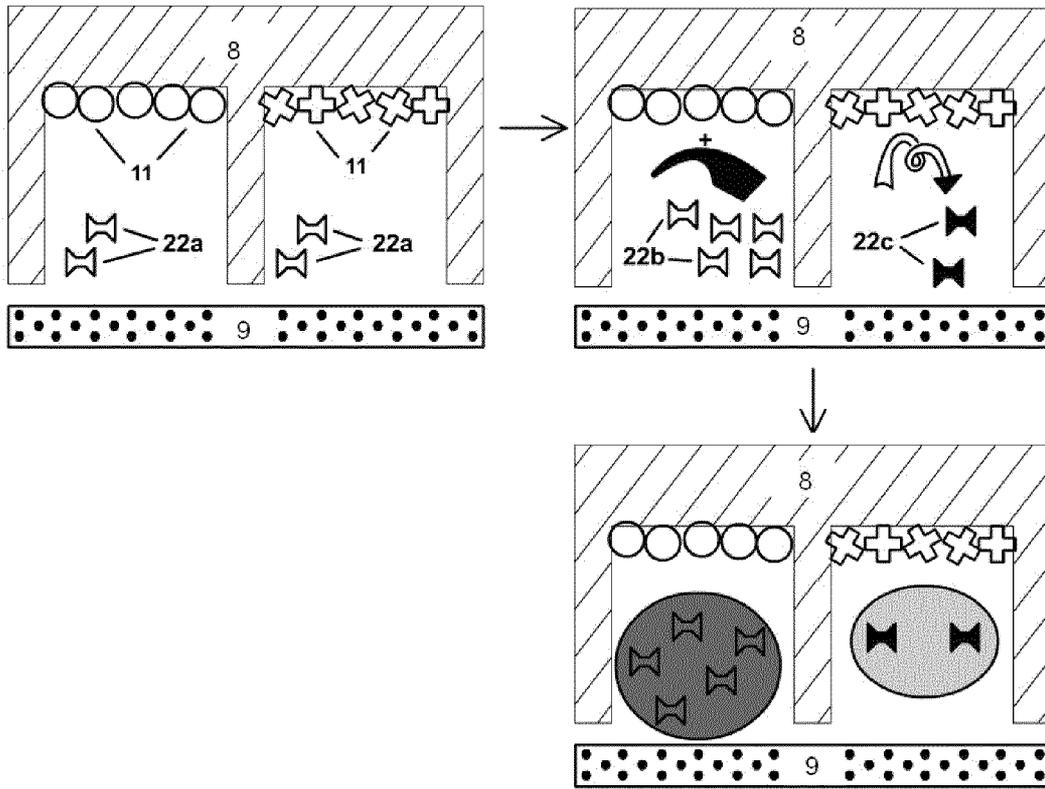
