



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 103 23 685 A1** 2004.12.09

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **103 23 685.6**

(22) Anmeldetag: **22.05.2003**

(43) Offenlegungstag: **09.12.2004**

(51) Int Cl.7: **G01N 33/50**

(71) Anmelder:

**Rühe, Jürgen, Prof. Dr., 79356 Eichstetten, DE;
Klapproth, Holger, Dr., 79108 Freiburg, DE**

(72) Erfinder:

gleich Anmelder

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur kovalenten Immobilisierung von Sonden-Biomolekülen an organischen Oberflächen**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kovalenten Immobilisierung von Sonden-Biomolekülen an organischen Oberflächen unter Verwendung von photoreaktiven Vernetzern, mit denen die Sonden-Biomoleküle an einer organischen Oberfläche kovalent immobilisiert werden oder an lösliche Polymere oder Copolymere kovalent gebunden werden, die dann an einer organischen Oberfläche kovalent immobilisiert werden.

Beschreibung

Hermanson, Academic Press 1996.

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kovalenten Immobilisierung von Sonden-Biomolekülen an organischen Oberflächen wie Polymeroberflächen oder Oberflächen von anorganischen Substraten modifiziert mit selbstorganisierten Monolagen unter Verwendung von photoreaktiven Vernetzern mit denen die Sonden-Biomoleküle an einer organischen Oberfläche kovalent immobilisiert werden, oder an lösliche Polymere oder Copolymere kovalent gebunden werden, die dann an einer organischen Oberfläche kovalent immobilisiert werden.

[0002] In den letzten Jahren haben in der Analytik Mikrotechniken immer mehr an Bedeutung gewonnen und es sind zahlreiche Festphasensysteme auf der Grundlage von selbstorganisierten Monolagern (engl. »self-assembled monolayers«, »SAMs«) aus bifunktionellen Molekülen (engl. »Linker«) entwickelt worden, über die spezifisch Probenmoleküle an die Oberfläche des festen Trägers gekoppelt bzw. konjugiert werden, an der dann auch der Nachweis mit Hilfe von geeigneten Markierungen (beispielsweise radioaktiv, gefärbt, fluoreszierend) erfolgt.

[0003] Für diese Systeme hat sich in Analogie zu den elektronischen Mikro-Chips die Bezeichnung Sensor-Chips eingebürgert. Im Falle der Konjugation von biologischen Molekülen (sog. »Biokonjugation«) an solche Sensor-Chips, beispielsweise Oligonukleotiden oder Antikörpern, spricht man auch von Bio-Chips. Die Kopplung an die Trägeroberfläche kann direkt oder indirekt erfolgen. Ein Beispiel für eine indirekte Kopplung ist die Kopplung einer nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz durch Hybridisierung an ein immobilisiertes, komplementäres Oligonukleotid als Sonde. In diesem Fall hat die Verwendung der Sonde noch den Vorteil der natürlichen Spezifität der Wechselwirkung biologischer Makromoleküle.

[0004] Typischerweise werden zur Herstellung von Sensor-Chips Oberflächen aus Metall- bzw. Halbleitern, wie z.B. Aluminiumoxid, Quarzglas, Glas, in eine Lösung von bifunktionellen Molekülen (sog. »Linker«), die beispielsweise eine Halogensilan- (z.B. Chlorsilan-) oder Alkoxysilangruppe zur Kopplung an die Trägeroberfläche aufweisen, getaucht, so daß sich ein selbstorganisierter Monolayer (SAM) bildet. Dieser weist in diesem Fall eine Dicke von wenigen Angström aus. Die Kopplung der Linker an die Proben- oder Sondenmoleküle erfolgt über eine geeignete weitere funktionelle Gruppe, beispielsweise eine Amino- oder Epoxygruppe. Geeignete bifunktionelle Linker für die Kopplung einer Vielzahl von Proben- oder Sonden-Molekülen, insbesondere auch biologischen Ursprungs, an eine Vielzahl von Trägeroberflächen sind dem Fachmann gut bekannt, vgl. beispielsweise »Bioconjugate Techniques« von G. T.

