

(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2004-517297
(P2004-517297A)

(43) 公表日 平成16年6月10日(2004.6.10)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D 4B024
C 1 2 M 1/00	GO 1 N 33/53	M 4B029
C 1 2 N 15/09	C 1 2 M 1/00	A 4B063
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A

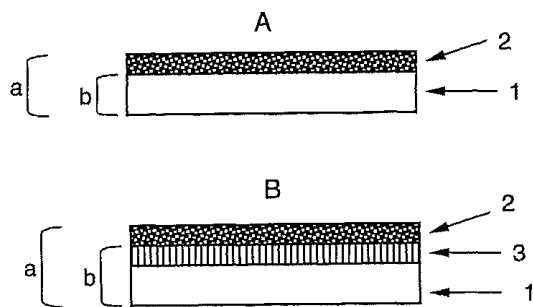
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 64 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-581123 (P2001-581123)	(71) 出願人 502386019 ビオレフ ゲーエムベーハー ドイツ連邦共和国, 63776 メンブリス, ダムヴェーク 1
(86) (22) 出願日 平成13年3月14日 (2001.3.14)	
(85) 翻訳文提出日 平成14年10月24日 (2002.10.24)	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2001/002851	
(87) 国際公開番号 W02001/084150	(74) 代理人 100070150 弁理士 伊東 忠彦
(87) 国際公開日 平成13年11月8日 (2001.11.8)	(74) 代理人 100091214 弁理士 大貫 進介
(31) 優先権主張番号 100 20 704.9	(74) 代理人 100107766 弁理士 伊東 忠重
(32) 優先日 平成12年4月27日 (2000.4.27)	(72) 発明者 シュタープ, ハンス-ユールゲン ドイツ連邦共和国, 82319 シュタルンベルク, アム・ミュールベルクシュレツスル 5
(33) 優先権主張国 ドイツ (DE)	Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA09 HA12
(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), AU, BR, CA, CN, CZ, EE, HU, IL, IN, JP, KR, LT, LV, MX, NO, NZ, PL, RU, SG, SI, SK, TR, US, ZA	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物学的サンプル材料のアーカイブ及び臨床分析用のバイオチップ

(57) 【要約】

診断使用のためのバイオチップは、生物学的域元から生ずる分析されるべきサンプル材料が表面に結合される固体マトリクスよりなるサンプルサポートを有する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

分析されるべき、生物学的生物から生ずるサンプル材料が表面に結合される固体マトリクスのサンプルキャリアを有する、診断目的用のバイオチップ。

【請求項 2】

上記生物学的サンプル材料は、上記サンプルキャリアの上記マトリクスの上記表面に直接的に結合され、上記サンプルキャリアの上記マトリクス又は表面は、上記サンプル材料に対する上記表面の結合容量を改善するために化学的若しくは物理的方法によって好ましくは事前に処置されることを特徴とする請求項 1 記載のバイオチップ。

【請求項 3】

上記バイオチップの各単一の試料の表面には、個々の生物学的生物、好ましくは、個々の患者からのサンプル材料が結合されることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のバイオチップ。

10

【請求項 4】

上記表面に結合される上記生物学的材料は、好ましくは全血、血漿、血清、尿、腹水、羊水、唾液、液、体腔からの洗浄材料或いは気管支肺胞洗浄等のような体液、組織のサンプル若しくは臓器のサンプル、又は、上記体液、組織若しくは臓器のサンプルからの成分、細胞、分画、濃縮物若しくは抽出物であることを特徴とする請求項 1 乃至 3 記載のバイオチップ。

【請求項 5】

上記サンプルキャリアの上記表面はマイクロ域に、好ましくは 1 cm^2 当たり少なくとも 100 のマイクロ域に細分化され、上記マイクロ域は、窪みとして構成されるか、疎水性の若しくは非可溶性の境界領域によって互いから離間されることが好ましいことを特徴とする請求項 1 乃至 4 のうちいずれか一項記載のバイオチップ。

20

【請求項 6】

生物学的材料を結合するのに適当な表面を有し、請求項 1 記載のバイオチップを形成するのに適切であることを特徴とする固体マトリクスよりなるサンプルキャリア。

【請求項 7】

上記生物学的材料を結合するのに適当な上記表面はマイクロ域に細分化されることを特徴とする請求項 6 記載のサンプルキャリア。

30

【請求項 8】

1 cm^2 当たり少なくとも 100 マイクロ域を好ましくは有し、上記マイクロ域は窪みとして構成されるか、疎水性の又は非可溶性の境界領域によって互いから離間されることを特徴とする請求項 7 記載のサンプルキャリア。

【請求項 9】

上記バイオチップ又は上記サンプルキャリアの表面積は、最大で 10 cm^2 、好ましくは最大で 4 cm^2 であり、上記サンプルキャリアは好ましくは平坦形状体、より好ましくは正方形若しくは長方形の外形を有して構成され、上記平坦形状のサンプルキャリアの厚さは好ましくは 3 mm 未満、特に好ましくは 1 mm 未満であることを特徴とする請求項 1 乃至 5 のうちいずれか一項記載のバイオチップ、又は、請求項 6 乃至 8 のうちいずれか一項記載のサンプルキャリア。

40

【請求項 10】

上記サンプルキャリアの上記マトリクス又は上記表面は、化学的若しくは物理的な方法で事前に処置され、又は、上記サンプルキャリアの上記表面は、化学的若しくは物理的な事前処置によって拡大されることを特徴とする請求項 1 乃至 9 のうちいずれか一項記載のバイオチップ又はサンプルキャリア。

【請求項 11】

上記表面に対する上記サンプル材料の結合を改善するためには、上記サンプルキャリアの上記表面は、リンカー層でコーティングされ、上記リンカー層を用いて上記サンプルキャリアが結合されることを特徴とする請求項 1 乃至 10 のうちいずれか一項記載のバイオチ

50

ップ又はサンプルキャリア。

【請求項 1 2】

上記リンカー層は、好ましくは、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖、脂質、核酸のような特定のグループの生物学的マクロ分子の選択的な結合若しくは濃縮、又は、細胞若しくはある細胞のタイプ又は細胞集団の結合又は濃縮を可能にするリンカー分子よりなり、上記リンカー層の異なる表面部分は好ましくは異なるタイプのリンカー分子を含むことを特徴とする請求項 1 1 記載のバイオチップ又はサンプルキャリア。

【請求項 1 3】

上記サンプルキャリアの上記表面上の上記リンカー層は、断続的となるよう構成されて上記リンカーを含む表面のマイクロ域と中間のリンカーを含まないゾーンとが形成され、1 cm^2 当たり少なくとも 100 のマイクロ域が存在することを特徴とする請求項 1 1 又は 1 2 記載のバイオチップ又はサンプルキャリア。

10

【請求項 1 4】

好ましくは機械読み取り可能なバーコード、機械読み取り可能な磁気ストリップ、デジタル記憶素子、又は、他の機械読み取り可能な記憶媒体を用いて、バイオチップの識別、患者関連データの記憶、又は、分析データの記憶を可能にする手段を具備することを特徴とする請求項 1 乃至 1 3 のうちいずれか一項記載のバイオチップ又はサンプルキャリア。