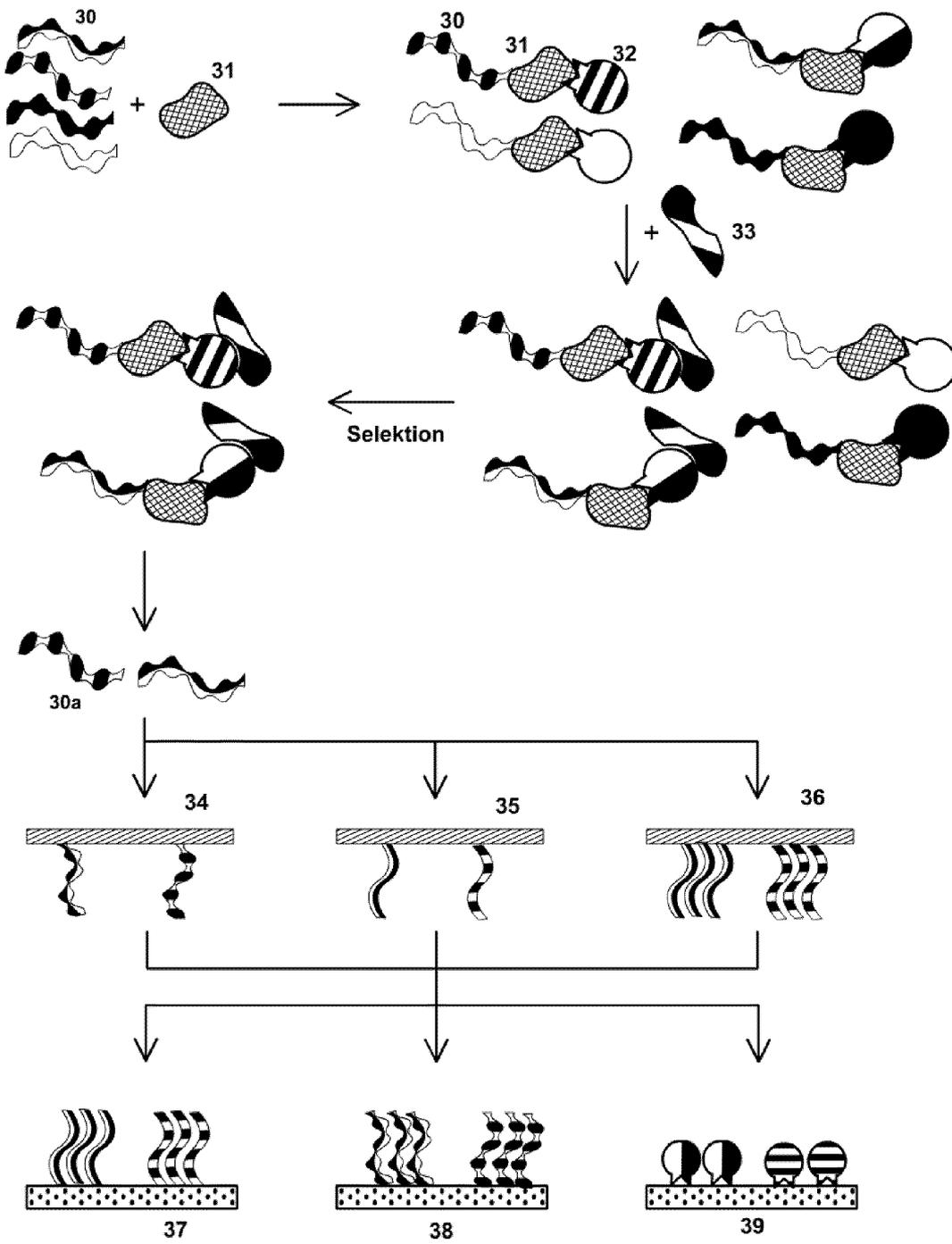