[0005] Ein Nachteil dieser reaktiven (und dadurch empfindlichen) Oberflächen, z.B. Oberflächen mit Epoxy-, Aldehyd- oder Aminofunktionen, ist deren oft nur begrenzte Haltbarkeit (wenige Wochen), so daß sie unter Luftabschluß gelagert werden müssen.

[0006] Die Immobilisierung von beispielsweise Nukleinsäuren auf nicht reaktiven Polymer- bzw. Kunststoff/Plastikoberflächen (z. B. als Sonden zur Herstellung von Sensor/Bio-Chips) mit herkömmlichen Methoden ist aber kompliziert und erfordert sehr viel Aufwand.

[0007] Aufgabe der Erfindung ist daher die Bereitstellung eines einfachen und schnell durchzuführenden Verfahrens zur kovalenten Immobilisierung von Sonden-Biomolekülen an organischen Oberflächen wie Polymeroberflächen oder mit organischen Substanzen modifizierte anorganische Substrate.

[0008] Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zur kovalenten Immobilisierung von Sonden-Biomolekülen an organischen Oberflächen wie Polymeroberflächen, bei dem

- (a) ein Sonden-Biomolekül direkt, oder indirekt über einen Abstandhalter (»Spacer«), mit einer oder mehreren photoreaktiven Gruppe(n) (»Photocrosslinker«) versehen wird (dieser kann terminal oder seitlich gebunden oder integraler Bestandteil der Kette des Biomoleküles sein), und
- (b) das Reaktionsprodukt aus (a) auf eine organische Oberfläche wie z.B. eine Polymeroberfläche aufgebracht (z.B. durch Aufdrucken) und durch Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge (z.B. W-Licht) daran kovalent immobilisiert wird, oder das Reaktionsprodukt aus (a) an ein lösliches (z.B. wasserlösliches) Polymer oder Copolymer gebunden wird, welches dann an einer aus organischen Molekülen bestehenden Oberfläche wie beispielsweise einer Polymeroberfläche immobilisiert wird.

[0009] Alternativ wird diese Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zur kovalenten Immobilisierung von Sonden-Biomolekülen an organischen Oberflächen wie Polymeroberflächen, bei dem

- a) ein lösliches (z.B. wasserlösliches) Polymer oder Copolymer mit reaktiven Gruppen hergestellt und nach der Polymerisation Oligomere oder Polymere mit einer oder mehreren photoreaktiven Gruppe(n) (die photoreaktive Gruppe kann terminal oder seitlich gebunden oder integraler Bestandteil der Kette sein) und Sonden- bzw. Rezeptor-Biomoleküle (an die ein nachzuweisendes Ziel-Biomolekül binden kann) kovalent gebunden werden, oder
- (b) die das lösliche Polymer oder Copolymer mit reaktiven Gruppen bildenden Monomeren, copo-

lymerisationsfähige Monomere mit einer oder mehreren photoreaktiven Gruppe(n) und copolymerisationsfähige Sonden-Biomoleküle (im Einpotfverfahren) copolymerisiert werden,
(c) das Reaktionsprodukt aus (a) oder (b) auf eine organische Oberfläche wie eine Polymeroberfläche aufgebracht (z.B. durch Aufdrucken) und durch Bestrahlung mit Licht (z.B. W-Licht) einer geeigneten Wellenlänge daran kovalent immobilisiert wird.