【請求項 1 5】

シート状のマトリクス生材料は機械的に分離されてバイオチップに適した寸法の表面の片が得られ、又は、マトリクス生材料は液化され、続いて好ましくは射出成型のような鑄造方法を用いて対応する成型に鑄造されることを特徴とする請求項 6 記載のサンプルキャリアの形成プロセス。

20

【請求項 1 6】

得られた上記サンプルキャリアの表面は、マイクロ域に細分化され、上記細分化は、

- a) 上記表面の物理的処置、
- b) 上記表面の化学的処置、
- c) プリンティング方法、

d) ピペットロボットを用いた上記マイクロ域の域へのリンカー分子の適用、又は、

e) 上記方法の少なくとも 2 つを組合すことで実現されることを特徴とする請求項 1 5 記載のプロセス。

30

【請求項 1 7】

a) 検査されるべき生物から体液若しくは組織サンプルの形態で生物学的サンプル材料を得る段階と、

b) 体液、細胞、又は、組織サンプルから得た液体若しくは懸濁したサンプル材料でコーティングすることによりサンプルキャリアの表面にサンプル材料を結合することでバイオチップを形成し、乾燥する段階と、

c) ピペットロボットを用いて上記バイオチップの一つのマイクロ域に特定の診断検出試薬を適用し、関連する検出反応に適した条件下でインキュベートする段階と、

d) 未特定の反応を抑制するために洗浄液を適用し、上記洗浄液を除去する段階と、

e) 必要な場合に段階 c) と d) を繰り返す段階と、

40

f) 正に反応するマイクロ域からの測定信号を検出する段階と、

g) 測定データをコンピュータ支援評価し、上記測定データを記憶する段階と、を有する診断検出方法。

【請求項 1 8】

上記段階 a) では、上記生物学的サンプル材料は上記サンプルキャリアの上記表面に結合される前に好ましくは、遠心分離法、細胞崩壊又は抽出によって用意されることを特徴とする請求項 1 7 記載の方法。

【請求項 1 9】

上記段階 c) 乃至 g) は、1 つ以上のバイオチップに並列に若しくは同時に実施されることを特徴とする請求項 1 7 記載の方法。

50

【請求項 20】

バイオチップの個々のマイクロ域は、異なる特定の診断検出試薬を用いて同時に若しくは順次に処置されることを特徴とする請求項 17 記載の方法。

【請求項 21】

上記段階 c) で利用される特定の診断検出試薬は、抗体、抗原、レクチン、DNA プローブ、生体分子結合染料、又は、他の特定結合分子であることを特徴とする請求項 17 記載の方法。

【請求項 22】

上記測定信号の検出は、CCD カメラ、フォトランジスタ、又は放射能、蛍光若しくは発光検出器を利用して行われることを特徴とする請求項 17 記載の方法。

10

【請求項 23】

ある患者のサンプル材料でコーティングされた同じバイオチップは、連続して 2 回又は何回か上記段階 c) 乃至上記段階 f) 又は上記段階 c) 乃至上記段階 g) に従って分析され、上記バイオチップは連続する分析の間の期間中は保存され、上記バイオチップの異なるマイクロ域は連続する分析において検出試薬で処置されることを特徴とする請求項 17 記載の方法。

【請求項 24】

診断検出反応のための及び / 又は患者から収集したサンプル材料を保存及びアーカイブするための、請求項 1 乃至 14 のうちいずれか一項記載のバイオチップ若しくはサンプル材料、又は、請求項 17 又は 18 の段階 a) 及び段階 b) 記載のプロセスの使用。

20

【請求項 25】

患者のサンプルのルーチン診断、臨床研究、又は、疫学的研究における目的のため、血液バンク、企業、若しくは、他の機構、或いは、腫瘍診断における質の保証及び質の確認の目的のため、又は、裁判目的のために患者のサンプル材料を保存及びアーカイブする請求項 24 記載の使用。

【請求項 26】

薬学又は動物学の目的のため、腫瘍診断のため、臨床研究における腫瘍マーカー分析のため、血液バンク、企業若しくは他の機構における質の保証のため、疫学的研究のため、組織タイピングのため、又は、裁判目的のための請求項 17 乃至 23 記載のプロセスの使用。

30

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、診断目的のために適切であり、分析されるべき生物学的サンプル材料でコーティングされており、場所を節約してサンプル材料をアーカイブし、サンプル材料に臨床検査診断分析を行うことに夫々適しているバイオチップに関わる。本発明は、更に、このようなバイオチップの作成に適切なサンプルキャリアと、上記したサンプルキャリア又はバイオチップの作成のための処理とに関わる。本発明は、更に、本発明のバイオチップを用いた診断方法、並びに、様々な医学分野における本発明のバイオチップ及び診断方法の使用に関わる。

【0002】

臨床検査診断は、治療法における重要な基礎を成す。利用できる診断マーカー分子の数が増加することで、臨床検査診断の可能性が常に広がっている。行われるべき検出反応のボリューム、緊急度、並びに、経済的理由により、短時間で多数の異なる分析を取り扱うことができる自動分析方法が優先的に用いられる。

40

【0003】

患者の健康状態を臨床検査分析するための生材料は、典型的には、全血、血漿、血清、尿、腹水、羊水、唾液、液等のような体液、又は、異なる臓器の組織サンプルである。治療する医師は、可能性として患者に特定の治療、例えば、遠心分離法を受けさせて患者からサンプルを集め、患者のサンプルを試験管の中に移し、このサンプルは、試験管に入れられたまま送り出されるか分析が実施されるまで保存される。

50

【0004】

分析されるべきパラメータ、即ち、分析されるべき成分（分析物）によって、サンプルは、室温で保存され、又は、冷やされるか冷凍状態で保存される。長期保存の場合、即ち、数週間、数ヶ月、又は、数年にわたって保存される場合、患者のサンプルは、分析物の劣化を防止するために - 20 以下の温度で冷凍されなくてはならない。室温で生ずる劣化の主な原因は、液体サンプル材料において特有の酵素活性化である。

【0005】

長期保存の典型的なサンプル容積は、少なくとも 500 μ l である。1 回目の分析後に更なる分析的測定が後の時点で、又は、後の異なる時点で行われるべき場合、血液の元の収集物から幾つかの 500 μ l のサンプルが調製され、保存され、又は、冷凍状態で保存されなくてはならない。これらサンプルは比較的場所を多く占有するため、長期間にわたる保存は比較的高価となる。このため、患者のサンプルを長期間保存することは、一般的に用いられない。しかしながら、これは、前に集めたサンプルを後で見直す可能性を失うこととなる。多くの場合、特に、ある診断パラメータに関して、患者の現在の状態を同じ患者の初期の状態と比較することが重要となる時、望ましい、又は、必要となる場合もある。場合によっては、関連パラメータに関するトレンド分析を実施するために、様々な時点で患者の以前の状態を幾つか記録することが便利となる。しかしながら、このような比較は、関連の診断テストが以前に行われていない、又は、行われ得てなく、元のサンプルが保存されていない場合にはできない。

10

【0006】

患者の健康状態の分析に関して、最も異なる種類の方法が臨床検査で現在利用されている。これら方法の中でも、先ず、酵素の活性化測定、特別な呈色反応、免疫化学方法、細胞学的方法、分子生物学的方法がある。近年では、免疫化学方法が中でも重要となり、多くの従来方法の代わりとなった。分子生物学的方法もルーチン診断において登場しつつある。

20

【0007】

現在利用されている免疫化学分析システムは、多くの場合約 10 - 500 μ l の容積で行われる抗原抗体反応に基づいている。ここでは、検出されるべき分析物を含む患者のサンプル（体液等）、この場合、抗原は、このパラメータに特定の抗体と一緒にインキュベートされこの分析物だけを認識し結合する。この抗原抗体反応の生成物は、抗体結合の抗原を含む複合体である。患者のサンプル中の抗原の濃度が高い程、形成される抗原抗体複合体の濃度も高くなる。現在のテストシステムでは、これら抗原抗体反応は、溶液中で自由に（濁度測定又は比濁分析によって検出）行われるか、抗原特定表面（例えば、RIA、ELISA）で実施される。抗原抗体反応が行われると、1 回目の場合では、抗原抗体複合体は溶液にあり、2 回目の場合では、固相、主にプラスチック表面に結合される。抗原抗体複合体の検出及び定量化は、濁度測定又は比濁分析の場合には濁度を測定することで実施され、RIA（放射免疫測定）の場合には放射検出と共に放射線同位体マーク抗体によって実施され、ELISA（酵素免疫測定）及びLIAの場合には酵素触媒の呈色反応の検出と共に酵素マークされた抗体によって実施される。これらテストシステムを手段として、分析物及び抗原の濃度は、1 pg/ml（タンパク質）までの範囲で検出され得る。

30

40

【0008】

実験的技術において確立された上記分析システムの小型化及び自動化は、現在集中的に研究されている。このため、近年では、様々な小型化された固相リンクテストシステムが開発され、これらシステムはその大きさの小ささのためコンピュータチップに類似して「バイオチップ」と呼ばれる。このようなバイオチップの大きさは、典型的には、0.25 乃至 9 cm^2 である。ある文献に記載されているバイオチップは、ガラスの固体マトリクス（S. P. A. Foder 外：Light - directed, spatially addressable parallel chemical synthesis; Science 251 (1991年2月), p. 767 - 773); C. A. Ro

50

we外: An array immunosensor for simultaneous detection of clinical analytes; Analytical Chemistry Col. 71 (1999年1月15日) p. 433 - 439; L. G. Mendoza外: High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); BioTechniques 27 (1999年10月), p. 778 - 788)、ナイロン若しくはニトロセルロース膜、ケイ素樹脂 (J. Cheng外: Chip PCR. Nucleic Acids Research Col. 24 (1996) p. 380 - 385)、又は、シリコンを含む。異なるリンカー分子を通じて、これらマトリックスに生体分子、例えば、DNA、ペプチド、タンパク質を共有結合することも可能である。3.6 cm²の表面には、10000までの異なる生体分子を与えることができ、これには互いから分離しているマトリックスの特定域への生体分子のマイクロメートルに正確なアドレス指定を必要とする。これは、例えば、生体分子の写真平版的に制御される合成 (S. P. A. Foder外: Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis; Science 251 (1991年2月), p. 767 - 773) によって、又は、精度機械的な、マイクロプロセッサ制御されたプログラム可能なピペットロボットを用いた生体分子のスポットオン (L. G. Mendoza外: High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); BioTechniques 27 (1999年10月), p. 778 - 788; M. Eggers外: A microchip for quantitative detection of molecules utilizing luminescent and radioisotope reporter groups; BioTechniques 17 (1994), p. 516 - 523) によって実現され得る。

【0009】

固相結合された生体分子を用いて、患者のサンプルに含まれる分析されるべき分析物は、続いて適切な検出システムで結合され検出され得る。

【0010】

高感度の検出システムとして、例えば、電荷結合素子 (CCD) カメラ (L. G. Mendoza外、M. Eggers外; 前掲箇所)、フォトランジスタ (T. Vo-Dinh外: DNA biochip using a phototransistor integrated circuit; Analytical Chemistry 71 (1999) p. 358 - 363)、及び、蛍光検出器 (S. P. A. Fodor外; 前掲箇所) が使用されている。

上記バイオチップは、現在では、研究目的、例えば、DNA塩基配列決定法、遺伝子発見分析、遺伝子突然変異分析、及び、タンパク質結合研究、即ち、抗体結合研究のためだけに使用されている。遺伝子発見分析 (M. Chena外: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray; Science 270 (1995年10月20日) p. 467 - 470) では、ある遺伝子に対して補完的なDNA配列がピペットロボットを用いてチップブランクのマトリックスにスポットオンされ、このとき、一つのスポット全てがある遺伝子を表している。続いて、mRNAは、分析されるべき組織サンプルから分離され、蛍光染料でマーキングされ、バイオチップ全体に与えられる。次に、マーキングされたmRNA分子のバイオチップのある部位への結合が検出され得る。分析が行われた後、バイオチップは、mRNAサンプルで汚染されているため廃棄される。同様にして、バイオチップは、DNA配列分析、及び、遺伝子突然変異分析にも利用され得る。

【0011】

サンプル材料の免疫化学分析に関して、Mendoza外 (前掲箇所) は、小型化された

テストシステムのプロトタイプを記載した。著者は、96の窪み(ウェル)のある特別なガラススライドを用い、各窪みには144の異なる抗原を含むスポットの様子がピペットロボット及びキャピラリー・プリンティング方法を用いて印刷される。抗体を含む溶液でインキュベートされた後、抗原抗体複合体が形成されたスポットは、CCDカメラを用いて検出され得る。

【0012】

従って、従来技術から公知のバイオチップは、特定の、選択された、又は、特別に合成された分子が、定められ小型化された配置で固体マトリクスに与えられ結合される実施例に制限される。これら分子は、異質成分からなる混合物、例えば、患者のサンプル中である分析物の存在を検出する機能を担う。つまり、これらバイオチップは、テスト指定、即ち、チップに存在する検出分子によって予め決定された検出反応だけを許可する。

10

【0013】

このアプローチ法は、臨床診断的用法に関して幾つか不都合な点を有する。このアプローチ法を用いると、多数の異なる測定を同時に実施することができるが、多くの場合限定された数のパラメータ、即ち、分析物だけが明らかであるといった問題がある。つまり、あるチップに存在する複数の検出分子は、未使用のままであるか、関心のないものである。更に、患者のサンプルとインキュベートされた後、このようなバイオチップが原則として更なる分析のために使用されてはならないことを考慮しなくてはならない。これらの理由により、上記タイプのバイオチップの使用は、臨床検査におけるルーチン検出方法にはさほど適してなく、費用効果的な方法で利用され得ない。

20

【0014】

更に、これまで公知のバイオチップでは、更に行う各分析に対して新しい患者のサンプル材料が必要であった。その結果、患者は血液サンプルを取られるために何回か出向かなくてはならず、医師及び患者夫々に対してある程度の労力を伴う。既に収集されたサンプルを用いて後の時点である検査が繰り返されるべき場合、サンプル材料を液体又は冷凍状態で中間保存する必要が生じ、上記欠点を伴うこととなる。

【0015】

開発が進んだ結果、新規の検出反応が常にアクセス可能にされている。従来技術から公知のバイオチップをこのような新しく開発された検出反応で使用可能にするためには、バイオチップは常に最新化されなくてはならず、これは、高支出を伴い、更には、時間的に遅

30

【0016】

時として、新しい検出方法が利用できるようになると、ある患者の元のサンプル材料がもはや利用できなくなり、患者のサンプル材料の長期保存が問題であるために関心のある臨床パラメータの時間における変化を検査することができない場合が多い。従来技術から公知のバイオチップは、この問題の解決策には寄与し得ない。

【0017】

本発明の基礎を成す作業は、従って、診断目的のためにバイオチップの形態にある小型化された分析システムを提供することであり、この分析システムは、比較的長い時間間隔の場合でも同じ患者のサンプル材料に対して分析的検出方法を繰り返し実行することを可能にする。更に、バイオチップは、長期間にわたってサンプル材料を場所を節約して保存且つアーカイブすることを可能にする。

40

【0018】

更に、本発明の基礎を成す作業は、バイオチップを前記必要条件に従わせて検出反応の自動実施を可能にする方法を提供する。この方法は、非常に柔軟、即ち、他の元々意図されていない検出反応に容易に適応可能でなくてはならない。更に、処理は、時間の間隔で同じサンプル材料に対して繰り返し検査を行うことを可能にさせる。

【0019】

前記問題は、請求項1記載のバイオチップによって、及び、請求項17記載の診断検出処理によって解決され得る。従属項は、前記問題を同様に解決する本発明の更なる実施例に

50

関する。

【0020】

請求項1によると、本発明によるバイオチップは、分析されるべき、生物学的生物からのサンプル材料が表面にリンクされている固体マトリクスからなるサンプルキャリアを有する。従って、分析されるべきサンプル材料は固相にリンクされている。

【0021】

最新技術から公知のバイオチップと比べて、本発明の場合、どの具体的に選択された又は合成された分子もチップの表面に結合されていないが、その代わりに、サンプル材料自体、例えば、異なる生体分子の異質成分からなる混合物を含む体液が結合されている。従って、本発明によるバイオチップは、患者指定の又は患者のサンプル指定チップであり、これまでの公知のバイオチップはテスト指定、即ち、検出指定バイオチップである。サンプル材料の結合は、サンプルキャリアマトリクスの表面に直接的に行われてもよい。サンプルキャリアのマトリクス又は表面は、サンプル材料に対する表面の結合容量を改善するために化学的又は物理的な方法によって予め処置されることが好ましい。この目的に適切な方法、例えば、エッチング又は粗処理は、当業者に公知である。

10

【0022】

本発明によるバイオチップの一般的な構造は、図1Aから分かり、図1Aは、サンプルキャリア(b)及びそこに結合されたサンプル材料(2)を含むバイオチップ(a)の断面図である。サンプルキャリアは、実質的に固体マトリクス(1)よりなる。

【0023】

サンプル材料の結合は、サンプルキャリアの表面に適用されるリンカー分子の層(リンカー層)を手段として任意に行われてもよい。

20

【0024】

このようなバイオチップ(a)の概略的な構造は、図1Bに示されており、同図は、固体マトリクス(1)及び固体マトリクスの上に位置するリンカー層(3)を含むサンプルキャリア(b)の断面図であり、サンプル材料(2)はリンカー層を介してサンプルキャリアの表面に結合される。

【0025】

本発明のバイオチップを用いると、診断検出反応は、以下に詳細に説明するように、サンプル材料でコーティングされているバイオチップの非常に小さい域に、検出に適した分子が適用されるようにして主に行われる。このようにして、同時に又は連続的に、異なる診断試薬を用いてバイオチップの表面の異なる域を処置することが可能となる。

30

【0026】

本発明のバイオチップでは、検出に使用される分子ではなく、分析されるべきサンプル材料がバイオチップのマトリクスを形成するサンプルキャリアの表面に結合され、このようなチップの用途及び適用分野は、製造によりある選択された診断分子に制限されない。むしろ、有用な又は必要な診断検出試薬の選択は、検出方法が適用されるときだけ行われるため、適用が非常に柔軟となる。

【0027】

本発明によるバイオチップでは、分析されるべきサンプル材料は、サンプルキャリアの表面に結合される。サンプル材料は、乾燥した状態にあるため、室温でも保存中安定している。本発明のバイオチップは小型化システムであるため、患者のサンプル材料を場所を節約して且つ経済的に保存及びアーカイブすることが可能となる。このようにして、本発明による多数の患者指定バイオチップは、小さい場所で保存され得、多数の分析的検出反応を実施することに利用できる。

40

【0028】

バイオチップをアーカイブする可能性は、互いとは無関係にチップ表面の様々な部位で幾つかの検出反応を実施する可能性と共に、特定の患者、又は、患者の特定のサンプルにおける特定の診断マーカーの検査を異なる時間の間隔でできるようにする。特に、元々、即ち、サンプル収集時に計画されていないような場合でも後の時点でこのような診断検査が

50

できるといったことが有利である。これは、収集後の後の時点で展開した検出反応に特に適用される。

【0029】

本発明によるバイオチップの個々の試料は、夫々決まった個人の生物学的生物から収集されたサンプル材料、例えば、ある患者からのサンプル材料を含むことが好ましい。人間以外で、適切なサンプル材料を得ることができる更なる生物学的生物は動物、植物、菌類、及び、微生物である。

【0030】

バイオチップの表面にリンクされるサンプル材料として好ましく使用されるものは、例えば、全血、血漿、血清、尿、腹水、羊水、唾液、液、体腔からの洗浄材料或いは気管支肺胞洗浄等のような体液である。同様にして、組織のサンプル若しくは臓器のサンプル、又は、上記液体或いは組織若しくは臓器のサンプルからの成分、細胞、分画、細胞崩壊材料、濃縮物若しくは抽出物が使用されてもよい。ある場合では、サンプル中にあれば関心のある分析物が中に濃縮されるように事前処置を施すことも適当である。例えば、血清分析に関して、血液サンプルの固体成分は、遠心分離法によって分離され、続いて、このようにして得られた血清はサンプルキャリアの表面に与えられ結合される。

10

【0031】

特に有利な実施例では、サンプル材料が載せられた本発明によるサンプルキャリアの表面はマイクロ域に区分されている。これらマイクロ域は、互いに近接して配置されているが互いから離間されている非常に小さい表面域である。通常、表面は、複数のこのようなマイクロ域に、好ましくは少なくとも 1 cm^2 当たり100マイクロ域に細分化される。ある用途に関して、1単位域当たり比較的少ない数のマイクロ域、例えば、 1 cm^2 当たり10乃至100マイクロ域で十分である。マイクロ域は、窪みとして好ましくは構成されてもよく、又は、疎水性の若しくは非溶性の境界領域によって互いから離間されてもよい。サンプルキャリアに疎水性の又は非溶性の境界領域を設けることによって、これら領域におけるサンプル材料のリンクを防止することができ、従って、個々の境界領域の間に位置するこれら境界領域にはサンプル材料がない。マイクロ域の構成は、以下に図2及び図3を参照し例として更に示す。

20

【0032】

チップ表面をマイクロ域に区分にすることによってピペットロボットによる単一の部位の検出及び処置が容易となるため、分析的検出反応の実行が改善される。特に、マイクロ域が正規グリッド又はスクリーンの形態で設けられた場合、夫々の座標を用いて個々のマイクロ域を識別しアドレス指定することが可能となる。それにより、ピペットロボットを用いてバイオチップの個々の部位に検出試薬を選択的に適用することが簡略化される。同時に、サンプル材料でコーティングされたチップ表面の区分は、検出信頼度を向上させ、個々のマイクロ域が境界領域によって互いから分離されているか窪みの形態で存在するため、望ましくない反応又は汚染の危険性が防止される。

30

【0033】

サンプル材料が表面に結合されている、本発明によるバイオチップのサンプルキャリアは、実質的に固体マトリクスよりなる。サンプルキャリアのマトリクスの適切なベース材料は、例えば、ケイ素樹脂、プラスチック（例えば、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリウレタン、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリテレフタル酸エチレン、ポリアミド、ニトロセルロース）又は、ガラスであるが、他の固体材料が使用されてもよい。透明な固体材料が優先して使用される。しかしながら、マトリクス材料を選択するとき、意図するサンプル材料を確実に結合することに適切かを考慮しなくてはならない。サンプルキャリアは、少なくとも2つの異なるマトリクス材料の積層体でもよく、このとき2層のうち的一方が剛性なキャリア層となり、他方がサンプル材料を結合する表面となることが好ましい。

40

【0034】

既に上記した通り、サンプル材料がリンクされているサンプルキャリアの表面がマイクロ

50

域に細分化されている場合、特に有利である。本発明によるバイオチップの外側の寸法は、小型化の要件が満たされるように選択される。このようなバイオチップの、又は、このようなバイオチップを形成するためのサンプルキャリアの表面は、最大で 10 cm^2 、好ましくは、最大で 4 cm^2 、特に好ましくは最大で 1 cm^2 である。

【0035】

サンプルキャリア、従って、バイオチップは、優先的に、平坦形状体として構成され、特に好ましくは正方形の又は長方形の外形を有する。しかしながら、他の幾何学的形状、例えば、丸又は円形のサンプルキャリア又はバイオチップも好適である。平坦形状のサンプルキャリアの厚さは好ましくは 3 mm 未満、特に好ましくは 1 mm 未満である。個々の場合では、バイオチップの外側の寸法は、既に利用できるピペットロボット又は分析オートマトンと互換性があり、このような機器において本発明によるバイオチップを使用することを可能にするよう選択される。

10

【0036】

本発明のバイオチップを形成するためには、サンプルキャリアの表面は、生物学的サンプル材料でコーティングされ、この材料は、サンプルキャリアの表面に結合され、この結合は、共有又は非共有でもよい。サンプル材料を結合する、従って、生体分子を結合する能力を向上するためには、あるマトリクス材料をサンプルキャリアとして使用するとき、これら材料、従って、サンプルキャリアの表面に化学的又は物理的方法（例えば、エッチング）を受けさせて結合能を向上させることが有用となる場合もある。更に、化学的な又は物理的な前処置により、サンプルキャリアの表面は拡大され得、従って、結合能が向上する。この目的に適切な方法は当業者に公知である。

20

【0037】

本発明の好ましい実施例によると、サンプル材料の、従って、その中に含まれる分析物（例えば、生体分子又は細胞）のサンプルキャリアの表面への結合を改善するために、又は、ある分析物、又は、分析物のグループ若しくはクラスの選択的な若しくは好ましい結合を生じさせるためにサンプル材料の適用前にサンプルキャリアの表面にリンカー層が設けられてもよい。このようにして、ある分析物の又は分析物のグループの濃縮又は事前選択を実現することが可能となる。これに関連して、リンカーは、一方でサンプルキャリアの表面、即ち、そのマトリクス材料と固く結合することができ、他方で、生物学的なサンプル材料を結合する、又は、生物学的なサンプル材料を選択的に又は好ましい方法で結合することができる化合物を意味すると理解する。

30

【0038】

好ましくは、サンプルキャリアの表面には好ましくは、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖、脂質、核酸のようなあるグループの生物学的マクロ分子の選択的な結合若しくは濃縮、又は、細胞若しくはある細胞のタイプ又は細胞集団の結合又は濃縮を可能にするリンカー分子の層が設けられる。更に、サンプルキャリアの表面の異なる域部分を異なるタイプのリンカー分子でコーティングすることも有利となり得る。このようにして、例えば、患者のサンプルに存在する分析物（例えば、生物学的マクロ分子の異なるクラス）の事前選択及び空間分離を行うことが可能となる。

【0039】

リンカー分子として、例えば、(L. C. Shriver - Lake; Antibody immobilization using heterobifunctional crosslinkers; Biosensors & Bioelectronics Col. 12 (1997), p. 1101 - 1106): N - スクシンイミジル - 4 - マレイミドブチレート (GMBS; アミノ基の結合に関して), 4 - (N - マレイミドメチル) - シクロヘキサ - 1 - カルボキシルヒドラジド - HCl ($\text{M}_2\text{C}_2\text{H}$; 残留糖の結合に関して)、又は、最も異なるマクロ分子又は細胞或いは細胞のタイプを結合することに関して既知の結合特性を有する抗体がある。

40

【0040】

既に述べたとおり、サンプルキャリア又はバイオチップの表面がマイクロ域に区分されて

50

いると有利である。既に記載した方法以外でこの区分化は、断続的に構成されたリンカー層によって実現されてもよい。この場合、リンカーを含む表面域のマイクロ域と、及び、それらの間にあるリンカーのないゾーンとが形成され、 1 cm^2 当たり少なくとも100マイクロ域が存在することが好ましい。

【0041】

サンプル材料を結合するのに最適で好ましくはマイクロ域に細分化されている表面を有するサンプルキャリアの製造は、様々な方法で達成され得る。バイオチップに好適な寸法の表面の片を形成するためには、通常大きい大きさのシート状のマトリクスの生材料（ガラス、プラスチック等）は、既知の機械的な方法を用いて対応する方法で分離され、それによりサンプルキャリアが得られる。或いは、対応するマトリクス生材料は、液化され、続いて適当な成型に例えば、射出成型によって鑄造されて、サンプルキャリアが形成される。

10

【0042】

記載したマイクロ域、従って、中間境界領域は、例えば、エングレービング、パンチング、エンボシング若しくはプリンティングのような物理的な方法を用いて、又は、エッチング若しくは疎水性の層を加えるような化学的方法によって形成され得る。更に、ピペットロボットを用いてサンプルキャリアの表面にマイクロ域の形態でリンカー層を与えることも可能である。更に、本発明のマイクロ域の形成を可能にするために様々な既知のプリンティング方法が適応され得る。最後に、前述の方法は、組み合わせて利用されてもよい。更に、既にシート状のマトリクス生材料であるマイクロ域に細分化することも可能であり、上記マトリクス生材料はその後、上記のような個々のサンプルキャリアに分離される。

20

【0043】

本発明によるバイオチップは、1つのバイオチップ当たり1人の特定の患者（「患者指定」バイオチップ）からのサンプル材料をアーカイブし、多数の診断分析を行うことに特に適切である。このようなチップのアーカイブ処理及び分析オートマトンにおけるその自動処理並びに評価を容易に又は可能にするために、本発明の更なる実施例によると、バイオチップ又は対応するサンプルキャリアに、バイオチップの識別、又は、患者関連データの保存、又は、分析データの保存を可能にする手段が設けられることが提案される。これは、好ましくは、機械読み取り可能なバーコード、機械読み取り可能な磁気ストリップ、デジタル記憶素子、又は、別のコンピュータ読み取り可能な記憶媒体を用いて行われ得る。多数の患者関連バイオチップがアーカイブ又は処理されなくてはならないときに上記実施例は有利となる。

30

【0044】

バイオチップにデータを保存する手段があることにより、例えば、サンプルを収集し、可能性としてサンプル材料をサンプルキャリアに適用する医師又は臨床医師が例えば、患者関連データ、又は、バイオチップ上のサンプルの収集に関連するデータを保存することができるようになる。更に、分析結果、又は、その評価を保存することも可能となり、それにより、以前に既に実施された分析に関する情報も保存することができる。

【0045】

本発明は、更に、サンプル材料を用いてバイオチップを製造する処理段階と、診断検出反応を実施し評価する段階とを有する診断検出方法を有する。

40

【0046】

最初に体液、組織サンプル等が患者又は別の生物から得られ、必要である場合、事前処置（例えば、遠心分離法、濃縮等）を受けさせる。必要な場合、サンプル材料は、適切な緩衝液又は溶剤に懸濁又は溶解される。バイオチップを作るためには、好ましくは液体の形態にあるこのサンプル材料は、例えば、ピペットによって又はディッピングによって本発明によるサンプルキャリアの表面に与えられる。数分間例えば、1乃至10分間にわたる短いインキュベーション時間の後、全ての余剰のサンプル材料は（例えば、吸引によって）除去される。その後、好ましくは、僅かに上昇した温度（30乃至60）で乾燥され、それにより、サンプル材料、従って、その中に含まれる分析物（例えば、生体分子）はサン

50

ブルキャリアの表面にリンクされ、又は、場合によってはリンカー層にリンクされる。前述の処理段階は、サンプル材料を収集する医師によって、又は補助医療スタッフによって行われる。従って得られた患者指定の又はサンプル指定のバイオチップは、続いて乾燥した状態で、室温で保存され得、直ぐに又は後で分析するために用意される。

【 0 0 4 7 】

サンプル材料でコーティングされたこのようなバイオチップに対して分析検出反応を実施するためには、後の段階で所望の検出試薬が上記バイオチップの個々の部位又は個々のマイクロ域に好ましくはピペットロボットを用いて与えられる。検出試薬として適切なものは、例えば、抗体、抗原、配列特異的抗体、レクチン、DNAプローブ、低分子の配位子、ホルモン、生体分子結合染料、又は、他の特定結合分子である。

10

【 0 0 4 8 】

バイオチップの記載した部位又はマイクロ域は、ある時間にわたってある温度でインキュベートされ、このとき、選択された検出試薬はある濃度であり、各場合における実験的パラメータは使用される検出試薬の種類及びサンプル材料に依存する。当業者は、適切な実験的パラメータの選択に通常精通しているであろう。

【 0 0 4 9 】

決められたインキュベート時間の後、液体検出試薬はピペットロボットを用いて吸引されて除去される。その後、次の段階では、同様にしてピペットロボットを用いて、洗浄溶媒、必要であれば、更なる検出試薬が分析されるべき部位又はマイクロ域に順番に適用され、吸引される。更に使用される洗浄溶液及び検出試薬、例えば、蛍光マーキングされた抗体並びに適切な反応条件は、原則として当業者に公知である。

20

【 0 0 5 0 】

最後に、正の検出反応が見られた部位又はマイクロ域は、適当な検出器によって識別される。これら測定信号の登録は、好ましくは、CCDカメラ、フォトランジスタ、又は、放射能、発光もしくは蛍光検出器を用いて実現されることが好ましく、検出方法の選択は、使用される検出試薬の種類に依存する。検出器によって供給される主な測定データは、コンピュータ支援評価を受けることができる。正の検出反応は、原則として、分析物（例えば、患者のサンプル中のある抗原）と、使用される検出試薬との間の特定の相互作用又はリンケージによって、例えば、抗原抗体複合体を形成することで生ずる。これらは、当業者に公知の、更なる反応段階又は試薬によって検出可能となる。

30

【 0 0 5 1 】

例えば、異なる患者からの本発明による比較的多数のバイオチップが記載した方法で同時に又は並列に分析される場合、即ち、検出反応及び検出が複数のバイオチップに対して同時に又は並列に実施される場合に特に有利である。

【 0 0 5 2 】

バイオチップ又は複数のバイオチップが並列（同時に）又は続いて順次に処置される場合に更に有利であり、このとき異なる検出試薬は異なる検出特異性を有し、各場合における上記検出試薬は前に検査されていない部位又はマイクロ域に適用される。このようにして、非常に短時間で、複数の患者指定バイオチップで診断マーカ分子の有無を試験することが可能となる。バイオチップのある部位又はマイクロ域が何回も検出反応のために使用されることを防止するために、既に「使用済み」の部位又は域の位置が登録されバイオチップの記憶媒体に記憶されてもよい。

40

【 0 0 5 3 】

更に、可能性として異なる濃度の同じ検出試薬を用いて同じバイオチップの異なる部位又はマイクロ域を分析することが可能となる。このようにして、検出の信頼度は、多数の、又は、並列の測定によって向上される。

【 0 0 5 4 】

検出反応と検出が行われた後、バイオチップは、アーカイブ及び保存のために戻され得、更なる検出反応に利用できるようにされる。つまり、ある患者のサンプル材料でコーティングされた同じバイオチップは、上記段階に従って、検出反応、検出及び評価を含む分析

50

を2乃至数回にわたって連続して受けることができ、このとき上記バイオチップは連続する分析の間の時間中保存又はアーカイブされる。連続的な分析において、バイオチップの異なるマイクロ域は、異なる検出試薬で処置される。

【0055】

比較的長い時間の間隔であっても、単一のバイオチップに対して複数の診断検出反応を実施する可能性により、必要なサンプル材料の量は相当減少され、即ち、比較的少ない量（例えば、0.5ml）の最初のサンプルに基づいてバイオチップを形成することが可能となり、長期間にわたる多数の検出反応を可能にする。

【0056】

本発明によるバイオチップは、それに結合された生材料と共に、数年にわたって、少なくとも5年間にわたって室温で保存可能であり、この保存期間中、上記した検出反応を行うために繰り返し使用され得る。本発明のバイオチップは、従って、診断検出反応を実施する可能性を与える患者からのサンプル材料を保存又はアーカイブすることが重要な全ての場合において有利である。

