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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. Oktober 2011 (27.10.2011)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2011/131533 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
F04B 19/00 (2006.01) *F04B 19/24* (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2011/055793

(22) Internationales Anmeldedatum:
13. April 2011 (13.04.2011)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2010 028 012.7
21. April 2010 (21.04.2010) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **QIAGEN GMBH** [DE/DE]; Qiagen Straße 1, 40724 Hilden (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **WENDE, Andy** [DE/DE]; Am Bürenbach 3, 40724 Hilden (DE). **JEZIORSKI, Markus** [DE/DE]; Seidenweberstraße 5, 40764 Langenfeld (DE).

(74) Anwalt: **GILLE HRABAL STRUCK NEIDLEIN PROP ROOS**; Brucknerstr. 20, 40593 Düsseldorf (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, 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, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2011/131533 A1

(54) **Title**: LIQUID CONTROLLER FOR MICRO-THROUGHFLOW SYSTEM

(54) **Bezeichnung** : FLÜSSIGKEITSSTEUERUNG FÜR MIKRODURCHFLUSSSYSTEM

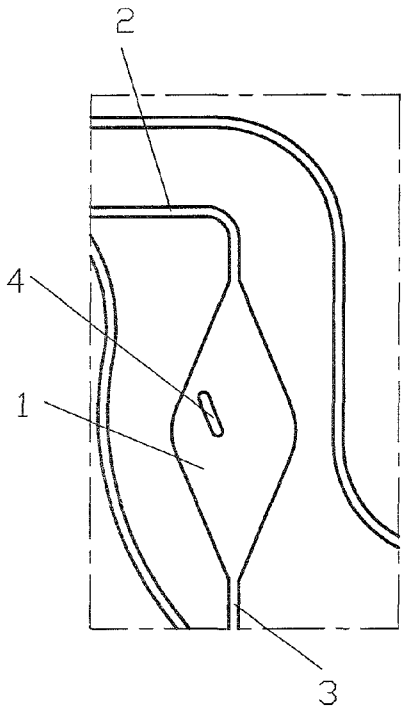


FIG.1

(57) **Abstract**: The invention relates to a method and a device for controlled transport of a liquid within a throughflow system, in particular a micro-throughflow system. According to the invention, the transport of an aqueous liquid in a throughflow system is controlled, above all, with the aid of pentadecane, that is to say $C_{15}H_{32}$. For this purpose, a throughflow system is provided which comprises pentadecane for controlling liquid transport within the throughflow system. The throughflow system is flooded entirely or partially with pentadecane for the purpose of control.

(57) **Zusammenfassung**: Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung für einen gesteuerten Transport einer Flüssigkeit innerhalb eines Durchflusssystems, insbesondere eines Mikrodurchflusssystems. Erfindungsgemäß wird der Transport einer wässrigen Flüssigkeit in einem Durchflusssystem vor allem mit Hilfe von Pentadecan, also $C_{15}H_{32}$ gesteuert wird. Hierfür wird ein Durchflusssystem bereitgestellt, welches Pentadecan zur Steuerung eines Flüssigkeitstransports innerhalb des Durchflusssystems umfasst. Das Durchflusssystem wird zwecks Steuerung mit Pentadecan ganz oder teilweise geflutet.

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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*

Flüssigkeitssteuerung für Mikrodurchflusssystem

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung für einen gesteuerten Transport einer Flüssigkeit innerhalb eines Durchflusssystems, insbesondere eines Mikrodurchflusssystems.

Ein Mikrodurchflusssystem ist eine Vorrichtung mit Kanälen, deren Durchmesser kleiner als 1 mm ist. Insbesondere sind die Kanaldurchmesser maximal 150 μm groß. Ein solches Mikrodurchflusssystem wird in der Regel unter Anwendung von Halbleitertechniken hergestellt. Es ist daher auch bekannt, Halbleiter als Material zu wählen, um Kanäle zu fertigen. Aber auch andere Materialien wie Polymere oder Glas können eingesetzt werden. Ein Mikrodurchflusssystem im Sinne der vorliegenden Erfindung umfasst dann Kanäle und Bauteile, die in ein Substrat integriert sind. Aus der Druckschrift US 7,144,616 B1 geht ein solches Mikrodurchflusssystem hervor.

In der pharmazeutischen Industrie werden täglich mehrere hunderttausend verschiedene Substanzen auf ihre Eignung als Ausgangsstoffe für neue Medikamente untersucht. Derartige Anforderungen haben zur Konsequenz, dass Bedarf für Mikrodurchflusssysteme besteht, mit denen kleinste Flüssigkeitsmengen präzise gehandhabt werden können. Mikrodurchflusssysteme werden auch in der industriellen Verfahrenstechnik eingesetzt, um kleinste Flüssigkeitsmengen schnell und gleichmäßig miteinander zu vermischen. Auf biochemischem Gebiet werden Mikrosysteme für die Analyse von biologischen Proben verwendet.

Mikrodurchflusssysteme sind sehr klein und werden zunehmend kleiner gebaut. Die eingesetzten Bauteile müssen entsprechend klein sein. Es besteht daher ein ständiger Bedarf an einer weiteren Miniaturisierung der verwendeten Bauteile.

Sogenannte Lab-on-a-Chip-Systeme, zum Beispiel bekannt aus den Druckschriften „Robin Hui Liu, Jianing Yang, Ralf Lenigk, Justin Bonanno, and Piotr Grodzinski: Self-Contained, Fully Integrated Biochip for Sample Preparation, Polymerase Chain Reaction Amplification, and DNA Microarray Detection, Anal. Chem. 2004, 76, 1824-1831" sowie „R. Pal et al.: An integrated microfluidic device for influenza and other genetic analyses, Lab Chip, 2005, 5, 1024–1032", umfassen Mikrodurchflusssysteme. Es handelt sich dabei um miniaturisierte Diagnose- und/ oder Analysevorrichtungen. Solche Systeme werden auch als „LoC"-Systeme bezeichnet.

In Durchflusssystemen werden Ventile benötigt, um Stoffflüsse zu steuern und/ oder Reaktionskammern zu öffnen oder zu verschließen. Dazu werden meist mechanische Ventile (Drehventile etc.) benutzt, die mechanisch bewegt werden müssen, um den Öffnungszustand zu verändern. Vielfach besteht bei Durchflusssystemen der Bedarf, eine erste Flüssigkeit dosiert einer zweiten Flüssigkeit zuzufügen. Nach dem Stand der Technik ist dafür ein entsprechendes System an Leitungen und Ventilen erforderlich, um eine solche Dosierung vorzunehmen.

