

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-536595
(P2004-536595A)

(43) 公表日 平成16年12月9日(2004.12.9)

(51) Int. Cl.⁷ F I テーマコード (参考)
 C 1 2 M 3/00 A 4 B 0 2 9
 // G O 1 N 37/00 G O 1 N 37/00 1 0 1

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 26 頁)

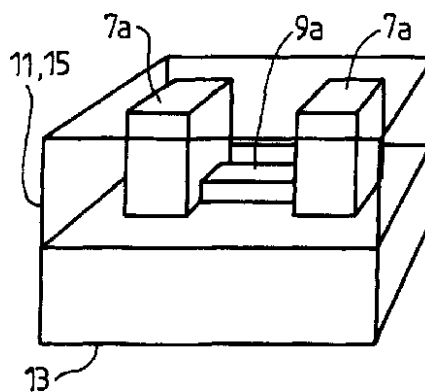
<p>(21) 出願番号 特願2003-503354 (P2003-503354) (86) (22) 出願日 平成13年6月8日 (2001.6.8) (85) 翻訳文提出日 平成15年12月4日 (2003.12.4) (86) 国際出願番号 PCT/EP2001/007058 (87) 国際公開番号 W02002/100542 (87) 国際公開日 平成14年12月19日 (2002.12.19) (81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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</p>	<p>(71) 出願人 594131887 サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシエルシュ・シアンティフィックーシーエヌアールエス CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS フランス国 75794 パリ・セデックス 16リュ・ミシェル・アンジュ 3 (74) 代理人 100065215 弁理士 三枝 英二 (74) 代理人 100076510 弁理士 掛樋 悠路 (74) 代理人 100086427 弁理士 小原 健志</p>
---	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイクロ流体構造、特にバイオチップを製造する方法および該方法によって得られた構造

(57) 【要約】

マイクロ流体構造（特にバイオチップ）を製造する方法であって、該方法は、少なくとも以下を包含する： - 少なくともマイクロウェルおよび該マイクロウェルを相互接続するマイクログループまたはマイクロチャネルを含む3次元構造を規定するための手段を用いて3次元マイクロモールドを製造すること；ならびに - ポリマー材料から作製される膜を成形するための該3次元マイクロモールドのみを使用すること（該膜は少なくとも該マイクロウェルおよび該マイクログループまたはマイクロチャネルを組み込み、該膜は3次元マイクロ流体構造を構成する）。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

マイクロ流体構造、特にバイオチップを製造する方法であって、該方法は、少なくとも以下を包含する：

- 少なくともマイクロウェルおよび該マイクロウェルを相互接続するマイクログループ (micro-grooves) またはマイクロチャンネルを含む 3 次元形状を規定するための手段を用いて 3 次元マイクロモールド (micro-mould) を製造すること；及び
- ポリマー材料から作製される膜を成形するための該 3 次元マイクロモールドのみを使用すること (該膜は少なくとも該マイクロウェルおよび該マイクログループまたはマイクロチャンネルを組み込み、該膜は 3 次元マイクロ流体構造を構成する)。

10

【請求項 2】

基体によって 3 次元マイクロ流体構造を完成し、該基体の 1 つの表面が膜の 1 つの表面に適用されることを包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

以下を包含する、請求項 2 に記載の方法：

- マイクロウェルおよびマイクログループを規定するための手段を少なくとも含む、3 次元形状を規定するための手段を用いて、前記 3 次元マイクロモールドを製造すること、
- ポリマー材料から作製される膜を成形するための前記 3 次元マイクロモールドのみを使用すること (ここで該マイクロウェルは膜を横切り、該マイクログループは 1 つの膜表面上に位置し、かつ該マイクロウェルを相互接続する)、及び
- 該マイクロウェルの 1 つの自由端 (free end) を閉じそしてマイクログループを閉じて、該マイクロウェルを相互接続する埋め込まれたチャンネルを形成するために、該膜の 1 つの表面および基体の 1 つの表面を接触させること。

20

【請求項 4】

先の請求項のいずれかに記載の方法であって、1 つの膜表面上に、該膜を横切るマイクロウェルおよびマイクログループを有する膜を形成するために、マイクロモールドと該マイクロモールド上にプレスされたプレートとの間にポリマー材料を注入すること、および約 1 時間、約 70 の温度で該ポリマー材料をベーキングすることを包含する、方法。

【請求項 5】

先の請求項のいずれかに記載の方法であって、膜と基体との間で自然の接着を得るために、該膜を形成するために疎水性特性を有するポリマー材料を使用すること、および疎水性特性を有する材料から作製される基体を使用することを包含する、方法。

30

【請求項 6】

膜を形成するためにポリジメチルシロキサン (PDMS) のようなポリマー材料を使用することを包含する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

酸素プラズマ処理のような処理によって膜のマイクロチャンネルまたはマイクログループおよびマイクロウェルを親水性にすることを包含する、先の請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

酸素プラズマ処理を適用する前に膜をガラス基体と接触させ、ガラス基体と接触している該膜の表面の疎水性特性を維持することを包含する、請求項 7 に記載の方法。

40

【請求項 9】

先の請求項のいずれかに記載の方法であって、該方法は、誘導結合型プラズマ反応性イオンエッチング (Inductive Coupled Plasma Reactive Ion Etching) (ICP RIE) によってシリコンマイクロモールドを得ることを包含し、該エッチングは 3 次元であり、少なくともマイクログループまたはマイクロチャンネルを形成するための第 1 エッチングおよびマイクロウェルを形成するための第 2 エッチングを必要とする、方法。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法であって、得られたシリコンマイクロモールドを CHF₃ プラズマ

50

処理に暴露して、得られたシリコンマイクロモールドの表面と該シリコンマイクロモールド中に成形される膜との間の接着を最小化することを包含する、方法。

【請求項 1 1】

先の請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法であって、マスクを通してそして中間現像なしに、少なくとも 2 回の連続する UV 暴露によってレジストマイクロモールドを得ることを包含し、第 1 の暴露はマイクログループを形成するための手段を規定し、第 2 の暴露は、第 2 のレジスト層をスピコートした後、マイクロウェルを形成するための手段を規定する、方法。

【請求項 1 2】

SU8 のようなレジストを使用することを包含する、請求項 1 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 3】

先の請求項のいずれかに記載の方法によって製造されるマイクロ流体構造。

【請求項 1 4】

ポリマー材料から作製され、少なくともマイクロウェルおよび該マイクロウェルを相互接続するマイクログループまたはマイクロチャンネルを含む膜を備え、該膜が 3 次元マイクロ構造を構成する点で特徴付けられる、請求項 1 3 に記載のマイクロ流体構造。

【請求項 1 5】

少なくとも 1 つの基体を備え、該基体の 1 つの表面が膜の表面に適用されている点で特徴付けられる、請求項 1 4 に記載のマイクロ流体構造。

【請求項 1 6】

前記膜がポリマー材料から作製される点で特徴付けられる、請求項 1 4 に記載のマイクロ流体構造。

20

【請求項 1 7】

前記構造が透明である点で特徴付けられる、請求項 1 5 に記載のマイクロ流体構造。

【請求項 1 8】

前記膜がポリジメチルシロキサンから作製される点で特徴付けられる、請求項 1 6 または 1 7 に記載のマイクロ流体構造。

【請求項 1 9】

請求項 1 4 ~ 1 8 のいずれかに記載のマイクロ流体構造であって、膜のマイクロウェルが $30 \mu\text{m} \sim 100 \mu\text{m}$ の寸法を有し、該膜が約 $40 \mu\text{m} \sim 300 \mu\text{m}$ の厚さを有し、マイクロチャンネルが $10 \mu\text{m} \sim 300 \mu\text{m}$ のサイズの長方形の断面を有し、そしてマイクロウェルの数が $100 \sim 10000 / \text{cm}^2$ の範囲で構成され得る点で特徴付けられる、マイクロ流体構造。

30

【請求項 2 0】

請求項 1 4 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載のマイクロ流体構造であって、該マイクロ流体構造について使用される材料が、生物学的物質および該マイクロ流体構造によって処理される生きている細胞と生体適合性であるか、または特定のコーティングによって適合性とされる点で特徴付けられる、マイクロ流体構造。

【請求項 2 1】

バイオチップを提供するための、請求項 1 3 ~ 2 0 のいずれかに記載のマイクロ流体構造の使用。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、マイクロ流体構造（特にバイオチップ）を製造する方法および該方法によって得られた構造に関する。

【0002】

生物学的測定または顕微操作のためのマイクロマシン構造およびマイクロエレクトロニクスを統合するための生物学的および医学研究共同体に関する興味が増加している。生物学的アッセイにおける細胞の迅速な分離および単離のためのマイクロ構造は、研究室および

50

製薬産業にとって非常に興味深い。例えば、神経培養物の場合、ニューロンの制御された誘導 (guidance) は、複雑な発達する神経ネットワークの研究および理解のためのバイオチップの望ましい特徴である。

【0003】

新しい分野のマイクロフルイディックスは、少量の生物学的材料および化学薬品を取り扱うための、安価な、生物学的適合性の、かつ使い捨ての道具を提供する際に、生物工学産業についての恩恵であることが分かっている。マイクロ流体構造は、PCRおよびキャピラリー電気泳動セル操作のような技術において必須となっている。これらのマイクロ流体ツールはしばしば、チャンネルが代表的にはマイクロモールディング (micromoulding) を介して作製されそしてガラス基体上に配置されるポリジメチルシロキサン (PDMS) の改変物を使用して作製される。しかし、これらの構造はしばしば、入口および出口末端を有する二次元に限定された閉鎖構造である。いくつかのより複雑なマルチレベル構造は、多数の層のマイクロフルイディックスを積み重ねることを介して作製され得るが、これらはしばしば整列するのが難しく、本当のマイクロ規模のアラインメントを提供しない。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の目的は、新しいマイクロ流体構造 (特にバイオチップ) (このマイクロ流体構造は3次元形状を有する) を着想することである。

【課題を解決するための手段】

20

【0005】

この目的に対して、本発明は、マイクロ流体構造、特にバイオチップを製造する方法を提供し、この方法は、少なくとも以下を包含する：

- 少なくともマイクロウェルおよび該マイクロウェルを相互接続するマイクログループ (micro-grooves) またはマイクロチャンネルを含む3次元形状を規定するための手段を用いて3次元マイクロモールド (micro-mould) を製造すること；及び
- ポリマー材料から作製される膜を成形するための該3次元マイクロモールドのみを使用すること (該膜は、少なくとも該マイクロウェルおよび該マイクログループまたはマイクロチャンネルを組み込み、該膜は、3次元マイクロ流体構造を構成する)。

【0006】

30

別の実施形態において、この方法は、基体によって3次元マイクロ流体構造を完成し、該基体の1つの表面が膜の1つの表面に適用されることを包含する。

【0007】

特に、該方法は、以下を包含する：

- マイクロウェルおよびマイクログループを規定するための手段を少なくとも含む、3次元形状を規定するための手段を用いて、3次元マイクロモールドを製造すること、
- ポリマー材料から作製される膜を成形するための3次元マイクロモールドのみを使用すること (ここで、該マイクロウェルは膜を横切り、該マイクログループは1つの膜表面上に位置し、かつ該マイクロウェルを相互接続する)、および
- 該マイクロウェルの1つの自由端 (free end) を閉じそしてマイクログループを閉じて、該マイクロウェルを相互接続する埋め込まれたチャンネルを形成するために、該膜の1つの表面および基体の1つの表面を接触させること。

40

【0008】

例としては、該方法は、1つの膜表面上に位置する、該膜を横切るマイクロウェルおよびマイクログループを有する膜を形成するために、マイクロモールドと該マイクロモールドの上にプレスされたプレートとの間にポリマー材料を注入すること、ならびに約1時間約70の温度で該ポリマー材料をベーキングすることを包含する。

【0009】

有利には、該方法は、膜と基体との間で自然の接着を得るために、該膜を形成するために疎水性特性を有するポリマー材料を使用すること、および疎水性特性を有する材料から作

50

製される基体を使用することを包含する。

【0010】

例としては、該方法は、膜を形成するためにポリジメチルシロキサン(PDMS)のようなポリマー材料を使用することを包含する。

【0011】

有利には、該方法は、酸素プラズマ処理のような処理によって膜のマイクロチャネルまたはマイクログループおよびマイクロウェルを親水性にすることを包含する。

【0012】

特に該方法は、酸素プラズマ処理を適用する前に膜をガラス基体と接触させ、ガラス基体と接触する該膜の表面の疎水性特性を維持することを包含する。

10

【0013】

第1の実施形態において、該方法は、誘導結合型プラズマ反応性イオンエッチング(ICP-RIE)によってシリコンマイクロモールドを得ることを包含し、該エッチングは3次元であり、少なくともマイクログループまたはマイクロチャネルを形成するための第1エッチングおよびマイクロウェルを形成するための第2エッチングを必要とする。

【0014】

有利には、前記第1の実施形態において、該方法は、得られたシリコンマイクロモールドの表面と該シリコンマイクロモールド中に成形される膜との間の接着を最小化するために、得られたシリコンマイクロモールドをCHF₃プラズマ処理に暴露することを包含する。

20

【0015】

第2の実施形態において、該方法は、マスクを通してそして中間現像なしに、少なくとも2回の連続するUV暴露によってレジストマイクロモールドを得ることを包含し、第1暴露はマイクログループを形成するための手段を規定し、第2の暴露は、第2のレジスト層をスピニングした後、マイクロウェルを形成するための手段を規定する。

【0016】

有利には、前記第2の実施形態において、前記方法は、SU8のようなレジストを使用することを包含する。

【0017】

本発明はまた、本発明に従う方法によって得られるような3次元マイクロ流体構造に関する。

30

【0018】

マイクロマシニングバイオチップの3次元構造マイクロ流体膜への組み合わせは、最小数百のウェルのアレイ中で、センシングもしくは操作目的のための高度に並行化したバイオマイクロシステム(これは単一細胞または小グループの生存細胞を単離し得る)を導く。これらのいわゆる細胞バイオチップは、工業または研究について非常に興味深い。

【0019】

特に、本発明は、多数の並行操作が生きている細胞に対して保持される必要のある際に有用である。マイクロ流体チャネルの手段によって地下接続される、提案された3次元マイクロ流体構造(これはマイクロウェルのアレイ中で細胞を整列する)は、以下の用途を有し得る：

40

- 高度に並行化した技術が絶対的に必要である薬理学および高出力スクリーニング；3次元マイクロ流体構造において、単一細胞を含むオープンウェルは、製薬産物(ごく少数の速く高度に並行化した産物)のアドレスを可能にする地下マイクロ流体ネットワークに接続されている、

- 遺伝子移入(現在では、トランスフェクション技術は効率的ではなく、本発明の細胞チップは、鍵となるデバイスであり得、これは、トランスフェクションの分析および最適化のためのアレイとして単一細胞を単離し得る)、

- エキソピボ(ex-vivo)培養物および誘導されたニューロンの成長(基礎研究のための)、ならびに

50

- 細胞バイオセンサー（細胞に対する環境効果および汚染効果の測定）。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

本発明の1つの実施形態に従う3次元マイクロ流体構造1は、図1に示される。

【0021】

3次元マイクロ流体構造1は、少なくとも膜3および基体5によって形成される。膜3は、少なくとも前記膜3を横断する垂直なマイクロウェル7のアレイ、および膜表面の少なくとも1つの上に位置しそして前記マイクロウェル7の少なくともいくつかを相互接続する縦のマイクログループ9を組み込む。

【0022】

3次元マイクロ流体構造1は、第1または第2の技術に従って成形することによって直接得られる。

【0023】

第1の技術は、深いプラズマエッチング（ICP RIE 誘導結合型プラズマ反応性イオンエッチング）の手段によって、シリコンマイクロモールドを得ることを可能にする。このエッチングは、3次元である必要があり、少なくとも2レベルのエッチングが必要である：マイクロチャネルについて1つおよびオープンウェルについて1つ。

【0024】

有利には、3次元マイクロ流体構造の表面は、得られたマイクロモールドの表面と成形されるマイクロ膜との間の接着を最小にするために、炭素ポリマー(carbonic polymer)（これは、表面をCHF₃プラズマに暴露する手段によって得られる）によってカバーされる。

【0025】

第2の技術は、厚いレジストモールドを得ることを可能にし、使用されるレジストは、例えばSU8である。一般に、少なくとも2つの連続するUV暴露が、マスクを通して、中間現像なしで必要とされ、膜の3次元形状を規定するのを可能にする。具体的には、少なくとも第1の暴露はマイクロチャネル形状を規定し、第2の暴露は、第2レジスト層をスピニングした後、マイクロウェルの形状を規定することを可能にする。2つの形状間のアラインメントは、連続する層のレジストを現像することなく作製され得る：確かに、UV暴露は、暴露されたレジストの屈折率を変化させ、このように暴露された表面は可視性となる。より複雑な構造が連続する層のスピニングおよびUV暴露によって得られ得る。次いで、マイクロモールドの全体の形状は、特定の現像機で現像される。

【0026】

特に、該方法は、基体13の表面上にSU8の第1層11をスピニングするために、図2aに示されるような第1工程を包含する。この第1層11の厚さは、約20μm~300μmであり、この厚さは、スピニング操作の速度および期間によって規定される。次いで、第1層11はベークされる。

【0027】

図2bに示される第2工程において、第1レジスト層11は、少なくともマイクログループ9の形状9aを規定するために、マスクを通して（示されていない）UV暴露に供される。

【0028】

図2cに示される第3工程において、第1層11を現像することなく、第2レジスト層15は、第1層11上にスピニングされる。第2層15の厚さはまた、このスピニング操作のスピードおよび期間によって規定され、この厚さは約20μm~300μmである。次いで、第2層15はベークされる。

【0029】

図2dに示される第4工程において、第2レジスト層15は、少なくともマイクロウェル7の形状7aを規定するためにマスクを通して（示されていない）UV暴露に供される。

【0030】

10

20

30

40

50

図 2 e に示される最終工程において、構造は、縦のマイクログループ 9 および垂直のマイクロウェル 7 を規定するための手段を含む 3 次元マイクロモールド 20 を得るために、それ自体公知の様式で現像される。層 11 と 15 との間のアラインメントは、顕微鏡 (microscopy) によって可視となる暴露表面の屈折率の変化に起因して実施される。

【0031】

次いで、3次元マイクロモールド 20 (これは、提供される 2 つの方法の 1 つによって得られる) は、疎水性特性を有するポリジメチルシロキサン (PDMS) のようなポリマー材料から作製される膜を成形するために使用される。このポリマー (PDMS) は、モールドとポリアクリル板 (これはモールド構造の上にプレスされる) との間に注入される。1 時間 70 のベーキング後、膜が形成される: マイクロウェルは膜を横切り、そしてマイクロチャネルは 1 つの膜表面上に形成される。

10

【0032】

第 1 の実施形態において、マイクロモールド膜は、3次元マイクロ流体構造を構成し得る。

【0033】

第 2 の実施形態において、図 1 に示されるように、マイクロモールド膜 3 は、基体 5 と結合している。

【0034】

例としては、基体 5 は、マイクロコンダクタ 24 を介して電子回路に接続される少なくともマイクロ電極 22 を備える電子チップによって構成され得る。マイクロ電極 22 は金製 (golded) であり得、有利には、基体 5 は、疎水性特性を有する材料から作製される。

20

【0035】

膜は、顕微鏡下で電子チップに直接配置され、その結果、マイクロウェルは、電子チップの電極上に整列され得る。膜および電子チップは、これらの疎水性特性に起因して、共に接着する。

【0036】

有利には、マイクロコンダクタ 24 および基体 5 は、顕微鏡を介してマイクロ流体構造を可視化し得るように、透明である。例えば、基体 5 は、ガラス板によって形成され、そしてマイクロコンダクタ 24 は ITO 製である。

【0037】

一般に、材料は、マイクロ流体構造と、生物学的物質およびマイクロ流体構造によって処理される生きている細胞との生体適合性を保証するように選択される。使用される材料が生体適合性の条件を満たしていない場合、この材料は、すなわち、適切なコーティングに従って処理される。

30

【0038】

マイクロウェルおよびマイクロチャネルは、マイクロウェルに細胞が侵入するのを可能にするために、そして水溶性の生化学的化合物がマイクロチャネルに侵入するのを可能にするために、親水性にされる必要がある。一方、電子チップに面するマイクロ膜表面は、両方の表面間の接着を維持するために、その疎水性特性を維持する必要がある。例えば、酸素プラズマ処理は膜に適用され、これがガラス基体 (電子チップ基体と異なる) にくっつくのを維持する: プラズマは浸透し、マイクロウェルおよびマイクロチャネルの特性を改変し、これらの表面を親水性にする。

40

【0039】

一般には、本発明に従う方法によって得られる 3 次元マイクロ流体構造において、膜のマイクロウェルは、 $30\ \mu\text{m} \sim 100\ \mu\text{m}$ の寸法を有し、膜は約 $40\ \mu\text{m} \sim 300\ \mu\text{m}$ の厚さを有する。さらに、マイクロチャネルは、 $10\ \mu\text{m} \sim 300\ \mu\text{m}$ のサイズの長方形の断面を有し、マイクロウェルの数は、 $100 \sim 10000 / \text{cm}^2$ の範囲で含まれ得る。

【図面の簡単な説明】

【0040】

本発明の他の特徴、利点、および詳細は、純粹に例として与えられる添付の図面を参照し

50

て、上記の説明の記載から明らかである。

【図1】図1は、本発明の方法に従って製造された3次元マイクロ流体構造の断片的な斜視図である。

【図2】図2 a ~ 2 e は、好ましい実施形態に従う該方法を例示するための概略図である。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
19 December 2002 (19.12.2002)

PCT

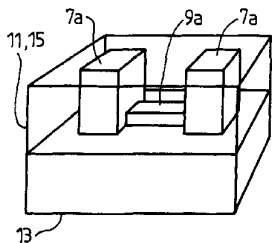
(10) International Publication Number
WO 02/100542 A1

- (51) International Patent Classification: **B01L 3/00**
 - (21) International Application Number: PCT/EP01/07058
 - (22) International Filing Date: 8 June 2001 (08.06.2001)
 - (25) Filing Language: English
 - (26) Publication Language: English
 - (71) Applicant (for all designated States except US): **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).
 - (72) Inventors; and
 - (75) Inventors/Applicants (for US only): **LE PLOUFLE, Bruno** [FR/FR]; 88, rue du Moulin Vert, F-75014 Paris (FR). **FUJITA, Horoyuki** [JP/JP]; 9-14 Senkawa 1-chome, Toshima-ku, Tokyo 1711-0041 (JP). **TAMIVA, Eiichi** [JP/JP]; School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology, Tatsunokuchi, Ishikawa 923-1292 (JP). **GRISCOM, Laurent** [FR/FR]; 50, rue de Paris, F-35000 Rennes (FR). **DEGENAAR, Patrick** [NL/JP]; Bld 5-503, Jaist dormitory, Jaist, 1-8 Asahidai, Tatsunokuchi, Nomi-gun, Ishikawa 923-1211 (JP).
 - (74) Agent: **CABINET ORES**; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).
 - (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, 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, MY, NZ, NI, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
 - (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: — with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/100542 A1

(54) Title: METHOD OF MANUFACTURING A MICROFLUIDIC STRUCTURE, IN PARTICULAR A BIOCHIP, AND STRUCTURE OBTAINED BY SAID METHOD



(57) Abstract: A method of manufacturing a microfluidic structure, in particular a biochip, said method consisting at least in: manufacturing a three-dimensional micro-mould with means for defining a three-dimensional geometry including at least micro-wells and micro-grooves or micro-channels interconnecting said micro-wells; and in using only said three-dimensional micro-mould for molding a membrane made of a polymer material, said membrane incorporating at least said micro-wells and said micro-grooves or micro-channels, said membrane constituting a three-dimensional microfluidic structure.

METHOD OF MANUFACTURING A MICROFLUIDIC STRUCTURE, IN PARTICULAR A BIOCHIP, AND STRUCTURE OBTAINED BY SAID METHOD

5 The present invention relates to a method of manufacturing a microfluidic structure, in particular a biochip, and to a structure obtained by said method.

10 There is increasing interest in the biological and medical research community to integrate micromachined structures and microelectronics for biological measurements or micromanipulation. Microstructures for rapid separation and isolation of cells in biological assays are of great interest for research laboratories and pharmaceutical industry. For instance, in the case of neural cultures, controlled guidance of neurons is a desired feature of a biochip for the research and understanding of complex developing neural networks.

15 The new field of microfluidics is turning out to be a boon for the biotech industry in providing inexpensive, biologically compatible and disposable tools for handling small quantities of biological materials and chemicals. Microfluidic structures have become essential in techniques such as PCR and capillary electrophoretic cell manipulation. These microfluidic tools are often made using a variant of poly-dimethylsiloxane (PDMS) in which the channels are typically made through micromoulding and placement on a glass substrate. These structures, however, are often closed structures limited to two dimensions with an input and an output end. Some more complex multi level structures can be made through stacking multiple layers of microfluidics, but these are often difficult to align and do not offer truly micro scale alignment.

25 An object of the invention is to conceive a new microfluidic structure, in particular a biochip, said microfluidic structure having a three-dimensional geometry.

To this end, the invention provides a method of manufacturing a microfluidic structure, in particular a biochip, said method consisting at least :

- in manufacturing a three-dimensional micro-mould with means for defining a three-dimensional geometry including at least micro-wells and micro-grooves or micro-channels interconnecting said micro-wells ; and

- 5 a membrane made of a polymer material, said membrane incorporating at least said micro-wells and said micro-grooves or micro-channels, said membrane constituting a three-dimensional microfluidic structure.

In another implementation, the method consists in completing the three-dimensional microfluidic structure by a substrate, one face of the substrate being applied on one face of the membrane.

In particular, the method consists :

- in manufacturing said three dimensional micro-mould with means for defining a three-dimensional geometry including at least means for defining micro-wells and micro-grooves,

- 15 - in using only said three-dimensional micro-mould for molding a membrane made of polymer material, where the micro-wells are crossing the membrane, and the micro-grooves are located on one of the membrane faces and interconnecting said micro-wells, and

20 - in setting into contact said one face of the membrane and one face of the substrate in order to close one free end of the micro-wells, and to close the micro-grooves to form embedded channels interconnecting said micro-wells.

By way of example, the method consists in injecting the polymer material between the micro-mould and a plate pressed onto the top of the micro-mould, and in baking the polymer material at a temperature of about 70°C during approximatively one hour, in order to form said membrane with said micro-wells crossing the membrane and said micro-grooves located on one of the membrane faces.

Advantageously, the method consists in using a polymer material having hydrophobic properties to form the membrane, and in using a substrate made of a material having also hydrophobic properties, in order to obtain a natural adherence between the membrane and the substrate.

By way of example, the method consists in using a polymer material such as a polydimethylsiloxane (PDMS) to form the membrane.

Advantageously, the method consists in rendering hydrophilic the micro-wells and the micro-grooves or the micro-channels of the membrane by a treatment such as an oxygen plasma treatment.

In particular, the method consists in setting in contact said membrane with a glass substrate before applying the oxygen plasma treatment, the face of the membrane in contact with the glass substrate keeping its hydrophobic properties.

In a first implementation, the method consists in obtaining a silicon micro-mould by an Inductive Coupled Plasma Reactive Ion Etching (ICP RIE), said etching being tri-dimensional and requiring at least a first etching to form the micro-grooves or micro-channels and a second etching to form the micro-wells.

Advantageously, in said first implementation, the method consists in exposing the obtained silicon micro-mould to a CHF₃ plasma treatment in order to minimize the adherence between the surface of the obtained silicon micro-mould and the membrane to be molded in said silicon micro-mould.

In a second implementation, the method consists in obtaining a resist micro-mould by at least two successive UV exposures through a mask and without intermediate developing, the first exposure defining means for forming the micro-grooves and the second exposure, after spin-coating a second resist layer, defining means for forming the micro-wells.

Advantageously, in said second implementation, said method consists in using a resist such as a SU8.

The invention relates also to a three-dimensional microfluidic structure as obtained by the method according to the invention.

Combination of micromachined biochips to three-dimensional structured microfluidic membranes will lead to highly parallelised bio-microsystems, capable to isolate single cells, or small groups of living cells, in an array of minimum several hundreds of wells, for sensing or manipulation purposes. These so called cell-biochips have great interest for industry or for the research.

In particular, the invention is useful where a great number of parallel manipulations have to be held on living cells. The proposed three-dimensional microfluidic structure, arranging cells in an array of micro-wells, underground-connected by means of microfluidic channels may have applications for:

- 5 - Pharmacology and high output screening where highly parallelized techniques are absolutely necessary ; in the three-dimensional microfluidic structure, the open wells containing single cells are connected to underground microfluidic network which permits the addressing of pharmaceuticals products (very few products, fast, highly parallelized),
- 10 - Gene transfer, as nowadays transfection techniques are not efficient, and the cell-chip of the invention could be a key device, being capable to isolate single cells as an array for analysis and optimization of the transfection,
- ex-vivo culture and guided growth of neurons, for fundamental research, and
- 15 - cell bio-sensors (measurement of environment effects and pollution effects on cells).

Other characteristics, advantages, and details of the invention appear from the following explanatory description with reference to the accompanying drawings, given purely by way of example, and in which :

- 20 - Figure 1 is fragmentary perspective view of a three-dimensional microfluidic structure manufactured according to the method of the invention, and
- Figure 2a to 2e are schematic views for illustrating the method of the invention according to a preferred implementation.

A three-dimensional microfluidic structure 1 according to one embodiment of the invention is illustrated on figure 1.

The three-dimensional microfluidic structure 1 is formed by at least a membrane 3 and a substrate 5. The membrane 3 incorporates at least an array of vertical micro-wells 7 crossing said membrane 3, and longitudinal micro-grooves 9 located on one of the membrane faces and interconnecting at least some of said micro-wells 7.

This three-dimensional microfluidic structure 1 is directly obtained by molding according to a first or second technique.

The first technique permits to obtain a silicon micro-mould, by means of deep plasma etching (ICP RIE Inductive Coupled Plasma Reactive Ion Etching). The etching has to be tri-dimensional, and at least two-levels etching are required: one for the micro-channels and one for the open wells.

Advantageously, the surface of the three-dimensional microfluidic structure is covered by a carbonic polymer, obtained by means of exposing the surface to a CHF₃ plasma, in order to minimize the adherence between the surface of the obtained micro-mould and the micro-membrane to be molded.

The second technique permits to obtain a thick resist mould, the resist used being SU8 for example. In general, at least two successive UV exposures are required through a mask, without any intermediate developing, permit to define the three-dimensional geometry of the membrane. Concretely, at least a first exposure permits to define the geometry of the micro-channels, and a second exposure, after spin-coating a second resist layer, permits to define the geometry of the micro-wells. The alignment between the two geometries can be made without developing the resist of successive layers: indeed the UV exposure changes the refraction index of exposed resist, the exposed surfaces becoming thus visible. A more complex structure could be obtained by spin-coating and UV exposing of successive layers. The total geometry of the micro-mould is then developed in a specific developer.

In particular, the method consists in a first step as illustrated on figure 2a, to spin-coat a first layer 11 of SU8 on a face of a substrate 13. The thickness of this first layer 11 is of about 20µm to 300µm, this thickness being defined by the speed and the duration of the spin-coating operation. The first layer 11 is then baked.

In a second step as illustrated on figure 2b, the first resist layer 11 is submitted to a UV exposure through a mask (not represented) to define at least the geometry 9a of the micro-grooves 9.