10

【0057】

サンプル材料におけるある分析物の安定性が重要に思われるような特別な場合では、バイオチップは、低温、例えば、0乃至15、又は、比較的低い温度、例えば、0以下で保存されてもよい。原則として、乾燥した状態でバイオチップを長期保存、又は、数年にわたって保存した後、核酸分解酵素又はタンパク質分解酵素のような潜在的に劣化した酵素の大きな不活性化が行われることが予想される。

20

【0058】

本発明のバイオチップは、内側の側壁に沿って案内レールがある開閉可能なケース又はボックスの中に便宜上保存又はアーカイブされ、この案内レールに沿ってバイオチップはケースの中に入れられ、中でロックされる。このような案内レールを複数設けることにより、単一のケースに100のバイオチップを場所節約的な方法で収容することが可能となる。多数のこのようなケースは、引き出しシステム又はカップボードシステムにおいて不動な又は可動な構成要素として一体化され得る。

【0059】

本発明によるバイオチップ、従って、本発明による診断検出方法は、その保存性、及び、多数の個々の検出反応を実施する可能性により、複数の実際的な適用法に適切である。以下では、いくつかの可能な適用法を記載する。

30

【0060】

本発明によるバイオチップは、モニタするために腫瘍診断の分野、例えば、血清又は組織サンプルにおけるある腫瘍マーカーの現れに関して使用され得る。これら腫瘍マーカーは、腫瘍によって形成され、病人の体液で分泌されるか、腫瘍に対する反応の結果として生物によって形成される。反対に、これらマーカー分子は、健康な人の血清又は他の体液には存在せず、又は、存在しても微量である。腫瘍が成長すると、マーカーの血清濃度が増加する。しかしながら、「中間」血清濃度の評価は、探ることが無害であるにも関わらず異常な正常値（例えば、遺伝的に原因）、及び、腫瘍の成長の始まりの両方を指すため、診断を確立することにおいて問題が生ずる。従って、決定的な質問は、ある期間で腫瘍マーカーの血清濃度において増加があったか否かである。この質問は、その腫瘍マーカーの血清濃度がある時間間隔で検査されている場合に答えられる。このようにしてだけ、初期の時点で、比較的正確に腫瘍の成長の始まりを認識することができる。原則として、このようなマーカー検出は、時間の間隔（即ち、順次決定）で各テスト人に対して行われなくてはならず、それにより、トレンド分析が実施され得る。本発明のバイオチップを用いた腫瘍マーカーのトレンド分析又は順次決定は、腫瘍の展開コントロール又は追跡のため例えば、術後再発コントロール又は細胞増殖抑制セラピーのコントロールに関して利用されてもよい。

40

【0061】

患者のサンプルに対する既知のアーカイブ方法を用いて、上記したテストシリーズは実現

50

され得ず、又は、巨費を投じてだけ実現される。反対に、本発明によるバイオチップ及び本発明による方法を用いると、このサンプル材料を大量に、長期間にわたって場所節約的方法で保存し、且つ、例えば、腫瘍マーカーを判別するために、複数の診断検出方法を実施することが可能となる。これにより、診断の確立を相当促進させる回顧的なトレンド分析を可能にさせる。本発明によるバイオチップのアーカイブ性により、腫瘍マーカーの有無に関してある発端者の比較的古いバイオチップを試験するために新しい腫瘍マーカーが知られてきている場合にも可能である。本発明は、従って、初期の段階で腫瘍の成長を認識することに貢献し、初期の適切な介入にも寄与する。

【0062】

更に、本発明のバイオチップは、患者のサンプル材料をアーカイブすることが同様に重要な要素となる臨床研究に適切である。これは、特に、例えば、科学的な問題の調合物が変えられ、患者の前のサンプルを後で確認する必要がでた場合に特に顕著である。現在利用されている方法、即ち、サンプル（原則として少なくとも0.5ml）を冷凍し後で解凍する方法に比べて、本発明によるバイオチップは、相当多くの検出反応を可能にすると共に必要とする場所がかなり少なくよく容易な保存を可能にするためより適切である。1つのバイオチップによってより多くの検出反応が可能となったため、特定の時点で患者の幾つかの並列サンプルを用意し保存する必要性がもはやなくなる。

10

【0063】

本発明によるバイオチップの更なる適用分野は、人間のドナー材料（例えば、体液、細胞、組織）を有し、ドナー材料のサンプル及び可能性としてそこからの生成物がコントロール目的のために診断検出反応を行うよう保存される又はされなくてはならない血液バンク又はファーム、又は他の機構である。通常、場所をとりすぎるため、サンプル自体ではなく分析結果だけが保存される。しかしながら、汚染が生じることに関連して、このようなサンプルを、例えば、法律的な安全防護対策のために可能性として他の検出方法を用いて再び分析することも有利である。このようなサンプルの新たな分析は、人間の材料の生材料、中間材料、又は、最終生成物が、それらの組成物に関して法律の規定又は条件に従うことが証明された場合も有利である。本発明によるバイオチップは、ドナー血液又は血液バンク、企業、及び、他の機構からの他のドナー材料のその後の分析のために有利に使用されてもよい。汚染した場合、又は、適合しない疑いがある場合、アーカイブされたバイオチップは、それに基づいて疑いのあるドナーサンプル又は生成物のサンプルを後で分析

20

30

【0064】

更に、本発明のバイオチップ又はサンプルキャリヤは、患者のサンプルのルーチン診断の目的のために患者のサンプル材料の保存及びアーカイブに使用されてもよい。

【0065】

本発明によるバイオチップは、例えば、感染症の増殖を検査するために疫学的研究において有利に利用され得る。これまで、このような検査は、前からのサンプル材料が、実質的な理由によりもはや入手可能でなかったため、必要な数の血液サンプル等を保存することができず、しばしば失敗した。これに対して、記載したバイオチップは、場所を節約し、経済的に長期保存及びアーカイブすることを可能にする。それにより、多数のサンプルをアーカイブすることが可能となる。これらサンプルは、後の疫学的研究のために利用され、従って、これらの研究は、前からのアーカイブされたサンプルに戻ることができるためより多くの患者の集合を考慮することができる。

40

【0066】

本発明によるバイオチップ及び方法は、薬学又は動物学の分野において問題の異なる調合物に関連して有利に利用され得る。既に述べた適用例以外で、組織適合試験の目的のための適用、又は、法医学の分野への適用も可能である。

【0067】

50

以下では、基本原理、並びに、例として、本発明の幾つかの好ましい実施例を図1乃至図3を参照してより詳細に説明する。しかしながら、本発明は、例示する実施例に制限されない。参照記号は、全図面にわたって同様の構成要素を指すことに用いられ、各記号は同じ意味を持つものとする。

【0068】

図1Aは、サンプルキャリア(b)及びその表面に結合されたサンプル材料(2)を含む本発明によるバイオチップ(a)を通る断面図である。サンプルキャリア(b)は、実質的に固体マトリクス(1)よりなる。

【0069】

図1Bは、サンプルキャリア(b)が固体マトリクス(1)及び更にはその上に位置するリンカー層(3)を有する本発明によるバイオチップ(a)の実施例の断面図である。サンプル材料(2)は、サンプルキャリアのリンカー層(3)を介してマトリクスにリンクされている。