Ein mechanisch Ventil für das Öffnen und Schließen eines Kanals ist aus der Druckschrift JP 2006183818 A oder aus der Druckschrift US 6,981,518 B2 bekannt. Gemäß der Druckschrift US 6,981,151 B2 wird ein mechanisches Ventilelement mit Hilfe eines Hebels linear verfahren, um einen Kanal zu öffnen oder zu verschließen. Verschiedene Ventile für Mikrodurchflusssysteme werden in der Druckschrift „Chunsun Zhang et al., Micropumps, Microvalves, and micromixers within PCR microfluid chips: Advances and trends, Biotechnology Advances 25 (2007) 483 – 514, Elsevier" beschrieben. Einen Überblick über vorbekannte Ventile für mikrofluidische Durchflusssysteme findet sich ergänzend in J. Micromech. Microeng. 16 (2006) R13–R39, A review of microvalves, Kwang W Oh et al..

In mikrofluidischen, automatisierten Systemen müssen die verwendeten Ventile hinreichend klein dimensioniert werden, was hohe Anforderungen an die Fertigungsgenauigkeit der Ventile stellt. Weiterhin ist die Ventilsteuerung

durch Stellmotoren oder ähnliches im Betreibergerät eines solchen LoC-Systems sicherzustellen.

Speziell für den Einsatz im mikrofluidischen Bereich findet man daher im Stand der Technik alternative Ventilkonzepte, die das Öffnen bzw. Schließen von Kanälen ohne mechanische Ansteuerung gewährleisten. Bei diesen Konzepten handelt es sich um Wachs-, Paraffin-, Verfestigungs- bzw. Vereisungsventile. Ihre Vorteile liegen in ihrer geringen Größe (sie sind quasi Bestandteil des zu kontrollierenden Kanals) und darin, dass für ihre Steuerung meist keine zusätzliche Mechanik von Nöten ist. In der Regel werden Phasenübergänge von fest (einschließlich wachsförmig) nach flüssig und umgekehrt ausgenutzt. Derartige Ventile gehen aus den Druckschriften „Yan He et al.: Capillary-based fully integrated and automated system for nanoliter polymerase chain reaction analysis directly from cheek cells, Journal of Chromatography A, 924 (2001) 271 -284", „P. Selvaganapathy*, E.T. Carlen, C.H. Mastrangelo: Electrothermally actuated inline microfluidic valve, Sensors and Actuators A 104 (2003) 275–282", "Lena Klintberg et al.: Fabrication of a paraffin actuator using hot embossing of polycarbonate, Sensors and Actuators A 103 (2003) 307 -316", "Robin Hui Liu, Jianing Yang, Ralf Lenigk, Justin Bonanno, and Piotr Grodzinski:Self-Contained, Fully Integrated Biochip for Sample Preparation, Polymerase Chain Reaction Amplification, and DNA Microarray Detection, Anal. Chem. 2004, 76, 1824-1831",„R. Pal et al.: An integrated microfluidic device for influenza and other genetic analyses, Lab Chip, 2005, 5, 1024–1032", "Zongyuan Chen, Jing Wang, Shizhi Qian and Haim H. Bau: Thermally-actuated, phase change flow control for microfluidic systems, Lab Chip, 2005, 5, 1277–1285", US 2008/0056949 A1, US 2008/0112855 A1, US 2007/0227592 A1, US 2007/0231216 A1, US 2004/0007275 A1, US 2008/0314465 A1, US 2005/0247356 A1 sowie US 2005/0247357 A1 hervor. Es ist bekannt, ein Wachs innerhalb eines Durchflusssystems zu platzieren und dieses zu gewünschter Zeit zu verflüssigen.

Eine Vereisung benötigt abhängig vom verwendeten Puffer nachteilhaft relativ tiefe Temperaturen von bis zu -20°C, bevor ein Vereisungsventil vereist und damit schließt. Wachsventile sind je nach Bauart nur ein- bis zweimal schaltbar und benötigen je nach Bauart eine aktive Ansteuerung über Pumpmechanismen zum Bewegen des Wachses. Bekannte Eis- und Wachsventile lösen nicht das Problem der Bildung von Lufteinschlüssen bei Erstbefüllung von mikrofluidischen Kanal-/Kavitätssystemen. Zur Verwendung von Wachsventilen muss zusätzlich zum Herstellungspozess der fluidischen Kartusche noch Wachs in den entsprechenden Bereichen positioniert werden, was einen erhöhten Herstellungsaufwand bedeutet.

Es ist dem genannten Stand der Technik gegenüber Aufgabe der Erfindung, die Steuerung von einem mikrofluidischen Kanal weiterzuentwickeln.

Die Aufgabe der Erfindung wird durch ein Verfahren gelöst, bei dem der Transport einer ersten, insbesondere wässrigen Flüssigkeit in einem Durchflusssystem mit Hilfe einer zweiten angrenzenden Flüssigkeit und zwar insbesondere Pentadecan, also $C_{15}H_{32}$ durch ganz oder teilweises Fluten des Durchflusssystems gesteuert wird. Die Aufgabe der Erfindung wird außerdem durch ein Durchflusssystem gelöst, welches die zweite Flüssigkeit und zwar insbesondere Pentadecan zur Steuerung eines Flüssigkeitstransports innerhalb des Durchflusssystems umfasst. Die zweite Flüssigkeit ist so ausgewählt, dass diese in der zu steuernden ersten Flüssigkeit nicht gelöst werden kann und mit der ersten Flüssigkeit nicht vermischt. Es handelt sich also bei der zweiten Flüssigkeit um eine hydrophobe Flüssigkeit, wenn die erste Flüssigkeit eine wässrige Flüssigkeit ist. Außerdem liegt die Temperatur der ersten Flüssigkeit, die bewirkt, dass die erste Flüssigkeit aufhört zu fließen, unterhalb der Temperatur der zweiten Flüssigkeit, die bewirkt, dass die zweite Flüssigkeit aufhört zu fließen. Im Fall von Ölen ist eine solche Temperatur unter der Bezeichnung „Stockpunkt" bekannt.