[0010] Der Vorteil der Erfindung liegt in der Möglichkeit, auf unreaktive Oberflächen (z.B. silansierte Glasträger oder Substrate aus handelsüblichen Kunststoffen) ein viskoses Medium, z.B. das Reaktionsprodukt der Schritte (a) oder (b) des oben definierten alternativen Verfahrens, zu drucken, das sehr einfach zu immobilisieren ist, nämlich durch Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge. Gleichzeitig wird durch diesen Vorgang die Menge an Analyt, die gekoppelt werden kann, wesentlich erhöht, da eine pseudo-dreidimensionale Matrix aufgebaut wird. Klassische Probleme dreidimensionaler Matrices, wie z.B. Verlauffeffekte des Mediums beim Drucken auf Polymergele, werden auf diese Weise zusätzlich gelöst. Zudem muss nicht auf reaktive (und dadurch empfindliche) Oberflächen gedruckt werden. Reaktive Oberflächen sind z.B. Oberflächen mit Epoxy-, Aldehyd- oder Aminofunktionen. Reaktive Oberflächen weisen oft nur eine begrenzte Haltbarkeit (wenige Wochen) auf und müssen unter Luftabschluss gelagert werden. Keine reaktive Oberfläche bedeutet, dass Träger aus z.B. Polystyrol oder Polymethylmethacrylat (PMMA) verwendet werden können, die jahrelang stabil sind. Ein weiterer Vorteil ist, daß z.B. die Polymeroberflächen nicht durch vorgeschaltete Prozessschritte wie z.B. Plasmaprozesse hydrophilisiert werden müssen, da die Zugänglichkeit der Oberfläche zum Beispiel bei der oben definierten alternativen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens durch das gekoppelte (quellbare, benetzbare) Copolymer hergestellt wird. Abgesehen davon sind außerdem die Oberflächeneigenschaften des Substrats (z.B. der Sensoroberfläche) in einfacher Weise sehr genau zu kontrollieren. Ein Beispiel für eine wichtige Oberflächeneigenschaft die mit Hilfe des hier beschriebenen Verfahrens einfach kontrolliert werden kann, ist die Benetzbarkeit. Ein weiterer Vorteil ist die vereinfachte Analytik, da im Prinzip nur daß Volumen des aufgetragenen Tropfens bestimmt werden muß und sich daraus die Anzahl der immobilisierten Sonden unmittelbar ergibt. Dies ist bei den Verfahren des Standes der Technik zur Bindung von beispielsweise DNA an SAMs kein triviales Unterfangen.

[0011] Die Erfindung betrifft ferner eine organische Oberfläche wie eine Polymeroberfläche mit kovalent, vorzugsweise unter Musterbildung (z.B. durch Aufdrucken), darauf immobilisierten Sonden-Biomolekü-

len, die nach einem oben definierten Verfahren erhältlich ist.

[0012] Die Erfindung gibt ferner die Verwendung einer organischen Oberfläche wie einer Polymeroberfläche mit unter Musterbildung darauf immobilisierten Sonden-Biomolekülen als Sensor-Chip an und betrifft nach einer weiteren Ausführungsform außerdem ein medizinisches oder diagnostisches Instrument, daß eine erfindungsgemäße organische Oberfläche wie eine Polymeroberfläche oder einen damit erhaltenen Sensor-Chip aufweist.

[0013] Vorteilhafte und/oder bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind Gegenstand der Unteransprüche.

[0014] In den erfindungsgemäßen Verfahren kann/können die photoreaktive(n) Gruppe(n) unter Benzophenon oder Derivaten davon, Anthrachinon oder Derivaten davon und Thymidin oder Derivaten davon ausgewählt werden.

[0015] Geeignete reaktive Gruppen sind zum Beispiel Epoxy-, Carboxy-, Aktivester-, Isocyanat-, Maleinimid-, Isothiocyanat- und Azlactongruppen.

[0016] Nach einer Ausführungsform des alternativen erfindungsgemäßen Verfahrens wird in Schritt (a) das lösliche Polymer oder Copolymer mit reaktiven Gruppen z.B. durch Copolymerisation von (Meth)acrylsäure und/oder Dimethylacrylamid und/oder Vinylpyrrolidon und Glycidylmethacrylat hergestellt.