In a third step as illustrated on figure 2c, without developing the first layer 11, a second resist layer 15 is spin-coated on the first layer 11. The thickness of the second layer 15 is also defined by the speed and the duration of this spin-coating

WO 02/100542

6

PCT/EP01/07058

operation, the thickness being of about 20 μ m to 300 μ m. The second layer 15 is then baked.

In a fourth step as illustrated on figure 2d, the second resist layer 15 is submitted to a UV exposure through a mask (non represented) for defining at least the geometry 7a of the micro-wells 7.

In a final step as illustrated on figure 2e, the structure is developed in a manner known per se to obtain a three-dimensional micro-mould 20 including means for defining longitudinal micro-grooves 9 and vertical micro-wells 7. The alignment between the layers 11 and 15 is performed owing to the change of the refractive index of the exposed surfaces which become visible by microscopy.

The three-dimensional micro-mould 20, obtained by one of the two methods presented, is then used to mould a membrane made of a polymer material, such as a polydimethylsiloxane (PDMS) having hydrophobic properties. The polymer (PDMS) is injected between the mould and a polyacrylic plate, pressed onto the top of the mould structure. After one hour of 70°C baking, the membrane is formed: micro-wells are crossing the membrane, and micro-channels are formed on one of the membrane faces.

In a first embodiment, the micro-molded membrane can constitute a three-dimensional microfluidic structure.

In a second embodiment, as illustrated on figure 1, the micro-molded membrane 3 is associated with the substrate 5.

By way of example, the substrate 5 can be constituted by an electronic chip comprising at least micro-electrodes 22 which are connected to an electronic circuitry through micro-conductors 24. The micro-electrodes 22 can be golded and, advantageously, the substrate 5 is made of a material having hydrophobic properties.

The membrane is directly placed onto the electronic chip, under a microscope, so that micro-wells can be aligned onto the electrodes of the electronic-chip. The membrane and the electronic-chip adhere together due to their hydrophobic properties.

Advantageously, the micro-conductors 24 and the substrate 5 are transparent, in order to be able to visualize the microfluidic structure through microscopy. For instance, the substrate 5 is formed by a glass plate, and the micro-conductors 24 are in ITO.

5 In general, the materials are chosen in order to ensure the biocompatibility of the microfluidic structure with biological substances and living cells to be treated by the microfluidic structure. If the materials used do not satisfy the condition of biocompatibility, said materials are treated accordingly, i.e. with an appropriate coating.

10 Micro-wells and micro-channels have to be rendered hydrophilic, in order to permit to cells to enter into the micro-wells, and to permit to aqueous bio-chemical compounds to enter into the micro-channels. In the other hand, the micro-membrane surface facing the electronic chip has to keep its hydrophobic properties in order to keep adherence between both surfaces. For example, an oxygen
15 plasma treatment is applied to the membrane while maintaining this one stuck onto a glass substrate (different to the electronic chip substrate): the plasma penetrates and modifies the properties of micro-wells and micro-channels, rendering their surfaces hydrophilic.

In general, in a three-dimensional microfluidic structure obtained by
20 the method according to the invention, the micro-wells of the membrane have dimensions varying from 30 μm to 100 μm , the membrane has a thickness of about 40 μm to 300 μm . Furthermore, the micro-channels have a rectangular section with sizes vary from 10 μm to 300 μm , and the number of micro-wells can be comprised in a range of 100 to 10 000 / cm^2 .

25

CLAIMS

1. A method of manufacturing a microfluidic structure, in particular a biochip, said method consisting at least :
- 5 - in manufacturing a three-dimensional micro-mould with means for defining a three-dimensional geometry including at least micro-wells and micro-grooves or micro-channels interconnecting said micro-wells ; and
- in using only said three-dimensional micro-mould for molding a membrane made of a polymer material, said membrane incorporating at least said
- 10 micro-wells and said micro-grooves or micro-channels, said membrane constituting a three-dimensional microfluidic structure.
2. A method according to claim 1, consisting in completing the three-dimensional microfluidic structure by a substrate one face thereof being applied on one face of the membrane.
- 15 3. A method according to claim 2, consisting :
- in manufacturing said three dimensional micro-mould with means for defining a three-dimensional geometry including at least means for defining micro-wells and micro-grooves,
- in using only said three-dimensional micro-mould for molding
- 20 a membrane made of polymer material, where the micro-wells are crossing the membrane, and the micro-grooves are located on one of the membrane faces and interconnecting said micro-wells, and
- in setting into contact said one face of the membrane and one face of the substrate in order to close one free end of the micro-wells, and to close the
- 25 micro-grooves to form embedded channels interconnecting said micro-wells.
4. A method according to any of the preceding claims, consisting in injecting the polymer material between the micro-mould and a plate pressed onto the top of the micro-mould, and in baking the polymer material at a temperature of about 70°C during approximatively one hour, in order to form said membrane with said
- 30 micro-wells crossing the membrane and said micro-grooves on one of the membrane faces.

5. A method according to any of the preceding claims, consisting in using a polymer material having hydrophobic properties to form the membrane, and in using a substrate made of a material having also hydrophobic properties, in order to obtain a natural adherence between the membrane and the substrate.
- 5 6. A method according to claim 5, consisting in using a polymer material such as a polydimethylsiloxane (PDMS) to form the membrane.
7. A method according to any of the preceding claims, consisting in rendering hydrophilic the micro-wells and the micro-grooves or the micro-channels of the membrane by a treatment such as an oxygen plasma treatment.
- 10 8. A method according to claim 7, consisting in setting in contact said membrane with a glass substrate before applying the oxygen plasma treatment, the face of the membrane in contact with the glass substrate keeping its hydrophobic properties.
- 15 9. A method according to any of the preceding claims, consisting in obtaining a silicon micro-mould by an Inductive Coupled Plasma Reactive Ion Etching (ICP RIE), said etching being tri-dimensional and requiring at least a first etching to form the micro-grooves or micro-channels and a second etching to form the micro-wells.
- 20 10. A method according to claim 9, consisting in exposing the obtained silicon micro-mould to a CHF₃ plasma treatment in order to minimize the adherence between the surface of the obtained silicon micro-mould and the membrane to be molded in said silicon micro-mould.
- 25 11. A method according to any of the preceding claims 1 to 8, consisting in obtaining a resist micro-mould by at least two successive UV exposures through a mask and without intermediate developing, the first exposure defining means for forming the micro-grooves and the second exposure, after spin-coating a second resist layer, defining means for forming the micro-wells.
- 30 12. A method according to claim 11, consisting in using a resist such as a SU8.
13. A microfluidic structure as manufactured by the method according to any of the preceding claims.

14. A microfluidic structure according to claim 13, characterized in that it comprises at least a membrane made of a polymer material and including at least micro-wells and micro-grooves or micro-channels interconnecting said micro-wells, said membrane constituting a three-dimensional micro-structure.
- 5 15. A microfluidic structure according to claim 14, characterized that it comprises also at least a substrate, one surface of said substrate being applied on a surface of the membrane.
16. A microfluidic structure according to claim 14, characterized in that said membrane is made of a polymer material.
- 10 17. A microfluidic structure according to claim 15, characterized in that said structure is transparent.
18. A microfluidic structure according to claim 16 or 17, characterized in that said membrane is made of a polydimethylsiloxane.
- 15 19. A microfluidic structure according to any of claims 14 to 18, characterized in that the micro-wells of the membrane have dimensions varying from 30 μm to 100 μm , in that the membrane has a thickness of about 40 μm to 300 μm , in that the micro-channels have a rectangular section which sizes vary from 10 μm to 300 μm , and in that the number of micro-wells can be comprised in a range of 100 to 10 000/cm².
- 20 20. A microfluidic structure according to anyone of the claims 14 to 19, characterized in that the material(s) used for the microfluidic structure is biocompatible or rendered compatible by a specific coating, with the biological substances and living cells to be treated by said microfluidic structure.
- 25 21. The use of a microfluidic structure according to any of claims 13 to 20 to provide a biochip.

WO 02/100542

1/1

PCT/EP01/07058

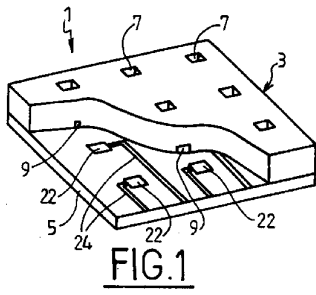


FIG. 1

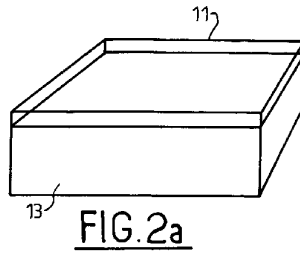


FIG. 2a

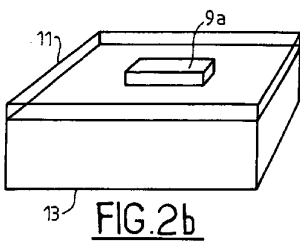


FIG. 2b

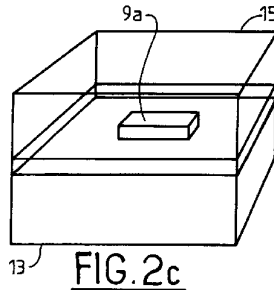


FIG. 2c

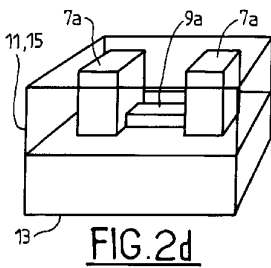


FIG. 2d

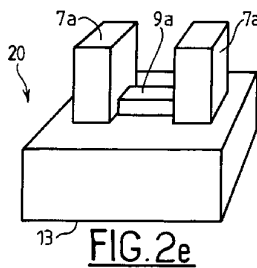


FIG. 2e

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【手続補正書】

【提出日】平成15年5月16日(2003.5.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

マイクロ流体構造、特にバイオチップを製造する方法であって、該方法は、以下を包含する：

- 少なくともマイクロウェルおよび該マイクロウェルを相互接続するマイクログループ(micro-grooves)またはマイクロチャンネルを含む3次元形状を規定するための手段を用いて3次元マイクロモールド(micro-mould)を製造すること；および
- ポリマー材料から作製される膜を直接成形するための該3次元マイクロモールドを使用すること(該膜は、少なくとも該膜を横断するマイクロウェルおよび該1つの膜表面上に少なくともいくつかのマイクロウェルを相互接続する該マイクログループまたはマイクロチャンネルを組み込み、該膜は、 $100 \sim 10000 / \text{cm}^2$ の範囲にある多数のマイクロウェルを有する3次元マイクロ流体構造を構成する)。

【請求項2】

基体によって3次元マイクロ流体構造を完成し、該基体の1つの表面が膜の1つの表面に適用されることを包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

以下を包含する、請求項2に記載の方法：

- マイクロウェルおよびマイクログループを規定するための手段を少なくとも含む、3次元形状を規定するための手段を用いて、前記3次元マイクロモールドを製造すること、
- ポリマー材料から作製される膜を成形するための前記3次元マイクロモールドのみを使用すること(ここで該マイクロウェルは膜を横切り、該マイクログループは1つの膜表面上に位置し、かつ該マイクロウェルを相互接続する)、及び
- 該マイクロウェルの1つの自由端(free end)を閉じそしてマイクログループを閉じて、該マイクロウェルを相互接続する埋め込まれたチャンネルを形成するために、該膜の1つの表面および基体の1つの表面を接触させること。

【請求項4】

先の請求項のいずれかに記載の方法であって、1つの膜表面上に、該膜を横切るマイクロウェルおよびマイクログループを有する膜を形成するために、マイクロモールドと該マイクロモールド上にプレスされたプレートとの間にポリマー材料を注入すること、および約1時間、約70の温度で該ポリマー材料をベーキングすることを包含する、方法。

【請求項5】

先の請求項のいずれかに記載の方法であって、膜と基体との間で自然の接着を得るために、疎水性特性を有するポリマー材料を使用することを包含する、方法。

【請求項6】

膜を形成するためにポリジメチルシロキサン(PDMS)のようなポリマー材料を使用することを包含する、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

酸素プラズマ処理のような処理によって膜のマイクロチャンネルまたはマイクログループおよびマイクロウェルを親水性にすることを包含する、先の請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項8】

酸素プラズマ処理を適用する前に膜をガラス基体と接触させ、ガラス基体と接触している該膜の表面の疎水性特性を維持することを包含する、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

先の請求項のいずれかに記載の方法であって、該方法は、誘導結合型プラズマ反応性イオンエッチング (Inductive Coupled Plasma Reactive Ion Etching) (ICP RIE) によってシリコンマイクロモールドを得ることを包含し、該エッチングは3次元であり、少なくともマイクログループまたはマイクロチャネルを形成するための第1エッチングおよびマイクロウェルを形成するための第2エッチングを必要とする、方法。

【請求項 10】

請求項9に記載の方法であって、得られたシリコンマイクロモールドをCHF₃プラズマ処理に暴露して、得られたシリコンマイクロモールドの表面と該シリコンマイクロモールド中に成形される膜との間の接着を最小化することを包含する、方法。

【請求項 11】

先の請求項1~8のいずれかに記載の方法であって、マスクを通してそして中間現像なしに、少なくとも2回の連続するUV暴露によってレジストマイクロモールドを得ることを包含し、第1の暴露はマイクログループを形成するための手段を規定し、第2の暴露は、第2のレジスト層をスピコートした後、マイクロウェルを形成するための手段を規定する、方法。

【請求項 12】

先の請求項のいずれかに記載の方法によって製造されるマイクロ流体構造。

【請求項 13】

ポリマー材料から作製され、少なくともマイクロウェルおよび該マイクロウェルを相互接続するマイクログループまたはマイクロチャネルを含む膜を備え、該膜が3次元マイクロ構造を構成する点で特徴付けられる、請求項12に記載のマイクロ流体構造。

【請求項 14】

少なくとも1つの基体を備え、該基体の1つの表面が膜の表面に適用されている点で特徴付けられる、請求項13に記載のマイクロ流体構造。

【請求項 15】

前記膜がポリマー材料から作製される点で特徴付けられる、請求項13に記載のマイクロ流体構造。

【請求項 16】

前記構造が透明である点で特徴付けられる、請求項14に記載のマイクロ流体構造。

【請求項 17】

前記膜がポリジメチルシロキサンから作製される点で特徴付けられる、請求項15または16に記載のマイクロ流体構造。

【請求項 18】

請求項13または17のいずれかに記載のマイクロ流体構造であって、膜のマイクロウェルが30 μm ~ 100 μmの寸法を有し、該膜が約40 μm ~ 300 μmの厚さを有し、マイクロチャネルが10 μm ~ 300 μmのサイズの長方形の断面を有し、そしてマイクロウェルの数が100 ~ 10000 / cm²の範囲で構成され得る点で特徴付けられる、マイクロ流体構造。

【請求項 19】

請求項13 ~ 18のいずれか1項に記載のマイクロ流体構造であって、該マイクロ流体構造について使用される材料が、生物学的物質および該マイクロ流体構造によって処理される生きている細胞と生体適合性であるか、または特定のコーティングによって適合性とされる点で特徴付けられる、マイクロ流体構造。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/07058
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 B01L3/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched: (classification system followed by classification symbols) IPC 7 B01L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are excluded 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, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	P. DEGENAAR ET AL.: "A method of micrometer resolution patterning of primary culture neurons for SPM Analysis" "Online!" 12 April 2001 (2001-04-12), THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY XP002183338 130 Retrieved from the Internet: <URL: http://jb.bcasj.or.jp/130-3/3faaodtx.htm> "retrieved on 2001-11-16!" page 369 -page 370 ---	1-6, 11-21
Y	---	7,8
X	DE 199 48 087 A (EVOTEC BIOSYSTEMS AG) 3 May 2001 (2001-05-03) column 3, line 6 -column 4, line 66 column 5, line 5 - line 9 column 8, line 20 - line 32 claims; figures 1,9 --- -/--	1-3,5,6, 13-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 ** 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 *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
22 November 2001		06/12/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3010		Authorized officer Jochheim, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 01/07058

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 6 039 897 A (YAGER PAUL ET AL) 21 March 2000 (2000-03-21) claim 1; figures 1A,1B,1C; example 1 -----	1-3,5,6, 13-21
X	US 5 932 315 A (LUM PAUL ET AL) 3 August 1999 (1999-08-03) claim 11; figure 3 -----	1-3,5, 13-17, 19-21
X	WO 00 60352 A (WHATMAN INTERNATIONAL PLC ;BUTT NEIL (GB); JONES PETER (GB); SUTTO) 12 October 2000 (2000-10-12) page 1, paragraph 4 -page 2, paragraph 1 page 5, paragraph 3 page 16, paragraph 3 -page 17, paragraph 1 claim 1; figures 4,6 -----	1-6, 13-21
Y	S. ZHANG ET AL.: "Biological surface engineering: a simple system for cell pattern formation" "Online! 28 July 1998 (1998-07-28) , BIOMATERIALS XP002183339 20 Retrieved from the Internet: <URL: http://147.46.94.112/journal/sej/j_b/data/ bio9907v20i1307.pdf> 'retrieved on 2001-11-16! page 1214, paragraph 2.3. -----	7,8
A	US 5 376 252 A (OHMAN OVE ET AL) 27 December 1994 (1994-12-27) column 7, line 40 -column 8, line 20 -----	1,5,6

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) July 1992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 01/07058

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19948087	A 03-05-2001	DE 19948087 A1 WO 0124933 A1	03-05-2001 12-04-2001
US 6039897	A 21-03-2000	NONE	
US 5932315	A 03-08-1999	NONE	
WO 0060352	A 12-10-2000	AU 3569700 A WO 0060352 A2	23-10-2000 12-10-2000
US 5376252	A 27-12-1994	SE 470347 B AT 130528 T DE 69114838 D1 DE 69114838 T2 EP 0527905 A1 JP 2983060 B2 SE 9001699 A WO 9116966 A1	31-01-1994 15-12-1995 04-01-1996 05-06-1996 24-02-1993 29-11-1999 11-11-1991 14-11-1991

フロントページの続き

- (74)代理人 100099988
弁理士 斎藤 健治
- (74)代理人 100105821
弁理士 藤井 淳
- (74)代理人 100099911
弁理士 関 仁士
- (74)代理人 100108084
弁理士 中野 睦子
- (72)発明者 レ ピオウフレ プルノ
フランス国 エフ - 7 5 0 1 4 パリ リュ ドゥ ムーラン ヴェルデ 8 8
- (72)発明者 藤田 博之
東京都豊島区千川1丁目9 - 1 4
- (72)発明者 民谷 栄一
石川県辰口町北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究科内
- (72)発明者 グリスコム ローラン
フランス国 エフ - 3 5 0 0 0 レンヌ リュ デ パリ 5 0
- (72)発明者 デゲナー バトリック
石川県能美郡辰口町旭台1 - 8 ジェイスト ジェイストドミトリー ビルディング 5 - 5 0 3
- Fターム(参考) 4B029 AA08 BB11 CC02 CC08 GA03 GA08 GB09 GB10