Verfahrensgemäß befindet sich innerhalb des Durchflutungssystems die erste und zweite Flüssigkeit in wenigstens einem Kanal und/oder wenigstens einer Kammer. Die erste und die zweite Flüssigkeit grenzen unmittelbar aneinander an. Beide Flüssigkeiten bewegen sich gemeinsam innerhalb des Durchflusssystems, um so einen Transport bzw. eine Bewegung der ersten Flüssigkeit innerhalb des Durchflusssystems zu erhalten. Die Bewegung der ersten Flüssigkeit wird gestoppt, indem zumindest ein Teil der zweiten Flüssigkeit bis zum Erreichen der Temperatur abgekühlt wird, die bewirkt, dass die zweite Flüssigkeit aufhört zu fließen. Vorzugsweise wird allerdings nicht derart abgekühlt, dass die Temperatur erreicht wird, die bewirkt, dass die erste Flüssigkeit ebenfalls aufhört zu fließen. So wird sichergestellt, dass die erste Flüssigkeit stets fließfähig bleibt. Es kann dann besonders schnell und einfach der Transport der ersten Flüssigkeit gestoppt und begonnen oder fortgesetzt werden.

Pentadecan ist ein wasserunlöslicher, stark hydrophober, stark benetzender Stoff mit einem Stockpunkt von 5° bis 10° und der somit oberhalb von Schmelztemperaturen von wässrigen Lösungen aufhört zu fließen. Aufgrund dieser Eigenschaften kann mit Hilfe von Pentadecan eine wässrige Flüssigkeit durch gewünschte Bereiche des Durchflusssystems, insbesondere umfassend ein oder mehrere Kanäle und/ oder ein oder mehrere Kammern, transportiert werden, indem Pentadecan die wässrige Flüssigkeit vor sich her schiebt oder hinter sich her zieht. Aufgrund der stark hydrophoben Eigenschaften des Pentadecans findet dabei kein oder zumindest praktisch kein Vermischen mit der wässrigen Flüssigkeit statt. Pentadecan kann zuerst einen in gewünschten Bereich des Durchflusssystems hinein gepumpt werden. Aufgrund der stark benetzenden Eigenschaften des Pentadecans gelingt dies grundsätzlich problemlos blasenfrei. Wird im Anschluss daran die wässrige Flüssigkeit in den gewünschten Bereich gepumpt, so verdrängt die wässrige Flüssigkeit Pentadecan vollständig und befindet sich damit blasenfrei im vorgesehenen Bereich des Durchflusssystems. Anschließend kann erneut Pentadecan in den vorgesehenen Bereich hineingepumpt werden, um nun die Flüssigkeit vollständig aus diesem Bereich herauszudrücken. Die Schritte können also reversibel durchgeführt werden.

Im Fall einer wässrigen Flüssigkeit eignen sich ebenfalls in besonderer Weise $C_{16}H_{34}$,also Hexadecan oder $C_{14}H_{30}$, also Tetradecan. Hexadecan sowie Tetradecan sind bei einer Raumtemperatur von 20°C grundsätzlich fließfähig. Beide Flüssigkeiten verhalten sich hydrophob und erstarren bei einer Temperatur oberhalb von 0°C. Beide Flüssigkeiten weisen daher ähnliche Vorteile wie Pentadecan auf.

Sämtliche drei Flüssigkeiten weisen gegenüber Paraffin, also einem Gemisch aus Alkanen, den Vorteil auf, nicht aus einem Gemisch von mehreren Substanzen zu bestehen. Der Stockpunkt ist entsprechend genauer vorhersehbar, was eine genauere, erleichterte Steuerung möglich macht. In einer Ausführungsform liegt daher die zweite Flüssigkeit nicht als Gemisch vor.

Ein blasenfreies Befüllen, welches durch die Erfindung grundsätzlich sehr zuverlässig ermöglicht wird, ist insbesondere dann von Vorteil, wenn sich solche Gaseinschlüsse in flüssigkeitsgefüllten Reaktionskammern durch Erhitzen (bspw. Denaturierungsschritt bei einer PCR) ausdehnen und einen enormen Druck im geschlossenen System erzeugen können. Ein anderer Vorteil blasenfreier Befüllung liegt darin, das zur Verfügung stehende Reaktionsvolumen zu maximieren, um so die Effektivität zu maximieren.

Soll ein Durchfluss durch einen Bereich hindurch gestoppt werden, so gelingt dies problemlos und schnell durch eine entsprechende Temperaturabsenkung der zweiten Flüssigkeit zwecks Verfestigung. Die sich verfestigende zweite Flüssigkeit kann sich dann vor oder hinter der ersten, insbesondere wässrigen Flüssigkeit befinden, deren weiterer Transport gestoppt werden soll. Liegt zum Beispiel Pentadecan innerhalb des Durchflusssystems in verfestigter Form vor und blockiert so den Durchfluss durch einen Bereich des Durchflusssystems, so genügt eine hinreichende Temperaturerhöhung des Pentadecans, um den entsprechenden Durchfluss (wieder) zu ermöglichen.

In einer Ausführungsform wird daher eine Kammer des Mikrodurchflusssystems mit Pentadecan gefüllt und anschließend die wässrige Flüssigkeit über einen zuführenden Kanal in die mit Pentadecan gefüllte Kammer gepumpt. Auf diese Weise kann eine Kammer eines Durchflusssystems, insbesondere eines Mikrodurchflusssystems selbst dann blasenfrei mit der wässrigen Flüssigkeit gefüllt werden, wenn sich in der Kammer Mittel wie ein Rührelement befinden, die ein blasenfreies Befüllen erschweren.

Ein solches Durchflusssystem kann beispielsweise für die Durchführung einer PCR eingesetzt werden. Die wässrige Flüssigkeit ist dann Wasser mit den für die Durchführung einer PCR erforderlichen Inhaltsstoffen.

Da eine zweite Flüssigkeit wie Pentadecan sich bei 5 bis 10°C verfestigt, kann der Transport einer wässrigen Flüssigkeit durch Verfestigen oder Verflüssigen von Pentadecan in einer üblichen Umgebung, in der Raumtemperatur herrscht, ohne großen Energieaufwand gesteuert werden.

Problemlos und genau kann quasi automatisch ein Transport durch Verfestigen gesteuert werden, indem ein Bereich des Durchflusssystems im Fall von Pentadecan auf eine Pentadecan – Erstarrungstemperatur gekühlt wird, eine wässrige Flüssigkeit mit Hilfe von Pentadecan insbesondere durch diesen Bereich hindurch transportiert wird, und der Transport der wässrigen Flüssigkeit gestoppt wird, indem Pentadecan in den gekühlten Bereich hinein gelangt und erstarrt. Zu diesem Zweck wird die wässrige Flüssigeit vorzugsweise mit Hilfe von Pentadecan in den gekühlten Bereich hinein gedrückt. Der Bereich wird dann nicht derart gekühlt, dass die wässrige Flüssigkeit erstarrt. Solche Vorteile und Verfahrensschritte lassen sich auch mit solchen zweiten Flüssigkeiten erzielen, die mit Pentadecan vergleichbar sind wie Tetradecan oder Hexadecan.

Der gekühlte Bereich umfasst beispielsweise eine Kammer mit Zuführkanal. Zunächst gelangt die wässrige Flüssigkeit in den gekühlten Kanal und

anschließend in die gekühlte Kammer hinein. In Fließrichtung gesehen hinter der Flüssigkeit befindet sich Pentadecan und gelangt so schließlich ebenfalls in den gekühlten Kanal hinein. Im gekühlten Kanal erstarrt das Pentadecan, also das $C_{15}H_{32}$. Als Folge davon stoppt der weitere Transport der wässrigen Flüssigkeit. Vorzugsweise liegt die Kühltemperatur bei 0°C bis 5°C, um einerseits ein rasches Erstarren des Pentadecans herbeizuführen und andererseits ein Erstarren der wässrigen Flüssigkeit zuverlässig zu vermeiden. Um ein rasches Erstarren herbeizuführen, beträgt der Durchmesser des Kanals, in dem Pentadecan erstarren soll, vorzugsweise nicht mehr 1 mm, besonders bevorzugt nicht mehr als 600 μm, noch bevorzugter nicht mehr als 100 μm. Der Kanal besteht zum Beispiel aus Polykarbonat, Polypropylen oder Glas.

Allgemein wird eine wässrige Flüssigkeit innerhalb des Durchflusssystems transportiert, indem Pentadecan in einen Bereich des Durchflusssystems hineingepumpt wird, in dem sich die wässrige Flüssigkeit befindet. Pentadecan schiebt dann die wässrige Flüssigkeit vor sich her, ohne sich mit dieser zu vermischen.

Zur Durchführung des Verfahrens wird ein Durchflusssystem, insbesondere Mikrodurchflusssystem bereitgestellt, welches Pentadecan zur Steuerung des Transports einer Flüssigkeit innerhalb des Durchflusssystems umfasst. Das Pentadecan befindet sich dann in einer Kammer und/ oder in einem Kanal des Durchflusssystems und zwar insbesondere in einem Bereich, der auf eine solche Temperatur gekühlt werden kann, dass das Pentadecan zu erstarren vermag, vorzugsweise nicht aber eine wässrige Lösung. In der Regel wird daher auf eine Plustemperatur abgekühlt, die nahe bei 0°C liegt.

Das Durchflusssystem umfasst daher insbesondere Mittel zum Kühlen und/ oder Erwärmen des darin befindlichen Pentadecans. Ein Peltierelement eignet sich im Fall eines Chip artigen Aufbaus des Durchflusssystems in besonderer Weise als Mittel zum Kühlen und/ oder Erwärmen. Es können aber auch andere Mittel zum Kühlen und/ oder Erwärmen eingesetzt werden, wie zum Beispiel ein Durchflusssystem, durch welches eine gekühlte oder

erwärmte Flüssigkeit hindurch geleitet wird.

Alternativ oder ergänzend kann das Durchflusssystem Heiz- und Kühlmittel zur Durchführung einer PCR umfassen, um damit eine PCR durchführen zu können.

Alternativ oder ergänzend kann das Durchflusssystem ein oder mehrere Reagenzien zur Durchführung einer Analyse oder einer PCR umfassen. Reagenzien können in Kammern des Durchflusssystems untergebracht sein und in flüssiger oder trockener Form vorliegen.

Verwendete wässrige erste Flüssigkeiten können ein Reaktionsgemisch zur Durchführung einer Nukleinsäureamplifikation mit oder ohne vorheriger Reverser Transkription sein.

Mit Hilfe der Erfindung kann eine PCR oder eine isothermale Amplifikation (bspw. RPA, HDA, EXPAR) durchgeführt werden, wie diese aus den Druckschriften „Myriam Vincent, Yan Xu & Huimin Kong, Helicase-dependent isothermal DNA amplification, EMBO reports VOL 5 , NO 8, 2004, S. 795", „Olaf Piepenburg, Colin H. Williams, Derek L. Stemple, Niall A. Armes, DNA Detection Using Recombination Proteins, PLoS Biology, July 2006, Volume 4, Issue 7, e204", „Jeffrey Van Ness, Lori K. Van Ness, and David J. Galas, Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides, 4504–4509, PNAS, April 15, 2003, Vol. 100, No. 8" bekannt sind.

Die benötigten wässrigen Gemische, also erste Flüssigkeiten im Sinne der Erfindung können im Wesentlichen enthalten:

- Puffersubstanzen zur pH-Wert-Stabilisierung,
- Salze zur Einstellung eines für die verwendeten Enzyme günstigen Milieus,
- Enzyme wie DNA-Polymerase, Reverse Transkriptase, Restriktionsenzyme, Helicase, Recombinase etc.,
- Koenzyme/Kofaktoren wie ATP, NADH,

- Ausgangsstoffe der enzymatischen Reaktion (passende Oligonukleotide, Nukleotidtriphosphate),
- die Reaktion unterstützende Stoffe wie DMSO, Betain, PEG etc.,

Wässrige Gemische, die eine Nachweisreaktion eines Analyten ermöglichen und die eine erste Flüssigkeit im Sinne der Erfindung sein können, können enthalten:

- Puffersubstanzen und Salze wie oben beschrieben,
- Analyten (Proteine, Nukleinsäuren),
- Sonden (TaqMan-Sonden, Hybridisierungssonden (beides Oligonukleotide), markierte und unmarkierte Antikörper),
- weitere eine Detektion der Analyten ermöglichende Stoffe wie Antikörper, Enzyme (Alkalische Phosphatase, Meerrettich-Peroxidase etc.), fluoreszente Proteine wie bspw. Phycoerythrin).