[0017] Nach einer weiteren Ausführungsform des alternativen erfindungsgemäßen Verfahrens werden in Schritt (a) die photoreaktiven Oligomeren oder Polymeren durch kovalente Bindung von 5'-aminomodifiziertem Oligothymidin und die Sonden-Biomoleküle durch kovalente Bindung von 5'-aminomodifizierten Sonden-Biomolekülen gebildet. Bei der Aminomodifizierung kann es sich um eine primäre Aminogruppe handeln. Es sei aber hier darauf hingewiesen, daß die photoreaktiven Oligomeren oder Polymeren und die Sonden- bzw. Rezeptor-Biomoleküle keineswegs auf die gleiche Weise modifiziert sein müssen, z.B. 5'-aminomodifiziert, um an das lösliche Polymer oder Copolymer kovalent gebunden werden zu können. Dadurch wird das alternative erfindungsgemäße Verfahren lediglich besonders einfach durchführbar. Die zur Modifizierung verwendete Gruppe unterliegt keinen besonderen Beschränkungen, sondern wird nach Maßgabe der praktischen Gegebenheiten gewählt. In Frage kommt beispielsweise auch eine Carboxy- oder Thiomodifizierung.

[0018] Nach einer weiteren Ausführungsform des alternativen erfindungsgemäßen Verfahrens werden in Schritt (b) 5'-arylmodifiziertes Oligothymidin und

5'-aryl- oder 3'-modifizierte Sonden-Biomoleküle mit einem oder mehreren Acrylat(en) oder Methacrylat(en) copolymerisiert.

[0019] Nach einer weiteren Ausführungsform des alternativen erfindungsgemäßen Verfahrens werden in Schritt (b) 4-Methacryloyloxybenzophenon und 5'-aryl- oder 3'-modifizierte Sonden-Biomoleküle mit einem oder mehreren Acrylat(en) oder Methacrylat(en) copolymerisiert.

[0020] Beispielsweise ist/sind die photoreaktive(n) Gruppe(n) Ultraviolett-reaktiv.

[0021] Nach weiteren Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Verfahren werden die direkt oder indirekt mit photoreaktiven Gruppen versehenen Sonden-Biomoleküle oder (in dem alternativen Verfahren) das lösliche Polymer oder Copolymer mit kovalent gebundenen photoreaktiven Oligomeren oder Polymeren und Sonden-Biomolekülen unter Musterbildung auf eine organische Oberfläche wie eine Polymeroberfläche aufgedruckt.

[0022] Für das erfindungsgemäße Verfahren eignen sich als organische Oberflächen z.B. Polymeroberflächen wie Oberflächen aus Cycloolefincopolymeren (COCs), Polystyrol, Polyethylen, Polypropylen oder Polymethylmethacrylat (PMMA, Plexiglas). Ein geeignetes COC ist zum Beispiel das von Ticona unter dem Handelsnamen »Topas« vertriebene. Es sei an dieser Stelle ausdrücklich darauf hingewiesen, daß sich das erfindungsgemäße Verfahren in Abhängigkeit von den verwendeten photoreaktiven Gruppen für beliebige organische Oberflächen eignet. Geeignet sind somit beispielsweise auch mit organischen Molekülen beschichtete Oberflächen wie mit selbstorganisierten Monolagen (engl. »self-assembled monolayers«, SAMs) beschichtete anorganische Substrate. Diese SAMs können selber völlig unreaktiv sein und somit beispielsweise aus reinen Alkylsilanen bestehen.

[0023] In dem erfindungsgemäßen Verfahren kann das Sonden-Biomolekül beispielsweise ein Partner eines spezifisch wechselwirkenden Systems von komplementären Bindungspartnern (Rezeptor/Ligand) sein.

[0024] Ein spezifisch wechselwirkendes System von komplementären Bindungspartnern kann beispielsweise auf der Wechselwirkung einer Nukleinsäure mit einer komplementären Nukleinsäure, der Wechselwirkung einer Peptidnukleinsäure (PNA) mit einer Nukleinsäure, der Enzym/Substrat-, Rezeptor/Effektor-, Lectin/Zucker-, Antikörper/Antigen-, Avidin/Biotin- oder Streptavidin/Biotin-Wechselwirkung beruhen.

