

(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
17. Oktober 2002 (17.10.2002)

PCT

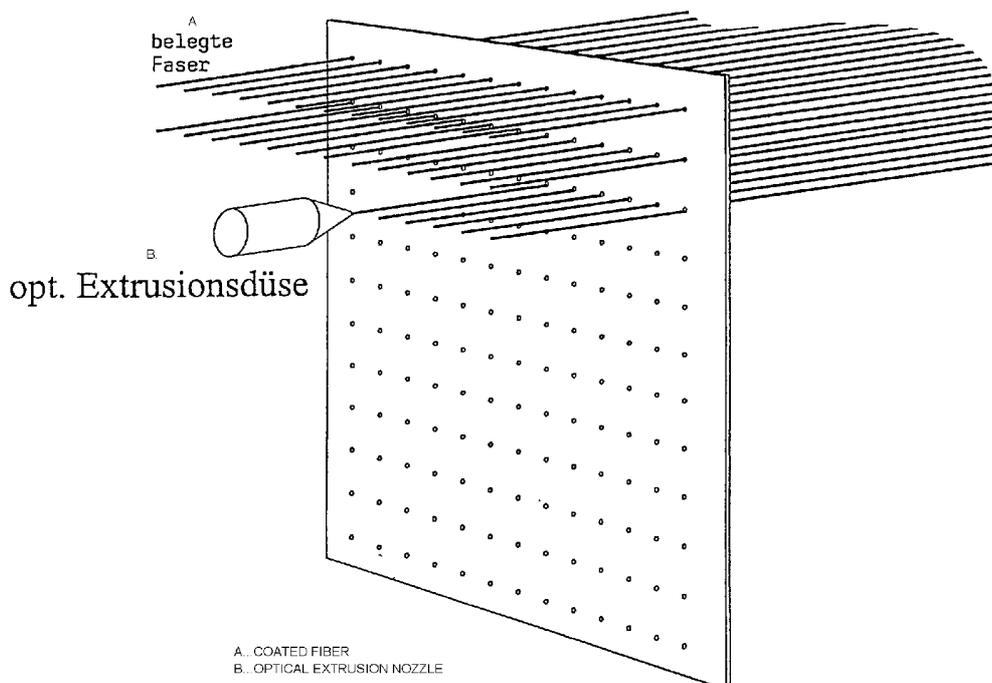
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/082080 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/53 (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FRANK, Ronald
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/03824 [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, 38124 Braunschweig (DE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 5. April 2002 (05.04.2002) (74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, 81541 München (DE).
(25) Einreichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
(30) Angaben zur Priorität: 101 17 135.8 5. April 2001 (05.04.2001) DE
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, 38124 Braunschweig (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING A PLURALITY OF IDENTICAL COPIES OF A TWO-DIMENSIONAL TEST ARRAY OF PROBE MOLECULES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINER VIELZAHL IDENTISCHER KOPIEN EINER PLANAREN TESTANORDNUNG VON SONDENMOLEKÜLEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for producing a plurality of identical copies of a two-dimensional closest-packed test array of probe molecules used to detect target biomolecules on the basis of fiber bundles that are cut to desired lengths.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 02/082080 A2



eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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.

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer Vielzahl identischer Kopien einer planaren dichtest gepackten Testanordnung von Sondenmolekülen zum Nachweis von Ziel-Biomolekülen auf der Grundlage von Faserbündeln, die in gewünschten Abständen geschnitten werden.

5

10

15 **Verfahren zur Herstellung einer Vielzahl identischer
Kopien einer planaren Testanordnung von Sondenmolekülen**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer
Vielzahl identischer Kopien einer planaren Testanordnung
20 von Sondenmolekülen zum Nachweis von Ziel-Molekülen auf
der Grundlage von Faserbündeln, die in gewünschten
Abständen geschnitten werden.

Sammlungen von großen Zahlen unterschiedlicher Sonden bzw.
25 Sondenmolekülen bzw. Testverbindungen, die auf einer
ebenen Fläche geordnet abgelegt/gebunden/immobilisiert
werden, werden im wissenschaftlichen Sprachgebrauch als
Arrays bezeichnet. Solche Arrays erlauben einen schnellen
simultanen Test/Assay aller
30 Sonden/Sondenmoleküle/Verbindungen durch Inter-
aktionsanalyse mit einem oder einer Mischung von Analyten
z. B. in biologischen Proben, d.h. Ziel-Biomolekülen. Der
Vorteil eines Arrays gegenüber dem simultanen Test/Assay
mit immobilisierten Sonden bzw. Sondenmolekülen bzw.
35 Testverbindungen auf beweglichen Elementen, wie z.B. auf

Perlen (Beads), besteht darin, dass in einem Array die Art (chemische Struktur und/oder Identität) der immobilisierten Sonden bzw. Sondenmoleküle bzw. Testmoleküle genau durch den Ort in der Arrayfläche bekannt ist und ein örtliches Testsignal (dieses kann durch Wechselwirkung mit dem Zielmolekül entstehen, z.B. durch Bindung, oder z.B. durch enzymatische Umsetzung der Sonde durch das Zielmolekül verschwinden und somit indirekt zum Nachweis dienen) somit sofort einer Molekülart zugeordnet werden kann. Insbesondere in miniaturisierter Form werden Arrays mit biologischen Sonden bzw. Sondenmolekülen bzw. Testmolekülen auch Biochips genannt.

Wichtige Beispiele für solche Arrays sind:

Nukleinsäure-Arrays aus DNA-Fragmenten, cDNAs, RNAs, PCR-Produkten, Plasmiden, Bakteriophagen, synthetischen Oligonukleotiden oder auch synthetischen PNA-Oligomeren, welche mittels Hybridisierung (Bildung eines Doppelstrangmoleküls) zu komplementären Nukleinsäureanalyten ausgelesen werden;

Protein-Arrays aus Antikörpern, in Zellen exprimierten Proteinen, Phagen-Fusionsproteinen (»Phage Display«) und

Verbindungs-Arrays aus synthetischen Peptiden, deren Analoga wie Peptoide, Oligo-Carbamate usw. oder allgemein organisch-chemischen Verbindungen, welche beispielsweise mittels Bindung zu affinen Protein- oder anderen Analyten oder beispielsweise mittels enzymatischer Umsetzung ausgelesen werden.

Anwendungen finden solche Arrays sowie die hierfür entwickelten Methoden und Geräte in der biologischen Grundlagenforschung, aber insbesondere auch in der medizinischen Diagnostik und pharmazeutischen Wirkstoffentwicklung. Auch andere naturwissenschaftliche Forschungsrichtungen, wie z.B. die Katalysatorentwicklung und Materialwissenschaften, beginnen, solche Konzepte erfolgreich zu übernehmen. Voraussetzung für den vorteilhaften routinemäßigen Einsatz solcher Arrays ist deren kostengünstige, schnelle und vollautomatische Herstellung mit einer hohen Dichte und Diversität an Teststrukturen (Informationsgehalt).