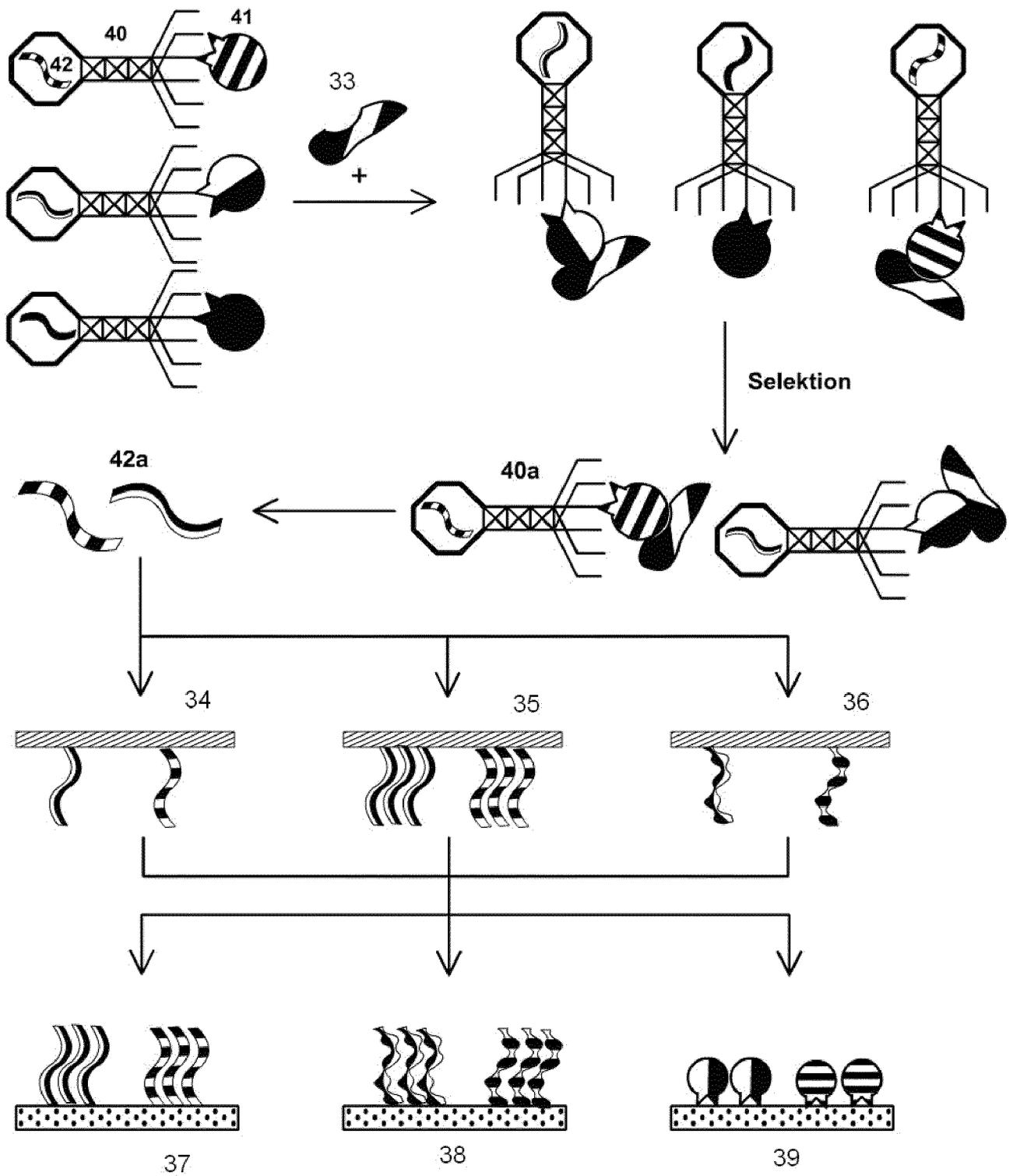
Figure 11



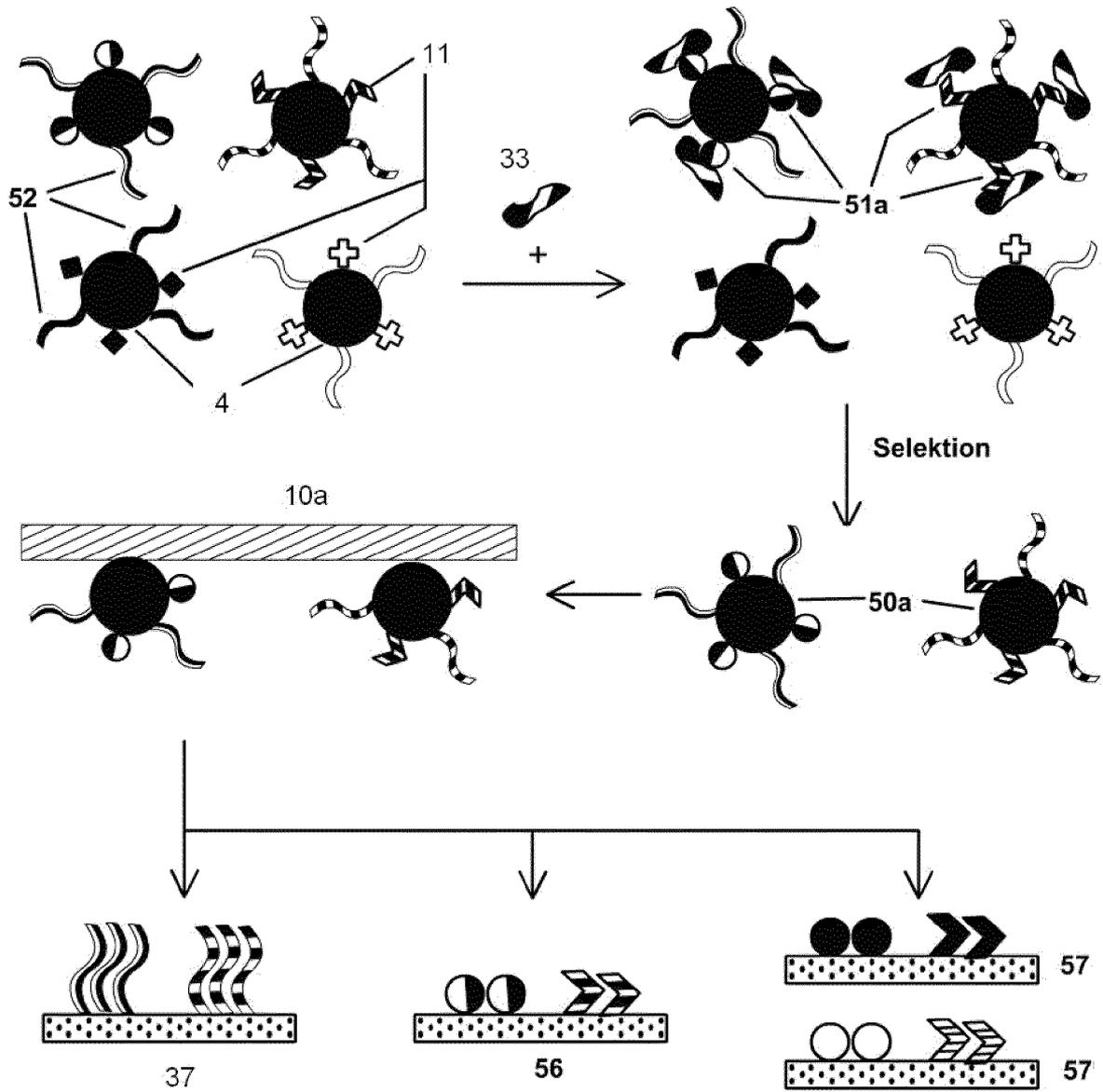
Figur 12



Figur 13



Figur 14



Figur 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/062373

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. B01J19/00 C12Q1/68 G01N33/543
ADD. C40B60/14

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)
B01J C12Q C40B G01N

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 practicable, search terms used)
EPO-Internal, 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 2010/100265 A1 (HAHN SCHICKARD GES [DE]; UNIV ALBERT LUDWIGS FREIBURG [DE]; ZENGERLE R) 10 September 2010 (2010-09-10) the whole document page 20 - page 21; claims; figure 1 page 14 - page 15	1-17
X	WO 2009/039208 A1 (TWO INC [US]; LARMAN HARRY BENJAMIN [US]; STELLACCI FRANCESCO [US]) 26 March 2009 (2009-03-26) claim 1 the whole document	1-17
X	WO 95/12808 A1 (NANOGEN INC [US]) 11 May 1995 (1995-05-11) abstract page 37; figure 13	1-17
	----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

"E" earlier application or patent 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 10 September 2013	Date of mailing of the international search report 17/09/2013
--	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Veefkind, Victor
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/062373

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/022332 A2 (UNIV TEXAS [US]; CROOKS RICHARD M [US]; JOOHOON KIM [US]; SUN LI [US];) 21 February 2008 (2008-02-21) page 10, line 24 - page 11, line 15; claims; figure 2 page 26, line 22 - line 35 the whole document	1-17
X	WO 2006/131687 A1 (BABRAHAM INST [GB]; TAUSSIG MICHAEL JOHN [GB]; HE MINGYUE [GB]) 14 December 2006 (2006-12-14) the whole document pages 4-5,9; claims pages 11-12	1-17
X	WO 00/27521 A1 (SOLEXA LTD [GB]; BALASUBRAMANIAN SHANKAR [GB]; KLENERMAN DAVID [GB]) 18 May 2000 (2000-05-18) page 8, line 16 - line 24; claims; figure 1 the whole document	1-17
X	KIM S ET AL: "DNA chip replication for a personalized DNA chip", BIOMOLECULAR ENGINEERING, ELSEVIER, NEW YORK, NY, US, vol. 23, no. 2-3, 1 June 2006 (2006-06-01) , pages 129-134, XP028041906, ISSN: 1389-0344, DOI: 10.1016/J.BIOENG.2006.01.003 [retrieved on 2006-06-01] the whole document	1-17
X	HARINI CHANDRA ET AL: "Cell-free synthesis-based protein microarrays and their applications", PROTEOMICS, vol. 10, no. 4, 1 February 2010 (2010-02-01), pages 717-730, XP055077310, ISSN: 1615-9853, DOI: 10.1002/pmic.200900462 paragraph [02.4] the whole document	1-17
X	WO 01/32935 A2 (HU CELINE [US]) 10 May 2001 (2001-05-10) claim 46 the whole document	1-17
X,P L	WO 2012/104399 A2 (UNIV ALBERT LUDWIGS FREIBURG [DE]; ROTH GUENTER [DE]; BURGER JUEGEN [D]) 9 August 2012 (2012-08-09) the whole document	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/062373

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010100265	A1	10-09-2010	CA 2756335 A1 10-09-2010
			CN 102449164 A 09-05-2012
			DE 102009012169 B3 04-11-2010
			EP 2403961 A1 11-01-2012
			JP 2012519475 A 30-08-2012
			US 2012015844 A1 19-01-2012
			WO 2010100265 A1 10-09-2010

WO 2009039208	A1	26-03-2009	CA 2699518 A1 26-03-2009
			EP 2198000 A1 23-06-2010
			US 2010256017 A1 07-10-2010
			WO 2009039208 A1 26-03-2009

WO 9512808	A1	11-05-1995	AT 211259 T 15-01-2002
			AU 692800 B2 18-06-1998
			AU 8125794 A 23-05-1995
			BR 9407952 A 26-11-1996
			CA 2175483 A1 11-05-1995
			CN 1141078 A 22-01-1997
			CN 1558207 A 29-12-2004
			CN 1920055 A 28-02-2007
			DE 69429535 D1 31-01-2002
			DE 69429535 T2 22-08-2002
			DK 727045 T3 15-04-2002
			EP 0727045 A1 21-08-1996
			EP 1120155 A2 01-08-2001
			EP 1120156 A2 01-08-2001
			EP 1120157 A2 01-08-2001
			EP 1120469 A2 01-08-2001
			ES 2170133 T3 01-08-2002
			FI 961843 A 20-06-1996
			HK 1011079 A1 07-06-2002
			JP H09504910 A 13-05-1997
			JP 2007057540 A 08-03-2007
			NZ 275962 A 28-07-1998
			NZ 330036 A 28-01-2000
			NZ 330037 A 28-01-2000
			PT 727045 E 28-06-2002
			US 5605662 A 25-02-1997
			US 5929208 A 27-07-1999
US 8389212 B1 05-03-2013			
WO 9512808 A1 11-05-1995			

WO 2008022332	A2	21-02-2008	NONE

WO 2006131687	A1	14-12-2006	AU 2006256559 A1 14-12-2006
			CA 2610971 A1 14-12-2006
			EP 1888617 A1 20-02-2008
			GB 2429976 A 14-03-2007
			JP 4959691 B2 27-06-2012
			JP 2008545984 A 18-12-2008
			US 2008293591 A1 27-11-2008
			WO 2006131687 A1 14-12-2006

WO 0027521	A1	18-05-2000	AU 758630 B2 27-03-2003
			AU 1059100 A 29-05-2000
			CA 2348696 A1 18-05-2000
			EP 1131153 A1 12-09-2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/062373

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		IS 5933 A	02-05-2001
		JP 2002529715 A	10-09-2002
		WO 0027521 A1	18-05-2000

WO 0132935	A2	10-05-2001	
		AU 2622101 A	14-05-2001
		CA 2389769 A1	10-05-2001
		CN 1402796 A	12-03-2003
		EP 1230397 A2	14-08-2002
		JP 2003517589 A	27-05-2003
		US 2004171053 A1	02-09-2004
		WO 0132935 A2	10-05-2001

WO 2012104399	A2	09-08-2012	
		CA 2824221 A1	09-08-2012
		DE 102011010307 A1	09-08-2012
		WO 2012104399 A2	09-08-2012

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2013/062373

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. B01J19/00 C12Q1/68 G01N33/543
 ADD. C40B60/14

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

B. RECHERCHIERTER GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 B01J C12Q C40B G01N

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

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
 EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2010/100265 A1 (HAHN SCHICKARD GES [DE]; UNIV ALBERT LUDWIGS FREIBURG [DE]; ZENGERLE R) 10. September 2010 (2010-09-10) das ganze Dokument Seite 20 - Seite 21; Ansprüche; Abbildung 1 Seite 14 - Seite 15	1-17
X	WO 2009/039208 A1 (TWO INC [US]; LARMAN HARRY BENJAMIN [US]; STELLACCI FRANCESCO [US]) 26. März 2009 (2009-03-26) Anspruch 1 das ganze Dokument	1-17

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" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. 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 Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
10. September 2013	17/09/2013

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Veefkind, Victor
--	---

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95/12808 A1 (NANOGEN INC [US]) 11. Mai 1995 (1995-05-11) Zusammenfassung Seite 37; Abbildung 13 -----	1-17
X	WO 2008/022332 A2 (UNIV TEXAS [US]; CROOKS RICHARD M [US]; JOOHOON KIM [US]; SUN LI [US];) 21. Februar 2008 (2008-02-21) Seite 10, Zeile 24 - Seite 11, Zeile 15; Ansprüche; Abbildung 2 Seite 26, Zeile 22 - Zeile 35 das ganze Dokument -----	1-17
X	WO 2006/131687 A1 (BABRAHAM INST [GB]; TAUSSIG MICHAEL JOHN [GB]; HE MINGYUE [GB]) 14. Dezember 2006 (2006-12-14) das ganze Dokument Seiten 4-5,9; Ansprüche Seiten 11-12 -----	1-17
X	WO 00/27521 A1 (SOLEXA LTD [GB]; BALASUBRAMANIAN SHANKAR [GB]; KLENERMAN DAVID [GB]) 18. Mai 2000 (2000-05-18) Seite 8, Zeile 16 - Zeile 24; Ansprüche; Abbildung 1 das ganze Dokument -----	1-17
X	KIM S ET AL: "DNA chip replication for a personalized DNA chip", BIOMOLECULAR ENGINEERING, ELSEVIER, NEW YORK, NY, US, Bd. 23, Nr. 2-3, 1. Juni 2006 (2006-06-01) , Seiten 129-134, XP028041906, ISSN: 1389-0344, DOI: 10.1016/J.BIOENG.2006.01.003 [gefunden am 2006-06-01] das ganze Dokument -----	1-17
X	HARINI CHANDRA ET AL: "Cell-free synthesis-based protein microarrays and their applications", PROTEOMICS, Bd. 10, Nr. 4, 1. Februar 2010 (2010-02-01), Seiten 717-730, XP055077310, ISSN: 1615-9853, DOI: 10.1002/pmic.200900462 Absatz [02.4] das ganze Dokument -----	1-17
X	WO 01/32935 A2 (HU CELINE [US]) 10. Mai 2001 (2001-05-10) Anspruch 46 das ganze Dokument -----	1-17
	----- -/--	

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X,P L	WO 2012/104399 A2 (UNIV ALBERT LUDWIGS FREIBURG [DE]; ROTH GUENTER [DE]; BURGER JUEGEN [D] 9. August 2012 (2012-08-09) das ganze Dokument -----	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2013/062373

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2010100265	A1	10-09-2010	CA 2756335 A1 10-09-2010
			CN 102449164 A 09-05-2012
			DE 102009012169 B3 04-11-2010
			EP 2403961 A1 11-01-2012
			JP 2012519475 A 30-08-2012
			US 2012015844 A1 19-01-2012
			WO 2010100265 A1 10-09-2010
WO 2009039208	A1	26-03-2009	CA 2699518 A1 26-03-2009
			EP 2198000 A1 23-06-2010
			US 2010256017 A1 07-10-2010
			WO 2009039208 A1 26-03-2009
WO 9512808	A1	11-05-1995	AT 211259 T 15-01-2002
			AU 692800 B2 18-06-1998
			AU 8125794 A 23-05-1995
			BR 9407952 A 26-11-1996
			CA 2175483 A1 11-05-1995
			CN 1141078 A 22-01-1997
			CN 1558207 A 29-12-2004
			CN 1920055 A 28-02-2007
			DE 69429535 D1 31-01-2002
			DE 69429535 T2 22-08-2002
			DK 727045 T3 15-04-2002
			EP 0727045 A1 21-08-1996
			EP 1120155 A2 01-08-2001
			EP 1120156 A2 01-08-2001
			EP 1120157 A2 01-08-2001
			EP 1120469 A2 01-08-2001
			ES 2170133 T3 01-08-2002
			FI 961843 A 20-06-1996
			HK 1011079 A1 07-06-2002
			JP H09504910 A 13-05-1997
			JP 2007057540 A 08-03-2007
			NZ 275962 A 28-07-1998
			NZ 330036 A 28-01-2000
			NZ 330037 A 28-01-2000
			PT 727045 E 28-06-2002
			US 5605662 A 25-02-1997
			US 5929208 A 27-07-1999
			US 8389212 B1 05-03-2013
			WO 9512808 A1 11-05-1995
			WO 2008022332
WO 2006131687	A1	14-12-2006	AU 2006256559 A1 14-12-2006
			CA 2610971 A1 14-12-2006
			EP 1888617 A1 20-02-2008
			GB 2429976 A 14-03-2007
			JP 4959691 B2 27-06-2012
			JP 2008545984 A 18-12-2008
			US 2008293591 A1 27-11-2008
			WO 2006131687 A1 14-12-2006
WO 0027521	A1	18-05-2000	AU 758630 B2 27-03-2003
			AU 1059100 A 29-05-2000
			CA 2348696 A1 18-05-2000
			EP 1131153 A1 12-09-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2013/062373

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
		IS 5933 A	02-05-2001
		JP 2002529715 A	10-09-2002
		WO 0027521 A1	18-05-2000

WO 0132935	A2 10-05-2001	AU 2622101 A	14-05-2001
		CA 2389769 A1	10-05-2001
		CN 1402796 A	12-03-2003
		EP 1230397 A2	14-08-2002
		JP 2003517589 A	27-05-2003
		US 2004171053 A1	02-09-2004
		WO 0132935 A2	10-05-2001

WO 2012104399	A2 09-08-2012	CA 2824221 A1	09-08-2012
		DE 102011010307 A1	09-08-2012
		WO 2012104399 A2	09-08-2012