[0025] Natürlich kann die Nukleinsäure eine DNA

oder RNA sein, z.B. ein Oligonukleotid oder ein Aptamer oder auch eine sog. »LNA« wie unter www.proligo.com angeboten oder auch eine einpolymerisierbare DNA wie unter dem Handelsnamen »Acrydite« unter www.mosaic-technologies.com angeboten. Auch Peptidnukleinsäuren (PNAs) kommen in Frage

[0026] Bei dem Antikörper kann es sich beispielsweise um einen polyklonalen, monoklonalen, chimären oder »Single-chain«-Antikörper oder ein funktionelles Fragment oder Derivat (mit »funktionell« ist gemeint, daß das Fragment/Derivat ein Antigen binden kann, ohne daß notwendigerweise eine Immunogenität damit verbunden ist) eines derartigen Antikörpers handeln.

[0027] Im folgenden wird die Erfindung ohne Beschränkung unter Bezugnahme auf konkrete Ausführungsformen und Beispiele anhand von Nukleinsäuren als Sonden-Biomolekülen detaillierter erläutert.

Herstellung des Copolymers:

[0028] Ein geeignetes Copolymer kann beispielsweise durch Copolymerisation von Methacrylsäure und Glycidylmethacrylat in einem 1 : 20 (mol/mol) Gemisch durch Zugabe von 1% AIBN (Azobisisobutyronitril) in eine Lösung der Monomeren in einem geeigneten Lösungsmittel (z.B. 10% (v/v) Monomere in Chloroform) hergestellt werden. Das entstandene Copolymer kann durch Fällen mit Diethylether abgetrennt werden.

[0029] Eine photoreaktive Seitengruppe kann zum Beispiel durch Zugabe von 5'-aminomodifiziertem Oligothymidin eingefügt werden. Wahlweise kann nun aminomodifizierte Nukleinsäure wie DNA an nicht abreagierte Glycidylreste gebunden werden bzw. gleichzeitig mit dem Oligothymidin zugegeben werden, so daß eine Konkurrenzreaktion zwischen dem Oligothymidin und der Nukleinsäure/DNA stattfindet. Die aminomodifizierte Nukleinsäure/DNA kann beispielsweise in einer wäßrigen Natriumphosphatlösung bei pH 9 an das Polymer gekoppelt werden.

[0030] Das so substituierte Copolymer kann nun vermessen werden (um den DNA-Gehalt zu bestimmen) und auf fast beliebige organische Polymeroberflächen als Substrat gedruckt werden. Die Immobilisierung des Polymers erfolgt über W-Bestrahlung bei 260 nm.

[0031] Bei einem anderen Ansatz wird ein Copolymer aus einem eine W-reaktive Gruppe aufweisenden Monomer, einem reaktiven Monomer und einem hydrophilen (nicht reaktiven) Monomer gebildet. Z.B. 4-Methacryloyloxybenzophenon, Glycidoxymethacrylat und Methacrylsäure. Von diesem Polymer wird eine 50 nm dicke Schicht auf einem PMMA-Sub-

strat erzeugt. Die Immobilisierung des Polymeren erfolgt hier ausschließlich über eine photoinduzierte Kupplungsreaktion zwischen den im Polymer enthaltenen Benzophenon-Gruppen und dem Substrat, ausgelöst durch W-Bestrahlung bei 300 nm.

Patentansprüche

1. Verfahren zur kovalenten Immobilisierung von Sonden-Biomolekülen an organischen Oberflächen, bei dem

(a) ein Sonden-Biomolekül direkt, oder indirekt über einen Abstandhalter, mit einer oder mehreren photoreaktiven Gruppe(n) versehen wird, und

(b) das Reaktionsprodukt aus (a) auf eine organische Oberfläche aufgebracht und durch Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge daran kovalent immobilisiert wird, oder

das Reaktionsprodukt aus (a) an ein lösliches Polymer oder Copolymer gebunden wird, welches dann an einer organischen Oberfläche kovalent immobilisiert wird.