Sonstige wässrige bzw. auf kurzkettigen Alkoholen (Methanol, Ethanol, Propanol) basierenden Mischungen an Stoffen, die miteinander zur Reaktion gebracht werden sollen, sowie dazu notwendigen Hilfsstoffe können erste Flüssigkeiten im Sinne der Erfindung sein, die insbesondere auf dem Gebiet der Mikroreaktionstechnik eingesetzt werden.

Im Prinzip können alle vorgenannten Mischungen sowie einzelne Komponenten dieser Mischungen in flüssiger oder trockener Form in ein oder mehreren Kammern des Durchflusssystems bereits vom Hersteller untergebracht worden sein.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher verdeutlicht.

Figur 1 zeigt eine nicht befüllte, aus Polykarbonat bestehende Mikroreaktionskammer 1 eines Mikrodurchflusssystems. Das Durchflusssystem

wurde durch einen aus einem Polykarbonat gefertigten Chip gebildet, der mit einer aus Polykarbonat bestehenden Folie geeignet verschlossen wurde. Die Kanaldurchmesser betrugen 600 µm. Die Kammer wies eine Ausdehnung von 7,5 mm mal 21 mm auf. Über den am oberen Seitenrand befindlichen zuführenden Kanal 2 wurde die Kammer mit gefärbtem Pentadecan gefüllt und so geflutet, was trotz des Rührelements 4 in der Kammer 1 absolut blasenfrei gelang, wie die Figur 2 verdeutlicht. Nun wurde, wiederum über den zuführenden Kanal 2, (anders gefärbtes) Wasser in die mit Pentadecan gefüllte Kammer 1 gepumpt. Pentadecan floss daraufhin durch den abfließenden Kanal 3 aus der Kammer 1 heraus. Dieser Vorgang führte zu einem vollständigen Austausch des Pentadecans durch das Wasser, wie die Figur 3 zeigt. Die Reaktionskammer 1 wurde also blasenfrei mit einer wässrigen Flüssigkeit gefüllt.

Handelt es sich bei der wässrigen Flüssigkeit um eine Mischung zur Durchführung einer PCR, so kann die mit der wässrigen Flüssigkeit gemäß Figur 3 gefüllte Kammer den bekannten, PCR-typischen Temperaturprofilen unterworfen werden, um Nukleinsäuren zu amplifizieren.

Abschließend wurde das Wasser wieder mit Pentadecan aus der Mikroreaktionskammer 1 herausgedrückt, was einem Weitertransport des Reaktionsgemisches aus der Kammer in eine andere Kavität entspricht. Dieser Austausch erfolgte wiederum gemäß Figur 4 vollständig und blasenfrei.

Das beschriebene Ausführungsbeispiel belegt, dass Pentadecan, welches reproduzierbar in der Lage ist, mikrofluidische Reaktionskammern vollständig und blasenfrei zu befüllen, vollständig mit einem wässrigen Puffer aus der Kammer verdrängt werden kann. Dieser Prozess ist reversibel, denn das Ausführungsbeispiel zeigt weiterhin die nachfolgende Verdrängung des eingeführten wässrigen Puffers aus der Reaktionskammer 1 mit Hilfe von Pentadecan.

In einem zweiten Ausführungsbeispiel wurde demonstriert, dass der Fluss eines wässrigen Mediums in einem in Figur 5 gezeigten, mit Pentadecan gefluteten Kanalsystem mit offenen Anschlüssen 5 bis 10 durch vorheriges Abkühlen von definierten Kanalabschnitten exakt lenkbar ist. Das in der Figur 5 gezeigte, aus Kanälen gebildete Durchflusssystem bestand wiederum aus einer Basis aus gefrästem Polykarbonat, die mit einer aus Polypropylen bestehenden Folie verschlossen wurde. Der Kanaldurchmesser lag erneut bei 600 µm. Das Kanalsystem war 70 mm breit (von 6 nach 9) und 50 mm hoch (von 5 nach 7). Die gefüllten Kanäle sind in der Figur 5 mit schwarzen Strichen veranschaulicht. Anschließend wurde die Flussrichtung von gefärbtem Wasser durch mit Eis/H2O-gefüllte, auf Kanälen platzierte Röhrchen gesteuert. Die Röhrchen 12, 13, 14, 15 wurden wie in der Figur 6 gezeigt oberhalb der Kanäle aufgesetzt, die unmittelbar zu den Anschlüssen 6, 7, 9 und 10 führen. Die Kanäle wurde so auf nahe 0°C abgekühlt. Das Wasser wurde daraufhin in den Anschluss 5 hinein gepumpt und trat beim Anschluss 8 aus dem gezeigten Mikrodurchflusssystem wieder heraus.

Dabei wurde das gefärbte Wasser - wie in der Figur 6 gezeigt - in zwei für den Fluidfluss sehr unvorteilhaften 90°-Winkeln gelenkt. Dies belegt, dass das Einfrieren von Pentadecan zu einem robusten Verschließen beliebig auswählbarer Kanäle führt.

Das nachfolgend beschriebene dritte Ausführungsbeispiel demonstriert ein „automatisches Abmessen" von Flüssigkeitsvolumina bei Befüllungsvorgängen und beweist, dass dies selbst mit einfachsten Hilfsmitteln machbar ist.

Ein Mikrodurchflusssystem wurde auf Eis gelagert, um den in der Figur 7 gezeigten zuführenden Kanal 2 für Pentadecan „unpassierbar" zu machen. Über diesen zuführenden Kanal wurde dann mit Hilfe einer Mikropipette manuell eine zweiphasige Flüssigkeit in die dahinterliegende

Mikroreaktionskammer 1 gefüllt. Die beiden Phasen waren violett gefärbtes Wasser (untere Phase) sowie blau gefärbtes PD (obere Phase). Beide Flüssigkeiten wurden in die Pipettenspitze angesaugt und ohne abzusetzen oder zu unterbrechen in den Kanal 2 gepumpt. Die Befüllung der Reaktionskammer stoppte, sobald das Pentadecan in den eisgekühlten Kanal 2 gelangte, obwohl der Befüllungsdruck mit Hilfe der Mikropipette aufrecht erhalten bzw. erhöht wurde, ohne dass blaues PD die Reaktionskammer erreichen konnte. Pentadecan gelangte lediglich bis zu der in der Figur 7 gezeigten Kühlstelle 11.

