

(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
5. Januar 2006 (05.01.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/000275 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **B01J 19/00**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/005056

(22) Internationales Anmeldedatum:
10. Mai 2005 (10.05.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 031 167.6 28. Juni 2004 (28.06.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **INFINEON TECHNOLOGIES AG** [DE/DE]; St.-Martin-Strasse 53, 81669 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **DERTINGER, Stephan** [DE/DE]; Nymphenburger Str. 29, 80335 München (DE). **HANEDER, Thomas** [DE/DE]; Pfarrrer-Kölbl-Str. 7C, 85221 Dachau (DE). **MARTIN, Alfred** [DE/DE]; Hochnisselstr. 14A, 81825 München (DE).

(74) Anwalt: **HOCK, Joachim**; Müller-Boré & Partner, Grafinger Strasse 2, 81671 München (DE).

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

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

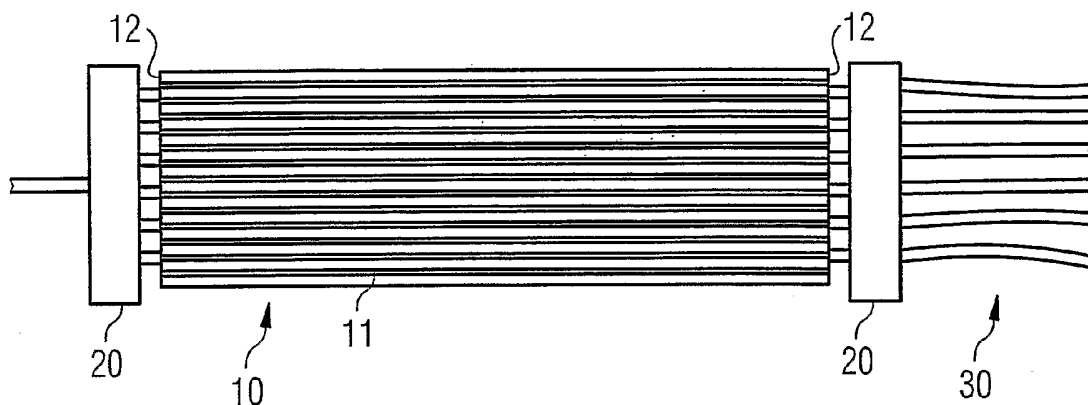
Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

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

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING BIOCHIPS FROM POROUS SUBSTRATES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON BIOCHIPS AUS PORÖSEN SUBSTRATEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for the production of biochips from porous substrates, wherein the biological-chemical substances used in a corresponding assay as probes and/or catcher molecules are initially applied to the porous surface of a relatively long, bar-shaped, porous substrate which is subsequently divided into small, prepared biochips. According to the inventive method, the homogeneity of the individual chips is improved and the production rate is increased.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Biochips aus porösen Substraten, worin die in einem entsprechenden Assay als Sonden bzw. Fängermoleküle eingesetzten biologisch-chemischen Substanzen zunächst auf die Porenoberflächen eines relativ langen, stabförmigen, porösen Substrats aufgebracht werden, das anschließend in kleine fertige Biochips vereinzelt wird. Durch das erfindungsgemäße Verfahren kann die Homogenität der einzelnen Chips verbessert und die Fertigungsgeschwindigkeit erhöht werden.

WO 2006/000275 A1

Verfahren zur Herstellung von Biochips aus porösen Substraten

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Biochips aus porösen Substraten, worin die in einem entsprechenden Assay als Sonden bzw. Fänger-moleküle eingesetzten biologisch-chemischen Substanzen zunächst auf die Poren-oberflächen eines relativ langen, stabförmigen, porösen Substrats aufgebracht werden, das anschließend in kleine fertige Biochips vereinzelt wird. Durch das erfindungsgemäße Verfahren kann die Homogenität der einzelnen Chips verbessert und die Fertigungsgeschwindigkeit erhöht werden.

10

Poröse Substrate eignen sich aufgrund ihrer vorteilhaften optischen und fluidischen Eigenschaften sehr gut als Substrat für DNA- und Protein-Mikroarrays. Technisch aufwendig ist dabei aber das Aufbringen einer großen Anzahl von biologisch-chemischen Substanzen (> 100) wie z.B. DNA, Antikörper und Proteine. Die biologischen Substanzen werden in der Regel in einem geeigneten Puffer gelöst und Spot für Spot in einem sequentiellen Prozeß auf die Oberfläche des porösen Substrats mittels Dispensier-technik aufgebracht. Durch die sequentielle Natur ist dieser Prozeß sehr zeitintensiv. Besonders für Arrays mit hoher Spotanzahl ist es jedoch wünschenswert, den Dispensierprozeß zu parallelisieren.

15

20

Bisher wird die biologisch-chemische Substanz durch verschiedene „Spotting-Verfahren“ wie z.B. Reservoir-Nadel-, Pin-and-Ring- oder Piezoverfahren, bei der eine biologisch-chemische Substanz wie z.B. ein zuvor synthetisiertes Oligonukleotid als Mikrotropfen lokal auf der Substratfläche abgesetzt wird, aufgebracht. Auf jedem Chip werden nacheinander

verschiedene Spots abgesetzt. Das Spotten kann durch die Verwendung von mehreren solcher Nadeln parallelisiert werden. Dies stellt aber an die Logistik der zu spottenden Substanzen höhere Anforderungen. Ein weiteres Problem ist die Homogenität der Spots. Bei vielen Nadeln kann nicht sichergestellt werden, daß die abgesetzten Flüssigkeitsmengen bei allen Nadeln identisch sind.

