

(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  
13. Dezember 2007 (13.12.2007)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2007/140889 A1**

- (51) Internationale Patentklassifikation:  
**B01J 19/00** (2006.01) **C40B 50/14** (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2007/004641
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
24. Mai 2007 (24.05.2007)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
10 2006 027 517.9 9. Juni 2006 (09.06.2006) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **EUROIMMUN MEDIZINISCHE LABOR-DIAGNOSTIKA AG** [DE/DE]; Seekamp 31, 23560 Lübeck (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **STELLER, Ulf**

[DE/DE]; Fuchsloch 10d, 21244 Buchholz (DE).  
**STÖCKER, Winfried** [DE/DE]; Am Sonnenberg 9,  
23627 Gross Grönau (DE).

(74) Anwälte: **HUBER, Arnulf** usw.; Uexküll & Stolberg, Be-  
selerstrasse 4, 22607 Hamburg (DE).

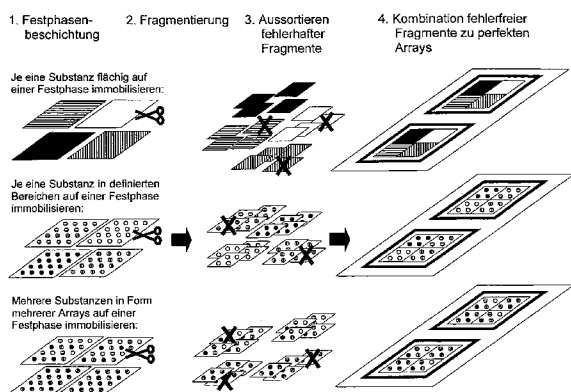
(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,  
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,  
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,  
IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,  
LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY,  
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS,  
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, 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,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PROCESS FOR OBTAINING PERFECT MACRO- AND MICROARRAYS BY COMBINING PRESELECTED  
COATED SOLID PHASE FRAGMENTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ERZEUGUNG PERFEKTER MACRO- UND MICROARRAYS DURCH KOMBINIE-  
REN VORSELEKTIERTER BESCHICHTETER FESTPHASEN-FRAGMENTE



- 1 ... SOLID PHASE COATING  
2 ... FRAGMENTATION  
3 ... REJECTION OF INCORRECT FRAGMENTS  
4 ... COMBINATION OF ERROR-FREE FRAGMENTS TO GIVE PERFECT ARRAYS

JE EINE SUBSTANZ FLÄCHIG AUF EINER FESTPHASE IMMOBILISIEREN ...  
IMMOBILIZE ONE SUBSTANCE EACH OVER THE SURFACE OF A SOLID PHASE

JE EINE SUBSTANZ IN DEFINIERTEN BEREICHEN AUF EINER FESTPHASE  
IMMOBILISIEREN ...  
IMMOBILIZE ONE SUBSTANCE EACH IN DEFINED REGIONS ON A SOLID PHASE

MEHRERE SUBSTANZEN IN FORM MEHRERER ARRAYS AUF EINER FESTPHASE  
IMMOBILISIEREN ...  
IMMOBILIZE A PLURALITY OF SUBSTANCES IN THE FORM OF A PLURALITY OF  
ARRAYS ON A SOLID PHASE

(57) Abstract: The present invention is an improved process for producing flat macro- and microarrays, frequently also known as biochips. The invention consists of a four-stage process according to fig. 1, wherein, in a first step, a plurality of flat solid phases are coated with different scavenger molecules, for example proteins or nucleic acids, these solid phases are fragmented in a 2nd step, incorrectly coated solid phase fragments are rejected in an optional 3rd step, and a plurality of solid phase fragments are combined on a support in a 4th step. The process decouples the difficult step of uniform coating of a solid phase with scavenger molecules from the combination of a plurality of solid phase molecules on a support to form an array. As a result, the process offers two significant advantages: firstly, it significantly eases the production of error-free or virtually error-free macro- and microarrays. Secondly, the process according to the invention enables the combination of a multitude of different scavenger molecules with one another on a test support, and the ability to select individually optimal solid phases and binding conditions for immobilization for each individual parameter, such that optimal test results can still be achieved for each parameter even in an array system. In contrast, in conventional production processes for microarrays, uniform binding conditions and solid phases have to be selected. Since these are frequently not equally suitable for all scavenger molecules, microarrays used to date frequently do not provide optimal test results for each parameter.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2007/140889 A1



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, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, 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

*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.*

---

**(57) Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung ist ein verbessertes Verfahren zur Herstellung flächiger Macro- und Microarrays, häufig auch Biochips genannt. Die Erfindung besteht aus einem vierstufigen Verfahren gemäß Abb. 1, wobei in einem ersten Schritt mehrere flächige Festphasen mit unterschiedlichen Fänger-Molekülen, z.B. Proteinen oder Nukleinsäuren, beschichtet werden, in einem 2. Schritt diese Festphasen fragmentiert werden, in einem optionalen 3. Schritt fehlerhaft beschichtete Festphasenfragmente aussortiert werden und in einem 4. Schritt mehrere Festphasenfragmente auf einem Träger kombiniert werden. Durch das Verfahren wird der schwierige Schritt der gleichmäßigen Beschichtung einer Festphase mit Fänger-Molekülen von der Kombination mehrerer Festphasenmoleküle auf einem Träger zur Ausprägung eines Arrays entkoppelt. Das Verfahren bietet dadurch zwei wesentliche Vorteile: Erstens erleichtert es wesentlich die Herstellung fehlerfreier oder nahezu fehlerfreier Macro- und Microarrays. Zweitens ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren, eine Vielzahl unterschiedlicher Fänger-Moleküle auf einem Testträger miteinander zu kombinieren und dabei für jeden einzelnen Parameter individuell optimale Festphasen und Bindungsbedingungen zur Immobilisierung wählen zu können, so dass auch im Arrayverbund noch für jeden Parameter optimale Testergebnisse erzielt werden können. Im Gegensatz dazu müssen bei herkömmlichen Herstellungsverfahren für Microarrays einheitliche Bindungsbedingungen und Festphasen gewählt werden. Da sich diese häufig nicht für alle Fänger-Moleküle gleich gut eignen, liefern bisher verwendete Microarrays häufig nicht für jeden Parameter optimale Testergebnisse.

**Verfahren zur Erzeugung perfekter Macro- und Microarrays durch Kombinieren vorselektierter beschichteter Festphasen-Fragmente****Beschreibung*****Stand der Technik***

Der Einsatz von Macro- und Microarrays zur Untersuchung der Menge und Identität von Nukleinsäuren, Proteinen und anderen Molekülen in einer Probenflüssigkeit ist mittlerweile weit verbreitet. Unter Arrays versteht man in diesem Zusammenhang eine Zusammenstellung unterschiedlicher festphasengebundener Fänger-Moleküle, von denen jedes mehr oder weniger spezifisch ein oder mehrere interessierende Moleküle in einer Probenflüssigkeit, die Analyten, binden kann. Die unterschiedlichen Fänger-Moleküle sind häufig in Form kleiner Flecken (Spots) von etwa ein bis 1000 µm Durchmesser auf einem flächenförmigen Träger immobilisiert und gitterförmig angeordnet, können aber auch in anderer Ausprägung, z.B. als winzige Kügelchen in Suspension vorliegen, wobei in diesem Fall jede Kugel i.d.R. nur mit einer Sorte Fänger-Molekül beschichtet ist.

Nach Inkubation des - häufig markierten - Probenmaterials mit einem Array werden durch Nachweis des festphasengebundenen Analyten diejenigen Spots bzw. Fänger-Moleküle identifiziert, an die sich eine Substanz aus der Probe gebunden hat. Durch Kenntnis der Bindungsspezifität der Fänger-Moleküle an jeder Position des Arrays können so Rückschlüsse auf die genaue Identität und/oder die Menge bestimmter Substanzen oder Substanzgruppen in der Probe gezogen werden.

Macro- und Microarrays gestatten es, eine riesige Anzahl (bis über hunderttausend) Analyten simultan, d.h. durch eine einzige Inkubation der Probenflüssigkeit mit dem Array, zu bestimmen. Bereits besonders weit verbreitete Anwendungen sind die Analyse der Genexpression, die Bestimmung von DNA-Sequenzen (z.B. die Organismen-Identifizierung, Genotypisierung, Bestimmung von Polymorphismen) sowie die Bestimmung von Menge und Identität von Proteinen und Antikörpern in einer biologischen Probe, z.B. humanen, tierischen oder pflanzlichen Ursprungs. Für diese Anwendungen kommen als Fänger-Moleküle typischerweise Nukleinsäuren, z.B. Oligonukleotide, Polynukleotide oder cDNA-Moleküle, Plasmide oder BAC-Klone, Proteine, Antigene und Antikörper oder auch Peptide als Fänger-Moleküle zum Einsatz.

Die derzeit verbreitetsten Verfahren zur Herstellung flächenförmiger Arrays sind das Drucken von Molekülen auf einen Träger und die *in-situ*-Synthese direkt auf einem Träger. Das Drucken ist ein universell für die meisten Molekülsorten anwendbares Verfahren. Hierbei

werden eine Vielzahl von Microtröpfchen, typischerweise 0,1 – 100 nl, welche jeweils eine Sorte der Fänger-Moleküle enthalten, auf den Träger mit Hilfe eines Druckverfahrens, beispielsweise mittels eines Nadeldruckers oder eines Tintenstrahldrucker-ähnlichen, kontaktfrei arbeitenden Microdispensers (z.B. Piezo-Technologie) aufgebracht (häufig auch als „Spotten“ bezeichnet). Die in den Microtropfen befindlichen Fänger-Moleküle binden sich an den Träger und prägen so die Spots aus. In der Regel werden die Tröpfchen in definierten Positionen z.B. in Form eines Gitters angeordnet, um später über die Position der Spots auf die Identität des an dieser Stelle immobilisierten Fänger-Moleküls schließen zu können.

Bei *in-situ*-Verfahren werden die unterschiedlichen Fänger-Moleküle parallel direkt auf einem Träger synthetisiert. Dieses Verfahren ist begrenzt auf solche Moleküle, die sich an Festphasen synthetisieren lassen und kommt z.B. für die Herstellung von Oligonukleotid- und Peptidarrays zum Einsatz.

Als Alternative zu den flächenförmigen Arrays kommen zur Multiparameter-Analyse auch so genannte Suspensionsarrays zum Einsatz, bei denen die Fänger-Moleküle an kleinste Partikel gebunden sind. Beispiele hierfür sind die „UltraPlex“-Technologie der Fa. SmartBead Technologies Ltd. (Cambridge, UK, [www.SmartBead.com](http://www.SmartBead.com)) sowie die *xMAP*™ Technologie der Firma Luminex Corporation (USA, [www.luminexcorp.com](http://www.luminexcorp.com)). Bei diesen Systemen ist an jedem Partikel ein Code befestigt, über den die Identität des auf dem Partikel immobilisierten Fänger-Moleküls ermittelt werden kann, da diese Zuordnung ja nicht wie bei einem geordneten flächigen Array über die Position erfolgen kann. Bei der *xMAP*™-Technologie erfolgt dies beispielsweise über das Verhältnis zweier Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen die Kunststoffkügelchen eingefärbt werden; bei der UltraPlex-Technologie über stark miniaturisierte Barcodes an den stäbchenförmig ausgeprägten Partikeln.

Vorteilhaft an Suspensionsarrays ist, dass die Beschichtung der Festphase mit dem Fänger-Molekül ähnlich der hier vorgelegten Erfindung räumlich und zeitlich getrennt von der Ausprägung des Arrays – bei Suspensionsarrays dem Zusammengeben unterschiedlich beschichteter Partikel – erfolgt. Jedoch sind mit diesem Verfahren auch zahlreiche Nachteile verbunden:

Die Auswahl der Festphasenmaterialien ist durch die Codierung stark eingeschränkt und kann nicht allein an den Eigenschaften des Fänger-Moleküls ausgerichtet werden. So ist die

xMAP™-Technologie beispielsweise allein auf die Verwendung von Polystyrolkugeln ausgelegt.

Die Codierung verkompliziert und verteuert die Produktion der Arrays. So müssen i.d.R. in einem zusätzlichen Produktionsschritt die Festphasen zunächst mit den unterschiedlichen Codes versehen werden.

Die Beschichtungsqualität kann für jeden einzelnen Partikel nur unter großem technischen Aufwand kontrolliert werden, da dazu jeder Partikel einzeln analysiert werden muss. Erschwerend kommt bei der Analyse dreidimensionaler Partikel hinzu, dass bei dieser Vermessung nicht notwendigerweise die Seite des Partikels erfasst wird, die auch später in der Analyse ausgelesen wird. So ist die Möglichkeit zur Kontrolle jedes Partikels überhaupt nur dann möglich, wenn sicher gestellt ist, dass die Beschichtung über die ganze Oberfläche der Partikel sehr gleichmäßig erfolgt. Letztendlich ist aber der Beweis, dass die Beschichtung an der später in der Analyse ausgelesenen Stelle bestimmte gesetzte Kriterien erfüllt hat, aufgrund der zufälligen Anordnung der Partikel während des Messvorganges nahezu unmöglich.