Zur Überprüfung des vorhandenen Überdrucks wurde die Öffnung der Pipettenspitze am Ende des Pumpvorgangs vom Kanaleingang entfernt, was zum schlagartigen Auslaufen der Restflüssigkeit führte.

Nach Beendigung des Versuchs war die Reaktionskammer mit Wasser gefüllt (beispielhaft für eine beliebige Reaktionslösung). Die Befüllung stoppte automatisch in dem Moment, als das Wasser vollständig in die Kammer gepumpt wurde und sich dadurch der davor liegende Kanal mit Pentadecan füllte. In diesem Moment endete der Befüllvorgang ohne irgendeine weitere Intervention (bspw. Ansteuern eines mechanischen Ventils oder Stoppen der Pumpe).

Neben der Möglichkeit, die Flussrichtung eines Fluids zu lenken, ist es mit dem verwendeten Pentadecan also möglich, den Transport einer wässrigen Lösung zwischen verschiedenen Kavitäten eines geschlossenen Systems, beispielsweise von Wasser zum Beispiel zum Rücklösen von getrockneten Reagenzien, automatisch zu stoppen, sobald die wässrige Flüssigkeitsfront einen gewünschten gekühlten Bereich oder eine gewünschte gekühlte Stelle eines Durchflusssystems vollständig passiert hat. Das dem Wasser nachfolgende Pentadecan verändert seinen Aggregatzustand von flüssig auf fest, sobald es den gekühlten Bereich oder die gekühlte Stelle erreicht und unterbindet so den weiteren Fluss der wässrigen Phase wirkungsvoll. Diese Eigenschaft erlaubt es, Flüssigkeitsvolumina ohne aufwendige Messverfahren

exakt abzumessen und somit Kavitäten sehr genau und reproduzierbar mit einer Arbeitsflüssigkeit zu füllen.

Die beschriebene Ventiltechnik umgeht mehrere Nachteile des Standes der Technik und löst diverse Probleme der wachsbasierten Ventiltechnik. Zusammenfassend werden folgende Vorteile erzielt:

- Die Schließtemperatur (Schmelztemperatur der Kanalfüllung) des Fluid gefüllten Kanals ist unabhängig vom verwendeten wässrigen Analysepuffer, was damit ausgestattete Mikrodurchflusssysteme beherrschbarer und leichter validierbar macht.

- Die Schließtemperatur liegt erheblich höher als jene von Eisventilen (in jedem Fall über 0°C), was ein schnelleres Schließen des Kanals erlaubt.

- Die Wärmekapazität des Phasenübergangs ist mindestens 30% geringer als beim Wasser-Eis-Übergang, was ebenfalls dazu führt, dass der Phasenwechsel schneller erfolgen kann als mit Wasser.

- Das erfindungsgemäße Ventil ist beliebig oft schaltbar, da der zu schaltende Kanal immer wieder mit einer zweiten Flüssigeit befüllbar ist.

- Der technische Aufwand zum Öffnen und Schließen eines Ventils ist erheblich geringer als konventionelle Ventiltechnik mit Ventilkörpern und Stellmotoren. Er ist auch geringer als der Aufwand zur Ansteuerung von zum Beispiel zweimal schaltbaren Wachsventilen nach Stand der Technik.

- Der Herstellungsaufwand ist erheblich geringer, da im Produktionsprozess ein Einbringen von Wachs in den Ventilbereich, wie es bei herkömmlichen Wachsventilen zwingend notwendig ist, entfällt.

- Das mikrofluidische Durchflusssystem wird insbesondere vor dem Befüllen mit einer ersten Flüssigkeit mit der zweiten Flüssigkeit befüllt. Handelt es sich bei der zweiten Flüssigkeit um eine stark benetzende Flüssigkeit, sorgt dieser „Priming" Prozess für eine reproduzierbar Lufteinschluss-freie Befüllung des Durchflusssystem.

- Das Bewegen eines nicht mischbaren zweiphasigen Flüssigkeitskörpers erlaubt ein exaktes Befüllen von Kavitäten, da der Fluidfluss nach Passage des Anteils der ersten Flüssigkeit an einem kühl geschalteten Ventilpunkt zum Erliegen kommt. Dies erlaubt ohne aufwendige Messverfahren bzw. online-Fluidflusskontrollen im Durchflusssystem ein exaktes Abmessen der bewegten Flüssigkeitsmenge.

Soweit Vorteile und Verfahrensschritte am Beispiel Pentadecan und wässrige Flüssigkeit beschrieben wurden, lassen sich diese Vorteile und Verfahrensschritte auch mit anderen Flüssigkeitspaaren erzielen, die sich untereinander vergleichbar verhalten, also insbesondere nicht miteinander mischbar sind.

Die erste Flüssigkeit kann in der zweiten Flüssigkeit dispergiert werden. Wird ein Anteil der zweiten Flüssigkeit innerhalb des Durchflusssystems gesteuert transportiert, so wird der darin dispergierte Anteil der ersten Flüssigkeit ebenfalls entsprechend gesteuert transportiert. Es ist so also möglich, mit Hilfe der zweiten Flüssigkeit Anteile der ersten Flüssigkeit gesteuert zu transportieren.

Ansprüche

1. Verfahren zur Steuerung des Transports einer ersten, insbesondere wässrigen Flüssigkeit in einem Durchflusssystem (1, 2, 3), insbesondere in einem Mikrodurchflusssystem, gemäß dem die Steuerung des Transports der ersten Flüssigkeit in dem Durchflusssystem mit Hilfe einer zweiten Flüssigkeit, insbesondere Pentadecan erfolgt, wobei die erste Flüssigkeit mit der zweiten Flüssigkeit nicht mischbar ist und das Durchflusssystem mit der zweiten Flüssigkeit zumindest teilweise geflutet wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine Kammer (1) des Mikrodurchflusssystems mit der zweiten Flüssigkeit gefüllt wird und anschließend die erste Flüssigkeit über einen zuführenden Kanal (2) in die mit der zweiten Flüssigkeit gefüllte Kammer (1) gepumpt wird.

3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die erste Flüssigkeit eine wässrige Mischung zur Durchführung einer PCR ist.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem der Transport einer ersten Flüssigkeit durch Verfestigen oder Verflüssigen der zweiten Flüssigkeit gesteuert wird.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Temperatur, bei der die erste Flüssigkeit aufhört zu fließen, tiefer ist als die Temperatur, bei der die zweite Flüssigkeit aufhört zu fließen.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem ein Bereich (11) des Durchflusssystems (1, 2, 3) auf eine Temperatur gekühlt wird, bei der die zweite Flüssigkeit aufhört zu fließen, eine erste Flüssigkeit mit Hilfe der zweiten Flüssigkeit transportiert wird, und der Transport der

ersten Flüssigkeit gestoppt wird, indem die zweite Flüssigkeit in den gekühlten Bereich hinein gelangt und erstarrt.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die erste Flüssigkeit innerhalb des Durchflusssystems (1, 2, 3) transportiert wird, indem die zweite Flüssigkeit in einen Bereich des Durchflusssystems hineingepumpt wird, in dem sich die erste Flüssigkeit befindet.

8. Durchflusssystem, insbesondere Mikrodurchflusssystem (1, 2, 3) umfassend Tetradecan, Pentadecan oder Hexadecan zur Steuerung des Transports einer Flüssigkeit innerhalb des Durchflusssystems.

9. Durchflusssystem nach dem vorhergehenden Vorrichtungsanspruch mit Mitteln zum Kühlen und/ oder Erwärmen des Tetradecans, Pentadecans oder Hexadecans.

10. Durchflusssystem nach einem der vorhergehenden Vorrichtungsansprüche umfassend Heiz- und Kühlmittel zur Durchführung einer PCR und zwar insbesondere ein Peltierelement.

11. Durchflusssystem nach einem der vorhergehenden Vorrichtungsansprüche umfassend ein oder mehrere Reagenzien zur Durchführung einer Analyse oder einer PCR.

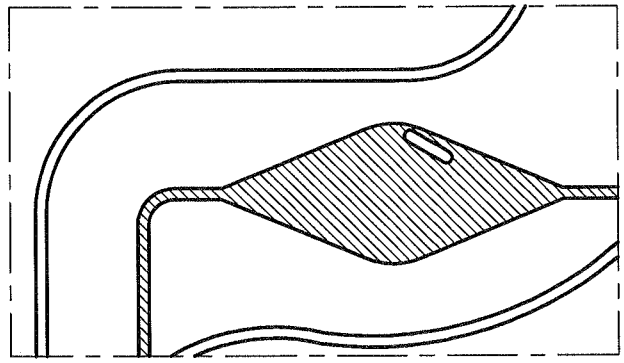


FIG.4

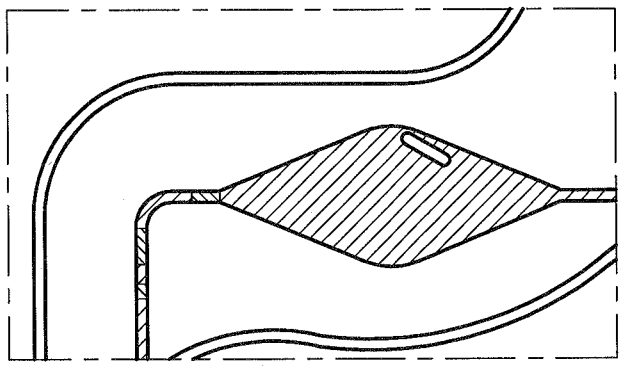


FIG.3

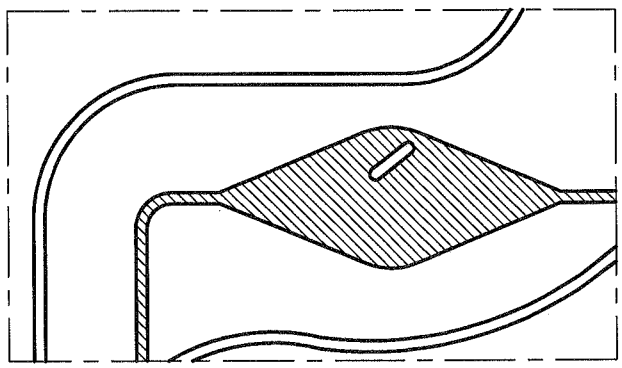


FIG.2

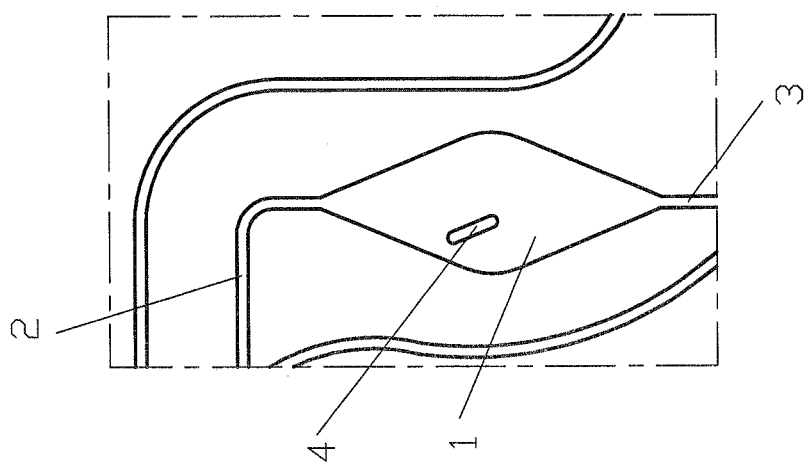


FIG.1

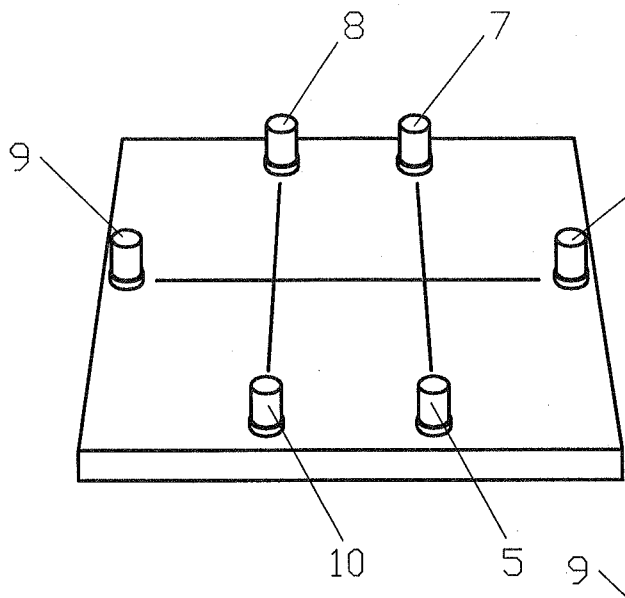


FIG.5

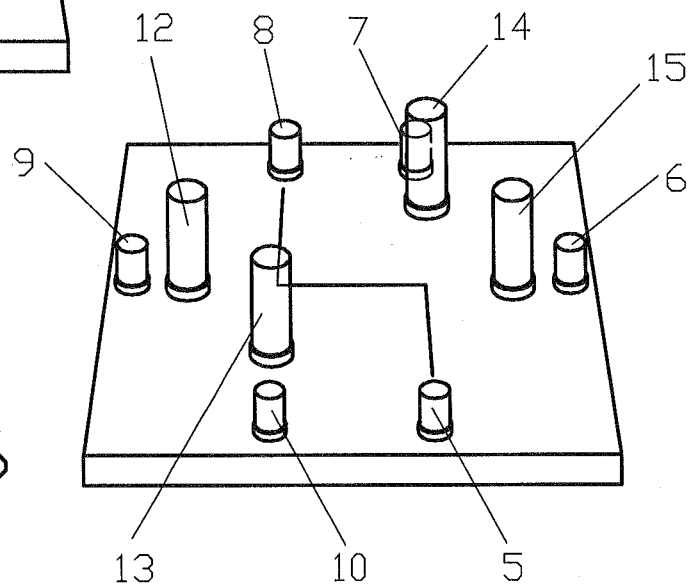


FIG.6

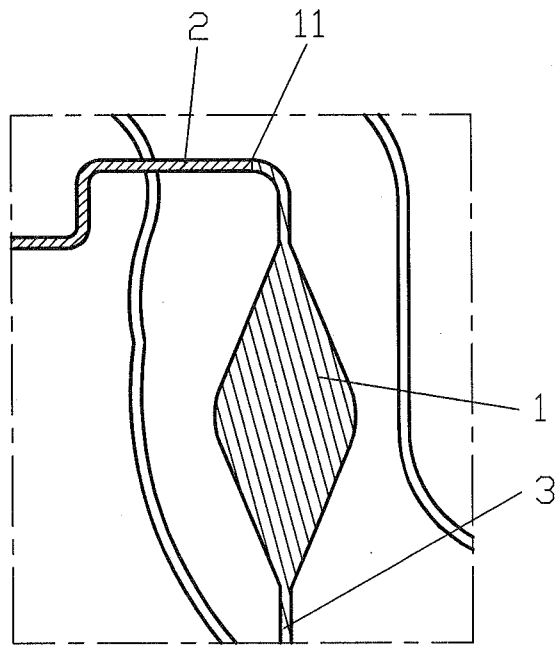


FIG.7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/055793

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. F04B19/00 F04B19/24
ADD.

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)
F04B

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010/000866 A1 (ROUX JEAN-MAXIME [FR] ET AL) 7 January 2010 (2010-01-07) abstract; figures 1-2 paragraphs [0068] - [0070]; claim 1	1-11
X	US 2010/000620 A1 (FOUILLET YVES [FR] ET AL) 7 January 2010 (2010-01-07) abstract; figures 1-4 paragraphs [0148] - [0150]; claim 1	1-11
X	FR 2 873 171 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; ECOLE POLYTECH [FR] CT NAT DE LA RECH SCI) 20 January 2006 (2006-01-20) abstract; figures page 6, line 20 - page 7, line 29	1-11

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 June 2011	22/06/2011

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/055793

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2008/023330 A1 (VIOVY JEAN-LOUIS [FR] ET AL) 31 January 2008 (2008-01-31) abstract; figures 11,18-24 paragraphs [0233] - [0234]; claim 1 -----	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2011/055793

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2010000866 A1	07-01-2010	EP 2143949 A2	13-01-2010
		FR 2933316 A1	08-01-2010
US 2010000620 A1	07-01-2010	EP 2143948 A2	13-01-2010
		FR 2933315 A1	08-01-2010
FR 2873171 A1	20-01-2006	AT 499990 T	15-03-2011
		CA 2574332 A1	23-02-2006
		EP 1835994 A1	26-09-2007
		WO 2006018490 A1	23-02-2006
		JP 2008506526 T	06-03-2008
		US 2008196778 A1	21-08-2008
US 2008023330 A1	31-01-2008	WO 2006027757 A2	16-03-2006
		JP 2008512235 T	24-04-2008

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2011/055793

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. F04B19/00 F04B19/24
ADD.

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
F04B

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

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

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2010/000866 A1 (ROUX JEAN-MAXIME [FR] ET AL) 7. Januar 2010 (2010-01-07) Zusammenfassung; Abbildungen 1-2 Absätze [0068] - [0070]; Anspruch 1	1-11
X	US 2010/000620 A1 (FOUILLET YVES [FR] ET AL) 7. Januar 2010 (2010-01-07) Zusammenfassung; Abbildungen 1-4 Absätze [0148] - [0150]; Anspruch 1	1-11
X	FR 2 873 171 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; ECOLE POLYTECH [FR] CT NAT DE LA RECH SCI) 20. Januar 2006 (2006-01-20) Zusammenfassung; Abbildungen Seite 6, Zeile 20 - Seite 7, Zeile 29	1-11

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen [X] Siehe Anhang Patentfamilie

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

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
14. Juni 2011	22/06/2011

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

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2011/055793

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2008/023330 A1 (VIOVY JEAN-LOUIS [FR] ET AL) 31. Januar 2008 (2008-01-31) Zusammenfassung; Abbildungen 11,18-24 Absätze [0233] - [0234]; Anspruch 1 -----	1-11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2011/055793

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2010000866 A1	07-01-2010	EP 2143949 A2	13-01-2010
		FR 2933316 A1	08-01-2010
US 2010000620 A1	07-01-2010	EP 2143948 A2	13-01-2010
		FR 2933315 A1	08-01-2010
FR 2873171 A1	20-01-2006	AT 499990 T	15-03-2011
		CA 2574332 A1	23-02-2006
		EP 1835994 A1	26-09-2007
		WO 2006018490 A1	23-02-2006
		JP 2008506526 T	06-03-2008
		US 2008196778 A1	21-08-2008
US 2008023330 A1	31-01-2008	WO 2006027757 A2	16-03-2006
		JP 2008512235 T	24-04-2008