Ein weiterer Ansatz, zu höherem Durchsatz zu gelangen, ist die Verwendung eines miniaturisierten Dispensierkopfes, der bis zu 384 Spots gleichzeitig absetzen kann (siehe WO 01/62377). Jede einzelne Dispensierdüse ist über einen Schlauch mit einem Reservoir verbunden. Der technische Aufwand, um beispielsweise Substrat und Dispensierkopf plan-parallel zueinander auszurichten (Minimierung des Keilfehlers), ist jedoch außerordentlich hoch. Bei nur unzureichender Justierung sind keine reproduzierbaren und homogenen Spots erhältlich.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu ermöglichen, welches die vorstehenden Probleme überwindet.

Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

Gemäß der vorliegenden Erfindung werden Verfahren bereitgestellt, die dadurch gekennzeichnet sind, daß die in einem entsprechenden Assay als Sonden bzw. Fängermoleküle eingesetzten biologisch-chemischen Substanzen zunächst auf die Porenoberflächen eines stabförmigen porösen Substrats aufgebracht werden, das anschließend in kleine, fertige Biochips vereinzelt wird. Durch diese Vorgehensweise kann die Homogenität der einzelnen Biochips verbessert und die Fertigungsgeschwindigkeit erhöht werden.

In einem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung einer Vielzahl von einzelnen Biochips aus einem stabförmigen, porösen Substrat bereitgestellt, umfassend die Schritte:

(i) Bereitstellen eines stabförmigen porösen Substrats, das Poren mit einem Durchmesser im Bereich von zwischen 1 μm und 100 μm und eine Querschnittsfläche aufweist, welche den Abmessungen eines zu fertigenden, einzelnen Biochips entspricht;

(ii) Beschichten der Porenoberflächen des stabförmigen porösen Substrats mit als Fängermoleküle fungierenden chemisch-biologischen Verbindungen, und

(iii) scheibenweise Sägen des stabförmigen porösen Substrats derart, daß vereinzelt, fertige Biochips mit einer Dicke im Bereich von 100 bis 1.000 μm erhalten werden.

Das in Schritt (i) eingesetzte makroporöse Substrat weist vorzugsweise einen Porendurchmesser von 1 μm bis 50 μm , mehr bevorzugt 1 bis 20 μm auf. Der Abstand von Porenmitte zu Porenmitte (Pitch), d.h. zweier zueinander benachbarter bzw. angrenzender Poren beträgt üblicherweise 1 bis 100 μm , vorzugsweise 2 bis 12 μm . Die Porendichte liegt üblicherweise im Bereich von 10^4 bis $10^8/\text{cm}^2$. Die Länge des stabförmigen porösen Substrats unterliegt keiner spezifischen Beschränkung, liegt aber aus Prozeßgründen üblicherweise im Bereich von ca. 1 cm bis 30 cm. Die Querschnittsfläche des stabförmigen, porösen Substrats entspricht den Abmessungen eines zu fertigenden, einzelnen Biochips und beträgt insofern üblicherweise 1 cm x 1 cm. Die Poren können in hexagonaler oder quadratischer Anordnung vorliegen. Ferner können die Poren beispielsweise im wesentlichen rund oder ellipsenförmig gestaltet sein. Das Material des stabförmigen porösen Substrats kann insbesondere

aus Siliziumoxid, Aluminiumoxid, Glas oder makroporösem Silizium ausgewählt werden, wobei letzteres besonders bevorzugt ist.

5 In Schritt (ii) erfolgt das Beschichten der Porenoberflächen des stabförmigen, porösen Substrats mit als Fängermoleküle fungierenden chemisch-biologischen Verbindungen bzw. Biomolekülen. Das ortsspezifische Anbinden von solchen chemisch-biologischen Verbindungen bzw. Biomolekülen an die
10 Porenoberflächen erfolgt üblicherweise mittels Dispensiertechniken, gegebenenfalls durch Pumptechniken unterstützt. So kann in Schritt (ii) eine Lösung von Biomolekülen unter Ausnutzen der Kapillarkraft mittels mindestens einer Nadel oder Nadelanordnung in die Poren des
15 eingesetzten Substrats beschickt bzw. gefüllt werden. Beispielsweise kann ein Überschuss an Flüssigkeit mit einer Nadel oder einem Instrument, welches eine Multiplizität solcher Nadeln und Flüssigkeiten aufweist, über die Porenöffnung so beschickt werden, dass sich diese Pore durch die
20 Kapillarwirkung mit Flüssigkeit füllt. Nach der gewünschten Reaktionszeit kann die Flüssigkeit durch Anlegen von Überdruck an die Porenöffnung entfernt werden.

Als Biomoleküle, die in Schritt (ii) ortsspezifisch an die
25 Porenoberflächen gekoppelt bzw. gebunden werden, kommen insbesondere DNA, RNA, PNA, (bei Nukleinsäuren und ihren chemischen Derivaten können z.B. Einzelstränge, Triplex-Strukturen oder Kombinationen hiervon vorliegen), Saccharide, Peptide, Proteine (z.B. Antikörper, Antigene, Rezeptoren),
30 Derivate der kombinatorischen Chemie (z.B. organische Moleküle), Zellbestandteile (z.B. Organellen), Zellen, Mehrzeller sowie Zellverbände in Frage. Soll der fertige Biochip im Rahmen eines EIA oder ELISA verwendet werden, so werden als Biomoleküle insbesondere spezifische Antikörper
35 verwendet. Das Anbinden bzw. Koppeln der Fängermoleküle wie

insbesondere Oligonukleotide bzw. DNA-Moleküle an das Substratmaterial kann über Linkermoleküle nach den im Stand der Technik üblichen Verfahren erfolgen, beispielsweise mittels Behandeln des porösen Substratmaterials bei Verwendung von

5 Epoxysilanen als Linkermoleküle durch anschließende Reaktion der terminalen Epoxidgruppen mit terminalen primären Aminogruppen oder Thiolgruppen von Oligonukleotiden bzw. DNA-Molekülen, die in entsprechenden Analyseverfahren als immobilisierte bzw. fixierte Fängermoleküle für die im zu