2. Verfahren zur kovalenten Immobilisierung von Sonden-Biomolekülen an organischen Oberflächen, bei dem

(a) ein lösliches Polymer oder Copolymer mit reaktiven Gruppen hergestellt und nach der Polymerisation Oligomere oder Polymere mit einer oder mehreren photoreaktiven Gruppe(n) und Sonden-Biomolekülen kovalent gebunden werden, oder

(b) die das lösliche Polymer oder Copolymer mit reaktiven Gruppen bildenden Monomeren, copolymerisationsfähige Monomere mit einer oder mehreren photoreaktiven Gruppe(n) und copolymerisationsfähige Sonden-Biomoleküle copolymerisiert werden,

(c) das Reaktionsprodukt aus (a) oder (b) auf eine organische Oberfläche aufgebracht und durch Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge daran kovalent immobilisiert wird.

3. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei als photoreaktive Gruppe(n) (eine) unter Benzophenon oder Derivaten davon, Anthrachinon oder Derivaten davon und Thymin oder Derivaten davon ausgewählte Gruppe(n) verwendet wird/werden.

4. Verfahren nach Anspruch 2, wobei in Schritt (a) das lösliche Polymer oder Copolymer mit reaktiven Gruppen durch Copolymerisation von (Meth)acrylsäure und/oder Dimethylacrylamid und/oder Vinylpyrrolidon und Glycidylmethacrylat hergestellt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei in Schritt (a) die photoreaktiven Oligomeren oder Polymeren durch kovalente Bindung von 5'-aminomodifiziertem Oligothymidin und die Sonden-Biomoleküle durch kovalente Bindung von 5'-aminomodifizierten Son-

den-Biomolekülen gebildet werden.

6. Verfahren nach Anspruch 2, wobei als Comonomere in Schritt (b) 5'-arylmodifiziertes Oligothymidin und 5'-aryl- oder 3'-modifizierte Sonden-Biomoleküle mit einem oder mehreren Acrylat(en) oder Methacrylat(en) copolymerisiert wird/werden.

7. Verfahren nach Anspruch 2, wobei als Comonomere in Schritt (b) 4-Methacryloyloxybenzophenon und 5'-aryl- oder 3'-modifizierte Sonden-Biomoleküle mit einem oder mehreren Acrylat(en) oder Methacrylat(en) copolymerisiert wird/werden.

8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die photoreaktive(n) Gruppe(n) Ultraviolett-reaktiv ist/sind.

9. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei in dem in Anspruch 1 definierten Schritt (b) oder dem in Anspruch 2 definierten Schritt (c) die Aufbringung durch Aufdrucken unter Musterbildung erfolgt.

10. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Polymeroberfläche aus Cycloolefincopolymeren, Polystyrol, Polyethylen, Polypropylen oder Polymethylmethacrylat besteht.

11. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei als Sonden-Biomolekül ein Partner eines spezifisch wechselwirkenden Systems von komplementären Bindungspartnern (Rezeptor/Ligand) verwendet wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei das spezifisch wechselwirkende System von komplementären Bindungspartnern auf der Wechselwirkung einer Nukleinsäure mit einer komplementären Nukleinsäure, der Wechselwirkung einer Peptidnukleinsäure mit einer Nukleinsäure, der Enzym/Substrat-, Rezeptor/Effektor-, Lectin/Zucker-, Antikörper/Antigen-, Avidin/Biotin- oder Streptavidin/Biotin-Wechselwirkung beruht.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Nukleinsäure eine DNA oder RNA oder ein Analogon davon ist.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die DNA oder RNA ein Oligonukleotid ist.

15. Verfahren nach Anspruch 12, wobei der Antikörper ein polyklonaler, monoklonaler, chimärer oder »Single-chain«-Antikörper oder ein funktionelles Fragment oder Derivat eines derartigen Antikörpers ist.

16. Organische Oberfläche mit kovalent darauf immobilisierten Sonden-Biomolekülen, erhältlich

nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15.

17. Organische Oberfläche mit unter Musterbildung kovalent darauf immobilisierten Sonden-Biomolekülen, erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15.

18. Verwendung einer organischen Oberfläche nach Anspruch 17 als Sensor-Chip.

19. Medizinisches oder diagnostisches Instrument, daß eine organische Oberfläche nach Anspruch 16 oder 17 aufweist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen