

(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
2. Dezember 2004 (02.12.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/104590 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/543

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/005210

(22) Internationales Anmeldedatum:
14. Mai 2004 (14.05.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 22 701.6 20. Mai 2003 (20.05.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN [DE/DE]; Unter den Linden 6, 10099 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MORITZ, Thomas [DE/DE]; Leibnitzstrasse 58, 10629 Berlin (DE). LINSCHIED, Michael [DE/DE]; Lipaer Strasse 12 a, 12203 Berlin (DE).

(74) Anwalt: BOEHMERT & BOEHMERT; Hollerallee 32, 28290 Bremen (DE).

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

AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

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

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

(54) Title: SAMPLE CARRIER BASED ON A POROUS FILM WITH METAL OXIDE PARTICLES, THE PRODUCTION AND UTILIZATION THEREOF, ESPECIALLY FOR SELECTIVE DETECTION OF PHOSPHORYLATED/SULPHATIZED BIOPOLYMERS

(54) Bezeichnung: PROBENTRÄGER AUF BASIS EINES PORÖSEN FILMS MIT METALLOXIDPARTIKELN, SEINE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG, INSBESONDERE ZUM SELEKTIVEN NACHWEIS VON PHOSPHORYLIERTEN/SULFATIERTEN BIOPOLYMEREN

(57) Abstract: The invention relates to a porous film comprising metal oxide particles, a sample carrier using said film, a production method for the sample carrier, the utilization of said sample carrier and a method for detecting phosphorylated/sulphatized biopolymers, especially peptides/proteins.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft einen porösen Film, umfassend Metalloxidpartikel, einen Probenträger unter Verwendung des Films, ein Herstellungsverfahren für den Probenträger, die Verwendung des Probenträgers sowie ein Verfahren zum Nachweis von phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen.

WO 2004/104590 A1

Poröser Film, umfassend Metalloxidpartikel, Probenträger unter Verwendung des Films, Verfahren zur Herstellung eines Probenträgers, Verwendung des Probenträgers sowie Verfahren zum selektiven Nachweis von phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen

Die vorliegende Erfindung betrifft einen porösen Film, umfassend Metalloxidpartikel, einen Probenträger unter Verwendung des Films, ein Herstellungsverfahren für den Probenträger, die Verwendung des Probenträgers sowie ein Verfahren zum Nachweis von phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen.

Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von Biopolymeren, insbesondere Proteinen spielen eine wichtige Rolle in der Regulierung von Zellfunktionen. Sie beeinflussen u. a. das Wachstum, den Metabolismus und die Genexpression. Das Erkennen des Phosphorylierungsmusters von Metabolismus und Proteomanalyse kann dazu beitragen die komplexen regulatorischen Netzwerke und Signalübertragungssysteme in einer Zelle besser zu verstehen. Die vollständige Analyse des Phosphorylierungsmusters einer biologischen Probe ist eine große Herausforderung in der Biochemie bzw. Bioanalytik, da die phosphorylierten Biopolymere, insbesondere Proteine in sehr geringen Konzentration, neben einer Vielzahl von anderen Biomolekülen vorhanden sind. Die Massenspektrometrie ist eine der wichtigsten Analysemethoden für die Charakterisierung von Biopolymeren, insbesondere Proteinen und Peptiden. Sie ist ein Analyseverfahren, um Verbindungen zu identifizieren, ihre Reinheit zu kontrollieren, die qualitative und quantitative Zusammensetzung einer Probe sowie die Masse einer Verbindung exakt zu bestimmen. Bei allen Formen der Massenspektrometrie ist die Bildung von Ionen der zu untersuchenden Spezies erforderlich, die anschließend aufgetrennt und in einem Detektor nachgewiesen werden. Demzufolge besteht jeder Massenspektrometer aus drei Bestandteilen, nämlich einer Ionenquelle, einer Vorrichtung zur Ionentrennung sowie einer Vorrichtung zum Ionennachweis. Abhängig von der Art der Ionenerzeugung unterscheidet man Elektronenstoß-Ionisations-Massenspektrometrie (EI), chemische Ionisations-Massenspektrometrie (CI), Fast-Atom-Bombardement-Massenspektrometrie (FAB), Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI) und Matrix-assistierte Laser-Desorption/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI). Die Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation (MALDI), gekoppelt mit einem Massenspektrometer ist *die* Methode

zur Hochdurchsatz-Analyse von Biopolymer-, insbesondere Protein- und Peptid-Gemischen. Dabei kann es aufgrund der niedrigen Konzentration von phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Proteinen/Peptiden zu einer vollständigen Signalunterdrückung in einem solchen Gemisch kommen, d. h. ein Nachweis dieser Verbindungen ist oftmals nicht möglich. Dementsprechend gibt es einen Bedarf auf dem Gebiet für ein Verfahren, zum Nachweis von phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen, das für diese hochempfindlich und selektiv ist. Insbesondere existiert ein Bedarf für Vorrichtungen und Verfahren, die die Durchführung der Matrix-assistierten Laser-Desorptions-Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-Massenspektrometrie) erleichtern und für die vorgenannten Substanzen selektiv und deutlich empfindlicher machen.

Demzufolge ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung, den Nachweis von phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen, auch in komplexen Gemischen, zu erleichtern. Insbesondere ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Vorrichtung und ein Verfahren bereitzustellen, die bzw. das den Nachweis von phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen mittels MALDI-Massenspektrometrie erleichtert und empfindlicher macht.

Diese Aufgaben werden gelöst durch einen Probenträger zur Anwendung bei der MALDI-Massenspektrometrie, umfassend:

- ein Substrat,
- einen auf dem Substrat befindlichen, porösen Film, umfassend Metalloxidpartikel.

Bevorzugt sind die Metalloxidpartikel ausgewählt aus der Gruppe, die Titandioxid, Zirkoniumdioxid, Nioboxid, Aluminiumtitanoxid, Wolfram-Zirkon-Oxid, Titaniumzirkoniumoxid, Hafniumdioxid, Wolframoxid, Zinndioxid, Bleioxid, Bleidioxid, Germaniumdioxid und Galliumoxid umfaßt (TiO_2 , ZrO_2 , NbO , Al_2TiO_5 , W_2ZrO_8 , TiZrO_4 , HfO_2 , WO_3 , SnO_2 , PbO , PbO_2 , GeO_2 , und Ga_2O_3).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die Metalloxidpartikel Partikel aus Titandioxid, Zirkoniumdioxid und/oder Titanzirkoniumoxid, oder aus einer Mischung der vorgenannten Verbindungen.

In einer Ausführungsform hat der Film eine mittlere Porengröße < 50 nm, bevorzugt eine mittlere Porengröße im Bereich von 1 nm – 25 nm, am bevorzugtesten eine mittlere Porengröße im Bereich von 1 nm – 10 nm.

Es wird bevorzugt, daß der Film eine Dicke von 0,1 μm – 10 μm , besonders bevorzugt eine Dicke im Bereich von 2 – 4 μm , am bevorzugtesten eine Dicke von ungefähr 3 μm hat.

In einer Ausführungsform besteht das Substrat aus Glas oder beschichtetem Glas. In einer Ausführungsform ist das Glas leitfähiges Glas oder leitfähig beschichtetes Glas. In einer bevorzugten Ausführungsform besteht das Substrat aus mit Indium-Zinn-Oxid (ITO) beschichtetem Glas.

In einer Ausführungsform besteht das Substrat aus Aluminium, Aluminium mit einer Aluminiumoxid-Schicht, insbesondere eloxiertem Aluminium (elektrolytisch oxidiert).

In einer Ausführungsform umfaßt der auf dem Substrat befindliche, poröse Film weiterhin:

- eine MALDI-Matrix.

In einer Ausführungsform umfaßt die MALDI-Matrix eine Substanz, ausgewählt aus der Gruppe: 2,5-Dihydroxybenzoesäure, 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure, α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure, Ferulasäure, 2,4,6-Trihydroxyacetophenon.

Unter "MALDI-Matrix", wie hierin verwendet, ist jede Substanz zu verstehen, die sich als Matrix zur Durchführung der MALDI-Massenspektrometrie eignet. Beispiele hierfür sind weiter unten genannt.

Unter "Biopolymeren", wie hierin verwendet, sind insbesondere Proteine, Peptide, Nucleinsäuren, Lipide und Lipopolysaccharide zu verstehen.

In einer Ausführungsform liegt der auf dem Substrat befindliche Film nur an bestimmten, eigens dafür vorgesehenen Bereichen vor und deckt diese ab, während andere, dazwischen liegende Bereiche von dem Film frei bleiben.

Eine solche "Strukturierung" kann mit Hilfe von auf dem Gebiet bekannten Verfahren erzielt werden, bspw. Siebdruckverfahren, Spin-Coating-, Dip-Coating-, Doctor-Blading-, Drop-Casting-Techniken, jeweils mit oder ohne entsprechende Lochmaske/Lochmaskenfolie, die das aufzubringende, für den Metalloxidfilm gewünschte Muster aufweist.

In einer Ausführungsform umfaßt der Probenträger weiterhin:

Eine oder mehrere auf dem Film aufgebrachte zu analysierende Proben, von denen angenommen wird, daß sie eine oder mehrere Substanzen von Interesse enthält (enthalten), wobei bevorzugt ist, daß die eine oder mehrere Probe(n) Substanzen enthält (enthalten), die ausgewählt sind aus der Gruppe, umfassend Nukleinsäuren und Proteine.

Am bevorzugtesten sind die Proteine phosphoryliert und/oder sulfatiert.

Wie hierin verwendet, bezeichnet der Begriff "Substanz von Interesse" eine Substanz, deren Nachweis angestrebt wird.

Insbesondere bezeichnet der Begriff "Substanz von Interesse" ein phosphoryliertes und/oder sulfatiertes Biopolymer.

Es ist zu betonen, daß die genaue Art und Natur des Substrats in dem erfindungsgemäßen Probenträger nicht wesentlich ist, solange gewährleistet ist, daß das Substrat zum Tragen des erfindungsgemäßen Films geeignet ist. Folglich werden die Aufgaben der vorliegenden Erfindung, unabhängig von einem Probenträger, auch gelöst durch einen porösen Film, umfassend Metalloxidpartikel, wobei der Film in bevorzugten Ausführungsformen die bereits oben erwähnten Merkmale aufweist. In einer Ausführungsform liegt der erfindungsgemäße Film auf einem Substrat, wie oben spezifiziert, vor.

Die Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden weiterhin gelöst durch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Films bzw. Probenträgers zum Nachweis von phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen aus Peptid/Proteingemischen, wobei der Nachweis bevorzugt mittels Matrix-assistierter-Laser-Desorptions-Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI) erfolgt.

Die Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden auch gelöst durch ein Verfahren zum selektiven Nachweis von phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen aus Peptid/Proteingemischen, umfassend die folgenden Schritte:

- Bereitstellen eines Probenträgers gemäß der vorliegenden Erfindung,
- Bereitstellen einer Probe, von der angenommen wird, daß sie phosphorylierte/sulfatierte Biopolymere, insbesondere Peptide/Proteine, alleine oder in Kombination mit anderen Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen, enthält und Aufbringen der Probe auf den Probenträger,
- Durchführen von MALDI-Massenspektrometrie.

Weiterhin werden die Aufgaben der vorliegenden Erfindung gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung eines Probenträgers zur Anwendung bei der MALDI-Massenspektrometrie, wobei der Probenträger ein Substrat und einen auf dem Substrat befindlichen porösen Film, umfassend Metalloxidpartikel, umfaßt, das Verfahren umfassend die folgenden Schritte:

- Herstellung eines Sols aus Metalloxid,
- Induzieren der Gelbildung, beispielsweise durch Einengung und/oder thermische Behandlung,
- Auftragen des Gels auf ein Substrat,
- Trocknung und anschließendes Tempern bei 200 – 600°C, bevorzugt 300 – 450°C, am bevorzugtesten bei ungefähr 400°C, für einen Zeitraum von 30 Minuten – 180 Minuten, bevorzugt 30 Minuten – 60 Minuten, am bevorzugtesten für ungefähr 45 Minuten.

Bevorzugt ist das Metalloxid ausgewählt aus der Gruppe, umfassend Titandioxid, Zirkoniumdioxid, Nioboxid, Aluminiumtitanoxid, Wolfram-Zirkoniumoxid, Titaniumzirkoniumoxid, Hafniumdioxid, Wolframoxid, Zinndioxid, Bleioxid, Bleidioxid, Germaniumdioxid und Galliumoxid.

In einer Ausführungsform hat der Film eine mittlere Porengröße von < 50 nm, bevorzugt im Bereich von 1 nm – 25 nm, am bevorzugtesten im Bereich von 1 nm – 10 nm.

Die Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden ebenso gelöst durch einen Probenträger, herstellbar nach einem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung, wobei bevorzugt ist, daß der Probenträger einen porösen Film aus Metalloxidpartikeln aufweist, wobei der Film

eine mittlere Porengröße von < 50 nm, bevorzugt im Bereich von 1 – 25 nm, am bevorzugtesten im Bereich von 1 – 10 nm hat.

Die Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden außerdem gelöst durch eine Verwendung eines Probenträgers gemäß der vorliegenden Erfindung zum selektiven Nachweis von phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen, wobei bevorzugt der Nachweis über MALDI-Massenspektrometrie erfolgt.