10 untersuchenden Analyten vorliegenden Zielmoleküle fungieren. Dabei können beispielsweise die als Fängermoleküle verwendbaren Oligonukleotide unter Verwendung der Synthesestrategie, wie in Tet. Let. 22, 1981, Seiten 1859 bis 1862, beschrieben, hergestellt werden. Die Oligonukleotide können dabei während

15 des Herstellungsverfahrens entweder an der 5-oder der 3-Endstellung mit terminalen Aminogruppen derivatisiert werden. Eine weitere Möglichkeit der Anbindung solcher Fängermoleküle an die Innenwandoberflächen der Poren kann durchgeführt werden, indem das Substrat zunächst mit einer Chlorquelle, wie Cl_2 ,

20 SOCl_2 , COCl_2 oder $(\text{COCl})_2$, gegebenenfalls unter Verwendung eines Radikalinitiators wie Peroxide, Azoverbindungen oder Bu_3SnH , behandelt wird und anschließend mit einer entsprechenden nucleophilen Verbindung, wie insbesondere mit Oligonukleotiden bzw. DNA-Molekülen, die terminale primäre Aminogruppen oder

25 Thiolgruppen aufweisen, umgesetzt werden (siehe WO 00/33976).

In Schritt (iii) erfolgt die Vereinzelung der dann fertigen Biochips durch scheibenweise Sägen des stabförmigen, porösen Substrats, so daß vereinzelte, fertige Biochips mit einer Dicke

30 im Bereich von 100 bis 1.000 μm , vorzugsweise 250 bis 450 μm erhalten werden. Das derart funktionalisierte, stabförmige, poröse Substrat kann auf eine in einem Sägerahmen gespannte Sägefolie, wie z.B. eine für derartige Zwecke üblicherweise verwendete Mylar®-Folie, angeordnet werden, wonach das

Aussägen der einzelnen Chips aus dem stabförmigen Substrat gemäß üblichen Techniken erfolgt. Das scheibenweise Sägen hat zur Folge, daß auf den Schnittkanten (Ober- und Unterseite der Chips) im Gegensatz zu „gespotteten“ porösen Substraten
5 vorteilhafterweise keine biologischen Moleküle immobilisiert sind.

Der Sägeprozeß sollte kompatibel zu der biologischen Beschichtung sein. Dies kann beispielsweise durch das Füllen
10 der Poren vor dem Sägen mit Substanzen erreicht werden, welche die Oberfläche nicht angreifen, nach dem Sägen durch ein Lösungsmittel wieder vollständig aus den Poren ausgewaschen werden können, aber dennoch im Sägeprozeß die Oberfläche in den Poren vor Sägewasser und Partikeln schützt. Geeignete
15 Substanzen hierfür sind beispielsweise langkettige Polyalkylenglykole wie insbesondere Polyethylenglykol (PEG) und Polyvinylalkohole.

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann das
20 stabförmige poröse Substrat mit Poren im Bereich von zwischen 1 µm und 100 µm und einer Querschnittsfläche von beispielsweise 1 cm x 1 cm, welche den späteren Biochip-Abmessungen entspricht, und einer Länge von beispielsweise zwischen 1 cm bis 30 cm, in Schritt (ii) durch eine fluidische Maske an den beiden
25 durchlässigen Stirnflächen des stabförmigen, porösen Substrats fluidisch kontaktiert werden (siehe Figur 1). Die fluidische Maske stellt sicher, daß Bereiche in Array-Anordnung gegeneinander abgedichtet werden. Jeder Bereich der Stirnfläche kann mit unterschiedlichen Substanzen belegt werden. Die als
30 Fänger-moleküle vorgesehenen Oligonukleotide werden dann direkt in den Poren synthetisiert, wobei die Synthese in den Poren des ganzen Stabs und damit auf vielen „Chips“ gleichzeitig stattfindet. Anschließend wird das stabförmige, poröse Substrat wieder scheibenweise getrennt. Wenn nur eher relativ geringe

Spotdichten erforderlich sind, kann mit dieser Methode eine große Anzahl von Biochips parallel hergestellt werden, was sowohl die Kosten als auch die Homogenität der Biochips verbessert. In besonders vorteilhafter Weise können die stabförmigen, porösen Substrate direkt an einen Oligo-Synthesizer (z.B. vorgesehen für Phosphoramidit-Synthesechemie) angeschlossen werden.

Eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sieht vor, in den Poren lokal die Synthese zu verhindern, indem die Pore verschlossen wird, d.h. die Poren lokal und definiert zu verschließen, so daß kein Synthesereagenz in die Poren gelangen kann. An der verdeckten Stelle findet dann keine Synthese statt. Hierzu kann das stabförmige, poröse Substrat mit Poren im Bereich von zwischen 1 µm und 100 µm und einer Querschnittsfläche von beispielsweise 1 cm x 1 cm, welche den späteren Biochip-Abmessungen entspricht, und einer Länge von beispielsweise zwischen 1 cm bis 30 cm, in Schritt (ii) mit einer entsprechend konfigurierten Maske bedeckt werden. Diese Maske verhindert lokal, daß chemische Substanzen in die Poren gelangen. Damit ist es beispielsweise auch möglich, durch sequenzielles Auflegen von Masken in lokal unterschiedlichen Bereichen unterschiedliche Oligonukleotide zu synthetisieren. Hierzu kann eine entsprechend oberflächenstrukturierte Maske aus elastomerem Material in Kontakt mit der Stirnfläche des stabförmigen, makroporösen Substrats gebracht werden. Bei einseitiger Aufbringung eines Flüssigkeitstropfens einer Lösung von Biomolekülen breitet sich die Flüssigkeit durch Kapillarkräfte in den durch die Maskenstruktur determinierten Poren aus.

Die Maske kann zum Beispiel aus einem flexiblen Kunststoff wie einem elastomeren Material sein, das kompatibel zu der Synthesechemie (Entschützungsreagenz, Oxalsäure in Wasser im

Fall der Phosphoramidit-Chemie) ist. Vorzugsweise ist das elastomere Material aus Polydialkylsiloxanen, Polyurethanen, Polyimiden und vernetzten Novolak-Harzen ausgewählt. Mehr bevorzugt ist das elastomere Material Polydimethylsiloxan (PDMS). PDMS weist eine geringe Oberflächenenergie auf und ist chemisch inert. Zudem ist PDMS homogen, isotrop und bis 300 nm optisch transparent.

Es sind verschiedene Ausführungsformen unter Variierung der Maskenfläche und der Chipfläche anwendbar. So kann die Maske Löcher enthalten (Lochmaske) (siehe Fig. 2a) oder eine Reliefstruktur (Stempel) (siehe Fig. 2b) aufweisen, welche jeweils bestimmte Poren bzw. Porenbereiche abdeckt. Bei der Löchervariante sollte die dem Substrat zugeneigte Oberfläche der Maske eine flexible Schicht besitzen, die biokompatibel ist und fluidisch abdichtet, was beispielsweise bei der Verwendung von PDMS als Maskenmaterial erreicht werden kann. Die Schicht muß die Oberfläche konform abdecken, darf aber die Löcher nicht verschließen. Ein Vorteil besteht darin, daß die Maskenfläche relativ klein ist, und somit ein kompletter Maskensatz für ein 30mer (ca. 100 verschiedene Masken) auf einem einzigen 150 mm Substrat untergebracht werden kann.

Werden nämlich beispielsweise 100 Chips pro stabförmigen Substrat vorgesehen, so können, insofern die Fluidikmasken die Dimension eines Chips aufweisen, leicht 100 Masken, die für die Synthese notwendig sind, auf einem „Maskenwafer“ untergebracht werden. Anders sieht es bei planaren Substraten aus. Um 100 Chips herzustellen, die sich auf einem einzigen 6" Wafer befinden, sind 100 Stück 6" Masken notwendig. Die Herstellung solcher Masken ist jedoch teuer, da jeder Fluidikmaske eine lithographische Maske zugrunde liegt.

Ein solcher Stempel bzw. Gußform bzw. Maske aus elastomerem Material mit einer Reliefstruktur kann beispielsweise durch

Replikatformen hergestellt werden, indem der flüssige Polymervorläufer eines Elastomers über eine Vorlage (Master) mit einer entsprechend vorbestimmten Oberflächenreliefstruktur gegossen wird, wie es aus der Softlithographie bekannt ist; 5 siehe z.B. Xia et al., Angewandte Chemie, 1998, 110, Seiten 568 bis 594. Durch das Aufbringen einer solchen Stempelmaske mit Reliefstruktur kann eine Art geschlossener Kapillarstruktur bzw. mindestens Teile von Kanälen bzw. Kapillaren, die mindestens einen Einlass und nach Durchlaufen mindestens einer 10 Pore, vorzugsweise eines Bereichs von Poren, einen Auslass aufweisen, erzeugt werden. Die Maske kann so strukturiert sein, daß die gebildeten Kanäle dabei gerade oder mäanderförmig sowie durchgehend oder kammartig geformt sind.

15 Es ist auch möglich, auf die Stirnflächen des stabförmigen Substrates eine strukturierte Dichtung aufzubringen, die benachbarte Bereiche des Substrats fluidisch entkoppelt. Die Maske wird dann auf die Dichtung gepresst und verhindert, daß chemische Substanzen lokal nicht in die Poren gelangen können.

20 Die als Fängermoleküle vorgesehenen Oligonukleotide werden dann wieder direkt in den nunmehr zugänglichen Poren synthetisiert, wobei die Synthese in den Poren des ganzen Stabs und damit auf vielen „Chips“ gleichzeitig stattfindet. Anschließend wird das 25 stabförmige poröse Substrat wieder scheibenweise getrennt.

In einem zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung einer Vielzahl von einzelnen Biochips aus einem porösen Substrat bereitgestellt, umfassend die 30 Schritte:

- (a) justiertes Aneinanderstapeln einer Vielzahl von porösen Substraten bzw. Chips mit einer Einzeldicke im Bereich von 100 bis 1.000 μm zu einem stabförmigen makroporösen Substrat;
- (b) reversibles Verbinden der einzelnen Substrate durch

Tempern des erzeugten stabförmigen makroporösen Substrats bei einer Temperatur im Bereich von 80 °C bis 200°C;

(c) Beschichten der Porenoberflächen des in Schritt (b) erzeugten stabförmigen, porösen Substrats mit als

5 Fänger-moleküle fungierenden chemisch-biologischen Verbindungen, und

(d) mechanisches Vereinzeln des stabförmigen, porösen Substrats derart, daß fertige Biochips mit einer Dicke im Bereich von 100 bis 1.000 µm erhalten werden.

10

Die in Schritt (a) eingesetzten Substrate bzw. vereinzelt Chips weisen vorzugsweise einen Porendurchmesser von 1 µm bis 50 µm, mehr bevorzugt 1 bis 20 µm auf. Der Abstand von Porenmitte zu Porenmitte (Pitch), d.h. zweier zueinander

15 benachbarter bzw. angrenzender Poren beträgt üblicherweise 1 bis 100 µm, vorzugsweise 2 bis 12 µm. Die Porendichte liegt üblicherweise im Bereich von 10^4 bis 10^8 /cm². Die Länge des daraus erzeugten stabförmigen porösen Substrats unterliegt keiner spezifischen Beschränkung, liegt aber üblicherweise aus

20 Prozeßgründen im Bereich von ca. 1 cm bis 30 cm. Die Querschnittsfläche der einzelnen Substrate bzw. Chips und damit auch des stabförmigen porösen Substrats entspricht den Abmessungen eines zu fertigenden, einzelnen Biochips und beträgt insofern üblicherweise 1 cm x 1 cm. Die Poren können in

25 hexagonaler oder quadratischer Anordnung vorliegen. Ferner können die Poren beispielsweise im wesentlichen rund oder ellipsenförmig gestaltet sein. Das Material kann beispielsweise aus Siliziumoxid, Aluminiumoxid, Glas oder makroporösem Silizium ausgewählt sein.