Um diese und andere Ungenauigkeiten bei der Analyse mit Suspensionsarrays zu kompensieren, werden in der Regel sehr viele Partikel für ein und dasselbe Fänger-Molekül ausgelesen, um die nötige Genauigkeit zu gewährleisten. Dadurch besteht ein erhöhter Bedarf an Partikeln, Reagenzien und Messzeit. Weiterhin müssen komplizierte Auswerteverfahren entwickelt werden, die schwer zu validieren sind und der Anwendung statistischer Methoden bedürfen, um ein akzeptables Maß an Genauigkeit und Reproduzierbarkeit zu erhalten.

Zusätzlich erfordert das Auslesen von Suspensionsarrays aufwendige und teure Auslesegeräte, da neben dem analytischen Signal auch der Code jedes Partikels ausgelesen werden muß.

Die Verwendung ein- oder zweidimensionaler Arrays auf flächenförmigen Trägern bietet daher wegen der flexibleren Auswahl des Array-Trägermaterials und der Beschichtungsbedingungen sowie der sehr einfachen Codierung, die allein über die räumliche Anordnung der Spots erfolgt, große Vorteile. Jedoch treten bei der Herstellung solcher flächenförmiger Arrays mit den bisherigen Verfahren zahlreiche Probleme auf,

welche die Herstellung fehlerfreier Arrays mit reproduzierbaren Eigenschaften je nach Array-Größe erschweren oder sogar unmöglich machen.

Das grundlegende Prinzip der Kombination mehrerer mit unterschiedlichen biologischen Materialien beschichteter Festphasen gemäß Patent EP0117262 "Verfahren und Vorrichtungen für Untersuchungen an unbeweglich gemachtem biologischen Material", das Bestandteil der hier vorgelegten Erfindung ist, beschreibt die Kombination mehrerer unterschiedlicher Gewebeschnitte und Zellen, um Untersuchungen an mehreren Substraten nebeneinander in einem Testfeld bzw. Reaktionsansatz zu ermöglichen. Die Anwendung dieses Verfahrens bietet für sich genommen jedoch noch keine Lösung für die speziellen Probleme, die bei der Herstellung hochwertiger molekularer Macro- und Microarrays auftreten.

#### **Probleme bei der Microarray-Herstellung**

- Das fehlerfreie und reproduzierbare Ausprägen gleichmäßiger Fänger-Molekül-Spots auf einem Träger ist bisher jedoch nicht zufrieden stellend gelöst, worunter insbesondere die Reproduzierbarkeit, Genauigkeit, Zuverlässigkeit und der dynamische Messbereich der Array-Analysen leiden. So treten bei dem oben erwähnten breit einsetzbaren Druckverfahren, bei dem unterschiedliche Fänger-Moleküle in Form eines Arrays auf ein gemeinsames Substrat aufgedruckt werden, folgende Probleme auf: Die Festphase kann nicht für jedes Fänger-Molekül individuell gewählt und optimiert werden, da alle Moleküle auf der gleichen Festphase immobilisiert werden. Dies ist insbesondere dann problematisch, wenn sich die physikochemischen Eigenschaften der Moleküle stark voneinander unterscheiden, wie dies z.B. bei Proteinen häufig der Fall ist. Bei der Ausprägung von Arrays mit herkömmlichen Verfahren muss daher in Kauf genommen werden, dass einzelne Fänger-Moleküle nicht in der optimalen Menge und Konformation immobilisiert sind und dadurch den Analyten schlechter oder unspezifischer binden, als dies bei der Verwendung von individuell auf das Fänger-Molekül optimierten Festphasen der Fall wäre. Eine solche vorteilhafte Auswahl bzw. Anpassung der Festphase an die individuellen Anforderungen des Fänger-Moleküls wird bei diagnostischen Testsystemen, bei denen lediglich ein Parameter pro Testfeld bzw. Reaktionsgefäß gemessen wird, bereits erfolgreich eingesetzt.
- Die Anbindungsbedingungen für die Immobilisierung auf der Festphase können nur in sehr begrenztem Umfang auf die unterschiedlichen Fänger-Moleküle angepasst werden. So können zwar unterschiedliche Puffer zum Aufbringen der Moleküle verwendet

werden, zumindest soweit diese mit der Drucktechnik kompatibel sind. Die Inkubationsbedingungen während des Anbindungsprozesses, z.B. das Trockenblasen, die Inkubation bei erhöhten Temperaturen oder in einer Feuchtkammer, sowie UV-Bestrahlung etc. können aber nicht für jedes Fänger-Molekül individuell eingestellt werden, da die Spots sich ja bereits auf einer gemeinsamen Oberfläche befinden. Weiterhin verhindert die Anwendung von Drucktechniken zur Ausprägung des Arrays die Anwendung anderer Beschichtungsmöglichkeiten, wie z.B. das Anbinden der Fänger-Moleküle aus verdünnten Lösungen, das sich z.B. bei der Beschichtung von ELISA-Platten bewährt hat, oder das Beschichten durch Ausstreichen oder Besprühen mit einer Lösung des Fänger-Moleküls.

- Einzelne Spots können fehlen z.B. aufgrund eines Pipettenausfalls (verstopft) oder Nadelausfalls (Nadelabbruch, klemmt), einer nicht erfolgten Probenaufnahme (Vorlage leer) oder einer fehlerhaften Probenabgabe (kein Kontakt der Nadel zum Träger).
- Ein Spot enthält nicht die beabsichtigte Menge an Fänger-Molekülen und bindet daher unter identischen Testbedingungen eine andere Menge des Analyten als ein Spot, der dem Standard entspricht. Ein präziser Rückschluss auf die Menge des Analyten in einer Probe, z.B. anhand einer zuvor erstellten Eichkurve, ist so nicht mehr möglich. Grund für diese fehlerhaften Spots können nicht exakt reproduzierte Volumina bei der Applikation der Fänger-Moleküle (typischerweise 0,1 – 1 nl) sein oder auch die unterschiedlich effiziente Anbindung der Fänger-Moleküle an die Träger aufgrund einer inhomogenen Oberflächenbeschaffenheit des Trägers – z.B. eine unterschiedliche Dichte der zur Anbindung der Fänger-Moleküle notwendigen funktionellen Gruppen, z.B. Amin-, Epoxyd- oder Carbonylgruppen.
- Das z.B. mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoff-Markers auf dem Array im Rahmen der Analyse erzeugte Spot-Signal hat nicht die beabsichtigte Morphologie, ist also z.B. nicht exakt rund oder weist eine ungleichmäßige Signalintensitätsverteilung auf, z.B. in Form eines vom Innern zu den Rändern laufenden Gradienten („Donut“- oder „Spiegelei“-Effekt). Diese Ungleichmäßigkeit kann z.B. durch eine ungleichmäßige Verteilung der Fänger-Moleküle im Spot verursacht werden, die z.B. durch den Eintrocknungsprozess, durch Applikationsfehler, Oberflächeninhomogenitäten oder auch durch Staubpartikel im Rahmen der Arrayherstellung verursacht werden. Als Resultat entstehen häufig ungenaue Analysenergebnisse, da i.d.R. nicht klar ist, welcher Bereich des Spots dem (homogenen) Referenzspot entspricht und daher mit der Menge des Analyten am besten korreliert.
- Die Positionierung der Spots ist zu ungenau, so dass sie z.B. nicht exakt in der beabsichtigten Anordnung, z.B. in Form eines Gitters, angeordnet sind. Dies erschwert

eine automatische Auswertung der Bindungsereignisse erheblich oder macht sie sogar unmöglich.

- Ein oder mehrere Spots enthalten die falschen Fänger-Moleküle. Ursache hierfür ist z.B. das Vertauschen der Proben in der Vorlage oder eine fehlerhafte Probenaufnahme beim Drucken. Alternativ können auch die Spots Verunreinigungen mit anderen Fänger-Molekülen enthalten, wenn z.B. die Pipetten oder Nadeln zwischen der Aufnahme unterschiedlicher Fänger-Moleküle nicht ausreichend gereinigt wurden.

In Anbetracht der sehr großen Zahl an Spots, die zur Ausprägung eines Arrays generiert werden müssen, ist es trotz der bereits weit über 10 Jahre andauernden Weiterentwicklung der Druck- bzw. Spotting-Verfahren sowie der *in-situ*-Synthese nach wie vor äußerst schwierig oder sogar unmöglich, größere Macro- und Microarrays fehlerfrei herzustellen, d.h. sie so herzustellen, dass alle Spot-Qualitätsparameter eines Arrays nur in einem engen und exakt definierten Toleranzbereich um einen festgelegten Referenzwert liegen. Beispielsweise ergibt sich unter der Annahme, dass mit dem eingesetzten Verfahren zur Ausprägung der Spots in zufälliger Verteilung bei jedem 1.000sten Spot Fehler auftreten, dass nur  $0,999^{1000} = 36,8 \%$  Arrays völlig fehlerfrei sind, wenn ein Array aus 1.000 Spots besteht. Die Ausschussrate für die Herstellung fehlerfreier Arrays beträgt damit 63,2 %. Bei 4.000 Spots beträgt unter der gleichen Annahme der Ausschuss schon 98,2 %, bei 10.000 Spots – lediglich eine etwa mittlere Dichte für Microarrays – bereits 99,9954 %. Liegt die Zuverlässigkeit der Spot-Generierung nur bei 99 %, was einen typischen Wert für viele derzeit verfügbaren Druckverfahren darstellt, so entsteht schon bei der Herstellung eines 500 Spots umfassenden fehlerfreien Arrays eine Ausschussrate von 99,34 %. Eine wirtschaftliche Herstellung fehlerfreier oder auch nur weitgehend fehlerfreier Macro- und Microarrays ist so mit den bisherigen Verfahren nicht möglich.

Durch Mehrfachbestimmungen und Replikate wird versucht, die Verlässlichkeit der Array-Analysen trotz schlechter Reproduzierbarkeit der Einzelspot-Ergebnisse zu verbessern. Insbesondere für die zunehmende Bedeutung von Macro- und Microarray-Analysen in der *In-vitro*-Diagnostik, die einen besonders hohen Anspruch einerseits an die Zuverlässigkeit der Analysen stellt, bei der aber andererseits auch ein möglichst einfaches und transparentes Auswerteverfahren anzustreben ist, um Fehlerquellen in der Analyse zu minimieren sowie Kosten und Zeitaufwand zu reduzieren, sind Verbesserungen in der Microarray-Qualität von großem Vorteil. So können die Einzelspot-Ergebnisse reproduzierbarer und die Array-Analyse dadurch verlässlicher und nachvollziehbarer gemacht und dadurch Arbeits- und materialintensive Mehrfachbestimmungen überflüssig werden.



## ***Erfindung***

Die vorliegende Erfindung besteht in einem verbesserten Verfahren zur Herstellung flächiger Macro- und Microarrays, häufig auch Biochips genannt, die für die Analyse der Bestandteile in Flüssigkeiten, insbesondere von Proteinen und Nukleinsäuren, zum Einsatz kommen. Es handelt sich um einen Prozess, der gemäß Abb. 1 aus bis zu vier Verfahrensschritten besteht: In einem 1. Schritt werden mehrere flächige Festphasen mit jeweils einem oder mehreren unterschiedlichen Fänger-Molekülen, z.B. verschiedenen Proteinen oder Nukleinsäuren, beschichtet; in einem 2. Schritt werden diese Festphasen fragmentiert; in einem optionalen 3. Schritt werden fehlerhafte Festphasenfragmente aussortiert und in einem 4. Schritt fehlerfreie Festphasenfragmente auf einem Träger zu einem oder mehreren Micro- oder Macroarrays kombiniert.

Mit der Erfindung wird der fehleranfällige Schritt der definierten und gleichmäßigen Beschichtung einer Festphase mit Fänger-Molekülen ganz oder teilweise entkoppelt von der Kombination verschiedener Fänger-Moleküle auf einem geeigneten Testträger zur Ausprägung eines Micro- oder Macroarrays. Dies bietet zwei wesentliche Vorteile:

Erstens wird trotz der derzeit nicht oder nur mit größtem Aufwand zu vermeidenden Beschichtungsfehler die Herstellung fehlerfreier oder nahezu fehlerfreier Macro- und Microarrays wesentlich erleichtert oder sogar erst möglich, da die Qualität jedes beschichteten Festphasenfragments vor der Ausprägung des Arrays auf dem Testträger überprüft werden kann und solche Fragmente, die zuvor definierten Qualitätskriterien nicht entsprechen, aussortiert werden können. So kommen nur fehlerfreie Fragmente zur Ausprägung eines „perfekten“ Arrays zum Einsatz. Bei einer großen Anzahl an Spots ist es aufgrund des fehlerbehafteten Beschichtungsprozesses ohne diese Vorselektion praktisch unmöglich, fehlerfrei Arrays herzustellen.

Zweitens ermöglicht das Verfahren, die Festphase und die Anbindungsbedingungen für die Immobilisierung jedes Moleküls individuell anzupassen und so verbesserte Arrayqualitäten gerade bei der Kombination von Fänger-Molekülen mit sehr unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften, wie z.B. Proteinen, zu erreichen.

Das Verfahren erleichtert so wesentlich die Produktion besonders hochwertiger Macro- und Microarrays und führt zu einer starken Reduktion der Menge an Materialien und Arbeitszeit, die zu deren Herstellung benötigt wird.

Das Verfahren der Kombination mehrerer unbeweglich gemachter biologischer Materialien auf einer Platte mit dem Ziel, mehrere Untersuchungen an Gewebeschnitten und Zellen nebeneinander in einem Testfeld bzw. Reaktionsansatz ablaufen zu lassen, ist in dem Patent EP0117262 "Verfahren und Vorrichtungen für Untersuchungen an unbeweglich gemachtem biologischen Material" erstmalig beschrieben. Die hier vorliegende Erfindung stellt bedeutende Erweiterungen und Verbesserungen dieses Verfahrens dar mit dem Ziel, das Prinzip der Kombination beschichteter Festphasen zur Ausprägung besonders hochwertiger Micro- und Macroarrays nutzbar zu machen. Wesentliche Weiterentwicklungen bestehen z.B. in folgenden Punkten:

- Das biologische Material besteht typischerweise nicht aus Zellen oder Gewebeschnitten, sondern i.d.R. aus einer Sorte oder Gemischen unterschiedlicher Fänger-Moleküle, z.B. aus Proteinen, Antikörpern, DNA oder Oligonukleotiden.
- Durch Kontrollieren und ggf. Aussortieren fehlerhaft beschichteter Fragmente im 3. Schritt gemäß Abb. 1, das vor der Kombination auf einem Träger erfolgt, wird die Ausprägung perfekter oder nahezu perfekter Arrays ermöglicht.
- Die Möglichkeit zur Verwendung unterschiedlicher Festphasen zur Immobilisierung unterschiedlicher Fänger-Moleküle gestattet es, auch bei Kombination aller Parameter in einem Testfeld in Form eines Arrays für jeden Parameter optimale Testergebnisse zu erzielen.
- Die Beschichtung der Festphasenfragmente erfolgt in einer Ausführungsvariante mit Hilfe moderner Methoden der Array-Herstellung, z.B. durch Drucken, Spotten oder *in-situ*-Synthese, die es ermöglichen, bereits auf jedem Fragment Arrays aus unterschiedlichen Fänger-Molekülen auszuprägen. Mit dieser Ausführungsvariante können bereits durch Kombination relativ weniger Festphasenfragmente Arrays mit einer sehr großen Anzahl unterschiedlicher Parameter erzeugt werden.
- Die Kombination von Fragmenten, die ihrerseits bereits eine Kombination von mit unterschiedlichen Fänger-Molekülen beschichteten Festphasen enthalten, verbessert die Möglichkeit zur Erzeugung sehr komplexer Arrays sowie die Anordnung mehrerer Arrays in mehreren Testfeldern auf einem zusammenhängenden Träger.
- Neben biochemischen und histochemischen Methoden kommen auch molekularbiologische Methoden im Rahmen der Testdurchführung zum Einsatz.
- Die Methode wird stark miniaturisiert und es können so auch sehr kleine Fragmente von z.B. 0,25mm<sup>2</sup> und kleiner miteinander kombiniert werden, wodurch die Anzahl der Parameter in einem Testfeld deutlich erhöht werden kann.

## **Detaillierte Beschreibung der Erfindung**

### ***Herstellung beschichteter, flächiger Festphasenfragmente***

Die Festphasen, auf denen die Fänger-Moleküle immobilisiert werden, sind z.B. flächige Festkörper aus glatten Materialien wie z.B. Glas, Quarz, Kunststoff, Silizium, Metall und Metallverbindungen, Kohlenstoff oder Kohlenstoffverbindungen oder auch porösen und/oder flexiblen Materialien wie z.B. Membranen oder Hydrogelen. Häufig sind oder werden diese Trägermaterialien modifiziert, um die Fänger-Moleküle z.B. über kovalente Bindung, nicht kovalente Bindung aufgrund hydrophober und Van der Waals Wechselwirkungen, elektrostatische Bindung oder Wasserstoff-Brücken an die Oberfläche binden zu können. Die Modifizierung des Trägers besteht z.B. in einer chemischen Aktivierung (z.B. Einführung von Amino-, Epoxy-, Aldehyd-, Isothiocyanat, Amino-, Carbodiimid-, NHS-Ester oder Metallkomplex-Gruppen). Neben dem nasschemischen Aufbringen derartiger Kopplungsgruppen können dafür beispielsweise auch Plasmaverfahren eingesetzt werden. Alternativ oder zusätzlich kann auch eine Primärbeladung der Oberfläche, z.B. mit Antikörpern, Antigenen, Polylysin, Protein A, G, L, Biotin, Avidin, Streptavidin, Nukleinsäuren, erfolgen, um darüber daran die Fänger-Moleküle zu binden. Entsprechend der beabsichtigten Anbindung werden ggf. auch die Fänger-Moleküle mit geeigneten Anbindungsfunktionen modifiziert, z.B. durch eine Amin-, Thiol-, Carbonyl- oder Carboxygruppe oder Biotin, Streptavidin, Digoxigenin oder Fluoreszein etc.

Neben homogenen Festphasen können die Festphasen bereits vor der Beschichtung vorstrukturiert werden, um die gleichmäßige Anbindung funktioneller Fänger-Moleküle in exakt definierter Anordnung zu unterstützen. Die Festphase kann z.B. in hydrophile und hydrophobe Bereiche unterteilt sein, so dass beim Eintauchen in eine Lösung die Fänger-Moleküle nur die hydrophilen Bereiche benetzen und so selektiv an diesen Stellen gebunden werden. Diese hydrophilen Bereiche können z.B. in Form von Kreisen oder Linien angeordnet sein. Die hydrophilen Bereiche können weiterhin z.B. durch die oben beschriebenen funktionellen Gruppen aktiviert sein, um eine effiziente Anbindung der Fänger-Moleküle zu unterstützen. Alternativ können z.B. membranbasierte vorstrukturierte Oberflächen zum Einsatz kommen, in denen die mit jeweils einer Substanz zu beschichtenden Membranbereiche (Spots) durch Barrieren, z.B. hydrophobe Bereiche, voneinander getrennt sind.

Die Beschichtung erfolgt z.B. durch Inkubation der Festphase mit einer verdünnten Lösung des Fänger-Moleküls oder durch Ausstreichen einer Lösung des Fänger-Moleküls auf der Festphase. Alternativ erfolgt das Aufbringen der Lösung des Fänger-Moleküls z.B. durch Drucken oder Spotten mit einer Nadel oder Micropipette. Unter Verwendung spezieller Microarray-Druckroboter können so wie bei der traditionellen Herstellung auch bereits mehrere unterschiedliche Fänger-Moleküle in Form eines Arrays auf einer Festphase kombiniert werden. Dies ist insbesondere dann vorteilhaft, wenn das endgültige Array aus einer sehr großen Anzahl verschiedener Fänger-Moleküle bestehen soll und die auf einem Fragment kombinierten Fänger-Moleküle ähnliche physikochemische Eigenschaften aufweisen, so dass sie unter identischen Anbindungsbedingungen immobilisiert werden können, wie es z.B. bei DNA-Oligonukleotiden der Fall ist. Alternativ kommt zur Ausprägung dieser "Primär-Arrays" auch die oben beschriebene *in-situ*-Synthese in Betracht.

Das Zerteilen der beschichteten Festphasen kann mechanisch z.B. mittels eines Messers oder Diamanten (z.B. für Kunststoffe oder Glas), mittels gezielter Einwirkung energiereicher Strahlung z.B. mit Hilfe eines Laserstrahls (z.B. für Kunststoffe, Membranen) oder z.B. mittels gezielter Einwirkung von Chemikalien (Ätzen) erfolgen.

Vorteilhaft werden die beschichteten Festphasen vor der Fragmentierung auf einen flächigen Träger aufgebracht und z.B. über Gravitationskraft, reversible Klebung, Unterdruck, magnetische Kräfte oder mechanische Barrieren an einer vorgegebenen Position gehalten. Vorteilhaft ist es auch, das Fragmentierverfahren und den Träger so auszuwählen, dass der Träger zusammenhängend bleibt und so die entstehenden Festkörperfragmente auch nach dem Fragmentieren noch über den Träger zusammengehalten werden und dadurch in den folgenden Schritten besser gehandhabt werden können.

Die flächige Festphase kann auch bereits vor dem Beschichten fragmentiert werden. Dies bietet z.B. den Vorteil, dass empfindliche Fänger-Moleküle nicht durch den Fragmentierungsprozess beschädigt werden, z.B. durch Hitze bei Anwendung von Laserstrahlung. Um die Festphasenfragmente anschließend noch gut beschichten zu können, ist es i.d.R. auch hier vorteilhaft, wenn die Fragmente auch nach der Fragmentierung zunächst noch auf einem Träger zusammen gehalten werden.

#### ***Selektion fehlerfrei beschichteter Fragmente vor der Kombination zu Arrays***

Das hier beschriebene Herstellungsverfahren bietet den entscheidenden Vorteil, für die Kombination auf dem Analysenträger ausschließlich diejenigen Festphasenfragmente

auszuwählen, die gemäß frei bestimmbarer Qualitätskriterien fehlerfrei sind. Diese Kriterien werden entsprechend der späteren Anwendung festgelegt und beinhalten z.B. die Toleranzen bezüglich der Menge immobilisierter Fänger-Moleküle pro beschichtetem Fragment bzw. pro Spot, der Gleichmäßigkeit der Verteilung der Fänger-Moleküle innerhalb eines Fragmentes bzw. der Spots, der Größe und Geometrie der Fragmente und Spots oder der Position der Spots innerhalb eines Fragmentes relativ zueinander. Zur Auswahl geeigneter Fragmente für die Kombination werden z.B. die Messungen einer In-Prozess-Kontrolle ausgewertet, die z.B. bei Anwendung des Druckverfahrens die Abgabe jedes Fänger-Molekül-Tropfens überwacht hat. Zusätzlich oder alternativ werden die Spots auf jedem Trägerstückchen untersucht, indem die immobilisierten Fänger-Moleküle z.B. anhand ihrer physikalischen Eigenschaften wie Lichtstreuung oder Lichtabsorption nachgewiesen werden. Zur besseren Detektierbarkeit kann es dafür vorteilhaft sein, die Fänger-Moleküle vor dem Aufbringen auf den Träger zu markieren, z.B. durch Ankopplung eines Fluoreszenzmoleküls. Alternativ erfolgt die Analyse indirekt, z.B. indem ein markierter Bindungspartner an die immobilisierten Fänger-Moleküle gebunden wird. Alternativ kann auch ein markiertes Markermolekül gemeinsam mit jedem Fänger-Molekül beschichtet werden. Die Anbindung des Markermoleküls kann dann sehr einfach z.B. über seine Fluoreszenz gemessen werden und erlaubt einen Rückschluss auf das Beschichtungsergebnis auch für das simultan aufgebrachte Fänger-Molekül. Dabei ist es günstig, wenn Marker- und Fänger-Molekül sich in ihren physikochemischen Eigenschaften ähneln oder sogar bis auf die Markierung identisch sind.

Bevorzugt werden die Messungen der Beschichtungsqualität durchgeführt, wenn die Trägerstücke noch nicht fragmentiert oder zumindest noch nicht vereinzelt sind und so vorteilhaft als zusammenhängender Festkörper gehandhabt werden können.

Weiterhin ist es i.d.R. zur Überprüfung der Array-Qualität wünschenswert, die Identität und Bindungsaktivität der Fänger-Moleküle, z.B. die von immobilisierten Antigenen, Antikörpern oder Nukleinsäuresequenzen zu überprüfen. Dazu können z.B. Stichproben der beschichteten Fragmente jeder Charge mit markierten Bindungspartnern für jedes auf dem Fragment vorhandene Fänger-Molekül inkubiert werden. Das Fehlen von Fänger-Molekülen in der Inkubations- oder Drucklösung und inaktive Fänger-Moleküle können so erkannt werden und Verunreinigungen von Fragmenten und Spots mit anderen als den gewünschten Fänger-Molekülen, wie sie z.B. durch Verschleppungen oder Kontaminationen bei der Array-Ausprägung auf einem Fragment mittels Drucktechniken auftreten können, werden aufgedeckt. Für Fragmente, die bereits mit Arrays bedruckt wurden, kann durch Inkubation

mit unterschiedlichen Bindungspartnern die Position jedes Fänger-Molekül-Spots im Array überprüft werden. In Verbindung mit den oben genannten Methoden, mit deren Hilfe jedes Fragment zerstörungsfrei überprüft werden kann, ergibt sich so eine umfassende Kontrolle der Eigenschaften jedes beschichteten Fragments.

### ***Kombination beschichteter Fragmente zur Ausprägung von Arrays***

Die Träger, auf denen die beschichteten Festkörperfragmente kombiniert werden, bestehen z.B. aus flächigen Festkörpern aus glatten Materialien wie z.B. Glas, Quarz, Kunststoff, Silizium, Metall und Metallverbindungen, Kohlenstoff oder Kohlenstoffverbindungen oder auch porösen Materialien.

Das Zusammenfügen von beschichteten Festphasenfragmenten auf einem Träger erfolgt beispielsweise über etablierte Bestückungsverfahren („*Verfahren zur Herstellung Festphasen-gebundener Bioreagenzien*“, WO2005/073693). Die Fragmente werden dazu z.B. von einem Roboter aufgenommen und an einer vorbestimmten Stelle auf den Träger, z.B. einen Objektträger, gesetzt und dort fixiert. Die Fixierung erfolgt z.B. durch Klebung, magnetische Kräfte oder Klemmung. Für die Klebung kommt z.B. doppelseitiges Klebeband in Frage. Bei transparenten Fragmenten bietet sich besonders die Verwendung eines Flüssigklebers an, der durch Bestrahlung mit UV-Licht zum Aushärten gebracht wird. So können die Fragmente nach dem Aufsetzen auf den Träger noch verschoben und in die optimale Position gebracht werden.

Durch Kombination mehrerer unterschiedlich beschichteter Festphasenfragmente wird auf einem größeren Träger ein Array ausgeprägt, das mehrere unterschiedliche Fänger-Moleküle enthält. Sind bereits auf einem Festphasenfragment mehrere verschiedene Fänger-Molekül-Spots in Form eines Arrays angeordnet (s. Abb. 1 unterste Reihe) können so auch sehr große Arrays kombiniert werden.

In einer Ausführungsvariante können die Arrays an mehreren separierten Bereichen eines zusammenhängenden Trägers ausgeprägt werden. In diesen separierten Bereichen können vorteilhaft mehrere unterschiedliche Proben parallel auf einem Träger jeweils mit einem zusammengesetzten Array inkubiert werden, wodurch der Arbeitsaufwand bei der Analyse mehrerer Proben erheblich reduziert wird.

### ***Überprüfung der korrekten Kombination der beschichteten Festphasenfragmente***

Abschließend kann anhand von Stichproben oder als Produkt-Endkontrolle die Identität, korrekte Position und genaue Lage der beschichteten Festphasenfragmente mittels

geeigneter Messmethoden überprüft werden, um Fehler im Rahmen des Bestückungsprozesses auszuschließen. Dies kann z.B. durch Sichtbarmachen der Fragmente anhand ihrer physikalischen Eigenschaften wie Lichtbrechung oder Lichtabsorption erfolgen. Die Identität und korrekte Position der Fragmente kann z.B. durch Auslesen einer auf den Trägerstückchen aufgetragenen Markierung oder durch Nachweis der Fänger-Molekül-Identität verifiziert werden.

### ***Kombinieren von bestückten Trägern zu größeren Arrays***

In einem weiteren Schritt können auch Trägerstücke, auf denen beschichtete Festphasenfragmente kombiniert wurden, wiederum als Festphasenfragmente eingesetzt werden und auf einem größeren Träger zur Ausprägung noch größerer Arrays kombiniert werden. Dieses Kombinieren bereits kombinierter Arrays lässt sich vorteilhaft immer weiter fortführen und ermöglicht es, besonders viele Spots auf einem Träger auszuprägen. So können z.B. sehr große Arrays mit sehr vielen unterschiedlichen Fänger-Molekülen ausgeprägt werden oder auch mehrere Arrays an unterschiedlichen Positionen auf einem zusammenhängenden Träger erzeugt werden, die dann mit unterschiedlichen Proben inkubiert werden können.

### **Vorteile des beschriebenen Verfahrens**

#### ***Die Array-Qualität wird verbessert, da eine erheblich größere Bandbreite an Beschichtungsmethoden zur Verfügung steht***

Da beim hier beschriebenen Verfahren der Beschichtungsprozess von der Array-Ausprägung, d.h. der räumlichen Anordnung der Fänger-Moleküle auf einer Festphase, entkoppelt ist, kann ein erheblich breiteres Methodenspektrum für die Beschichtung zum Einsatz kommen, als bei der oben beschriebenen, häufig problematischen Array-Ausprägung durch Drucken bzw. Spotten oder in-situ-Synthese gemäß dem traditionellen Verfahren. So können mit dem hier beschriebenen Verfahren Lösungen der Fänger-Moleküle z.B. auch durch Ausstreichen oder Aufsprühen auf eine Festphase aufgebracht werden. Alternativ kann die Festphase z.B. mit einer stark verdünnten Lösung des Fänger-Moleküls für beliebig lange Zeiträume inkubiert werden, ohne dass, wie bei Microtropfen, Probleme mit dem Verdunsten auftreten. Die Beschichtung aus verdünnten Lösungen ist z.B. eine Technik, die bereits seit vielen Jahren routinemäßig für die Beschichtung von Microtiterplatten mit Proteinen zur Herstellung von ELISA-Assays eingesetzt wird. Derartige Beschichtungsprotokolle lassen sich mit dem hier beschriebenen Verfahren jetzt auch für die Herstellung von Macro- und Microarrays nutzen. So können einerseits die Eigenschaften der

immobilisierten Fänger-Moleküle dramatisch verbessert werden, und andererseits kann der Beschichtungsprozess erheblich einfacher und schneller gestaltet werden.

***Die Array-Qualität wird verbessert, da das Beschichtungsverfahren optimal an die Eigenschaften jedes Fänger-Moleküls angepasst werden kann***

Mit dem hier beschriebenen Verfahren können Festphase und Beschichtungsbedingungen an jedes Fänger-Molekül individuell angepasst werden, da im Extremfall das Array komplett durch das Zusammensetzen von "Einzelspots", also von flächigen Festkörpern, die nur mit einer Sorte Fänger-Molekül beschichtet sind, ausgeprägt wird. Zum Beispiel können dadurch für jedes Fänger-Molekül das optimale Oberflächenmaterial (z.B. Glas oder Kunststoff oder Membran, ggf. vorbehandelt) und die optimalen Beschichtungszeiten, -temperaturen und -puffer eingesetzt werden. Dies ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn sich die Fänger-Moleküle in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften stark voneinander unterscheiden, wie dies z.B. für viele Proteine der Fall ist. So können Anbindung und Aktivität für jedes Fänger-Molekül getrennt optimiert und dadurch allerbeste Bindungsspezifitäten und Sensitivitäten für jedes Fänger-Molekül auf dem Array erreicht werden.

***Schnelle und flexible ("customized"- oder "on-demand"-) Fertigung von Arrays aus gelagerten Festphasenfragmenten ist problemlos möglich***

Fertig beschichtete Festphasenfragmente können allein durch Anwendung des Bestückungsprozesses zu unterschiedlichen Arrays kombiniert werden, ohne dafür erneut den aufwendigen Beschichtungsprozeß durchführen zu müssen. Bei Anlegen eines Vorrates beschichteter Festphasen können so vorteilhaft sehr schnell und mit wenig Aufwand Arrays auf unterschiedlichen Trägern und Trägerformaten ausgeprägt werden und durch die Auswahl verschiedener Fragmente die Array-Zusammensetzung jeweils sehr flexibel und individuell an neue Anforderungen angepasst werden – im Sinne eines „Customized“ Arrays. Auch kleine Chargen einer bestimmten Arraykonfiguration können auf diese Weise mit geringem Aufwand hergestellt werden. Durch Verfügbarmachen entsprechender Bestückungsmaschinen kann das Array sogar vor Ort vom Anwender selbst zusammengestellt werden, was z.B. bei der Durchführung von Routine-Laboranalysen häufig wünschenswert ist.



***Bessere Möglichkeiten zur Qualitätskontrolle erhöhen die Effizienz des Herstellungsprozesses und die Array-Qualität***

Beim herkömmlichen Verfahren kann die Qualität jedes Spots erst auf Ebene des fertig zusammengesetzten Arrays kontrolliert werden, während mit dem hier beschriebenen Verfahren die Qualität der Beschichtung bzw. jedes Spots bereits auf Ebene der Fragmente – vor der Ausprägung des gesamten Arrays – überprüft werden kann. Für die Herstellung weitgehend oder komplett fehlerfreier Arrays führt dies zu einer erheblichen Einsparung von Ressourcen, da im Falle eines Fehlers nicht die kompletten Arrays einschließlich aller guten Spots verworfen werden müssen, sondern nur die betroffenen Fragmente. Die Herstellung fehlerfreier Arrays wird durch die Möglichkeit dieser Vorselektion wesentlich erleichtert. Die besonders großen Vorteile, die sich dabei gerade für die Herstellung großer Arrays ergeben, sind weiter unten beschrieben.

Das hier beschriebene Verfahren erleichtert es aber nicht nur, die Anwesenheit und korrekte Ausprägung jedes Spots sicher zu stellen, sondern vereinfacht es weiterhin, die korrekte Identität und Aktivität der Fänger-Moleküle für jeden Spot zu verifizieren, z.B. die von immobilisierten Antigenen oder Antikörpern oder die korrekte Sequenz und Hybridisierungsaktivität, wenn Nukleinsäure-Fänger-Moleküle, z.B. Oligonukleotide, immobilisiert wurden.

Dazu können vorteilhaft wiederum vor der abschließenden Arrayausprägung die bespotteten Fragmente mit spezifischen Bindungspartnern für alle auf den Fragmenten vorhandenen Fänger-Moleküle getestet werden. Sofern auf den Fragmenten bereits mehrere Spots ausgeprägt wurden, kann durch sukzessive Inkubation die korrekte Position jedes Fänger-Molekül-Spots innerhalb des Array-Gitters verifiziert werden. Weiterhin können das Fehlen von Fänger-Molekülen oder inaktive Fänger-Moleküle in einem Spot erkannt sowie Verunreinigungen von Spots mit anderen Fänger-Molekülen, wie sie z.B. durch Verschleppungen oder Kontaminationen während der Array-Ausprägung auftreten können, aufgedeckt werden.

Ausreichend ist hier häufig eine Kontrolle von Stichproben jeder Charge. Dies gilt zumindest dann, wenn Veränderungen bezüglich der genannten Parameter während des Vorganges der Spot-Erzeugung nahezu ausgeschlossen werden können. Dies ist z.B. dann der Fall, wenn Mehrkanal-Druckköpfe, wie sie z.B. bei der TopSpot-Technologie (DEVICE AND METHOD FOR THE NON-CONTACT APPLICATION OF MICRO-DROPLETS ON A SUBSTRATE, WO0216021) zum Einsatz kommen, verwendet werden. Wenn dann z.B. für

das erste und letzte bespottete Fragment die Spot-Identitätsüberprüfung durchgeführt wird, kann daraus sicher geschlossen werden, dass die Spot-Identität auch bei den zeitlich dazwischen produzierten Arrays fehlerfrei ist, da deren Herstellung mit der selben Probenbeladung erfolgt ist. In Verbindung mit den oben genannten zerstörungsfreien Kontrollen, welche die Ausprägung jedes Fänger-Molekül-Spots auf jedem Fragment nachweist, ergibt sich so eine lückenlose Qualitätssicherung.

***Zur Herstellung fehlerfreier Arrays werden erheblich weniger Ressourcen benötigt***

Mit dem hier beschriebenen Verfahren gelingt es auch bei Anwendung der derzeit verfügbaren, fehlerbehafteten Druck- bzw. Spottechniken, mit akzeptablem Aufwand Arrays in höchster Qualität – also beliebig wählbar ganz oder auch nur fast ohne fehlerhafte Spots – herzustellen. Unter fehlerhaft wird dabei verstanden, dass ein Spot bestimmten ausgewählten Kriterien nicht entspricht (s.o.).

Der wesentliche Vorteil liegt darin, dass zur Erzeugung fehlerfreier Arrays erheblich weniger Spots ausgeprägt werden müssen, als mit dem konventionellen Verfahren und dadurch in erheblichem Umfang Material und Arbeitszeit eingespart werden kann. Dieser Vorteil wird anhand folgender Beispielrechnung verdeutlicht:

Für das hier beschriebene Verfahren gilt:

Im ersten Schritt werden Fänger-Moleküle z.B. mittels Druck- oder Spotting-Techniken auf einen flächigen Festkörper aufgespottet, der anschließend fragmentiert wird, so dass auf jedem Fragment die gewünschte Anzahl an Spots verbleibt. Der Anteil fehlerfreier Fragmente, d.h. solche, bei denen alle Spots den gesetzten Qualitätskriterien genügen, beträgt

$$\boxed{ZS^{ASPF}}$$

mit

ZS = Zuverlässigkeit des Spot-Erzeugungsprozesses (Werte zwischen 0 und 1), wobei eine Zuverlässigkeit von 1 einem komplett fehlerfreien Prozess entspricht, eine von 0,999 einer Fehlerhäufigkeit von 1 Spot pro 1000 Spots, eine von 0,99 einer Fehlerhäufigkeit von 1 Spot pro 100 Spots usw.

ASPF = Anzahl der Spots pro Fragment

In einem zweiten Schritt werden bei dem hier vorgestellten Verfahren die fehlerfreien Fragmente zu den endgültigen Arrays kombiniert. Der Anteil der aus fehlerfreien Fragmenten fehlerfrei zusammengesetzten Arrays beträgt:

$$ZB^{AF}$$

mit

ZB = Zuverlässigkeit des Fragmentier- und Bestückungsprozesses (Werte zwischen 0 und 1), wobei eine Zuverlässigkeit von 1 einem komplett fehlerfreien Prozess entspricht, eine von 0,999 einer Fehlerhäufigkeit von 1 pro 1000 Fragmentier- und Bestückungsvorgängen, eine von 0,99 einer Fehlerhäufigkeit von 1 pro 100 Vorgängen usw.

AF = Anzahl der zum Array kombinierten Fragmente

Unter Berücksichtigung beider Verfahrensschritte beträgt damit der Anteil der im ersten Schritt erzeugten Spots, die letztendlich in fehlerfreie Arrays eingehen:

$$ZB^{AF} \times ZS^{ASPF}$$

Beim herkömmlichen Prozess beträgt die Ausbeute fehlerfreier Arrays demgegenüber:

$$ZS^{AS}$$

mit

ZS = s.o.

AS = Anzahl der Spots pro Array

Das hier vorgestellte Verfahren ist damit effizienter, wenn

$$\boxed{ZB^{AF} \times ZS^{ASPF} > ZS^{AS}} \quad \text{ist.}$$

Da der Fragmentier- und Bestückungsprozess im Gegensatz zum Spotausprägungsprozess ein rein mechanischer Prozess ist, ist er i.d.R. mindestens so zuverlässig wie der Spoterzeugungsprozess. Unter der Annahme, dass ZB lediglich genau so groß wie ZS ist, ergibt sich für das hier beschriebene Verfahren:

$$ZB^{AF} \times ZS^{ASPF} = ZS^{AF + ASPF}$$

Selbst unter dieser - für das hier beschriebene Verfahren ungünstigen - Annahme ergibt sich ein deutlicher Vorteil für das hier beschriebene Verfahren, wenn

$$ZS^{AF + ASPF} > ZS^{AS} = ZS^{AF} \times ZS^{ASPF}$$

Da  $0 < ZS < 1$ , ist diese Gleichung erfüllt, wenn

$$AF + ASPF < AF \times ASPF \text{ ist.}$$

Da AF und ASPF jeweils  $\geq 2$  sind (mind. 2 Spots pro Fragment und 2 Fragmente pro Array), ist diese Bedingung immer erfüllt, wenn:

$$AF \text{ oder/und } ASPF \geq 3 \text{ sind.}$$

Damit ergibt sich bereits ab 3 Spots pro Fragment ( $ASPF = 3$ ) oder ab 3 Fragmenten pro Array ( $AF = 3$ ) mit dem hier beschriebenen Verfahren in jedem Fall eine bessere Ausbeute fehlerfreier Arrays als bei der direkten Arrayherstellung gemäß dem konventionellen Verfahren.

Je größer das Array ist (also je größer AF und ASPF bzw. AS) und je kleiner die Zuverlässigkeit des Spoterzeugungs-Prozesses ist, desto größer ist der Vorteil des hier beschriebenen Verfahrens.

Die Vorteile sind, wie in folgendem Beispiel zu sehen, bereits für die Herstellung eines relativ kleinen Microarrays beachtlich:

Beispiel:

Ziel: Herstellung eines Arrays mit 600 Spots

Annahme: AS = 600; AF = 20; ASPF = 30; ZS = ZB = 0,99

Bezogen auf die Anzahl der initial erzeugten Spots beträgt die Ausbeute fehlerfreier Arrays über den gesamten Prozess:

- mit dem herkömmlichen Verfahren =  $ZS^{AS} = 0,99^{600} = 0,24 \%$
- mit dem hier vorgestellten Verfahren =  $ZB^{AF} \times ZS^{ASPF} = 0,99^{50} = 61 \%$
- Verbesserungsfaktor =  $ZS^{AF + ASPF - AF \times ASPF} = 251,6$

Mit dem herkömmlichen Verfahren müssen also zur Herstellung eines perfekten Arrays mit 600 Spots 250-mal mehr Spots erzeugt werden als mit dem hier beschriebenen Verfahren. Der Material- und Zeitaufwand für die Arrayproduktion wird demzufolge mit dem hier beschriebenen Verfahren erheblich reduziert.

Wie anhand dieser Beispielrechnung leicht abzuleiten ist, ergeben sich auch für andere Randbedingungen und selbst für die Herstellung kleinerer Arrays klare Vorteile für das hier beschriebene Verfahren.

***Die Herstellung fehlerfreier großer Arrays gelingt auch mit nicht perfekten Verfahren zur Spot-Ausprägung***

Für große Arrays (großes AS) sinkt die Anzahl fehlerfreier Arrays beim konventionellen Herstellungsverfahren gemäß  $ZS^{AS}$  gegen null (da  $0 < ZS < 1$ ), d.h. eine Herstellung ist nicht mehr oder nur noch unter Einsatz immens großer Ressourcen möglich.

Bei dem hier vorgestellten Verfahren besteht demgegenüber die Möglichkeit, bereits auf Ebene der bespotteten Fragmente die Spotqualität zu untersuchen und nur solche Fragmente zum Gesamt-Array zu kombinieren, die den gewünschten Anforderungen entsprechen. Diese Vorselektion ermöglicht es, trotz fehlerhafter Verfahren der Spot-Ausprägung fehlerfreie große Arrays herzustellen.

Dies wird anhand folgender Beispielrechnung deutlich.

Bei Durchführung einer Vorselektion fehlerfreier Fragmente beträgt der Anteil fehlerfreier Arrays nach Kombination  $ZB^{AF}$

Da

1. AS bei größeren Arrays erheblich größer als AF ist

und unter der realistischen Annahme, dass der rein mechanische Bestückungsprozess zuverlässiger als das zur Spotterzeugung verwendete Verfahren ist, also

2. ZB größer oder mindestens gleich ZS ist,

ist auch  $ZB^{AF} >> ZS^{AS}$

Mit dem hier beschriebenen Verfahren steigt daher die Ausbeute fehlerfreier Arrays bei Verwendung fehlerbehafteter Methoden der Spot-Ausprägung erheblich an, wie anhand des folgenden Beispiels noch einmal verdeutlicht wird:

Beispiel: Herstellung von Arrays mit 1000 Spots.

Annahme: AS = 1000; AF = 25; ASPF = 40; ZS = ZB = 0,99

Der Anteil fehlerfreier Arrays beträgt gemäß  $ZS^{AS} = 0,99^{1000} = 0,0043 \%$  für das herkömmliche Verfahren – eine Herstellung ist praktisch unmöglich.

Mit dem hier beschriebenen Verfahren erhöht sich der Anteil fehlerfreier Arrays auf  $ZB^{AF} = 0,99^{25} = 77,8 \%$ , unter der Voraussetzung, dass fehlerhafte Fragmente vor der Kombination zum Array heraussortiert werden. Unter den gegebenen Randbedingungen wird so die Herstellung fehlerfreier 1000er-Arrays ermöglicht.

***Spezielle Verfahren, die bisher nur für kleine Arrays geeignet waren, können jetzt auch zur Herstellung hochkomplexer Arrays genutzt werden***

Bestimmte Verfahren der Spot-Erzeugung eignen sich bevorzugt für die Ausprägung relativ kleiner Arrays, z.B. das DDI-Verfahren (DNA directed immobilization, Wacker R und Niemeyer CM. *Chembiochem.* 2004 Apr 2;5(4):453-9). Hier wird zunächst ein Array aus DNA-Oligonukleotiden ausgeprägt. Dieses Array wird dann zur positionsspezifischen Immobilisierung von Protein-Fänger-Molekülen genutzt, indem die Proteine mit unterschiedlichen DNA-Sequenzen konjugiert werden, die jeweils zu einem Oligonukleotid auf dem Array komplementär sind. Durch Hybridisierung der DNA-Proteinkonjugate mit dem Oligoarray wird jedes Protein dann an einer definierten Stelle des Arrays gebunden und kann wiederum als Fänger-Molekül bei der Analyse einer Probenflüssigkeit dienen. Das hier beschriebene Verfahren ermöglicht es, mit dem DDI-Verfahren durch Kombination mehrerer so ausgeprägter Arrays zu einem Gesamtarray auch komplexe Arrays herzustellen.

***Die Produktionseffizienz steigt, da die Handhabung der Fänger-Molekülbanken vereinfacht wird und Fehler durch Vertauschungen und Kontaminationen unwahrscheinlicher werden***

Mit dem hier beschriebenen Verfahren wird bei der schwierigen initialen Festphasenbeschichtung pro Arbeitsgang jeweils nur ein kleiner Teil der Fänger-Moleküle, die das spätere Gesamt-Array ausmachen, an eine Festphase gekoppelt. Es müssen also nicht alle Fänger-Moleküle gleichzeitig vorgelegt, ggf. aliquotiert, verdünnt usw. werden, wodurch das Risiko, dass Fehler bei der Handhabung der Fänger-Moleküllösungen auftreten, abnimmt und dadurch die Produktionseffizienz steigt:

***Bessere Arrayqualitäten werden durch verkürzten Besspottungsprozess ermöglicht***

Die Ausprägung der Arrays auf den Festphasenfragmenten mit Hilfe von Druck- bzw. Spottechnologien kann in kürzerer Zeit als bei dem herkömmlichen Verfahren erfolgen, da pro Fragment jeweils nur ein kleiner Teil der später auf dem Gesamt-Array vorhandenen Fänger-Moleküle aufgebracht werden muss.

Dadurch ergeben sich folgende Vorteile:

- Die Verdunstung der Fänger-Moleküllösungen in der Vorlage wird reduziert, die Konzentration bleibt dadurch über den gesamten Besspottungsprozess besser konstant und damit reproduzierbar; Verdunstungs-Vermeidungstechniken wie eine feuchte Kammer oder Kühlung werden u.U. überflüssig.

- Die spontane Deaktivierung der Träger-Oberflächen, z.B. durch Reaktion mit Luftsauerstoff oder Luftfeuchtigkeit, ist in der kürzeren Zeit weniger stark ausgeprägt. Für alle Fänger-Moleküle werden damit besser äquivalente Anbindungsbedingungen und dadurch besser reproduzierbare Anbindungsergebnisse ermöglicht.

## Beispiele

### ***Beispiel 1: Ausprägung und Verwendung kombinierter DNA-Microarrays auf Objektträgern der Firma EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG (Lübeck)***

Vier Glasträger in den Abmessungen 26 mm x 76 mm und von 140 µm Dicke werden mit 1 % 3-Glycidyl-propoxy-trimethoxysilan (GPTS) in Hexan silanisiert. Auf die so mit Epoxy-Gruppen aktivierte Oberfläche werden mit einem kontaktfreien Piezo-Spotter (NanoPlotter NP1.2, GeSiM mbH, Großerkmannsdorf) verschiedene Lösungen 10 – 50 µM konzentrierter 5'-Amino-modifizierter DNA-Oligonukleotide in Form mehrerer 4 x 4-Spots großer Arrays aufgetropft. Die Tropfengröße beträgt ca. 300 pl. Der Spot zu Spot-Abstand innerhalb der Arrays beträgt 400 µm. Die Arrays sind ihrerseits in 25 Zeilen und 10 Spalten angeordnet; der Abstand der Mittelpunkte beträgt in horizontaler und vertikaler Richtung jeweils 2 mm. Die Anbindung der Oligonukleotide an die Glasoberfläche erfolgt durch Inkubation der Gläser über Nacht in einer Feuchtkammer. Die Tropfen lässt man auf den Gläsern eintrocknen und es wird ein Bild der Substanzreste auf dem Glas aufgenommen, welches es ermöglicht, die Anwesenheit und Position jedes Spots und jedes Arrays auf dem Glasträger zu überprüfen (siehe WO2005073693 „Verfahren zur Herstellung Festphasen-gebundener Bioreagenzien“). Anschließend werden die nicht gebundenen Oligonukleotide abgewaschen. Die Gläser werden mit dem in WO2005/073693 beschriebenen Prozess fragmentiert und anschließend auf einem zusammenhängenden Träger bestückt. Zunächst werden dazu die bespotteten Gläser mit der Unterseite auf einer Trägerfolie (Ultron Systems Inc., Californien, USA) angeheftet und erneut gescannt. Das Bild wird mit dem ursprünglichen Bild, welches die Lage der Spots zeigt, anhand der Ränder des Glases oder anderer Referenzmarkierungen präzise zur Überlappung gebracht; dabei hilft die halbtransparente Darstellung des oberen Bildes. Mit der Software wird dann ein 2 mm großes x-y-Raster über die beiden Bilder gelegt, so dass jedes Array in der Mitte eines 2 mm x 2 mm großen Kästchens zum Liegen kommt. Diejenigen Kästchen, für die anhand der ersten Aufnahme zu erkennen ist, dass sie fehlerhafte Arrays bzw. Spots enthalten, werden mit Hilfe der Software gekennzeichnet und später nicht zur Bestückung verwendet. Entlang der Rasterlinien wird dann präzise mit einem Diamant-Schneidwerkzeug geschnitten, wodurch 250 2 x 2 mm große Glasfragmente entstehen. Die Fragmente, die fehlerfreie Arrays enthalten, werden mit Hilfe eines



vakuumunterstützten Saugnapfes von ca. 1 mm Durchmesser angehoben und mittels einer Transfereinheit präzise auf den 5 Testfeldern eines 5er-EUROIMMUN-Objekträgers positioniert. In jedem der ca. 7 x 9 mm großen Testfelder werden 4 unterschiedliche Arrays kombiniert, so dass sich in einem Testfeld insgesamt  $4 \times 16 = 64$  Spots befinden und insgesamt 20 Glasfragmente auf einem Objekträger fixiert werden.

Die Arrays werden anschließend zur Untersuchung der genauen Sequenzen oder/und Mengen von Nukleinsäuren in einer Probe eingesetzt. Dafür wird genomische DNA im Falle der Analyse von Polymorphismen oder RNA für Expressionsanalysen aus der Probe isoliert. Anschließend werden bei genomischer DNA die interessierenden Abschnitte vervielfältigt und mit Fluoreszenzmolekülen markiert, indem in einer PCR-Reaktion fluoreszenzmarkierte Primer eingesetzt werden oder fluoreszenzmarkierte Nukleosidtriphosphate eingebaut werden. Alternativ wird die mRNA einer Probe unter Verwendung des LabelStar-Kits (Qiagen, Hilden) in cDNA umgeschrieben und diese dabei durch den Einsatz fluoreszenzgekoppelter Nukleosidtriphosphate markiert. Die so markierten Nukleinsäuren werden durch Erhitzen auf 95°C denaturiert und in einem Hybridisierungspuffer unter Anwendung der EUROIMMUN-Titerplane®-Technologie (EUROIMMUN AG, Lübeck) bei 45°C in jeweils einem Testfeld der EUROIMMUN-Objekträger mit den Oligonukleotid-Arrays über Nacht inkubiert. Nicht spezifisch an das Array gebundene Nukleinsäuren werden anschließend durch Waschen mit unstringentem Puffer (1X SSC, 0,1 % SDS) und stringentem Waschpuffer (0,1X SSC, 0,1 % SDS) entfernt. Die Objekträger werden durch einen Luft- oder Stickstrom oder durch Zentrifugation getrocknet. Zur Bestimmung der Bindung der Probenmoleküle an die Spots wird der Objekträger mit einem BioAnalyzer 4F (LaVision BioTec GmbH, Bielefeld) ausgelesen. Die Anwesenheit eines Fluoreszenzsignals an der Position eines Spots weist dabei nach, dass eine zu dem an dieser Stelle immobilisierten Oligonukleotid exakt oder weitgehend komplementäre markierte Nukleinsäuresequenz in der Probe vorhanden ist. Die Intensität der Fluoreszenz ist ein Maß für die Menge der Nukleinsäuresequenz in der Probenflüssigkeit.

***Beispiel 2: Ausprägung und Verwendung kombinierter, qualitätskontrollierter DNA-Microarrays auf Objekträgern der Fa. EUROIMMUN Labordiagnostika AG***

Die Herstellung und Verwendung erfolgt wie im Beispiel 1 angegeben. Jedoch sind zur verbesserten Qualitätskontrolle der Spots alle Fänger-Moleküle an ihrem 3'-Ende mit einem Fluoreszenzmolekül markiert oder jeder zu spottenden Oligonukleotidlösung wird eine geringe Menge eines anderen fluoreszenzmarkierten Oligonukleotids zugesetzt. Anstelle des Scannens der Salzreste werden die Gläser jetzt erst nach dem Abwaschen der nicht

gebundenen Oligonukleotide mit Hilfe des BioAnalyzers ausgelesen und dabei die Fluoreszenzsignale der fest gebundenen Fänger-Oligos bzw. des hinzugemischten Oligonukleotids ermittelt. Anhand dieser Fluoreszenz wird vor dem Fragmentieren der Gläser geprüft, ob jeder Spot entsprechend den Anforderungen vorhanden, homogen ausgeprägt und korrekt positioniert ist. Vor der Bestückung wird diese Aufnahme wie oben beschrieben herangezogen, um die Position der Arrays auf dem Glas zu ermitteln sowie Fragmente mit fehlerhaften Arrays zu markieren und von der weiteren Verwendung auszunehmen. Die Verwendung zur Untersuchung von Probenflüssigkeiten erfolgt wie oben angegeben, wobei zur Markierung der Probenmoleküle eine andere Fluoreszenz-Wellenlänge zum Einsatz kommt als zur Markierung der Fänger-Oligonukleotide bzw. des den Fänger-Oligonukleotiden hinzugemischten Oligonukleotids. Die Fluoreszenzsignale des Fänger-Oligonukleotids bzw. des den Fänger-Molekülen hinzugemischten fluoreszenzmarkierten Oligonukleotids werden nach der Hybridisierung parallel zum Auslesen der Probensignale erneut aufgenommen und dienen als Referenzsignale.

***Beispiel 3: Ausprägung der Arrays auf den Fragmenten mittels TopSpot-Technologie***

Das Verfahren und die Analyse entspricht dem in Beispiel 1 oder 2, jedoch werden 24 Oligonukleotid-Lösungen gleichzeitig mittels der TopSpot-Technologie unter Verwendung eines 24er Druckkopfes in Form eines 6 x 4-Primär-Arrays aufgebracht. Der Spot-zu-Spot-Abstand beträgt hier 500 µm. Es wird ansonsten exakt wie in Beispiel 1 oder 2 verfahren, jedoch haben die Glasfragmente eine Größe von 3,5 mm x 2,5 mm, um jeweils ein komplettes Array aufnehmen zu können. Wegen der größeren Abmessungen werden auf dem oben erwähnte Trägerglas lediglich 7 x 25 = 175 anstatt 250 Primär-Arrays ausgeprägt.

***Beispiel 4: Ausprägung und Verwendung von Antigen-Microarrays für die Autoimmundiagnostik***

Auf ein mit Aldehydgruppen funktionalisiertes Glas in den Abmessung 26 mm x 76 mm und von 140 µm Dicke oder dünne Kunststofffolien, z.B. aus PMMA, werden mit einem kontaktfreien Piezo-Spotter (NanoPlotter NP1.2, GeSiM mbH, D - Großerkmannsdorf) 16 verschiedene Autoantigenlösungen (0,2 – 0,5mg/ml) in Form mehrerer Arrays mit aus je 4x4-Spots aufgetropft. Die Array-Ausprägung entspricht dem Beispiel 1, die Inkubation in einer Feuchtkammer entfällt aber. Nach der Überprüfung der Anwesenheit aller Spots durch Scannen, wie in Bsp. 1 beschrieben, werden die nicht gebundene Antigenmoleküle abgewaschen. Wenn analog zum Bsp. 2 ein fluoreszierendes Antigen verwendet bzw. den zu spottenden Lösungen zugesetzt wird, erfolgt das Scannen alternativ dazu mit dem BioAnalyzere erst nach dem Abwaschen der nicht gebundenen Antigenmoleküle. Die Fragmentierung und Bestückung erfolgt für Glas wie in Beispiel 1 oder 2 beschrieben.

Kunststofffolien werden davon abweichend mit Hilfe eines CO<sub>2</sub>-Laserbeschrifters (ALLTEC GmbH, Selmsdorf) fragmentiert, wobei wie beim Diamant-Schneidverfahren nur die Kunststoffolie, nicht aber eine darunter liegende Trägerfolie, durchtrennt wird. Zur Testdurchführung werden die Testfelder unter Anwendung der Titerplane®-Technologie mit verdünnten Patientenseren inkubiert. Nach Waschschritten werden die Arrays mit einem Fluoreszein oder anders fluoreszenzmarkierten (z.B. Cy2, Cy3, Cy5) Anti-Human-IgG- oder Anti-Human-IgM-Antikörper inkubiert, der an die Autoantikörper aus dem Proben Serum bindet, die ihrerseits während der ersten Inkubation an die Antigen-Spots gebunden haben. Nach erneutem Waschen werden durch Auswertung im Mikroskop oder mittels des BioAnalyzers diejenigen Spots bzw. Antigene identifiziert, für die in der Probe Antikörper vorhanden waren. Die Intensität der Fluoreszenzsignale ist dabei ein Maß für die Menge der Autoantikörper in der Probe.

***Beispiel 5: Ausprägung von Antigen-Microarrays durch Kombination bespotteter Gläser***

Die Herstellung erfolgt wie in Beispiel 4, jedoch werden die Spots mit Hilfe eines Hochdurchsatz-Spotters im Abstand von etwa 300 µm erzeugt. Dabei wird eine Mikropipette über ein mit Gläsern belegtes Tablett hin- und herbewegt und dabei werden ca. 600 bis zu mehreren tausend Spots pro Sekunde abgegeben. Nach dem Abwaschen überschüssiger Antigenmoleküle werden die Gläser oder Kunststofffolien wie in Bsp. 4 beschrieben fragmentiert, wobei aus einem Glas etwa  $20 \times 70 = 1400$  quadratische Fragmente von je 1 mm<sup>2</sup> Fläche geschnitten werden. Hierbei wird auf die genaue Anordnung der Spots keine Rücksicht genommen, da unter den genannten Randbedingungen immer mehrere komplette Spots in einem Fragment zum liegen kommen. Nach der Fragmentierung werden die Gläser wie in Bsp. 4 beschrieben ausgelesen und Fragmente, die nur oder zu viele fehlerhafte Spots enthalten, aussortiert. Die Bestückung erfolgt wie in Beispiel 1 oder 2 beschrieben, wobei durch Kombination von bis zu 48 Fragmenten pro Testfeld, die jeweils mit einem anderen Antigen betropft wurden, in jedem Testfeld ein Array aus vielen verschiedenen Antigenen ausgeprägt wird. Die Testdurchführung mit diesen Arrays erfolgt wie in Bsp. 4 beschrieben.

***Beispiel 6: Herstellung von Protein- und DNA-Microarrays auf Basis von Membranen***

Die Herstellung und Testdurchführung erfolgt wie in den Beispielen 1-5, nur kommen anstelle der aktivierten Glasoberflächen oder Folien dünne Nylonmembranen (PALL GmbH, Dreieich) oder Nitrocellulosemembranen (Schleicher & Schüll, Dassel) zum Einsatz. Diese sind ggf. zur Versteifung auf dünne Gläser oder Kunststofffolien aufgeklebt. Die Fragmentierung der Membranen auf Gläsern erfolgt wie in Bsp. 1 beschriebenen mit einem Diamantschneider.

Membranen allein oder auf dünnen Kunststofffolien, z.B. PMMA, befestigte Membranen werden mit Hilfe eines Laserbeschrifters (ALLTEC GmbH, Selmsdorf) fragmentiert, dessen Leistung so eingestellt wird, dass der Laserstrahl die Membran ggf. einschließlich der daran fixierten Kunststoffolie, nicht aber eine darunter liegende Trägerfolie (s. Bsp. 1) durchtrennt. Die Auswahl perfekter Membranfragmente erfolgt durch Sichtbarmachen der Spots anhand von Fluoreszenzsignalen der Antigene bzw. Oligonukleotide wie in den obigen Beispielen 2 und 4 beschrieben. Die Bestückung der Membranfragmente in die Felder eines EUROIMMUN-Objektträgers erfolgt anschließend mit einer Bestückungsmaschine wie in Bsp. 1 beschrieben oder auch von Hand, z.B. mit Hilfe einer Pinzette. Bei der Testdurchführung wird bei der Verwendung von Membranen alternativ zur Fluoreszenzdetektion eine Farbreaktion oder Lumineszenzreaktion durchgeführt. Dafür wird im Fall von Antigenarrays eine alkalische Phosphatase oder Peroxidase anstelle des Fluoreszenzmoleküls an den Anti-Human-IgG- bzw. Anti-Human-IgM-Antikörper gekoppelt und im Fall von DNA-Arrays die Proben-Nukleinsäure mit Biotin oder Fluoreszein markiert und das Array nach der DNA-Hybridisierung mit Streptavidin- bzw. Anti-Fluoreszein-konjugierter alkalischer Phosphatase inkubiert. Nach Abwaschen der überschüssigen Phosphatase- bzw. Peroxidase-Konjugate wird das Farb- bzw. Lumineszenzsignal durch Überschichten des Arrays mit geeigneten Substraten (NBT/BCIP, CDP-Star Roche Diagnostics GmbH, oder Luminol) entwickelt und mit einer konventionellen Kamera oder einem Flachbettscanner bzw. im Falle des Lumineszenzsignals mit Hilfe des BioAnalyzers ausgelesen.

#### ***Beispiel 7: Flächige Beschichtung der Substrate***

Glas-, Kunststoff-, oder Membransubstrate, wie in den Beispielen 4 – 6 beschrieben, werden in Objektträger-Versandbehälter mit jeweils einer Antigenlösung (1 – 20 µg/ml Protein) über Nacht inkubiert. Die nicht gebundenen Antigenmoleküle werden anschließend abgewaschen und die auf der Oberfläche verbliebenen aktiven Gruppen durch Inkubation mit einer Proteinlösung, z.B. einer BSA-Lösung, blockiert. Die so beschichteten Substrate werden wie in den Beispielen 4 – 6 beschrieben fragmentiert. Nach Kontrolle der Beschichtungsqualität jedes Fragments anhand des Fluoreszenzsignals werden die perfekt beschichteten Fragmente auf einem Testträger zur Ausprägung eines Arrays kombiniert und wie in den Beispielen 4 – 6 beschrieben verwendet. Eine flächige Beschichtung kann auch mit Hilfe anderer Methoden erreicht werden, wie Siebdruck, Sprühtechniken, Spotten, Ausstreichen usw.

***Beispiel 8: Ausprägung und Verwendung von Allergie-Microarrays für die Allergiediagnostik***

Die Herstellung und Testdurchführung erfolgt wie in Beispiel 4 – 7. Anstatt der Autoantigenlösungen kommen jedoch Extrakte tierischen und pflanzlichen Ursprungs sowie aus Lebensmitteln und Mikroorganismen zum Einsatz. Bei der Testdurchführung kann so die Anwesenheit von Antikörpern im Serum, die gegen einen Bestandteil der immobilisierten Extrakte gerichtet sind, nachgewiesen werden. Als Konjugate kommen neben den beschriebenen Anti-Human-IgG- und Anti-Human-IgM-Antikörpern insbesondere Anti-Human-IgE-Antikörper zum Einsatz.

***Beispiel 9: Ausprägung von Microarrays in Mikrotiterplatten***

Das Verfahren entspricht dem in den Beispielen 1 – 8, jedoch werden die Fragmente nicht auf EUROIMMUN-Objektträgern kombiniert, sondern jeweils in den Vertiefungen einer 96er Multititerplatte (MTP) abgesetzt. Die Testdurchführung mit dem Probenmaterial findet anschließend in den Vertiefungen der MTP unter Anwendung der oben beschriebenen Fluoreszenz-, Lumineszenz- oder kolorimetrischen Nachweismethoden statt.

## **Ansprüche**

1. Verfahren zur Herstellung von Macro- und Microarrays (Biochips), dadurch charakterisiert, dass jeweils ein oder mehrere Fänger-Moleküle auf jeweils einem Trägerstück immobilisiert werden und anschließend zwei oder mehr dieser Trägerstücke auf einem Träger kombiniert und fixiert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Fänger-Moleküle auf Trägerstücken immobilisiert werden, die aus unterschiedlichen Materialien bestehen.
3. Verfahren nach Anspruch 1 - 2, bei dem die Beschichtungsqualität der Trägerstücke vor der Kombination kontrolliert wird und nur diejenigen Trägerstücke zur Kombination ausgewählt werden, welche bestimmte, gewählte Qualitätsmerkmale erfüllen.
4. Verfahren nach Anspruch 3, bei dem die Beschichtungsqualität unter anderem oder ausschließlich dadurch kontrolliert wird, dass nach dem Eintrocknen der Beschichtungslösung ein Bild von den präzipitierten Substanzresten, z.B. Salzen aus der Beschichtungslösung, aufgenommen wird.
5. Verfahren nach Anspruch 3, bei dem die Beschichtungsqualität unter anderem oder ausschließlich dadurch kontrolliert wird, dass die Fänger-Moleküle oder ein anderer Bestandteil der Beschichtungslösung eine Fluoreszenzmarkierung trägt und nach erfolgter Beschichtung die Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffs auf dem Trägerstück z.B. mittels eines Fluoreszenzscanners ermittelt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1 - 5, bei dem mehrere Trägerstücke in einem Testfeld kombiniert werden, so dass die immobilisierten Fänger-Moleküle ein gemeinsames Array ausprägen und gemeinsam mit einer einzigen Probenlösung inkubiert werden können.
7. Verfahren nach Anspruch 1 - 6, bei dem das durch die Kombination der Trägerstücke in einem Testfeld erzeugte Array mehr unterschiedliche Fänger-Molekül-Spezies enthält als die zur Kombination verwendeten Trägerstücke.
8. Verfahren nach Anspruch 1 - 7, bei dem mehrere Trägerstücke so auf einem zusammenhängenden Träger angeordnet werden, dass sie anschließend in

unterschiedlichen Testfeldern mit unterschiedlichen Probenflüssigkeiten inkubiert werden können.

9. Verfahren nach Anspruch 1 – 8, bei dem die Fänger-Moleküllösungen durch Spotten, Drucken, Pipettieren oder *in situ*-Synthese auf die Trägerstücke aufgebracht werden und so ein oder mehrere Spots auf jedem Trägerstück ausgeprägt werden.

10. Verfahren nach Anspruch 9, bei dem die Fänger-Moleküllösungen mit Hilfe der TopSpot-Technologie auf die Trägerstücke aufgebracht werden.

11. Verfahren nach Anspruch 1 – 8, bei dem die Trägerstücke durch Benetzen mit der Fänger-Moleküllösungen beschichtet werden.

12. Verfahren nach Anspruch 1 – 8, bei dem die Trägerstücke spezielle aktivierte Regionen enthalten, an denen sich durch Benetzen mit einer Lösung die Fänger-Moleküle anheften, während die nicht aktivierten Regionen unbeschichtet bleiben.

13. Verfahren nach Anspruch 1 – 12, bei dem die Beschichtung zunächst auf einem zusammenhängenden großen Trägerstück erfolgt, das anschließend in einzelne Trägerstücke fragmentiert wird, die dann gemäß Anspruch 1 – 12 zur Ausprägung von Arrays kombiniert werden.

14. Verfahren nach Anspruch 1 – 13, bei dem ein Trägerstück auf einem zweiten Träger lose angeheftet wird, das Trägerstück dann in kleine Trägerstücke fragmentiert wird, die über den zweiten Träger in ihrer Position gehalten werden, die angehefteten kleinen Trägerstücke dann mit Fänger-Molekülen beschichtet und anschließend vom zweiten Träger abgehoben und gemäß Anspruch 1 – 12 zur Ausprägung von Arrays kombiniert werden.

15. Verfahren nach Anspruch 1 – 14, bei dem das Verfahren gemäß WO2005/073693 zur Fragmentierung und anschließenden Bestückung ganz oder teilweise genutzt wird.

16. Verfahren nach Anspruch 1 – 15, bei dem die Fragmentierung mit Hilfe eines Lasers erfolgt.

17. Verfahren nach Anspruch 1 – 16, bei dem jedes Trägerstück nur mit einer Sorte von Fänger-Molekülen beschichtet ist.

18. Verfahren nach Anspruch 1 – 16, bei dem mindestens zwei unterschiedliche Sorten von Fänger-Molekülen auf jedes Trägerstück aufgebracht werden.
19. Verfahren nach Anspruch 1 – 16, bei dem mindestens fünf unterschiedliche Sorten von Fänger-Molekülen auf jedes Trägerstück aufgebracht werden.
20. Verfahren nach Anspruch 1 - 16, bei dem mindestens 20 unterschiedliche Sorten von Fänger-Molekülen auf jedes Trägerstück aufgebracht werden.
21. Verfahren nach Anspruch 1 - 16, bei dem mindestens 100 unterschiedliche Sorten von Fänger-Molekülen auf jedes Trägerstück aufgebracht werden.
22. Verfahren nach Anspruch 1 – 16, bei dem höchstens zwei unterschiedliche Sorten von Fänger-Molekülen auf jedes Trägerstück aufgebracht werden.
23. Verfahren nach Anspruch 1 – 16, bei dem höchstens 10 unterschiedliche Sorten von Fänger-Molekülen auf jedes Trägerstück aufgebracht werden.
24. Verfahren nach Anspruch 1 - 16, bei dem höchstens 100 unterschiedliche Sorten von Fänger-Molekülen auf jedes Trägerstück aufgebracht werden.
25. Verfahren nach Anspruch 1 - 16, bei dem höchstens 1000 unterschiedliche Sorten von Fänger-Molekülen auf jedes Trägerstück aufgebracht werden.
26. Verfahren nach Anspruch 1 - 25, bei dem anstelle von beschichteten Trägerstücken bereits aus mindestens zwei Trägerstücken kombinierte Arrays auf einem zusammenhängenden Träger kombiniert und fixiert werden.
27. Verfahren nach Anspruch 1-26, bei dem die Fänger-Moleküle aus Nukleinsäuren einschließlich Oligonukleotiden, Polynukleotiden, cDNA, DNA, RNA oder LNA bestehen
28. Verfahren nach Anspruch 1 – 26, bei dem die Fänger-Moleküle Proteine, Antigene oder Peptide sind



29. Verfahren nach Anspruch 1 – 26, bei dem die Fänger-Moleküle organische oder metallorganische Moleküle sind

30. Verfahren nach Anspruch 1 – 26, bei dem die Fänger-Moleküle Mischungen, Verbindungen, Konjugate oder Komplexe von zwei oder mehr der in den Ansprüchen 27 – 29 beschriebenen Molekülgruppen sind.

31. Macro und Microarrays, die mit einem Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 – 30 hergestellt wurden.

32. Einen Assay zur Untersuchung der Identität, Menge, und/oder Aktivität von Nukleinsäuren, Proteinen und/oder anderen Molekülen in einer Probenflüssigkeit, in dem die Probe in einem ersten Schritt mit einem Macro- oder Microarray gemäß Anspruch 26 inkubiert wird und anschließend die an die Fänger-Moleküle gebundenen Analyten bzw. deren Aktivität unter Nutzung geeigneter Markierungs- und Detektionsverfahren oder auch direkt aufgrund ihrer physikalischen, biochemischen oder enzymatischen Eigenschaften nachgewiesen werden. Die Identität der Fänger-Moleküle, an die Moleküle aus der Probe gebunden haben, wird durch die Position im Array ermittelt und erlaubt Rückschlüsse auf die Identität, Menge und/oder Aktivität der in der Probe vorhandenen Moleküle.

33. Ein Reagenzien-Testsystem, das Macro- und Microarrays gemäß Anspruch 31 umfasst und gemäß Anspruch 32 zur Untersuchung der Menge und Identität von Nukleinsäuren, Proteinen und/oder anderen Molekülen eingesetzt wird.

1. Festphasen-  
beschichtung

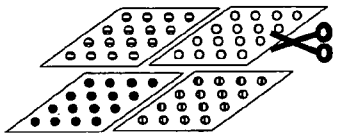
## 2. Fragmentierung

3. Aussortieren  
fehlerhafter  
Fragmente4. Kombination fehlerfreier  
Fragmente zu perfekten  
Arrays

Je eine Substanz flächig auf  
einer Festphase immobilisieren:



Je eine Substanz in definierten  
Bereichen auf einer Festphase  
immobilisieren:



Mehrere Substanzen in Form  
mehrerer Arrays auf einer  
Festphase immobilisieren:

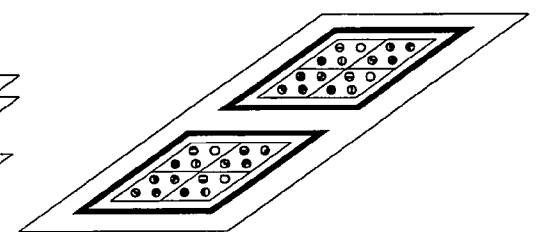
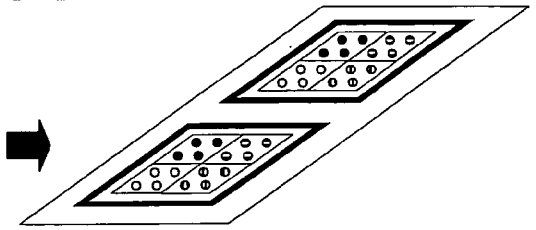
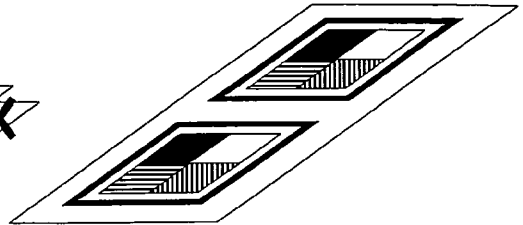
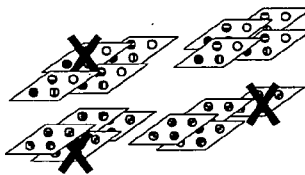
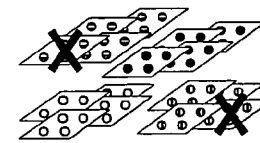
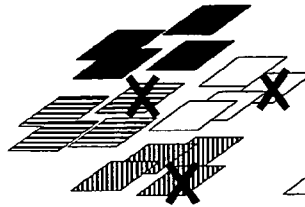
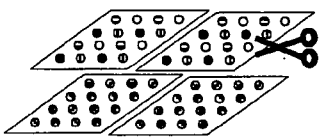


Abb. 1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2007/004641

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
INV. B01J19/00 C40B50/14

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

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

B01J C40B

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, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                           | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | GB 2 319 838 A (HEWLETT PACKARD CO [US]<br>HEWLETT PACKARD CO [US]; AGILENT<br>TECHNOLOGIES) 3 June 1998 (1998-06-03)<br>abstract<br>page 2, paragraph 3 - page 3, last<br>paragraph<br>page 4, last paragraph - page 11,<br>paragraph 2; claims; figures                                                    | 1-33                  |
| X         | EP 1 582 254 A (LINTEC CORP [JP]; RIKEN<br>[JP]) 5 October 2005 (2005-10-05)<br>abstract<br>paragraph [0007] - paragraph [0015]<br>paragraph [0017] - paragraph [0018]<br>paragraph [0022]<br>paragraph [0043] - paragraph [0052]<br>paragraph [0055] - paragraph [0088];<br>claims; figures<br>-----<br>-/- | 1-33                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

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

\*E\* earlier 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.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 September 2007

Date of mailing of the international search report

20/09/2007

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

Nazario, Luis

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2007/004641

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 2005/282156 A1 (RAVA RICHARD P [US] ET AL) 22 December 2005 (2005-12-22)<br>abstract<br>paragraph [0007] - paragraph [0011]<br>paragraph [0025]<br>paragraph [0056] - paragraph [0057];<br>figure 6<br>-----                                                                                                                             | 1-33                    |
| X         | DE 198 23 876 A1 (INST MIKROTECHNIK MAINZ GMBH [DE]) 2 December 1999 (1999-12-02)<br>abstract<br>column 1, line 55 - column 4, line 44<br>column 5, line 16 - column 6, line 68;<br>figures<br>-----                                                                                                                                        | 1-33                    |
| X         | WO 02/05945 A (MAX DELBRUECK CENTRUM [DE]; LEE KANG HUN [DE])<br>24 January 2002 (2002-01-24)<br>abstract<br>page 3, paragraph 2 - page 4, paragraph 1;<br>claims; figures<br>-----                                                                                                                                                         | 1-33                    |
| X         | EP 0 117 262 A1 (STOCKER WINFRIED DR MED) 5 September 1984 (1984-09-05)<br>cited in the application<br>abstract<br>page 7, paragraph 2<br>page 8, paragraph 8 - page 9, paragraph 2<br>page 11, paragraph 2 - page 15, paragraph 1; figures<br>-----                                                                                        | 1-8,<br>13-25,<br>27-33 |
| X         | WO 2005/073693 A (EUROIMMUN [DE]; STOCKER WINFRIED [DE]; RATEIKE MARTIN [DE]; MORRIN MAR) 11 August 2005 (2005-08-11)<br>cited in the application<br>abstract<br>page 7, last paragraph - page 8, paragraph 3<br>page 11, paragraph 3 - page 12, paragraph 2<br>page 13, last paragraph - page 14, paragraph 1<br>claims; examples<br>----- | 1-8,<br>11-33           |
|           | -/--                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                         |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2007/004641

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Relevant to claim No.        |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| X         | FERGUSON J A ET AL: "HIGH-DENSITY<br>FIBER-OPTIC DNA RANDOM MICROSPHERE ARRAY"<br>ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL<br>SOCIETY, COLUMBUS, US,<br>vol. 72, no. 22, 2000, pages 5618-5624,<br>XP001133705<br>ISSN: 0003-2700<br>abstract<br>page 5618, right-hand column, last<br>paragraph - page 5619, left-hand column,<br>paragraph 1<br>page 5619, left-hand column, last<br>paragraph - right-hand column, paragraph 4<br>figure 1 | 1-8, 11,<br>12, 17,<br>22-33 |
| X         | -----<br>US 2003/153006 A1 (WASHIZU MASAO [JP] ET<br>AL) 14 August 2003 (2003-08-14)<br><br>paragraph [0006] - paragraph [0014]<br>paragraph [0021]; claims; figure 2<br>-----                                                                                                                                                                                                                                                               | 1-8, 11,<br>12, 17,<br>22-33 |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/004641

| Patent document<br>cited in search report |    | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|----|---------------------|----------------------------|---------------------|
| GB 2319838                                | A  | 03-06-1998          | DE 19740263 A1             | 07-05-1998          |
|                                           |    |                     | JP 3893201 B2              | 14-03-2007          |
|                                           |    |                     | JP 10185923 A              | 14-07-1998          |
|                                           |    |                     | US 6875620 B1              | 05-04-2005          |
|                                           |    |                     | US 2004203049 A1           | 14-10-2004          |
| EP 1582254                                | A  | 05-10-2005          | JP 2005283306 A            | 13-10-2005          |
|                                           |    |                     | US 2005250139 A1           | 10-11-2005          |
| US 2005282156                             | A1 | 22-12-2005          | NONE                       |                     |
| DE 19823876                               | A1 | 02-12-1999          | NONE                       |                     |
| WO 0205945                                | A  | 24-01-2002          | DE 10034570 A1             | 31-01-2002          |
| EP 0117262                                | A1 | 05-09-1984          | AT 33717 T                 | 15-05-1988          |
|                                           |    |                     | DE 3376359 D1              | 26-05-1988          |
|                                           |    |                     | JP 59210364 A              | 29-11-1984          |
|                                           |    |                     | US 4647543 A               | 03-03-1987          |
| WO 2005073693                             | A  | 11-08-2005          | DE 102004005100 A1         | 25-08-2005          |
|                                           |    |                     | EP 1718948 A1              | 08-11-2006          |
| US 2003153006                             | A1 | 14-08-2003          | WO 0190225 A1              | 29-11-2001          |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2007/004641

**A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
INV. B01J19/00 C40B50/14

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

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
B01J C40B

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile                                                                                                                                                                               | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| X          | GB 2 319 838 A (HEWLETT PACKARD CO [US]<br>HEWLETT PACKARD CO [US]; AGILENT<br>TECHNOLOGIES) 3. Juni 1998 (1998-06-03)<br>Zusammenfassung<br>Seite 2, Absatz 3 - Seite 3, letzter<br>Absatz<br>Seite 4, letzter Absatz - Seite 11, Absatz<br>2; Ansprüche; Abbildungen           | 1-33               |
| X          | EP 1 582 254 A (LINTEC CORP [JP]; RIKEN<br>[JP]) 5. Oktober 2005 (2005-10-05)<br>Zusammenfassung<br>Absatz [0007] - Absatz [0015]<br>Absatz [0017] - Absatz [0018]<br>Absatz [0022]<br>Absatz [0043] - Absatz [0052]<br>Absatz [0055] - Absatz [0088]; Ansprüche;<br>Abbildungen | 1-33               |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. September 2007

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

20/09/2007

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

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

Bevollmächtigter Bediensteter

Nazario, Luis

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2007/004641

| C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                              |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| Kategorie*                                            | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Betr. Anspruch Nr.           |
| X                                                     | US 2005/282156 A1 (RAVA RICHARD P [US] ET AL) 22. Dezember 2005 (2005-12-22)<br>Zusammenfassung<br>Absatz [0007] - Absatz [0011]<br>Absatz [0025]<br>Absatz [0056] - Absatz [0057]; Abbildung 6<br>-----                                                                                                                                                                                                                     | 1-33                         |
| X                                                     | DE 198 23 876 A1 (INST MIKROTECHNIK MAINZ GMBH [DE]) 2. Dezember 1999 (1999-12-02)<br>Zusammenfassung<br>Spalte 1, Zeile 55 - Spalte 4, Zeile 44<br>Spalte 5, Zeile 16 - Spalte 6, Zeile 68;<br>Abbildungen<br>-----                                                                                                                                                                                                         | 1-33                         |
| X                                                     | WO 02/05945 A (MAX DELBRUECK CENTRUM [DE]; LEE KANG HUN [DE])<br>24. Januar 2002 (2002-01-24)<br>Zusammenfassung<br>Seite 3, Absatz 2 - Seite 4, Absatz 1;<br>Ansprüche; Abbildungen<br>-----                                                                                                                                                                                                                                | 1-33                         |
| X                                                     | EP 0 117 262 A1 (STOCKER WINFRIED DR MED)<br>5. September 1984 (1984-09-05)<br>in der Anmeldung erwähnt<br>Zusammenfassung<br>Seite 7, Absatz 2<br>Seite 8, Absatz 8 - Seite 9, Absatz 2<br>Seite 11, Absatz 2 - Seite 15, Absatz 1;<br>Abbildungen<br>-----                                                                                                                                                                 | 1-8,<br>13-25,<br>27-33      |
| X                                                     | WO 2005/073693 A (EUROIMMUN [DE]; STOCKER WINFRIED [DE]; RATEIKE MARTIN [DE]; MORRIN MAR) 11. August 2005 (2005-08-11)<br>in der Anmeldung erwähnt<br>Zusammenfassung<br>Seite 7, letzter Absatz - Seite 8, Absatz 3<br>Seite 11, Absatz 3 - Seite 12, Absatz 2<br>Seite 13, letzter Absatz - Seite 14, Absatz 1<br>Ansprüche; Beispiele<br>-----                                                                            | 1-8,<br>11-33                |
| X                                                     | FERGUSON J A ET AL: "HIGH-DENSITY FIBER-OPTIC DNA RANDOM MICROSPHERE ARRAY" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS, US, Bd. 72, Nr. 22, 2000, Seiten 5618-5624, XP001133705<br>ISSN: 0003-2700<br>Zusammenfassung<br>Seite 5618, rechte Spalte, letzter Absatz - Seite 5619, linke Spalte, Absatz 1<br>Seite 5619, linke Spalte, letzter Absatz - rechte Spalte, Absatz 4<br>Abbildung 1<br>-----<br>-/-- | 1-8, 11,<br>12, 17,<br>22-33 |



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2007/004641

## C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile                                                                          | Betr. Anspruch Nr.                      |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| X          | <p>US 2003/153006 A1 (WASHIZU MASAO [JP] ET AL) 14. August 2003 (2003-08-14)</p> <p>Absatz [0006] - Absatz [0014]<br/> Absatz [0021]; Ansprüche; Abbildung 2<br/> -----</p> | <p>1-8, 11,<br/> 12, 17,<br/> 22-33</p> |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2007/004641

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|----------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| GB 2319838 A                                       | 03-06-1998                    | DE 19740263 A1                    | 07-05-1998                    |
|                                                    |                               | JP 3893201 B2                     | 14-03-2007                    |
|                                                    |                               | JP 10185923 A                     | 14-07-1998                    |
|                                                    |                               | US 6875620 B1                     | 05-04-2005                    |
|                                                    |                               | US 2004203049 A1                  | 14-10-2004                    |
| EP 1582254 A                                       | 05-10-2005                    | JP 2005283306 A                   | 13-10-2005                    |
|                                                    |                               | US 2005250139 A1                  | 10-11-2005                    |
| US 2005282156 A1                                   | 22-12-2005                    | KEINE                             |                               |
| DE 19823876 A1                                     | 02-12-1999                    | KEINE                             |                               |
| WO 0205945 A                                       | 24-01-2002                    | DE 10034570 A1                    | 31-01-2002                    |
| EP 0117262 A1                                      | 05-09-1984                    | AT 33717 T                        | 15-05-1988                    |
|                                                    |                               | DE 3376359 D1                     | 26-05-1988                    |
|                                                    |                               | JP 59210364 A                     | 29-11-1984                    |
|                                                    |                               | US 4647543 A                      | 03-03-1987                    |
| WO 2005073693 A                                    | 11-08-2005                    | DE 102004005100 A1                | 25-08-2005                    |
|                                                    |                               | EP 1718948 A1                     | 08-11-2006                    |
| US 2003153006 A1                                   | 14-08-2003                    | WO 0190225 A1                     | 29-11-2001                    |