Die Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden außerdem gelöst durch ein Verfahren zum Vorbereiten einer Probe für die MALDI-Massenspektrometrie unter Verwendung eines erfindungsgemäßen Probenträgers, wobei das Verfahren die Schritte umfaßt:

- Bereitstellen eines erfindungsgemäßen Probenträgers,
- Aufbringen einer Probe auf den Metalloxidfilm des Probenträgers, wobei von der Probe angenommen wird, daß sie phosphorylierte/sulfatierte Biopolymere, insbesondere Proteine enthält,
- einen oder mehrere Waschschrte, um den Metalloxidfilm zu waschen,
- Aufbringen eines phosphathaltigen Mediums auf den Metalloxidfilm des Probenträgers,
- Aufbringen einer MALDI-Matrix auf den Metalloxidfilm des Probenträgers.

Je nach Bedarf kann nach den einzelnen Schritten getrocknet werden. Beispiele für phosphathaltige Medien sind phosphathaltige Pufferlösungen, z.B. Natriumphosphat, Kaliumphosphat, Ammoniumphosphat bei einem geeigneten pH-Wert. Alternativ zu dem getrennten Aufbringen eines phosphathaltigen Mediums und dem Aufbringen einer MALDI-Matrix kann die MALDI-Matrix auch selbst Phosphatgruppen aufweisen. Das Waschen in dem Waschschrte/den Waschschrten kann durch Aufbringen von/Spülen mit Wasser, verdünnten Säuren, Pufferlösungen etc. erfolgen.

Unter "MALDI-Matrix", wie hierin verwendet, ist jede Substanz zu verstehen, die sich als Matrix zur Durchführung der MALDI-Massenspektrometrie eignet. Beispiele hierfür sind weiter unten genannt.

Die zur Anmeldung kommende Erfindung betrifft einen Probenträger bzw. ein Verfahren für den selektiven und empfindlichen Nachweis von phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren,

insbesondere Peptiden/Proteinen in komplexen Peptid/Protein-Gemischen mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie. Die Erfindung ermöglicht überraschenderweise eine schnelle Probenaufbereitung (ca. 30 min), kleinste Probenmengen (0,5 µl), hohe Selektivität und hohe Empfindlichkeit und ist für einen hohen Probendurchsatz geeignet. Die Erfindung beinhaltet die Herstellung von Probenträgern aus mesoporösen Metalloxidfilmen für den Nachweis von phosphorylierten und/oder sulfatierten Biomolekülen und gibt Protokolle für die Immobilisierung, Aufreinigung und Freisetzung der Biomoleküle auf dem Probenträger an. Ohne auf einen besonderen Mechanismus festgelegt sein zu wollen, gehen die Erfinder derzeit davon aus, daß die Grundlage des Verfahrens die selektive Immobilisierung der phosphorylierten/sulfatierten Biomoleküle aufgrund ihrer Affinität zu dem mesoporösen Film und der anschließenden Freisetzung und Untersuchung in einem MALDI-Massenspektrometer ist. Der Film besteht aus nanopartikulären Metalloxiden, insbesondere Titandioxid und Zirkondioxid, die mit Hilfe eines Sol-Gel-Verfahrens hergestellt werden.

Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff "Porengröße" auf den zwischen den im Verbund gelagerten Partikeln vorhandenen Interstitialraum und bezeichnet dessen durchschnittliche Dimensionierungen. Der Begriff "mesoporös", wie hierin verwendet, bedeutet, daß die durchschnittliche Porengröße im Bereich von < 50 nm, bevorzugt im Bereich von 1 – 25 nm, am bevorzugtesten im Bereich von 1 – 10 nm liegt. Die Bezeichnung "nanopartikuläre Metalloxide" bezeichnet Metalloxide, die einen partikulären Charakter haben, wobei die durchschnittliche Partikelgröße im Bereich von 1 – 30 nm liegt.

MALDI-Probenträger werden von den führenden Massenspektrometer-Herstellern (Applied Biosystems, Waters/Micromass, BrukerDaltoniks) vertrieben. Diese Probenträger dienen zum einen dem Transport der Probe in das Massenspektrometer und/oder zur Aufreinigung bzw. Aufkonzentrieren der Probe. Eine selektive Immobilisierung von phosphorylierten/sulfatierten Biomolekülen wird mittels der kommerziell erhältlichen Probenträger nicht erreicht. Die Firma CypherGen bietet Protein Arrays auf der Basis von Metalloxiden an. Die Porengröße ist hier aber > 100 nm und daher nicht mesoporös. Es wird auch keine Selektivität bezüglich phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen beschrieben.

Ebenfalls bekannt und auch kommerziell erhältlich (Sigma/Aldrich, Pierce) ist die Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC). Dabei wird das phosphorylierte Peptid selektiv mit Hilfe von Eisenkationen oder Galliumkationen gebunden und anschließend wieder freige-

setzt. Nachteilig ist hier, daß größere Probenmengen benötigt werden und die Immobilisierung "off-line", d. h. mit Hilfe einer separaten Säule/Kartusche erfolgt und anschließend die Probe auf einen MALDI-Probenträger aufgetragen wird. Dadurch kann ein Probenverlust erfolgen und die Empfindlichkeit verringert werden.

Weiterhin sind von der Gruppe um Suzuki et al. ("2D-LC for Selective Extraction of Phosphopeptides using Titania Precolumn"; Poster Abstract, 31st ASMS Conference, January 8 - 12, 2003, Montreal, Canada) Studien bekannt, in denen die Verwendung von Titandioxid als neues Packungsmaterial für die HPLC-Analyse zur selektiven Aufreinigung von phosphorylierten Verbindungen beschrieben wird. Weiterhin wird die Verwendung einer Vorreinigung mittels Titandioxid-HPLC in einer eigens dafür vorgesehenen Säule und der sich anschließenden Analyse mittels Massenspektrometrie dieser voraufgereinigten Probe vorgeschlagen. Der *direkte* Einsatz von Titandioxid-Filmen im Massenspektrometer wird nicht in Erwägung gezogen.

Es wird nunmehr Bezug genommen auf die Zeichnungen, bei denen

Fig. 1 beispielhaft und schematisch einen Probenträger aus ITO-Glas mit einem insulär aufgetragenen Metalloxidfilm zeigt, wobei der Durchmesser der einzelnen "Inseln" 1 – 3 mm beträgt;

Fig. 2 den Einsatz des Probenträgers aus Fig. 1 in einen Metallträger eines MALDI-Massenspektrometers (Voyager DE) zeigt, wobei aus dem Metallträger eine Aussparung in Größe der Umriss des Probenträgers ausgeschnitten ist.

Fig. 3 eine Photographie eines Halters für einen erfindungsgemäßen Probenträger zum Einsatz bei der MALDI-Time-of-flight-Massenspektrometrie (MALDI-TOF) zeigt,

Fig. 4 eine Photographie eines weiteren Halters für einen erfindungsgemäßen Probenträger zum Einsatz bei der MALDI-Quadrupol-Ionenfallen-Massenspektrometrie unter Atmosphärendruck (AP/MALDI-QIT) zeigt,

Fig. 5 das Massenspektrum eines tryptischen Verdaus von Beta-Casein ohne Verwendung des erfindungsgemäßen Probenträgers zeigt, und

Fig. 6 das Massenspektrum eines tryptischen Verdaus von Beta-Casein unter Verwendung eines erfindungsgemäßen Probenträgers zeigt.

Die Erfindung wird nunmehr anhand der speziellen Beispiele verdeutlicht, die zu Erläuterungszwecken, nicht zur Beschränkung der Erfindung dargeboten werden.

Beispiel 1

Herstellung einer Ausführungsform eines mesoporösen Metalloxidfilms

25 ml Titanetetraäthylisopropoxid werden mit 10 ml Isopropanol in einem Tropftrichter gemischt und langsam unter Rühren in 200 ml Wasser getropft. Anschließend werden 5 ml – 100 ml konzentrierte Salpetersäure hinzugegeben (es können jedoch auch organische Säuren, wie Essigsäure, Ameisensäure, etc. verwendet werden) und 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das entstehende Isopropanol wird abgezogen. Das entstandene Sol wird dann 18 h bei 180 Grad Celsius in einem Autoklaven behandelt. Das resultierende Sol wird dann im Rotationsverdampfer bei 40°C und 30 mbar auf 15% w/w Titanoxid eingeengt, mit 20 % Carbowax versetzt und 24 Stunden gerührt. Die viskose Lösung wird auf einem Substrat, z. B. Indium Zinn Oxid (ITO) beschichtetes Glas, ausgestrichen. Das Substrat wurde mit Hilfe einer Klebefolie, in der Löcher von z. B. 2 mm Durchmesser gestanzt wurden, strukturiert. Eine Strukturierung des Substrats kann mit jedem hierzu geeigneten Verfahren erfolgen. Solche Verfahren sind dem Fachmann bekannt. Beispielhafte Verfahren, die verwendet werden können, und die zu einem Probenträger führen, der Bereiche mit und Bereiche ohne Metalloxidfilm hat, sind: Siebdruckverfahren, Spin-Coating-, Dip-Coating-, Doctor-Blading-, Drop-Casting-Techniken, jeweils mit oder ohne entsprechende Lochmaske/Lochmaskenfolie, die das aufzubringende, für den Metalloxidfilm gewünschte Muster aufweist.

Nach Trocknung der Lösung wird die Folie abgezogen. Anschließend wird der Glaträger bei 400°C 45 Minuten getempert. Es entstehen so mesoporöse Metalloxidfilme von 2 mm Durchmesser und 2 Mikrometer Dicke. Nach Abkühlen wird das ITO Glas in Stücke von 3 x 2 cm Größe geschnitten.

Die Anreicherung der phosphorylierten/sulfatierten Proteine/Peptide bei Auftragung der Probe erfolgt über einen erfindungsgemäßen Metalloxidfilm. Anschließend an die Aufbringung

der Probe wird mit geeigneten (unterschiedlichen) Waschlösungen, die aufgebracht und nach einer geeigneten Zeit wieder abgenommen werden, gewaschen, wobei mit den Waschlösungen zweierlei Ziele verfolgt werden, ohne daß die Erfinder an einen bestimmten Mechanismus gebunden sein wollen: 1. Auswaschen der nicht-gebundenen nicht-phosphorylierten Proteine/Peptide, 2. Lockerung der Bindung der phosphorylierten Proteine/Peptide durch Zugabe eines phosphathaltigen Puffers, wobei die im Puffer befindlichen Phosphate die gebundenen phosphorylierten Proteine/Peptide zumindest teilweise aus ihrer Bindung zu dem Metalloxidfilm lösen und dadurch dem Desorptions-Ionsisations-Vorgang zugänglich machen. Es hat sich nämlich überraschenderweise gezeigt, daß das Aufbringen eines phosphathaltigen Puffers auf den Metalloxidfilm die Empfindlichkeit bei der sich anschließenden Massenspektrometrie deutlich erhöht. Anschließend wird eine MALDI-übliche Matrix (bspw. 2,5-Dihydroxybenzoesäure, 3,5-Dimethoxy-4-hydroxymzimtsäure, Ferulasäure, 2,4,6-Trihydroxyacetophenon, α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure (HCCA)) aufgebracht. Alternativ zu dem getrennten Aufbringen eines phosphathaltigen Puffers und einer MALDI-Matrix kann auch eine phosphathaltige MALDI-Matrix aufgebracht werden, die sowohl als Matrix fungiert als auch den zuvor erwähnten "Phosphat-Austausch" bewirkt. Das Einbringen des so hergestellten und probenversehene Probenträgers in das Massenspektrometer erfolgt bspw. durch einen modifizierten Metallträger für das MALDI-TOF Voyager DE-Gerät der Firma Applied Biosystems. In den Metallträger wurde eine Aussparung in Größe des ITO Glases gefräst. Das Glas wird in die Aussparung gelegt und mit Metallzungen kontaktiert (siehe Fig. 1 und 2 für eine schematische Darstellung und Figur 3 und 4 für Photographien von tatsächlich hergestellten Probeträgern). Dabei ist in Figur 1 ein ITO-beschichtetes Glas (1) dargestellt, auf dem sich in "insulärer" Anordnung ein Metalloxidfilm befindet, wobei die einzelnen Spots (Inseln) (2) des Metalloxidfilms durchschnittlich einen Durchmesser von 1–3 mm haben.

Figur 2 zeigt schematisch einen Halter (3) eines MALDI-Massenspektrometers (bspw. Voyager DE von Applied Biosystems), in den eine Aussparung (4) in Größe des ITO-beschichteten Glases aus Figur 1 gefräst worden ist. Weiterhin zeigt Figur 2 eine Metallzunge (5) zum Kontaktieren des erfindungsgemäßen Probenträgers (z.B. des ITO-beschichteten Glases aus Figur 1).

Figuren 3 und 4 zeigen einen in der Praxis hergestellten und tatsächlich verwendeten Halter für einen erfindungsgemäßen Probenträger, wobei Figur 3 einen in der Praxis für MALDI-Time-of-flight-Massenspektrometrie (MALDI-TOF) verwendeten Halter, Figur 4 einen für MALDI-Quadrupol-Ionenfallen-Massenspektrometrie bei Atmosphärendruck (AP/MALDI-

QIT) verwendeten Halter zeigt. In beiden Figuren ist der insulär aufgetragene Metalloxidfilm, in Form von Kreisen, auf dem Glas zu sehen.

Beispiel 2

Um phosphorylierte Peptide mit Hilfe von MALDI-Massenspektrometrie nachzuweisen, kann beispielsweise folgendes Verfahren verwendet werden:

Idee des Verfahrens ist, daß die zu untersuchende Probe, von der angenommen wird, daß sie phosphorylierte Peptide/sulfatierte Peptide enthält, auf einen erfindungsgemäßen MALDI-Probenträger (mit Metalloxidfilm) aufgebracht wird, der die phosphorylierten Peptide/Proteine selektiv anreichert, während andere, nicht-phosphorylierte/sulfatierte Proteine/Peptide durch geeignete Waschlösungen entfernt werden können. Resultat ist ein mit phosphorylierten/sulfatierten Proteinen/Peptiden angereicherter Probenträger, der danach direkt in der MALDI-Massenspektrometrie verwendet werden kann. Für die Waschschritte nach Aufbringung der Probe können unterschiedliche Puffer verwendet werden, je nach Art, Umfang und Herkunft der aufgetragenen Probe. Anschließend wird eine MALDI-übliche Matrix aufgebracht, hierin als "MALDI-Matrix" bezeichnet.

Beispielsweise kann folgendes Protokoll für den erfolgreichen und hochselektiven Nachweis von phosphorylierten Peptiden verwendet werden:

Protokoll für den Nachweis von phosphorylierten Peptiden

1 µl Probelösung auf einen gemäß Beispiel 1 hergestellten Film pipettieren

15 min warten

überstehende Lösung mit Pipette abnehmen

3 x mit 2 µl Wasser waschen

3 x mit 2 µl 100 mM Essigsäure waschen

1 µl 100 mM Ammoniumdihydrogenphosphat auf den Film pipettieren

15 min warten

MALDI-Matrix auf den Film pipettieren (Bspw.: 2,5-Dihydroxybenzoesäure, 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure, Ferulasäure, 2,4,6-Trihydroxyacetophenon, α.-Cyano-4-hydroxyzimtsäure).

Trocknen lassen und messen mittels MALDI-Massenspektrometer.

Alternativ kann statt der getrennten Applikation eines Phosphatpuffers und einer MALDI-Matrix eine phosphathaltige/Phosphatgruppenenthaltende MALDI-Matrix auf den Film aufgetragen werden.

Beispiel 3

Fig. 5 und Fig. 6 zeigt ein Massenspektrum eines tryptischen Verdau von Beta-Casein, erhalten ohne (Fig. 5) und mit (Fig. 4) Verwendung eines erfindungsgemäßen Probenträgers(trypt. Verdau 15 pmol/ μ l, Matrix HCCA 10 mg/ml, 1 μ l Probe). Die zu Phosphopeptiden (phosphorylierten Peptiden) gehörenden Peaks sind mit einem Sternchen gekennzeichnet. In Fig. 5 sind die entsprechenden Peaks äußerst klein und werden deutlich überlagert von anderen Peaks von nicht-phosphorylierten Peptiden. Im Gegensatz dazu zeigt Fig. 6 die drei größten Peaks als Peaks, die auf phosphorylierten Peptiden beruhen. Dies bedeutet, daß die Verwendung eines erfindungsgemäßen Probenträgers zu einem hochselektiven und empfindlichen Nachweis von phosphorylierten Peptiden führt.

Da der Probenträger Bestandteil des MALDI-Spektrometers bzw. des dazugehörigen Verfahrens ist, entfallen aufwendige Vor-Aufreinigungsschritte in separaten Vorrichtungen, und es findet gewissermaßen eine "on-line"-Immobilisierung, Reinigung, Anreicherung und Freisetzung von phosphorylierten/sulfatierten Peptiden/Proteinen statt, was die erfindungsgemäße Vorrichtung bzw. das erfindungsgemäße Verfahren für die Hochdurchsatz-Analyse mittels MALDI-Massenspektrometrie bestens geeignet macht.

Die in der vorstehenden Beschreibung, den Ansprüchen sowie den Zeichnungen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebigen Kombinationen für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein.

Ansprüche

1. Probenträger zur Anwendung bei der MALDI-Massenspektrometrie, umfassend:
 - ein Substrat,
 - einen auf dem Substrat befindlichen, porösen Film, umfassend Metalloxidpartikel.
2. Probenträger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Metalloxidpartikel ausgewählt sind aus der Gruppe, die Titandioxid, Zirkoniumdioxid, Nioboxid, Aluminiumtitanoxid, Wolfram-Zirkon-Oxid, Titaniumzirkoniumoxid, Hafniumdioxid, Wolframoxid, Zinndioxid, Bleioxid, Bleidioxid, Germaniumdioxid und Galliumoxid umfaßt (TiO_2 , ZrO_2 , NbO , Al_2TiO_5 , W_2ZrO_8 , TiZrO_4 , HfO_2 , WO_3 , SnO_2 , PbO , PbO_2 , GeO_2 und Ga_2O_3).
3. Probenträger nach einem der Ansprüche 1 - 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Film eine mittlere Porengröße < 50 nm hat.
4. Probenträger nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Film eine mittlere Porengröße im Bereich von 1 nm – 25 nm hat.
5. Probenträger nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Film eine mittlere Porengröße im Bereich von 1 nm – 10 nm hat.
6. Probenträger nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Film eine Dicke von 0,1 μm – 10 μm hat.
7. Probenträger nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Film eine Dicke im Bereich von 2 – 4 μm hat.
8. Probenträger nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Film eine Dicke von ungefähr 3 μm hat.
9. Probenträger nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat aus Glas oder beschichtetem Glas besteht.

10. Probenträger nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Glas leitfähiges Glas oder leitfähig beschichtetes Glas ist.
11. Probenträger nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat aus mit Indium-Zinn-Oxid (ITO) beschichtetem Glas besteht.
12. Probenträger nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der auf der auf dem Substrat befindliche, poröse Film weiterhin umfaßt:
 - eine MALDI-Matrix.
13. Probenträger nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die MALDI-Matrix eine Substanz umfaßt, ausgewählt aus der Gruppe: 2,5-Dihydroxybenzoesäure, 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure, α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure, Ferulasäure, 2,4,6-Trihydroxyacetophenon.
14. Probenträger nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der auf dem Substrat befindliche Film nur an bestimmten, eigens dafür vorgesehenen Bereichen vorliegt und diese abdeckt, während andere, dazwischen liegende Bereiche von dem Film frei bleiben.
15. Probenträger nach einem der Ansprüche 1 – 14, weiterhin umfassend:
 - Eine oder mehrere auf dem Film aufgebraute zu analysierende Proben, von denen angenommen wird, daß sie eine oder mehrere Substanzen von Interesse enthält (enthalten).
16. Probenträger nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die eine oder mehrere Probe(n) Substanzen enthält (enthalten), die ausgewählt sind aus der Gruppe, umfassend Nucleinsäuren und Proteine.
17. Probenträger nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine phosphoryliert und/oder sulfatiert sind.
18. Verfahren zum selektiven Nachweis von phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen aus Peptid/Proteingemischen, umfassend die folgenden Schritte:

- Bereitstellen eines Probenträgers nach einem der Ansprüche 1 – 17,
- Bereitstellen einer Probe, von der angenommen wird, daß sie phosphorylierte/sulfatierte Biopolymere, insbesondere Peptide/Proteine, alleine oder in Kombination mit anderen Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen, enthält und Aufbringen der Probe auf den Probenträger,
- Durchführen von MALDI-Massenspektrometrie, unter Verwendung des Probenträgers.

19. Verfahren zur Herstellung eines Probenträgers zur Anwendung bei der MALDI-Massenspektrometrie, wobei der Probenträger ein Substrat und einen auf dem Substrat befindlichen porösen Film, umfassend Metalloxidpartikel, umfaßt, das Verfahren umfassend die folgenden Schritte:

- Herstellung eines Sols aus Metalloxid,
- Induzieren der Gelbildung, beispielsweise durch Einengung und/oder thermische Behandlung,
- Auftragen des Gels auf ein Substrat,
- Trocknung und anschließendes Tempern bei 200 – 600°C, bevorzugt 300 – 450°C, am bevorzugtesten bei ungefähr 400°C, für einen Zeitraum von 30 Minuten – 180 Minuten, bevorzugt 30 Minuten – 60 Minuten, am bevorzugtesten für ungefähr 45 Minuten.

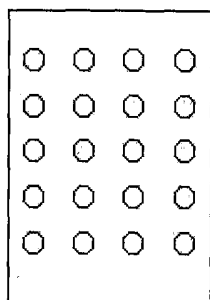
20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß das Metalloxid ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend Titandioxid, Zirkoniumdioxid, Nioboxid, Aluminiumtitanoxid, Wolfram-Zirkoniumoxid, Titaniumzirkoniumoxid, Hafniumdioxid, Wolframoxid, Zinndioxid, Bleioxid, Bleidioxid, Germaniumdioxid und Galliumoxid umfaßt (TiO_2 , ZrO_2 , NbO , Al_2TiO_5 , W_2ZrO_8 , TiZrO_4 , HfO_2 , WO_3 , SnO_2 , PbO , PbO_2 , GeO_2 und Ga_2O_3).

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 – 20, dadurch gekennzeichnet, daß der Film eine mittlere Porengröße von < 50 nm hat.

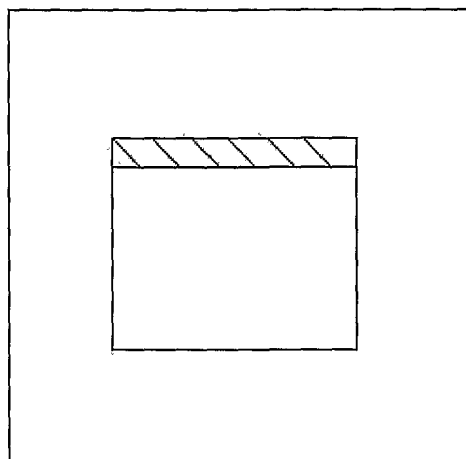
22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der Film eine mittlere Porengröße im Bereich von 1 nm – 25 nm hat.

23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß der Film eine mittlere Porengröße im Bereich von 1 nm – 10 nm hat.

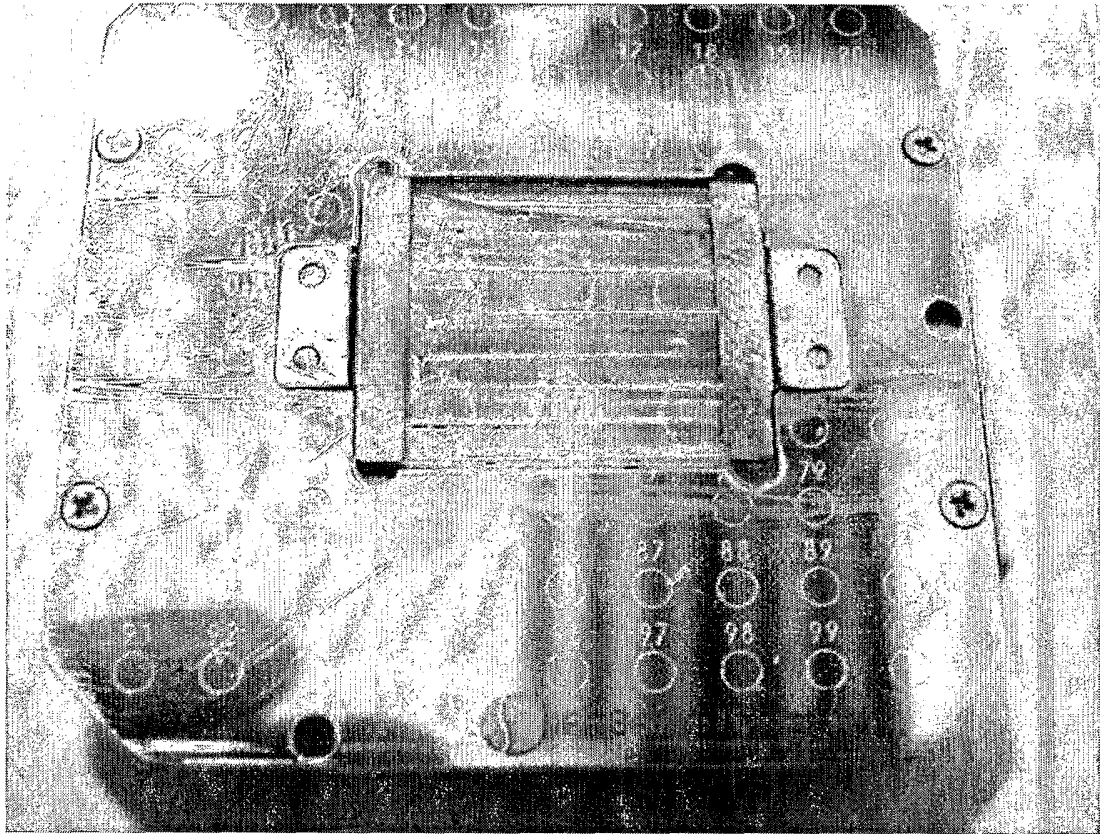
24. Probenträger, herstellbar nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 19 – 22.
25. Probenträger nach Anspruch 24, der einen porösen Film aus Metalloxidpartikeln aufweist, wobei der Film eine mittlere Porengröße von < 50 nm, bevorzugt im Bereich von 1 – 25 nm, am bevorzugtesten im Bereich von 1 nm – 10 nm hat.
26. Verwendung eines Probenträgers nach einem der Ansprüche 1 – 17 oder nach einem der Ansprüche 24 – 25 zum selektiven Nachweis von phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen.
27. Verwendung nach Anspruch 26, wobei der Nachweis über MALDI-Massenspektrometrie erfolgt.
28. Verfahren zum Vorbereiten einer Probe für die MALDI-Massenspektrometrie unter Verwendung eines Probenträgers nach einem der Ansprüche 1 – 17 oder nach einem der Ansprüche 24 – 25, wobei das Verfahren die Schritte umfaßt:
- Bereitstellen eines Probenträgers und einem der Ansprüche 1 – 17 oder nach einem der Ansprüche 24 – 25,
 - Aufbringen, auf den Metalloxidfilm des Probenträgers, einer Probe, von der angenommen wird, daß sie phosphorylierte/sulfatierte Biopolymere, insbesondere Peptide/Proteine enthält,
 - Waschen des Metalloxidfilms in einem oder mehreren Waschschritten.
 - Aufbringen, auf den Metalloxidfilm des Probenträgers, eines phosphathaltigen Mediums.
 - Aufbringen einer MALDI-Matrix auf den Metalloxidfilm des Probenträgers.
29. Verwendung des Verfahrens nach Anspruch 28 zur Durchführung der MALDI-Massenspektrometrie.



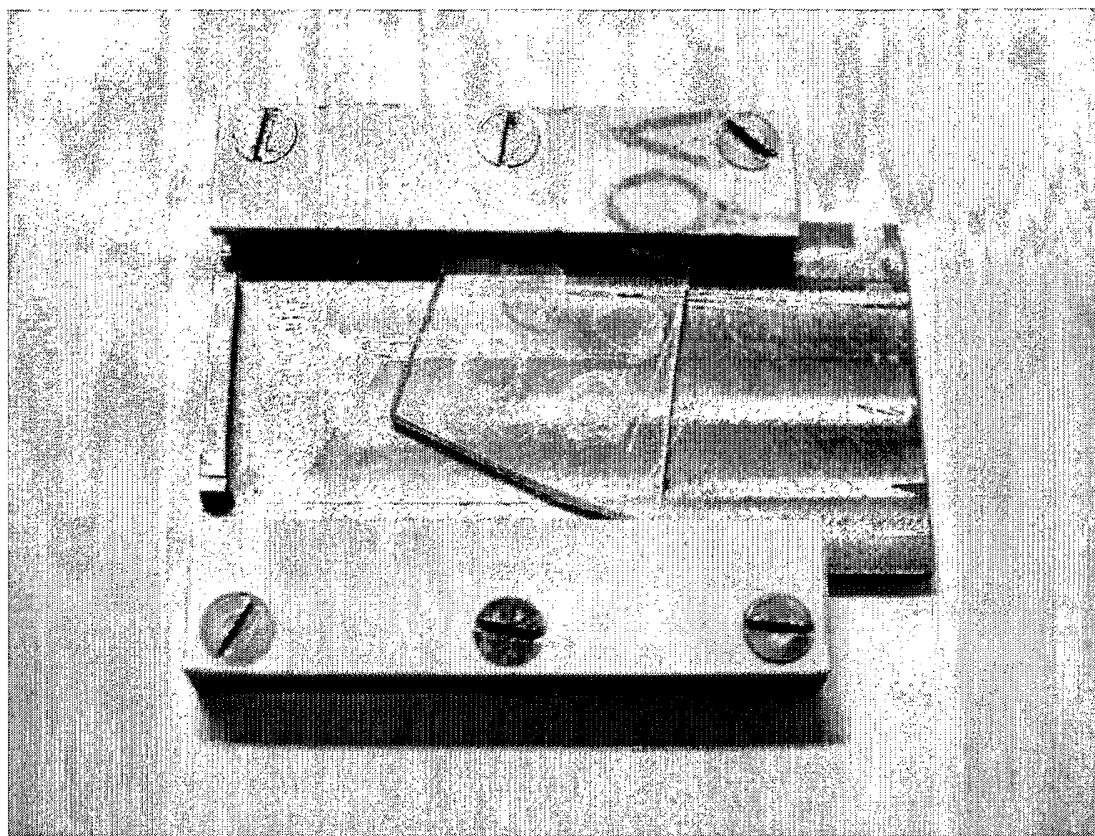
Figur 1



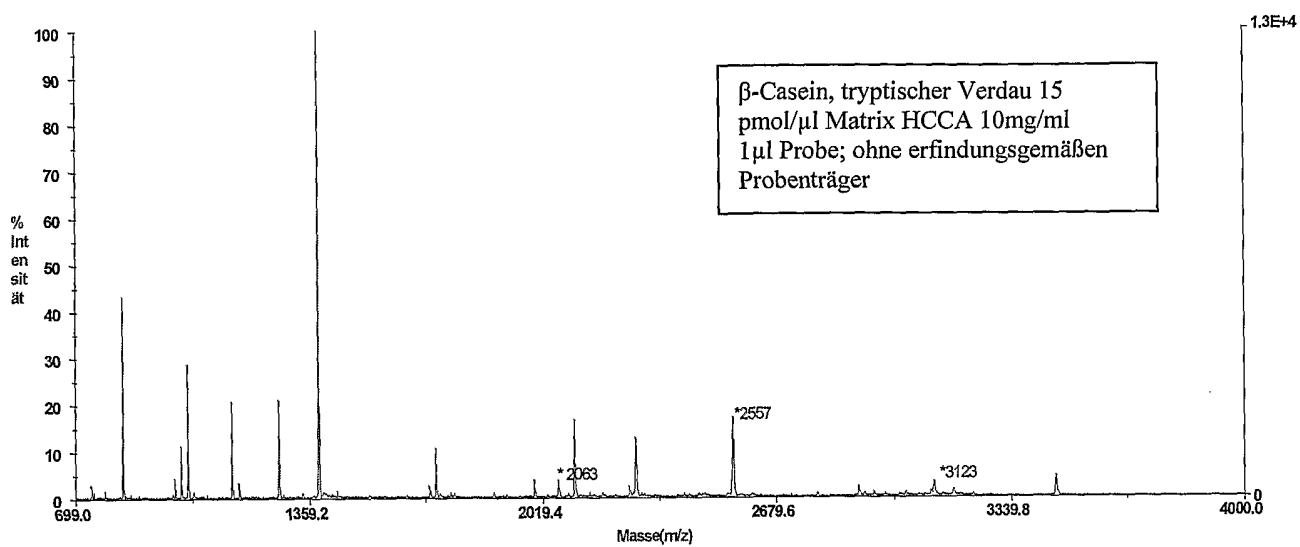
Figur 2



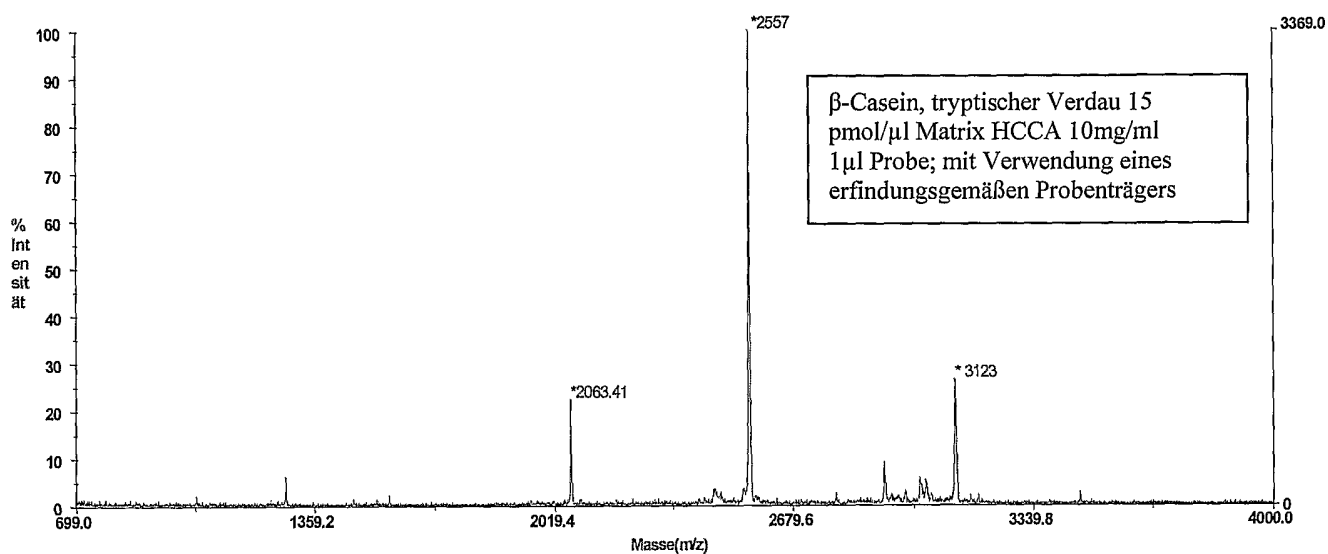
Figur 3



Figur 4



Figur 5



Figur 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/005210

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/543

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 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 practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96/29447 A (QUEEN'S UNIVERSITY) 26 September 1996 (1996-09-26) claims 1-18	1, 2
X	----- KINUMI TOMOYA ET AL: "Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using an inorganic particle matrix for small molecule analysis" JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY, vol. 35, no. 3, March 2000 (2000-03), pages 417-422, XP009037481 ISSN: 1076-5174 the whole document ----- -/--	1, 2, 12, 15

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> *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 | <ul style="list-style-type: none"> *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

13 October 2004

Date of mailing of the international search report

20/10/2004

Name and mailing address of the ISA

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

Authorized officer

Moreno de Vega, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/005210

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LINSCHIED MICHAEL W ET AL: "High resolution/high accuracy mass spectrometry of biopolymers using a new hybrid linear trap- FT ICR mass spectrometer." MOLECULAR AND CELLULAR PROTEOMICS, vol. 2, no. 7 Supplement, July 2003 (2003-07), page S18, XP009037483 & SIXTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MASS SPECTROMETRY IN THE HEALTH AND LIFE SCIENCES: MOLECULAR AND CE; SAN FRANCISCO, CA, USA; AUGUST 24-28, 2003 ISSN: 1535-9476 the whole document	1-29
X	WINKELMANN M ET AL: "Chemically patterned, metal oxide based surfaces produced by photolithographic techniques for studying protein- and cell-surface interactions I: Microfabrication and surface characterization" BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 24, no. 7, March 2003 (2003-03), pages 1133-1145, XP004401490 ISSN: 0142-9612 abstract	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/EP2004/005210

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9629447	A	26-09-1996	US	5585136 A	17-12-1996
			AT	204617 T	15-09-2001
			AU	4617496 A	08-10-1996
			CA	2213209 A1	26-09-1996
			WO	9629447 A1	26-09-1996
			DE	69614673 D1	27-09-2001
			DE	69614673 T2	27-06-2002
			DK	815285 T3	08-10-2001
			EP	0815285 A1	07-01-1998
			ES	2159716 T3	16-10-2001
			HK	1007889 A3	30-04-1999
			HK	1007889 A1	22-03-2002
			JP	11502262 T	23-02-1999
			PT	815285 T	28-12-2001
			US	RE36573 E	15-02-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/005210

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N33/543				
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK				
B. RECHERCHIERTE GEBIETE				