30

In den Schritten (a) und (b) werden somit polierte Einzelchips reversibel zu einem Stab gebondet. Dazu werden die Chips justiert gestapelt und durch einen Temperprozeß verbunden. Die Haltekräfte der Bondverbindung sind gering (nur

Wasserstoffbrücken, Van der Waals Kräfte), so daß die Verbindung ohne mechanische Beschädigung wieder gelöst werden kann. Die durch den Temperprozeß erreichte Verbindung der einzelnen Chips muß nur fluidisch abdichten, um
5 sicherzustellen, daß keine Flüssigkeit zwischen die einzelnen Chips läuft.

Nach der Synthese oder Beschichtung mit Biomolekülen, wie oben beschrieben, erfolgt dann die mechanische Vereinzelung des
10 Stapels in Einzelchips.

Ein Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, daß nach der biologischen Beschichtung bzw. der Immobilisierung der Fängermoleküle der Sägeprozeß entfallen kann.

15

Die Figuren zeigen:

Fig. 1 zeigt schematisch das Kontaktieren eines erfindungsgemäß eingesetzten stabförmigen Substrats mit einer fluidischen
20 Maske, durch welche erreicht wird, daß Bereiche des Chips getrennt fluidisch adressiert werden können.

Fig. 2 zeigt schematisch die erfindungsgemäße Ausführungsform, worin das stabförmige Substrat mit einer Masken abgedeckt wird,
25 um zu erreichen, daß die Fängermolekülverbindungen lokal in die durch die Maske determinierten Poren gelangen, wobei Fig. 2a das Vorsehen einer Maske mit durchgehenden Löchern (Lochmaske) und Fig. 2b das Vorsehen einer Stempelmaske zeigen.

30 In Figur 1 ist gezeigt, wie ein erfindungsgemäß eingesetztes stabförmiges poröses Substrat (10) mit Poren (11) mit einer fluidischen Maske (20) jeweils an dessen beiden Stirnflächen (12) fluidisch kontaktiert ist. An einer der fluidischen Masken (20) sind getrennte Zuleitungen (30) für einzelne,
35 determinierte Porenbereiche vorgesehen, durch welche

unterschiedliche Biomoleküllösungen geleitet werden können. Jeder Bereich der Stirnfläche kann über die Zuleitungen (30) mit unterschiedlichen Substanzen bzw. Biomolekülen belegt werden. Zudem stellt die fluidische Maske sicher, daß Bereiche
5 in Array-Anordnung gegeneinander abgedichtet sind.

Beispielsweise können mit einer solchen Anordnung dann auch die als Fängermoleküle vorgesehenen Oligonukleotide direkt in den Poren synthetisiert werden, wobei die Synthese in den Poren des ganzen Stabs und damit auf vielen „Chips“ gleichzeitig
10 stattfindet. Anschließend wird das stabförmige, poröse Substrat wieder scheibenweise getrennt. In besonders vorteilhafter Weise kann das stabförmige, poröse Substrat (10) über Zuleitungen (30) an einen Oligo-Synthesizer (nicht gezeigt) angeschlossen werden.

15

In Fig. 2a) ist das Anordnen einer Lochmaske (50) gezeigt, während in Fig. 2b) das Anordnen einer Stempelmaske mit Reliefstruktur (51) auf einem erfindungsgemäß eingesetzten stabförmigen porösen Substrat (10) mit Poren (11) dargestellt
20 ist. In beiden Ausführungsformen werden in Abhängigkeit von dem Maskenmuster dadurch lokal Poren bzw. Bereiche von Poren verschlossen, so daß kein Synthesereagenz bzw. Biomoleküle (40) in diese Poren gelangen kann bzw. können, während andere Poren bzw. Bereiche von Poren ortsspezifisch zur
25 Oberflächenbeschichtung mit Biomolekülen vorgesehen werden. Anschließend wird das stabförmige, poröse Substrat wieder scheibenweise getrennt.

30

Bezugszeichen

- 10 stabförmiges, poröses Substrat
- 11 Pore
- 12 Stirnflächen des Substrats

20	fluidische Maske
30	Zuleitungen für die einzelnen Bereiche auf dem Chip
40	Biomoleküle
50	Lochmaske
5 51	Stempelmaske

Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer Vielzahl von einzelnen Biochips aus einem stabförmigen, porösen Substrat bereitgestellt, umfassend die Schritte:
- (i) Bereitstellen eines stabförmigen porösen Substrats, das
5 Poren mit einem Durchmesser im Bereich von zwischen 1 μm und 100 μm und eine Querschnittsfläche aufweist, welche den Abmessungen eines zu fertigenden, einzelnen Biochips entspricht;
- (ii) Beschichten der Porenoberflächen des stabförmigen
10 porösen Substrats mit als Fängermoleküle fungierenden chemisch-biologischen Verbindungen, und
- (iii) scheibenweise Sägen des stabförmigen porösen Substrats derart, daß vereinzelt, fertige Biochips mit einer Dicke im Bereich von 100 bis 1.000 μm erhalten werden.
- 15
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Länge des stabförmigen porösen Substrats im Bereich von 1 cm bis 30 cm liegt.
- 20
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Material des stabförmigen porösen Substrats aus Siliziumoxid, Aluminiumoxid, Glas oder makroporösem Silizium ausgewählt ist.
- 25
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei in Schritt (ii) das Beschichten der Porenoberflächen mit den chemisch-biologischen Verbindungen mittels Dispensiertechniken, gegebenenfalls durch Pumpentechniken, erfolgt.
- 30
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei vor dem Schritt (iii) die funktionalisierten Poren zum Schutz mit

langkettigen Polyalkylenglykolen und/oder Polyvinylalkoholen gefüllt werden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei in
5 Schritt (ii) an mindestens einer der beiden Stirnflächen des stabförmigen, porösen Substrats eine fluidische Maske vorgesehen wird, so daß Bereiche in Array-Anordnung gegeneinander abgedichtet werden und Bereiche der Stirnfläche mit unterschiedlichen chemisch-biologischen Verbindungen
10 belegt werden können.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die als Fängermoleküle vorgesehenen Oligonukleotide direkt in den Poren synthetisiert werden.

15

8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, wobei das stabförmige, poröse Substrat über an die mindestens eine fluidische Maske angeschlossene Zuleitungen mit einem Oligo-Synthesizer verbunden ist.

20

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei in Schritt (ii) an mindestens einer der beiden Stirnflächen des stabförmigen, porösen Substrats eine Lochmaske oder eine Stempelmaske vorgesehen wird, so daß bereichsweise
25 Porenöffnungen derart bedeckt sind, daß keine chemisch-biologischen Verbindungen in diese Poren gelangen.

10. Verfahren zur Herstellung einer Vielzahl von einzelnen Biochips aus einem porösen Substrat, umfassend die Schritte:
30 (a) justiertes Aneinanderstapeln einer Vielzahl von porösen Substraten mit einer Einzeldicke im Bereich von 100 bis 1.000 µm zu einem stabförmigen makroporösen Substrat;
(b) reversibles Verbinden der einzelnen Substrate durch Tempern des erzeugten stabförmigen makroporösen Substrats bei
35 einer Temperatur im Bereich von 80 °C bis 200°C;
(c) Beschichten der Porenoberflächen des in Schritt (b) erzeugten stabförmigen, porösen Substrats mit als

Fängermoleküle fungierenden chemisch-biologischen Verbindungen, und

(d) mechanisches Vereinzeln des stabförmigen, porösen Substrats derart, daß fertige Biochips mit einer Dicke im
5 Bereich von 100 bis 1.000 μm erhalten werden.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Länge des stabförmigen porösen Substrats im Bereich von 1 cm bis 30 cm liegt.

10

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, wobei das Material des stabförmigen porösen Substrats aus Siliziumoxid, Aluminiumoxid, Glas oder makroporösem Silizium ausgewählt ist.

15

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei in Schritt (c) das Beschichten der Porenoberflächen mit den chemisch-biologischen Verbindungen mittels Dispensiertechniken, gegebenenfalls durch Pumpetechniken,
20 erfolgt.