Solche Arrays werden zur Zeit nach zwei verschiedenen Prinzipien durch Ablegen der Sonden bzw. Sondenmoleküle bzw. Testmoleküle auf bereits vorbereitete Materialoberflächen hergestellt (eine aktuelle Übersicht gibt S. Wölfl in: transcript Laborwelt 2000, 3, 12-20):

- 20 a) durch einmaliges Verteilen der Lösungen vorgefertigter Sonden bzw. Sondenmoleküle bzw. Testverbindungen auf der Oberfläche
- 25 b) durch wiederholte serielle Verteilung der Lösungen von Bausteinen für die chemische Synthese der Sonden bzw. Sondenmoleküle bzw. Testverbindungen *in situ* auf der Oberfläche.
- 30 Bisher bekannte Chip-Konfigurationen nutzen entweder eine rechtwinklige x/y Anordnung der Array-Elemente, die durch

Dosierung mittels entsprechender x/y-Pipettierstationen oder entsprechend gefertigter Photolithographie- bzw. Druckmasken erzeugt werden, oder eine kreisförmige $r\phi$ -Anordnung, welche durch eine Rotationsbewegung der

5 Chipoberfläche ($r\phi$ -Arrays) und einer schnell getakteten Dosiervorrichtung erzeugt werden. Damit können Dichten von bis zu 1 Million Sonden bzw. Sondenmolekülen bzw. Test-Verbindungen je cm^2 oder von wenigen Quadratmikrometern je Einzelfläche erreicht werden.

10

Für den Einsatz in der medizinischen Routine-Diagnostik sind jedoch sehr strenge Vorgaben bezüglich der Reproduzierbarkeit der Analyseergebnisse über sehr große

15 Anzahlen (mehrere Millionen) von Tests gegeben. Dies fordert eine nahezu identische Qualität der Chips (Arrays) aus einer und auch aus verschiedenen Produktionschargen. Alle oben erwähnten Herstellungsverfahren haben aber einen wesentlichen prinzipiellen Nachteil, daß nämlich jeder so produzierte Array nur eingeschränkt vergleichbar ist mit

20 einem zweiten »gleich« hergestellten, weil jedes Array-Element in einem Einzelprozess entsteht.

Dies gilt auch, wenn ein und dieselbe Lösung einer Sonde bzw. eines Sondenmoleküls bzw. einer Verbindung auf die

25 gleichen Orte einer Serie verschiedener Arrays verteilt wird. Fehler oder Abweichungen entstehen durch Dosierungenauigkeiten, Inhomogenitäten der Oberflächeneigenschaften und -funktionalität sowie variable Reaktionsausbeuten der Immobilisierung bzw.

30 Syntheseschritte.

Solche Fehlerabweichungen werden um so größer, je kleiner die räumlichen Dimensionen der Array-Elemente werden und potenzieren sich mit der Zahl der Arbeitsschritte, die für die Herstellung jedes einzelnen Array-Elementes nötig sind.

Wegen der unterschiedlichen chemischen Struktur und Eigenschaften der verschiedenen Sonden bzw. Sondenmoleküle bzw. Testmoleküle in den Array-Elementen sind auch Referenzelemente nur bedingt in der Lage, solche Variabilitäten zu korrigieren. Ein Qualitätstest jedes einzelnen Arrays schließt sich aus, weil dies zu aufwendig ist und viele Tests nicht reversibel geführt werden können, d.h. der Array würde durch die Qualitätskontrolle irreversibel verändert.

Fislage und Teterin haben in DE 198 03 077 C1 ein "Verfahren zur Herstellung von strukturierten Testkörpern zum spezifischen Nachweis einzelner Reaktanden von Rezeptorsubstanz-Ligandensubstanz-Komplexen" beschrieben, bei dem Schichten von Materialien, an die die Reaktandensubstanzen gebunden werden, zu einem dreidimensionalen Körper aufgeschichtet und verklebt werden, und diesen dreidimensionalen Körper nachher in einem Winkel zur Ebene der Schichten mit einem Mikrotom wiederum in dünne Schichten zerschnitten. Die so entstehenden Schichten sind aus dünnen aneinander liegenden Streifen aufgebaut, wobei jeder Streifen eine andere Reaktandensubstanz enthält, so daß in einem biologischen Test viele verschiedene Reaktandensubstanzen parallel in einem Testkörper gleichzeitig untersucht

werden können. Damit haben sie einen Prozess des mikrotomfeinen Abschneidens dünner Scheiben von einem Körper vorgeschlagen, der aus mit verschiedenen Substanzen belegten Segmenten aufgebaut ist. Die nach diesem
5 Verfahren hergestellten streifenartigen Testkörper nutzen aber nur eine Dimension, um eine Vielzahl an Reaktandensubstanzen für einen parallelen Test anzuordnen. Diese in DE 198 03 077 beschriebenen Reaktandensubstanzen können auch als Sondenmoleküle verstanden werden.

10

Anderson, Anderson und Braatz (WO 01/09607 A1) haben diesen Nachteil überwunden, indem sie den zu zerschneidenden dreidimensionalen Körper aus Fadensegmenten zusammensetzen, die zunächst mit den
15 verschiedenen Reaktandensubstanzen belegt und dann in einer rechteckig-gitterförmigen Anordnung parallel nebeneinander gelegt werden. Dieser Herstellungsprozeß ist für relativ dicke Fasern, wie in den Beispielen beschrieben, sicherlich anwendbar. Aber wenn die Dicke der
20 Fasern im Mikrometerbereich liegt und mehrere Hunderttausende davon parallel angeordnet werden sollen, dann wäre eine hochpräzise Maschinerie zu konzipieren.

Aufgabe der Erfindung ist daher, die dem oben genannten
25 Stand der Technik anhaftenden Nachteile oder Probleme zu beseitigen.

Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Herstellung einer Vielzahl identischer Kopien einer planaren
30 Testanordnung von Sondenmolekülen zum Nachweis von Ziel-Molekülen, bei dem man

(a) von einer Vielzahl von Fasern ausgeht, wobei jede Faser nur einen Typ Sondenmolekül zum Nachweis eines Typs Ziel-Molekül aufweist und die Anzahl der Fasern mindestens
5 der Anzahl der nachzuweisenden unterschiedlichen Typen von Ziel-Molekülen entspricht,

(b) die Vielzahl von Fasern in paralleler Ausrichtung anordnet,
10

(c) die so angeordneten Fasern zu einem Faserbündel bündelt und zur dichtesten Packung bringt (gesehen senkrecht zum Faserquerschnitt),

(d) die Anordnung der einzelnen Fasern zueinander in dem Faserbündel unveränderlich fixiert wird, so daß jede Faser eine geometrisch definierte Position einnimmt und ein verfestigtes Faserbündel entsteht, und
15

(e) das verfestigte Faserbündel quer zur Faserlänge in gewünschten Abständen unter Erhalt einer Vielzahl identischer Kopien einer planaren Testanordnung mit einem Muster von Sondenmolekülen zum Nachweis von Ziel-Molekülen in geometrisch definierten Positionen auf den
20 Schnittflächen geschnitten wird.
25

Erfindungsgemäß wird der Stand der Technik von WO 01/09607 dahingehend verbessert, daß der Prozess des Aneinanderlegens zu einem einfachen, sich selbst
30 organisierenden Prozess gestaltet wird. Die Fasern werden erst im Abstand voneinander etwa parallel angeordnet und

können so in die gewünschte Reihenfolge gebracht oder
lagenweise während des Anordnens erst mit den
Sondenmolekülen belegt werden. Das Anordnen erfordert
keine hohe Präzision, sondern es muß nur die richtige
5 Anordnung gewährleistet werden.

Weitere vorteilhafte und/oder bevorzugte Ausführungsformen
der Erfindung sind Gegenstand der Unteransprüche.

10 Nach einer Ausführungsform betrifft die Erfindung ein
Verfahren, bei dem auf den jeweiligen Oberflächen einer
Vielzahl von Fasern eine Vielzahl von Sondenmolekülen
immobilisiert wird oder auf diesen Oberflächen
synthetisiert wird.

15

Nach einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung
ein Verfahren, bei dem eine Vielzahl von Fasern durch
Extrusion einer Vielzahl von Fasergrundmaterialien mit
jeweils einer Vielzahl von daran immobilisierten
20 Sondenmolekülen hergestellt wird.

Nach einer Ausführungsform der Erfindung können die Fasern
beispielsweise aus porösem Kunststoff, insbesondere
Polyester, Polyurethan oder Nylon, Zellulose,
25 Zelluloseacetat, Baumwolle oder Seide bestehen. Die Fasern
müssen allerdings nicht unbedingt porös sein. Es wäre auch
möglich, Fasern aus z.B. Glas, Metall, Metall- oder
Halbmetalloxiden zu verwenden. Jedoch würde sich beim
Nachweis nur ein Signal im Bereich der »Beschichtung« auf
30 der Faser bilden, d.h. eine Art ringförmiges Signal um die
Faser herum, was natürlich nicht so intensiv wäre wie ein

Signal, das sich über den gesamten Querschnitt der Faser erstreckt.

5 Sofern Fasergrundmaterialien mit daran immobilisierten
Sondermolekülen für eine Extrusion eingesetzt werden
sollen, kann sich der *Fachmann vom Stand der Technik*
leiten lassen, der für eine schonende Extrusion von
funktionalisierten Fasergrundmaterialien relevant ist;
vgl. beispielsweise *Science*, 295 (2002) 472 und
10 *Schneegelsberg, Handbuch der Faser, Theorie und Systematik
der Faser*, 1999, ISBN 3 871 506 249.

Nach einer weiteren Ausführungsform der Erfindung erfolgt
die Zusammenfassung der Fasern zu einem Faserbündel
15 beispielsweise durch gleichsinniges Verdrillen oder
Verflechten.

Das Verdrillen des Bündels bringt die Fasern automatisch
auf die größte mögliche Nähe dicht aneinander. Dabei
20 ergibt sich eine etwas andere Anordnung der Fasern nach
dem Prinzip der dichtesten Packung. Aber die räumliche
Lage zueinander wird dadurch nicht verändert. Ein weiterer
Vorteil ist die höhere Dichte der Testanordnung.

25 Nach einer weiteren Ausführungsform der Erfindung erfolgt
die unveränderliche Fixierung der Anordnung der Fasern
zueinander und die Verfestigung des Faserbündels
beispielsweise durch Einbettung oder Einpolymerisation in
ein verfestigbares Material und sich anschließendes
30 Aushärten oder Auspolymerisieren oder Einfrieren
desselben.

Nach einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist das verfestigbare Material beispielsweise Paraffin, Gelatine, Polyacrylamid, Epoxidharz, Polyethylenglykol (PEG), eine wäßrige Polyvinylalkohol-Lösung oder eine wäßrige Polyvinylalkohol/PEG-Lösung. Grundsätzlich eignet sich jedes für die Mikrotomie oder Kryotomie geeignete Material. Der Fachmann ist mit der Abstimmung der Härten von verfestigbarem Material und Faser aufeinander vertraut.

Nach einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird das verfestigte Faserbündel beispielsweise mit einem Mikrotom, z.B. mit einem Ultra-Mikrotom, oder einem Kryotom geschnitten; die Schnitte können senkrecht oder in einem Winkel zur Achse des Faserbündels geführt werden.

Die Erfindung betrifft ferner eine planare Testanordnung von Sondenmolekülen zum Nachweis von Ziel-Molekülen, wobei die Testanordnung durch eine dichteste 2-dimensionale Anordnung bzw. dichteste Packung von planaren, flächigen, und zwar gleichflächigen Elementen in ein und derselben Ebene gebildet wird, wobei jedes Element nur einen Typ Sondenmolekül zum Nachweis eines Typs Ziel-Molekül aufweist und wobei die Anzahl der Fasern mindestens der Anzahl der nachzuweisenden unterschiedlichen Typen von Ziel-Molekülen entspricht.

Die Erfindung betrifft ferner eine planare Testanordnung von Sondenmolekülen zum Nachweis von Ziel-Molekülen, erhältlich nach einem Verfahren gemäß der Erfindung.

Bei der erfindungsgemäßen planaren Testanordnung können die Ziel-Moleküle Ziel-Biomoleküle darstellen.

- 5 Bei der erfindungsgemäßen planare Testanordnung können die gleichflächigen Elemente Scheibenform aufweisen, insbesondere eine Kreisscheibenform, elliptische Scheibenform oder hexagonale Scheibenform, und in dichtester Packung in ein und der selben Ebene vorliegen,
10 insbesondere in hexagonal dichtester Packung (gesehen senkrecht zur Scheibenebene).

Die Erfindung betrifft ferner eine medizinische oder diagnostische Vorrichtung, die eine oder mehrere, gleiche
15 oder verschiedene planare Testanordnung(en) von Sondenmolekülen zum Nachweis von Ziel-Molekülen gemäß der Erfindung enthält.

Die Erfindung betrifft ferner einen Kit, der mehrere
20 gleiche oder verschiedene planare Testanordnungen von Sondenmolekülen zum Nachweis von Zielmolekülen gemäß der Erfindung enthält.

Die Erfindung betrifft ferner einen Kit, der eine oder
25 mehrere gleiche oder verschiedene planare Testanordnungen von Sondenmolekülen zum Nachweis von Ziel-Molekülen gemäß der Erfindung sowie ein oder mehrere Reagenzien für den Nachweis von Ziel-Molekülen enthält, die an Sondenmoleküle binden.

Außerdem gibt die Erfindung die Verwendung einer erfindungsgemäßen planaren Testanordnung, einer erfindungsgemäßen medizinischen oder diagnostischen Vorrichtung oder eines erfindungsgemäßen Kits zum Nachweis
5 von Ziel-Molekülen an.

Die erfindungsgemäß verwendeten Sondenmoleküle können beispielsweise jeweils Partner eines spezifisch wechselwirkenden Systems komplementärer Bindungspartner
10 sein.

Durch die Bindung der komplementären Bindungspartner kann ein nachweisbares Signal entstehen, und zwar z.B. direkt durch die Bindung an sich, oder indirekt, weil ein
15 weiteres markiertes Molekül spezifisch an das Konjugat Sonde/Ziel-Biomolekül bindet (»Sandwich«-Assay). Ferner kann ein vor der Bindung vorhandenes Signal verschwinden, beispielsweise weil ein an einer Sonde angebrachter Marker abgespalten oder auf andere Weise deaktiviert wird (wenn
20 z.B. das Ziel-Biomolekül ein Enzym ist).

Das spezifisch wechselwirkende System komplementärer Bindungspartner kann beispielsweise auf der Wechselwirkung Nukleinsäure/komplementäre Nukleinsäure, Peptidnukleinsäure/Nukleinsäure, Enzym/Substrat, Rezeptor/Effektor, Lek-
25 tin/Zucker, Antikörper/Antigen, Avidin/Biotin, Streptavidin/Biotin beruhen.

Bei dem oben erwähnten Antikörper kann es sich
30 beispielsweise um einen polyklonalen, monoklonalen, chimären oder »Single-chain«-Antikörper oder ein

funktionelles Fragment oder Derivat eines solchen Antikörpers handeln.

Im folgenden wird die Erfindung ohne Beschränkung anhand
5 von Ausführungsbeispielen und unter Bezugnahme auf die Figur detaillierter beschrieben.

Es zeigen:

10 **Figur 1A** eine schematische Darstellung einzelner Schritte einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens und außerdem eine Ausführungsform eines nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen Produkts;

15 **Figur 1B** eine weitere schematische Darstellung einzelner Schritte einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens;

Figuren 2 und 2A bis 2C eine weitere schematische
20 Darstellung einzelner Schritte einer Ausführungsform der Erfindung;

Figur 3 ein erfindungsgemäß verdichtetes Faserbündel sowie mit Hilfe des Faserbündels gewonnene Testanordnungen; und
25

Figur 4 Frontalansichten von erfindungsgemäß verdichteten Faserbündeln bzw. von erfindungsgemäßen Testanordnungen.

Nach **Figur 1** kann man von einem Fasergrundmaterial mit
30 einer Vielzahl von daran immobilisierten Sondenmolekülen ausgehen und das Material mit Hilfe von Düsen eines

Bündels von oder einer Batterie von Düsen Fasern etwa parallel zueinander erspinnen, die an einer Platte oder Lochplatte fixiert sind, die den Düsen gegenüber angeordnet ist. Der Einfachheit halber ist nur eine Düse
5 dargestellt. Alternativ können bereits erspinnene Fäden durch eine Lochplatte durchgefädelt werden.

Während die in **Figur 1A** gezeigte Platte rechteckig bzw. quadratisch und mit in einem quadratischen Raster
10 angeordneten Löchern versehen ist, ist die in **Figur 1B** dargestellte Platte etwa kreisförmig und die Anordnung der Löcher etwa hexagonal.

Figur 2 zeigt eine Draufsicht auf eine Vorrichtung zur
15 parallelen Anordnung von Fasern und **Figuren 2A bis 2C** Schnittansichten. Die Vorrichtung ist mit Führungsstiften 2 versehen, die dazu dienen, einen endlosen Faden (beginnend bei 1 und endend bei 8) meandernd abzulegen. Nach **Figur 1B** ist der etwa rechtwinkelige Sockel der
20 Vorrichtung mit kanalartigen Rillen 7, Kanälen bzw. Rinnen versehen, die die einzelnen parallelen Strecken des Fadens aufnehmen. In diesen Rillen 7 können die Fasern imprägniert bzw. mit einer Funktionalisierung versehen werden. Plastikstreifen 5 dienen als Unterlage und/oder
25 zur Abdeckung der Endabschnitte der parallelen Strecken und können mit den Endabschnitten verschweißt und/oder verklebt werden. Eine Vielzahl von Paaren von Streifen 5 mit ihrem meandernd eingeschweißten oder eingeklebten Fäden können mit Hilfe von Dornen übereinander gestapelt
30 werden, die durch Führungslöcher 6 geführt werden, die in den Streifen 5 vorgesehen sind.

Figur 3 zeigt ein verdrehtes Faserbündel, von dem mit Hilfe einer Mikrotomklinge erfindungsgemäße Testanordnungen abgeschnitten sind. Diese Testanordnungen sind mit 4 Markierungen versehen, um sie analog ausrichten zu können.

Figur 4 zeigt Testanordnungen mit verschiedenen Querschnitten der miteinander verbundenen Fasern.

10

Erfindungsgemäß wird insbesondere zur Herstellung von Arrays für die medizinische Routinediagnostik folgendes Verfahren vorgeschlagen, bei dem jedes Array-Element einer großen Serie gleicher Arrays aus einem identischen Material entsteht:

15

Es werden beispielsweise zunächst die Sonden bzw. Sondenmoleküle an »eindimensionalen« Faden-, Draht-, oder Stäbchen-Elementen (»1D-Elementen«) immobilisiert. Dies kann beispielsweise erfolgen, indem entsprechende Sondenmoleküle direkt oder über geeignete Linker an reaktive Gruppen auf der Oberfläche der »1D-Elemente« gebunden werden. Beispielsweise kann eine Lösung der Sondenmoleküle an einem senkrecht befestigten Faden herunterlaufen gelassen werden, oder der Faden wird durch ein Bad einer Lösung der Sondenmoleküle gezogen oder in das Bad eingelegt. Besondere Beschränkungen hinsichtlich der Aufbringung bestehen nicht. Vorzugsweise wird der Faden z.B. mit einer Lösung der Sondenmoleküle gesättigt/imprägniert, was z.B. bei porösen Fasern wie Cellulose oder Baumwollfäden schon durch die Dochtwirkung

20
25
30

(Einsaugen) automatisch eintritt und eine homogene Verteilung der Lösung der Sondenmoleküle in der betreffenden Faser bewirkt.

- 5 Dann können die »eindimensionalen« Faden-, Draht-, oder Stäbchen-Elemente (»1D-Elemente«) ihrer Länge nach parallel angeordnet und dann z.B. wie bei der Herstellung eines Seils zu einem »dreidimensionalen« Array-Körper (»3D-Körper«) fest und optimal dicht gepackt miteinander
10 verbunden (z.B. verflochten). Dies ist am einfachsten beispielsweise durch gleichsinniges Verdrillen der Faseranordnung oder auch durch eine andere Art des Verflechtens erreichbar. Dieser 3D-Körper wird dann mit einem sich verfestigenden Material getränkt, das an sich
15 keinen besonderen Beschränkungen unterliegt. Danach wird quer oder schräg zur Achse der zusammengefügte »eindimensionalen« Array-Elemente an einem Ende des 3D-Körpers geschnitten, was auf beliebige Weise erfolgen kann. Die Schnittfläche entspricht dann einer zweidimensionalen
20 Anordnung der Array-Elemente wie in einem konventionellen Array (2D-Array). Eine Vielzahl an dünnen Scheiben kann dann nacheinander abgeschnitten werden und jede Scheibe besteht aus einem gleichen 2D-Array. Diese Arrays können dann auf eine stabile Unterlage aufgebracht werden und
25 sind so wie andere konventionelle Arrays weiter zu behandeln.

Dieses neue Herstellungsverfahren hat die folgenden vorteilhaften Merkmale:

a) Die »1D-Elemente« können aus bereits vorgefertigten Materialien (Stäbe, Drähte oder Fäden) bestehen, die in einem vorgeschalteten Gesamtprozess mit jeweils einer Sonde bzw. Sondenmolekül bzw. Verbindung belegt werden.

5 Das Belegen ist einem Vorgang gleich, mit dem Sonden bzw. Sondenmoleküle bzw. Verbindungen auf einer Oberfläche immobilisiert werden oder dort nach Prinzipien der Festphasensynthese in situ chemisch synthetisiert werden. Einfache Beispiele sind Zellulose,

10 Zelluloseacetat oder Baumwollfäden, an deren Hydroxylfunktionen chemisch die Verbindungen verknüpft werden. Ähnlich kann mit Seidenfäden oder Kunststofffäden, insbesondere Fäden auf Basis von Polyestern, Polyurethan oder Nylon, vorgegangen werden. Beispiele

15 für die Immobilisierung von Molekülen an Oberflächen, die für Kombinationen von Sonden/Ziel-Biomolekülen bzw. allgemein für Biokonjugationssysteme geeignet sind, finden sich in großer Zahl in dem Buch »Bioconjugate Techniques« von G. T. Hermanson, Academic Press, 1996.

20 Beispiele für Systeme zur Festphasensynthese finden sich in großer Anzahl in dem Buch »Organic Synthesis on Solid Phase« von F. Z. Dörwald, Wiley-VCH, 2000.

Alternativ können die »1D-Elemente« auch direkt aus beispielsweise einer Lösung von einem geeigneten Grundstoff hergestellt werden, wobei die Sonden bzw. Sondenmoleküle bzw. Testverbindungen bereits kovalent, ionisch oder mechanisch an Moleküle des Grundstoffs gebunden sind; vgl. z.B. WO 99/54 729. Die Herstellung

25 kann beispielsweise durch ein Extrusionsverfahren wie bei der Produktion von Kunstfasern oder von Viskose-,

30

Zelluloseacetat- oder Seidenfasern erfolgen. In diesem Fall ist auch eine rechteckige, hexagonale oder andere Form der Fäden/Drähte durch entsprechende Öffnungen der Extrusionsdüsen realisierbar.

5

Durch diese Vorgehensweise wird sichergestellt, daß jedes Array-Element, das später als kleinster Teil entsteht, aus dem gleichen Material besteht, welches im vorgeschalteten Herstellungsprozess in großen Mengen hergestellt wurde.

10

b) Die Anordnung und Verbindung der »1D-Elemente« kann bei einer Ausführungsform der Erfindung mit einem Seilflechtvorgang verglichen werden. Die Enden der Fasern werden in gegenseitigem Abstand in die Anordnung für das angestrebte Array gebracht und die Fäden dann leicht verdreht. Die Verdrillung führt zu einem festen Zusammenhalt bzw. einer Verdichtung des Bündels. Diese Verdichtung ist selbstorganisierend und reproduzierbar. Zur exakten Bestimmung der finalen Ausrichtung eines 2D-Arrayschnittes können Referenzfasern mit beispielsweise einer Farb- oder Fluoreszenz- oder einer anderen geeigneten Markierung mit eingeflochten werden. Es ist nur ein Sortiervorgang für alle Arrays einer Serie notwendig.

15

20

25

c) Der Schneidvorgang entspricht der konventionellen Mikrotom-Technologie, mit der extrem dünne Schnitte von biologischem Material, das in ein geeignetes Milieu eingebettet wird, hergestellt werden können. Ultra-Mikrotome fertigen Schnitte von bis zu nur 0.1 Mikrometern Dicke an. Aus einem 1 m langen 3D-Körper

30

könnten so problemlos 10 Millionen Array-Scheiben von 0.1 μm Dicke gefertigt werden.

Der 3D-Körper wird dafür mit einem Material, das für die
5 Mikrotomie geeignet ist (z.B. Paraffin, Gelatine, Poly-
acrylamid, Epoxidharz, Polyethylenglykol (PEG), wäßrige
Polyvinylalkohol-Lösung oder wäßrige
Polyvinylalkohol/PEG-Lösung), getränkt und die Fasern so
mit eingebettet oder einpolymerisiert oder eingefroren
10 wie sonst das biologische Material. Es gibt eine
Vielzahl einschlägiger Vorschriften der Hersteller von
Mikrotomen und Ultra-Mikrotomen, die erfindungsgemäß
geeignet sind.

15 d) Die Mikrotom-Schnitte können auf eine stabile Unterlage
wie Glas gelegt, gebondet und dann beliebig weiter be-
handelt werden, wie es in den Vorschriften zur
Verwendung konventioneller Arrays angegeben ist. Die
Maße der Array-Unterlagen können an die konventioneller
20 Arrays angepasst werden (z.B. Mikroskopieträger mit
Abmessungen von 2,5 x 7,5 cm), so daß auch kommerzielle
Geräte zur Array-Behandlung und -Auslesung eingesetzt
werden können.

25 Es können sowohl ein Schnitt je Unterlage oder aber auch
eine Anordnung von mehreren Schnitten auf eine
gemeinsame Unterlage (»Array aus Arrays«) angeordnet
werden. Bei der letzteren Anordnung können gleiche
Arrays mehrfach oder auch verschiedene Arrays angeordnet
30 werden. Zwischen die/den Schnitte(n) solcher »Arrays aus
Arrays« können kleine Stege gelegt/gefertigt werden, so

daß getrennte Kammern entstehen und jeder einzelne Schnitt simultan mit einer anderen biologischen Probe untersucht werden kann.

5 Der Gesamtprozess ist leicht vollautomatisierbar.

10

15

20

25

30

Bezugszeichenliste:

5		
	A	rechtes Endstück zur Faserführung
	B	Mittelstück für Imprägnierungskanäle
	C	linkes Endstück zur Faserführung
10		
	1	Faden (Anfang)
	2	Führungsstift
	3	Pipette zur Befüllung der Imprägnierkanäle 7
	4	Linie zum Abschneiden der Faserebene
15	5	Plastikstreifen zum Verschweißen der Faserenden
	6	Führungsloch zur Stapelung von Faserebenen
	7	Kanal für Imprägnierlösung
	8	Faden (Ende)

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer Vielzahl identischer
Kopien einer planaren Testanordnung von Sondenmolekülen
5 zum Nachweis von Ziel-Molekülen, bei dem man
- (a) von einer Vielzahl von Fasern ausgeht, wobei jede
Faser nur einen Typ Sondenmolekül zum Nachweis eines Typs
Ziel-Molekül aufweist und die Anzahl der Fasern mindestens
10 der Anzahl der nachzuweisenden unterschiedlichen Typen von
Ziel-Molekülen entspricht,
- (b) die Vielzahl von Fasern in paralleler Ausrichtung
anordnet,
- 15 (c) die einzelnen Fasern zu einem Faserbündel bündelt und
zur dichtesten Packung bringt (gesehen senkrecht zum
Faserquerschnitt),
- 20 (d) die Anordnung der einzelnen Fasern zueinander in dem
Faserbündel unveränderlich fixiert wird, so daß jede Faser
eine geometrisch definierte Position einnimmt und ein ver-
festigtes Faserbündel entsteht, und
- 25 (e) das verfestigte Faserbündel quer zur Faserlänge in
gewünschten Abständen unter Erhalt einer Vielzahl
identischer Kopien einer planaren Testanordnung mit einem
Muster von Sondenmolekülen zum Nachweis von Ziel-Molekülen
in geometrisch definierten Positionen auf den
30 Schnittflächen geschnitten wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem man die einzelnen Fasern zu einem Faserbündel (Subfaserbündel) und mehrere derartige Bündel zu einem gemeinsamen Bündel bündelt
5 (Superbündel).
3. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, wobei man bei Stufen (a) und (b)
- (i) die Vielzahl von Fasern aus einem Bündel von Düsen
10 erspinnt oder
- (ii) eine Endlosfaser meandernd in mehreren Ebenen anordnet und durch die parallelen Abschnitte der Meander die Vielzahl von Fasern bilden läßt oder
15
- (iii) mehrere Endlosfasern meandernd in jeweils einer Ebene paralleler Ebenen anordnet und durch die parallelen Abschnitte der Meander die Vielzahl von Fasern bilden läßt.
20
4. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei auf den jeweiligen Oberflächen einer Vielzahl von Fasern jeweils eine Vielzahl von Sondenmolekülen immobilisiert wird oder auf diesen
25 Oberflächen synthetisiert wird, wobei jede Oberfläche durch die zugängliche innere und äußere Oberfläche gebildet werden kann.
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis
30 3, wobei eine Vielzahl von Fasern durch Extrusion einer Vielzahl von Fasergrundmaterialien mit jeweils einer

Vielzahl von daran immobilisierten Sondenmolekülen hergestellt wird.

6. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden
5 Ansprüche, wobei die Fasern aus porösem Kunststoff, insbesondere Polyester, Polyurethan oder Nylon, Zellulose, Zelluloseacetat, Baumwolle oder Seide, insbesondere Naturseide, bestehen.
- 10 7. Verfahren nach mindestens einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Zusammenfassung der Fasern zu einem Faserbündel durch gleichsinniges Verdrillen oder Verflechten erfolgt.
- 15 8. Verfahren nach mindestens einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die unveränderliche Fixierung der Anordnung der Fasern zueinander und die Verfestigung des Faserbündels durch Einbettung oder Einpolymerisation in ein verfestigbares Material und sich anschließende
20 Aushärten, Auspolymerisieren oder Einfrieren desselben erfolgt.
9. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das verfestigbare Material Paraffin, Gelatine, Polyacrylamid, Epoxidharz,
25 Polyethylenglykol (PEG), eine wäßrige Polyvinylalkohol-Lösung oder Polyvinylalkohol/PEG-Lösung ist.
10. Verfahren nach mindestens einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das verfestigte Faserbündel mit einem
30 Mikrotom oder Kryotom geschnitten wird.

11. Planare Testanordnung von Sondenmolekülen zum Nachweis von Ziel-Molekülen, wobei die Testanordnung durch eine dichteste 2-dimensionale Anordnung bzw. dichteste Packung von planaren, flächigen, und zwar gleichflächigen Elementen in ein und derselben Ebene gebildet wird.
12. Planare Testanordnung von Sondenmolekülen zum Nachweis von Zielmolekülen, insbesondere nach Anspruch 11, wobei jedes Element nur einen Typ Sondenmolekül zum Nachweis eines Typs Ziel-Molekül aufweist und wobei die Anzahl der Elemente mindestens der Anzahl der nachzuweisenden unterschiedlichen Typen von Ziel-Molekülen entspricht.
13. Planare Testanordnung nach mindestens einem der Ansprüche 11 bis 12, wobei die gleichflächigen Elemente Scheibenform aufweisen, insbesondere eine Kreisscheibenform, elliptische Scheibenform oder hexagonale Scheibenform, und in dichtester Packung in ein und der selben Ebene vorliegen, insbesondere in hexagonal dichtester Packung (gesehen senkrecht zur Scheibenebene).
14. Planare Testanordnung von Sondenmolekülen zum Nachweis von Ziel-Molekülen, erhältlich nach einem Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10.
15. Planare Testanordnung nach mindestens einem der Ansprüche 10 ^{bis} 14, bei der die Ziel-Moleküle Ziel-Biomoleküle darstellen, insbesondere Zellen, Viren, Phagen, Nucleinsäuren, Peptidnucleinsäuren, Proteine, Enzyme, Rezeptoren, Lektine, Zucker, Antikörper, Antigene, Avidin, Streptavidin oder Biotin.

16. Medizinische oder diagnostische Vorrichtung, die eine oder mehrere, gleiche oder verschiedene planare Testanordnungen(en) von Sondenmolekülen zum Nachweis von Ziel-Molekülen gemäß mindestens einem der Ansprüche 10 bis 15 enthält.
17. Vorrichtung nach Anspruch 17, nämlich Halte-, Wasch- oder Inkubationsvorrichtung für Testanordnung(en).
18. Kit, der mehrere gleiche oder verschiedene planare Testanordnungen von Sondenmolekülen zum Nachweis von Zielmolekülen gemäß mindestens einem der Ansprüche 10 bis 15 enthält.
19. Kit, der eine oder mehrere gleiche oder verschiedene planare Testanordnungen von Sondenmolekülen zum Nachweis von Ziel-Molekülen gemäß mindestens einem der Ansprüche 10 bis 15 sowie ein oder mehrere Reagenzien für den Nachweis von Ziel-Molekülen enthält, die an Sondenmoleküle binden.
20. Verwendung einer planaren Testanordnung gemäß mindestens einem der Ansprüche 10 bis 15 oder einer medizinischen oder diagnostischen Vorrichtung gemäß Anspruch 16 bis 17 oder eines Kits gemäß einem der Ansprüche 18 bis 19 zum Nachweis von Ziel-Molekülen, insbesondere von Ziel-Biomolekülen.

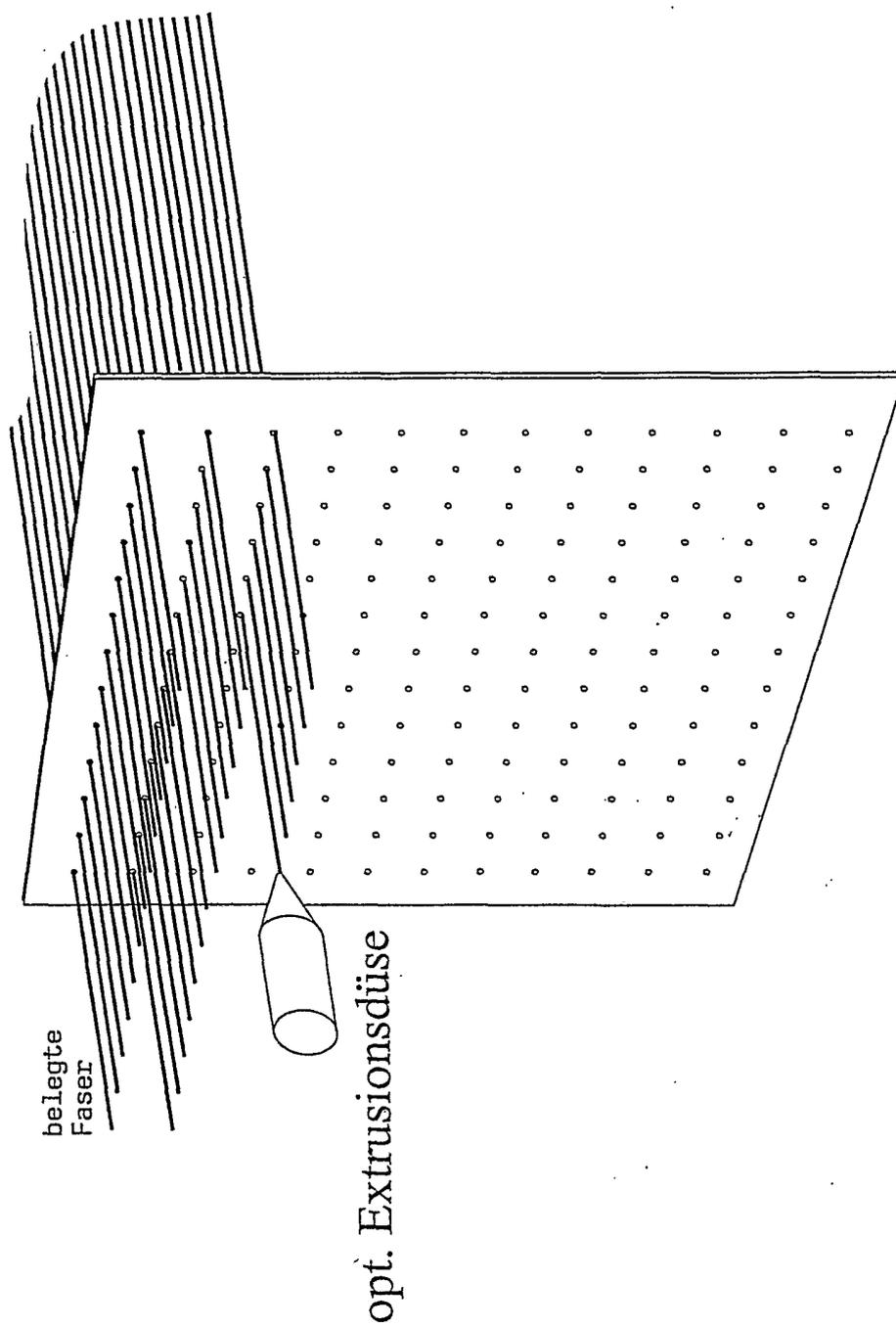


Fig. 1A

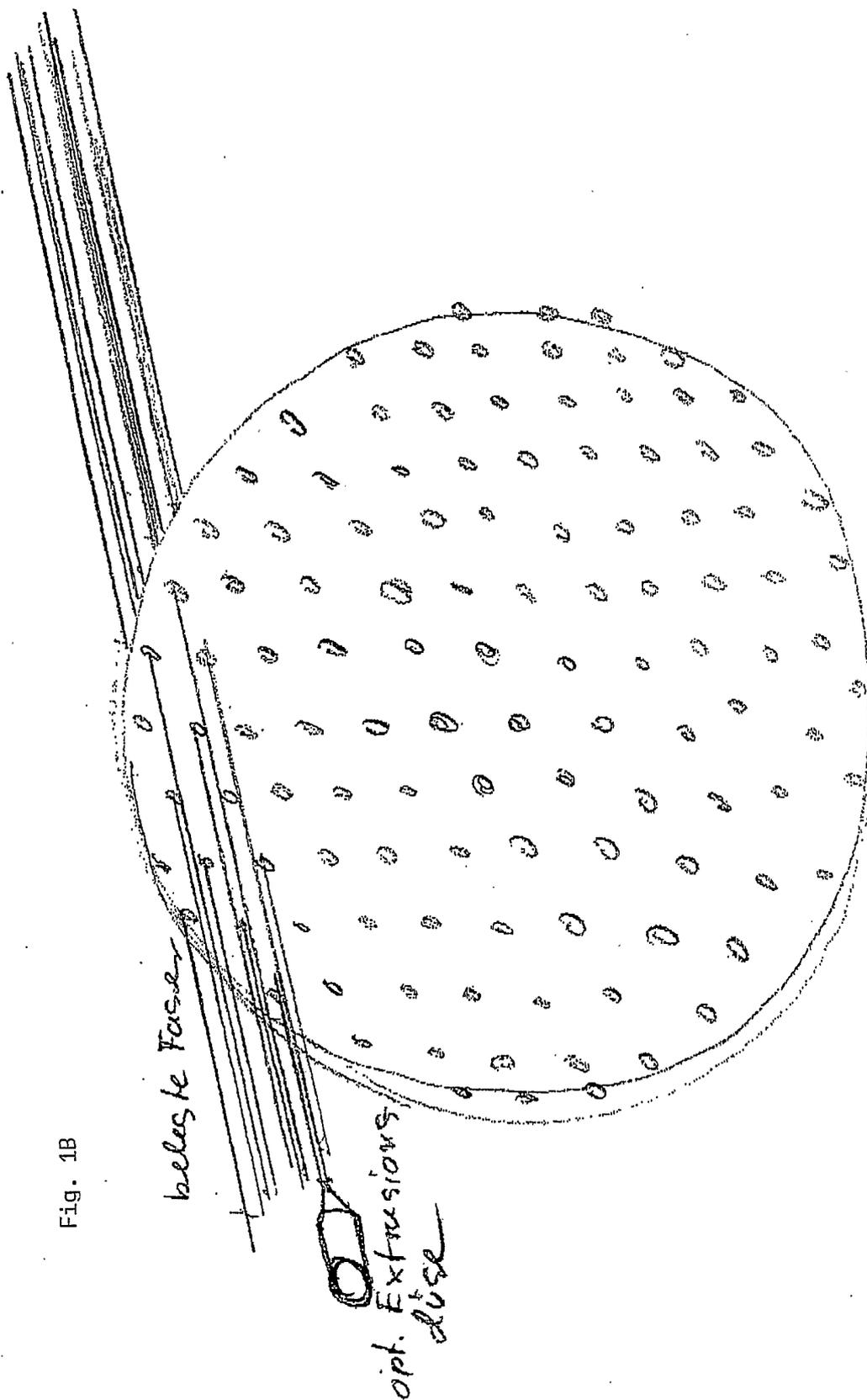


Fig. 1B

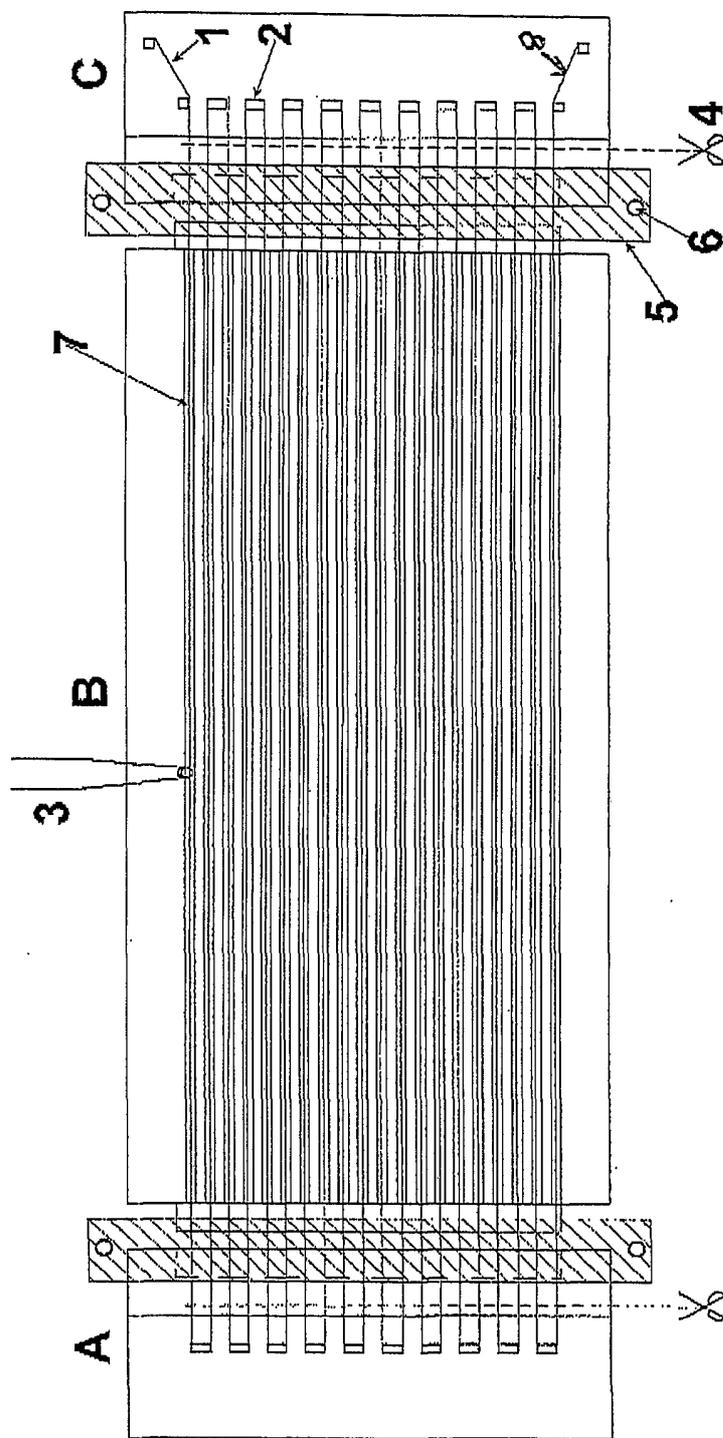


Fig. 2

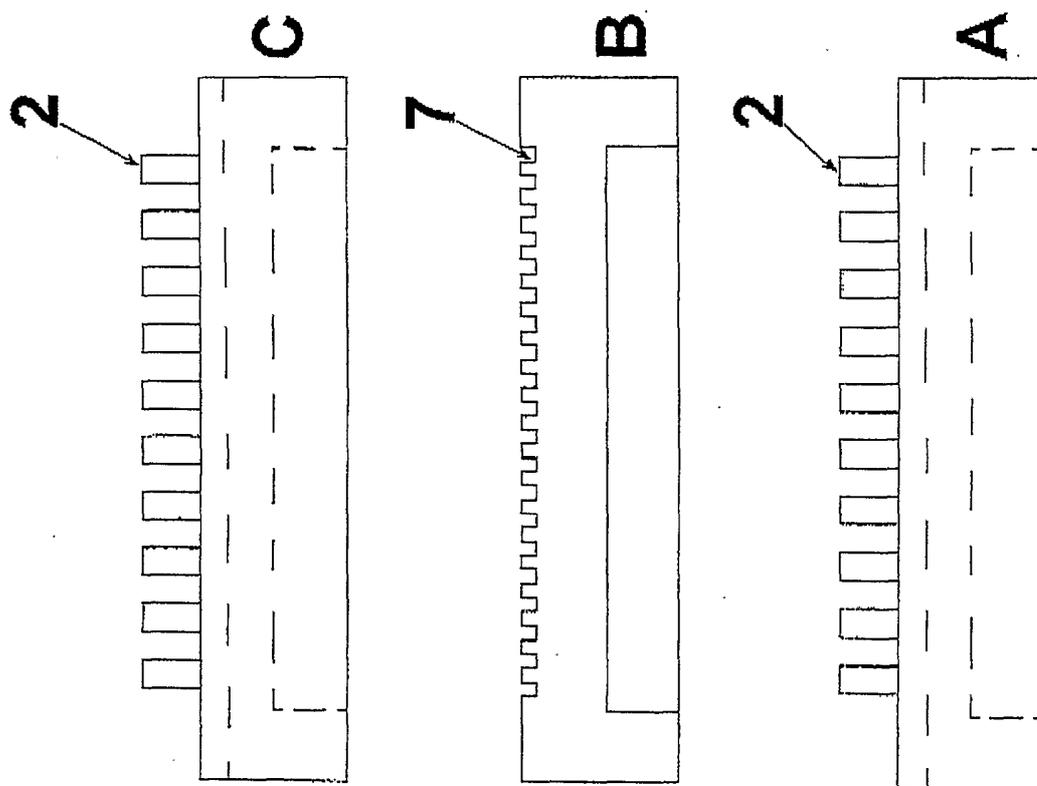


Fig. 2A bis 2C

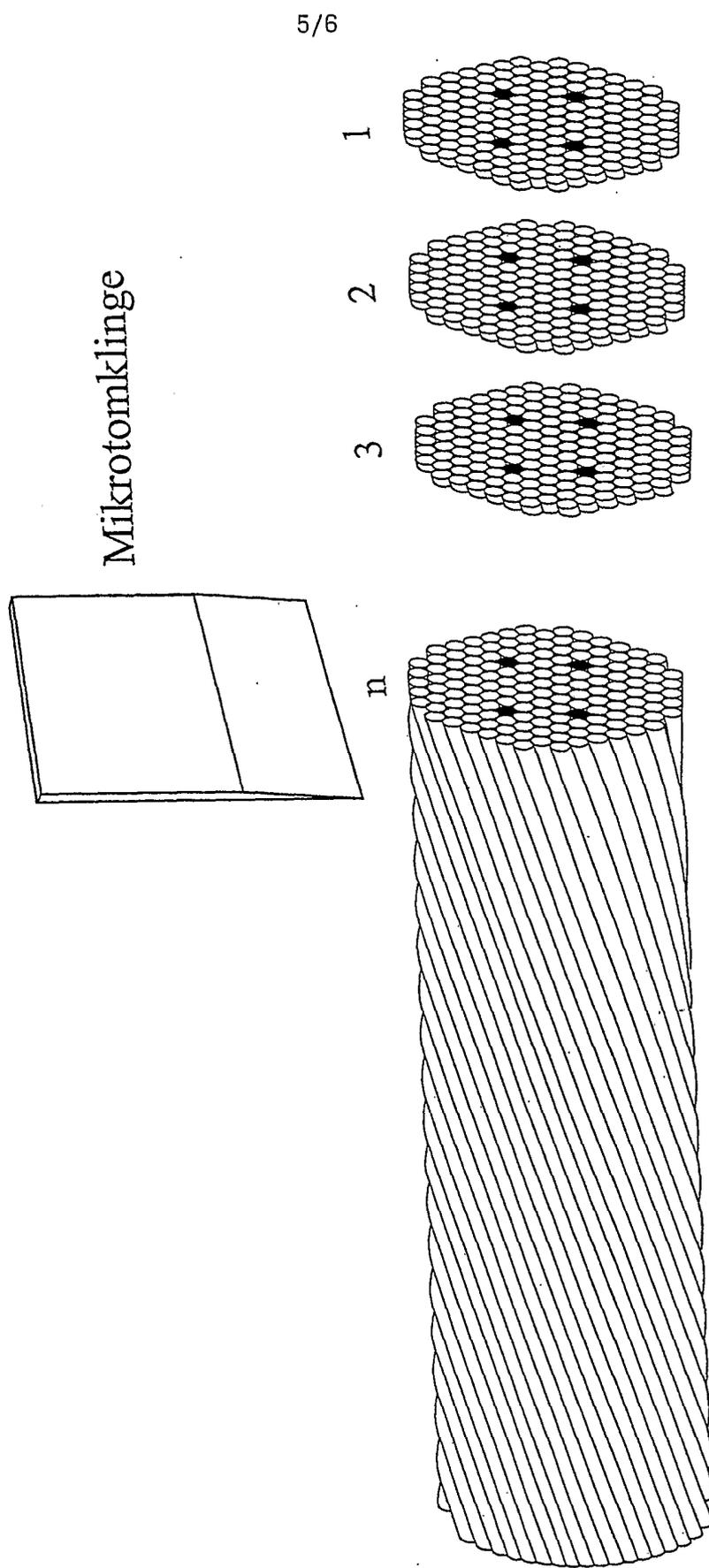


Fig. 3

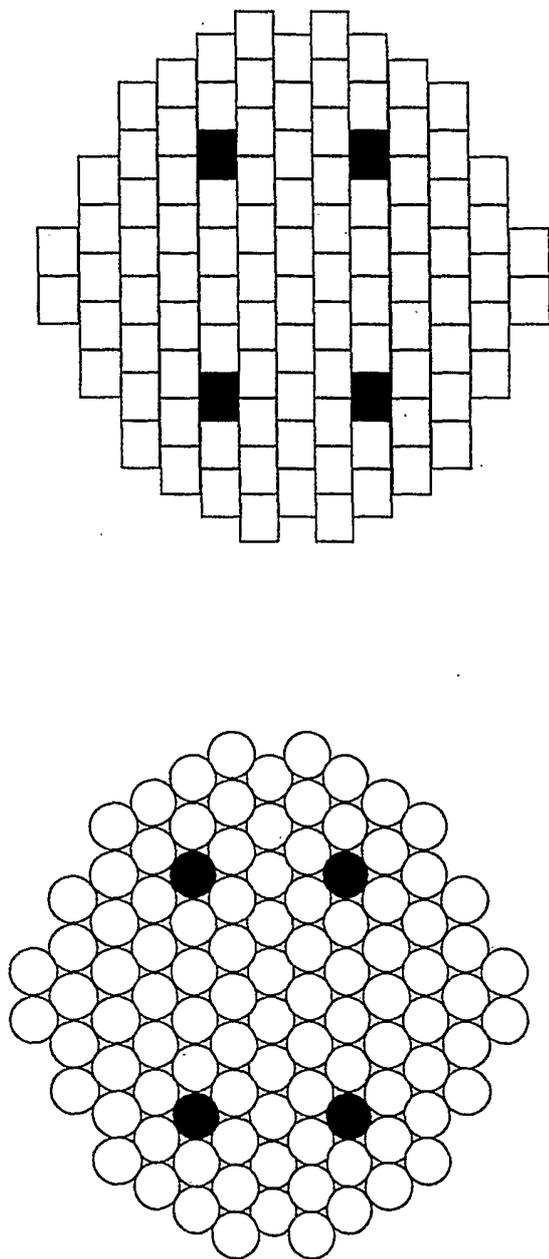


Fig. 4

- Faser mit Testverbindung
- Faser mit Referenzmarkierung