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 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, BIOSIS, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE				
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN				
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.		
X	WO 96/29447 A (QUEEN'S UNIVERSITY) 26. September 1996 (1996-09-26) Ansprüche 1-18	1,2		
X	----- KINUMI TOMOYA ET AL: "Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using an inorganic particle matrix for small molecule analysis" JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY, Bd. 35, Nr. 3, März 2000 (2000-03), Seiten 417-422, XP009037481 ISSN: 1076-5174 das ganze Dokument ----- -/--	1,2,12, 15		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"><input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen</td> <td style="width: 50%; border: none;"><input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie</td> </tr> </table>			<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie			
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> ° 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 </td> <td style="width: 50%; border: none;"> *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 </td> </tr> </table>			° 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
° 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		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts		
13. Oktober 2004		20/10/2004		
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde		Bevollmächtigter Bediensteter		
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Moreno de Vega, C		

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>LINSCHIED MICHAEL W ET AL: "High resolution/high accuracy mass spectrometry of biopolymers using a new hybrid linear trap- FT ICR mass spectrometer." MOLECULAR AND CELLULAR PROTEOMICS, Bd. 2, Nr. 7 Supplement, Juli 2003 (2003-07), Seite S18, XP009037483 & SIXTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MASS SPECTROMETRY IN THE HEALTH AND LIFE SCIENCES: MOLECULAR AND CE; SAN FRANCISCO, CA, USA; AUGUST 24-28, 2003 ISSN: 1535-9476 das ganze Dokument</p>	1-29
X	<p>----- WINKELMANN M ET AL: "Chemically patterned, metal oxide based surfaces produced by photolithographic techniques for studying protein- and cell-surface interactions I: Microfabrication and surface characterization" BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, Bd. 24, Nr. 7, März 2003 (2003-03), Seiten 1133-1145, XP004401490 ISSN: 0142-9612 Zusammenfassung -----</p>	1,2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/005210

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9629447	A	26-09-1996	
		US 5585136 A	17-12-1996
		AT 204617 T	15-09-2001
		AU 4617496 A	08-10-1996
		CA 2213209 A1	26-09-1996
		WO 9629447 A1	26-09-1996
		DE 69614673 D1	27-09-2001
		DE 69614673 T2	27-06-2002
		DK 815285 T3	08-10-2001
		EP 0815285 A1	07-01-1998
		ES 2159716 T3	16-10-2001
		HK 1007889 A3	30-04-1999
		HK 1007889 A1	22-03-2002
		JP 11502262 T	23-02-1999
		PT 815285 T	28-12-2001
		US RE36573 E	15-02-2000