FIG 1

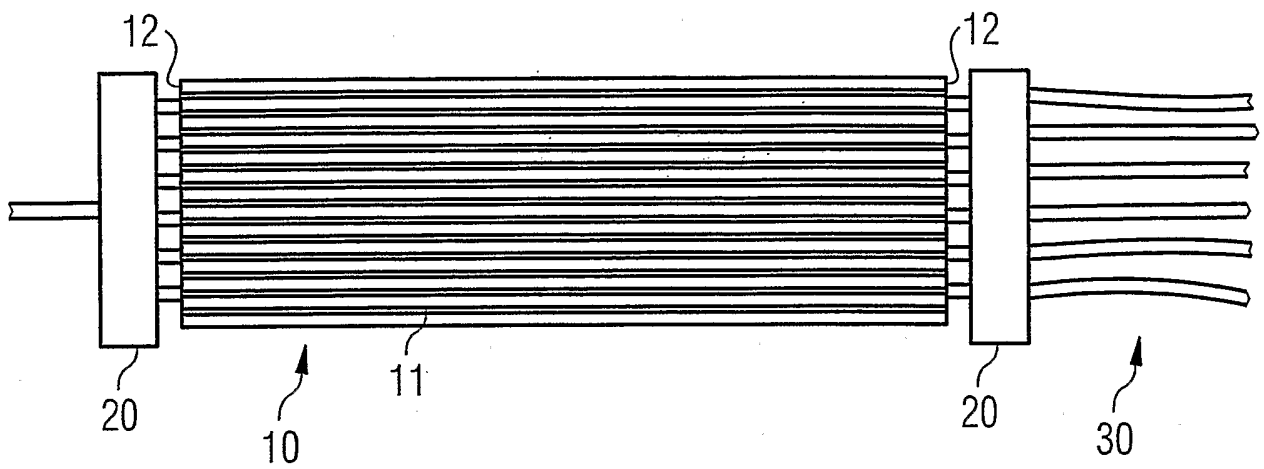


FIG 2A

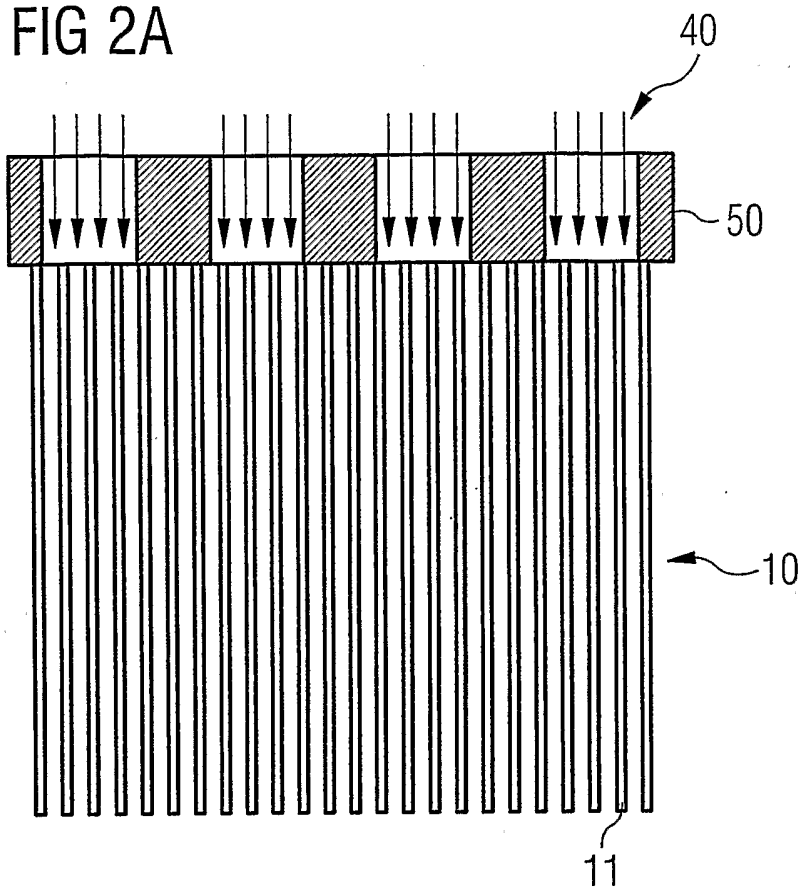
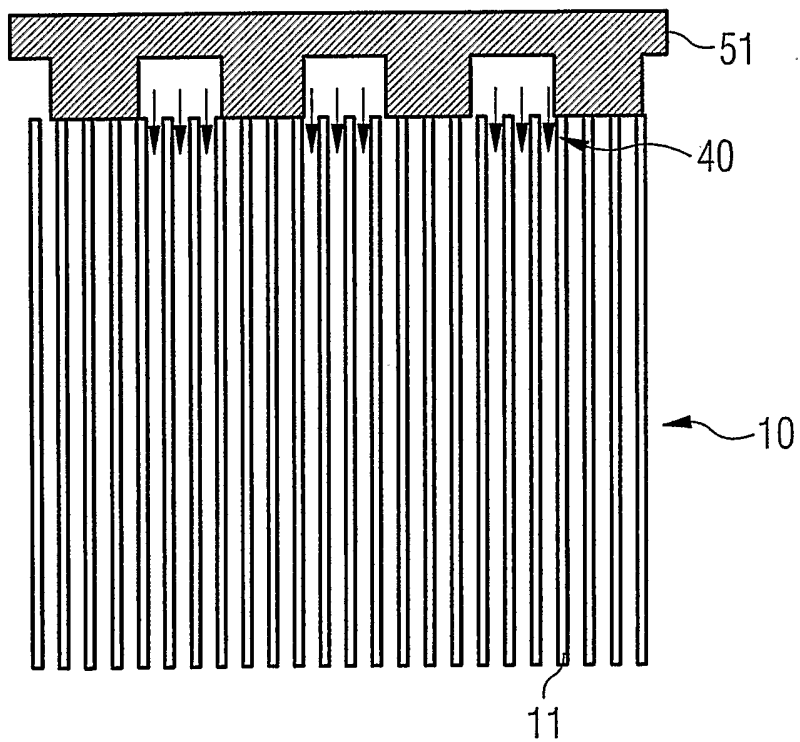


FIG 2B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/005056

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 B01J19/00		
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 B01J		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/16651 A (GENOSPECTRA, INC; CHEN, SHIPING; CHEN, ANTHONY; LUO, YULING) 28 February 2002 (2002-02-28) paragraph '0054! - paragraph '0068!; figure 3	1-13
X	WO 99/03341 A (STIMPSON, DON) 28 January 1999 (1999-01-28) page 4, line 14 - line 22; figure 1 page 5, line 25 - line 29 page 6, line 2 - line 4	1-13
X	WO 99/13313 A (GENOVATIONS, INC; HUDSON, JAMES, R., JR; DAWSON, ELLIOTT, P) 18 March 1999 (1999-03-18) claims 1-9	10-13
----- -/--		
<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	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search <p align="center">5 August 2005</p>	Date of mailing of the international search report <p align="center">12/08/2005</p>	
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 <p align="center">Veefkind, V</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/005056

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 2003/124716 A1 (HESS ROBERT A ET AL) 3 July 2003 (2003-07-03) paragraph '0153! - paragraph '0162! example 23 -----	1-9
X	US 2002/086325 A1 (NAGASAWA HIROSHI) 4 July 2002 (2002-07-04) paragraphs '0047!, '0055!; examples 1,2 -----	1,10
X	WO 99/55460 A (CORNING INCORPORATED) 4 November 1999 (1999-11-04) page 24, line 28 - page 26, line 19; figures 8,9 -----	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/005056

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0216651	A	28-02-2002	AU 8675901 A	04-03-2002
			WO 0216651 A2	28-02-2002
			US 2002055111 A1	09-05-2002
WO 9903341	A	28-01-1999	US 6037186 A	14-03-2000
			AU 8292398 A	10-02-1999
			EP 1041877 A1	11-10-2000
			WO 9903341 A1	28-01-1999
			US 6306664 B1	23-10-2001
			US 2003153098 A1	14-08-2003
			US 2002076829 A1	20-06-2002
WO 9913313	A	18-03-1999	AT 272833 T	15-08-2004
			AT 235682 T	15-04-2003
			AU 733589 B2	17-05-2001
			AU 7498598 A	29-03-1999
			CA 2301539 A1	18-03-1999
			CA 2407257 A1	18-03-1999
			CA 2407260 A1	18-03-1999
			CA 2407263 A1	18-03-1999
			CA 2407265 A1	18-03-1999
			CN 1269883 A	11-10-2000
			DE 69812655 D1	30-04-2003
			DE 69812655 T2	25-09-2003
			DE 69825496 D1	09-09-2004
			DE 69825496 T2	28-07-2005
			DK 1012564 T3	21-07-2003
			EP 1207383 A2	22-05-2002
			EP 1176413 A2	30-01-2002
			EP 1012564 A1	28-06-2000
			ES 2225407 T3	16-03-2005
			ES 2190591 T3	01-08-2003
			IL 134702 A	28-03-2004
			IL 151420 A	20-06-2004
			IL 151421 A	20-06-2004
			IL 151422 A	20-06-2004
			IL 151423 A	20-06-2004
			JP 2001515735 T	25-09-2001
			PT 1012564 T	29-08-2003
WO 9913313 A1	18-03-1999			
US 2003096292 A1	22-05-2003			
US 2001019827 A1	06-09-2001			
US 2003124716	A1	03-07-2003	US 2002094533 A1	18-07-2002
			US 2003180807 A1	25-09-2003
			AU 9680901 A	22-04-2002
			CA 2425476 A1	18-04-2002
			EP 1330306 A2	30-07-2003
			JP 2004510996 T	08-04-2004
			WO 0230561 A2	18-04-2002
			US 2004191924 A1	30-09-2004
			US 2002001546 A1	03-01-2002
US 2005079105 A1	14-04-2005			
US 2002086325	A1	04-07-2002	JP 2002202305 A	19-07-2002
			EP 1229129 A2	07-08-2002
WO 9955460	A	04-11-1999	EP 0955084 A1	10-11-1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP2005/005056

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9955460	A	AU 3552499 A	16-11-1999
		AU 3760499 A	16-11-1999
		CA 2327664 A1	04-11-1999
		CN 1311717 A	05-09-2001
		EP 1075327 A1	14-02-2001
		JP 2002513136 T	08-05-2002
		WO 9955460 A1	04-11-1999
		WO 9955461 A1	04-11-1999
		US 6596237 B1	22-07-2003
		US 6350618 B1	26-02-2002
		US 6884626 B1	26-04-2005
		US 6762061 B1	13-07-2004

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/005056

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 B01J19/00		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 B01J		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 02/16651 A (GENOSPECTRA, INC; CHEN, SHIPING; CHEN, ANTHONY; LUO, YULING) 28. Februar 2002 (2002-02-28) Absatz '0054! - Absatz '0068!; Abbildung 3 -----	1-13
X	WO 99/03341 A (STIMPSON, DON) 28. Januar 1999 (1999-01-28) Seite 4, Zeile 14 - Zeile 22; Abbildung 1 Seite 5, Zeile 25 - Zeile 29 Seite 6, Zeile 2 - Zeile 4 -----	1-13
X	WO 99/13313 A (GENOVATIONS, INC; HUDSON, JAMES, R., JR; DAWSON, ELLIOTT, P) 18. März 1999 (1999-03-18) Ansprüche 1-9 ----- -/--	10-13
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> 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 5. August 2005		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 12/08/2005
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 Veefkind, V

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/005056

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2003/124716 A1 (HESS ROBERT A ET AL) 3. Juli 2003 (2003-07-03) Absatz '0153! - Absatz '0162! Beispiel 23 -----	1-9
X	US 2002/086325 A1 (NAGASAWA HIROSHI) 4. Juli 2002 (2002-07-04) Absätze '0047!, '0055!; Beispiele 1,2 -----	1,10
X	WO 99/55460 A (CORNING INCORPORATED) 4. November 1999 (1999-11-04) Seite 24, Zeile 28 - Seite 26, Zeile 19; Abbildungen 8,9 -----	1-9

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/005056

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0216651	A	28-02-2002	AU 8675901 A	04-03-2002
			WO 0216651 A2	28-02-2002
			US 2002055111 A1	09-05-2002
WO 9903341	A	28-01-1999	US 6037186 A	14-03-2000
			AU 8292398 A	10-02-1999
			EP 1041877 A1	11-10-2000
			WO 9903341 A1	28-01-1999
			US 6306664 B1	23-10-2001
			US 2003153098 A1	14-08-2003
			US 2002076829 A1	20-06-2002
WO 9913313	A	18-03-1999	AT 272833 T	15-08-2004
			AT 235682 T	15-04-2003
			AU 733589 B2	17-05-2001
			AU 7498598 A	29-03-1999
			CA 2301539 A1	18-03-1999
			CA 2407257 A1	18-03-1999
			CA 2407260 A1	18-03-1999
			CA 2407263 A1	18-03-1999
			CA 2407265 A1	18-03-1999
			CN 1269883 A	11-10-2000
			DE 69812655 D1	30-04-2003
			DE 69812655 T2	25-09-2003
			DE 69825496 D1	09-09-2004
			DE 69825496 T2	28-07-2005
			DK 1012564 T3	21-07-2003
			EP 1207383 A2	22-05-2002
			EP 1176413 A2	30-01-2002
			EP 1012564 A1	28-06-2000
			ES 2225407 T3	16-03-2005
			ES 2190591 T3	01-08-2003
			IL 134702 A	28-03-2004
			IL 151420 A	20-06-2004
			IL 151421 A	20-06-2004
			IL 151422 A	20-06-2004
			IL 151423 A	20-06-2004
			JP 2001515735 T	25-09-2001
			PT 1012564 T	29-08-2003
WO 9913313 A1	18-03-1999			
US 2003096292 A1	22-05-2003			
US 2001019827 A1	06-09-2001			
US 2003124716	A1	03-07-2003	US 2002094533 A1	18-07-2002
			US 2003180807 A1	25-09-2003
			AU 9680901 A	22-04-2002
			CA 2425476 A1	18-04-2002
			EP 1330306 A2	30-07-2003
			JP 2004510996 T	08-04-2004
			WO 0230561 A2	18-04-2002
			US 2004191924 A1	30-09-2004
			US 2002001546 A1	03-01-2002
US 2005079105 A1	14-04-2005			
US 2002086325	A1	04-07-2002	JP 2002202305 A	19-07-2002
			EP 1229129 A2	07-08-2002
WO 9955460	A	04-11-1999	EP 0955084 A1	10-11-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/005056

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9955460	A	AU 3552499 A	16-11-1999
		AU 3760499 A	16-11-1999
		CA 2327664 A1	04-11-1999
		CN 1311717 A	05-09-2001
		EP 1075327 A1	14-02-2001
		JP 2002513136 T	08-05-2002
		WO 9955460 A1	04-11-1999
		WO 9955461 A1	04-11-1999
		US 6596237 B1	22-07-2003
		US 6350618 B1	26-02-2002
		US 6884626 B1	26-04-2005
		US 6762061 B1	13-07-2004