10

【0070】

図2は、前述の上記マイクロ域(c)を含む、本発明によるバイオチップの異なる実施例の断面図である。図2A乃至図2Hの各図では、マイクロ域があるバイオチップの領域が示されている。

【0071】

図2Aは、(b)が固体マトリクス(1)を含むサンプルキャリアを表すとして、マイクロ域(c)の領域におけるバイオチップを通る断面図である。同図から分かるように、生物学的サンプル材料(2)は、マイクロ域(c)の領域においてだけサンプルキャリアの表面に結合される。サンプルキャリア表面の隣接する領域にはサンプル材料はない。

20

【0072】

図2Bは、図2Aと同様にマイクロ域(c)の領域におけるバイオチップを通る断面図であるが、サンプル材料(2)はリンカー層(3)を介してサンプルキャリア(b)のマトリクス(1)に結合されている。リンカー層は、各マイクロ域の領域においてだけ存在し、隣接する領域にはリンカー分子はない。

【0073】

図2Cは、図2Aと同様にマイクロ域(c)の領域におけるバイオチップを通る断面図である。しかしながら、ここでは、各マイクロ域を囲う疎水性特性の又は非可溶性の境界領域(4)が設けられ、これら境界領域ではどのサンプル材料(2)も結合され得ない。

30

【0074】

図2Dは、図2Aに示すような実施例を示し、同図では、図2B及び図2Cで示す対策が組み合わされる。サンプル材料(2)は、マイクロ域(c)の領域に位置するリンカー層(3)を介してサンプルキャリアのマトリクスにリンクされる。更に、各マイクロ域を囲う疎水性特性の又は非可溶性の境界領域(4)が設けられる。

【0075】

図2Eは、図2Aのような表示の更なる実施例を示す。ここでは、サンプル材料(2)がサンプルキャリア(b)のマトリクス(1)に結合される窪み(5)の形態で構成されるマイクロ域(c)が示される。

40

【0076】

図2Fは、図2Eに示す実施例の変形例を示し、ここでは、サンプル材料(2)をサンプルキャリア(b)のマトリクス(1)に結合させるリンカー層(3)で底部がコーティングされた窪み(5)の形態で構成されるマイクロ域(c)が示される。

【0077】

図2Gは、図2Eに示す実施例の変形例を示し、このとき、マイクロ域(c)の窪み(5)は丸みのある溝の形態で構成される。

【0078】

図2Hは、図2Fに示す実施例の変形例を示し、このとき、マイクロ域(c)の窪み(5)は丸みのある溝の形態で構成される。

50

【 0 0 7 9 】

図 3 は、本発明によるバイオチップ又はサンプルキャリアの幾つかの実施例を例として示す平面図である。

【 0 0 8 0 】

図 3 A は、本発明によるバイオチップ又はサンプルキャリア (b) の基本形状を示し、このとき、サンプル材料でコーティングされるべき表面域は (6) で示される。表面域 (6) の外側の領域、特に、境界領域は、疎水性又は非可溶性でもよい。

【 0 0 8 1 】

図 3 B は、図 3 A に示すサンプルキャリア (b) の変形例を示し、同図では更に (8) でバーコード、磁気ストリップ、又は、他の記憶媒体を具備する。

10

【 0 0 8 2 】

図 3 C は、サンプルキャリア (b) 又はバイオチップを示す平面図であり、上記マイクロ域 (c) の配置は例として表示されている。図 3 A 及び図 3 B に示すように、同図でも境界領域は疎水性又は非可溶性である。

【 0 0 8 3 】

最後に、図 3 D は、図 3 C に示す実施例の変形例を示し、図 3 B に示すように、更にデータを記憶する手段、例えば、バーコード、磁気ストリップ、又は、別の記憶媒体が設けられる。

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 A 】

20

【 図 1 B 】

【 図 2 A 】

【 図 2 B 】

【 図 2 C 】

【 図 2 D 】

【 図 2 E 】

【 図 2 F 】

【 図 2 G 】

【 図 2 H 】

【 図 3 A 】

30

【 図 3 B 】

【 図 3 C 】

【 図 3 D 】

【国際公開パンフレット】

(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
8. November 2001 (08.11.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/84150 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation: G01N 33/543 (74) Anwalt: FLACCUS, ROlf-DIeter, Bussardweg 10, 50389 Wesseling (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/02851
- (22) Internationales Anmeldedatum: 14. März 2001 (14.03.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 100 20 704.9 27. April 2000 (27.04.2000) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BIOREF GMBH [DE/DE]; Damnweg 1, 63776 Mömbris (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AU, BR, CA, CN, CZ, EE, HU, IL, IN, JP, KR, LT, LV, MX, NO, NZ, PL, RU, SG, SI, SK, TR, US, ZA.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

Veröffentlicht:
 — mit internationalem Recherchenbericht
 — vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

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.

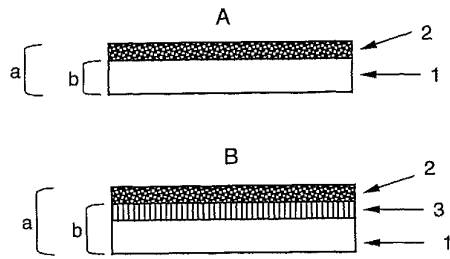
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STAAB, Hans-Jürgen [DE/DE]; Am Mühlbergschlössl 5, 82319 Starnberg (DE).

(54) Title: BIOCHIP FOR THE ARCHIVING AND MEDICAL LABORATORY ANALYSIS OF BIOLOGICAL SAMPLE MATERIAL

(54) Bezeichnung: BIOCHIP ZUR ARCHIVIERUNG UND LABORMEDIZINISCHEN ANALYSE VON BIOLOGISCHEM PROBENMATERIAL



WO 01/84150 A1



(57) Abstract: A biochip for diagnostic use comprises a sample support consisting of a solid matrix, to whose surface the sample material to be analysed, originating from a biological organism, is bonded.

(57) Zusammenfassung: Ein Biochip für diagnostische Zwecke umfasst einen Probenträger aus einer festen Matrix, auf dessen Oberfläche das zu analysierende, aus einem biologischen Organismus stammende Probenmaterial gebunden ist.

WO 01/84150

PCT/EP01/02851

BIOCHIP ZUR ARCHIVIERUNG UND LABORMEDIZINISCHEN ANALYSE VON BIOLOGISCHEM
PROBENMATERIAL

Biochip zur Archivierung und labormedizinischen Analyse von biologischem Probenmaterial, Verfahren zu dessen Herstellung sowie dessen Verwendung in diagnostischen Verfahren.

Die Erfindung betrifft einen für diagnostische Zwecke geeigneten Biochip, welcher mit dem zu analysierenden biologischen Probenmaterial beschichtet ist und sich sowohl für die raumsparende Archivierung von Probenmaterial als auch für dessen labormedizinische diagnostische Analyse eignet. Die Erfindung betrifft ferner Probenträger, welche für die Herstellung solcher Biochips geeignet sind, sowie Verfahren zur Herstellung der genannten Probenträger oder Biochips. Des weiteren betrifft die Erfindung diagnostische Verfahren unter Verwendung der erfindungsgemäßen Biochips, sowie die Verwendung der erfindungsgemäßen Biochips oder der genannten diagnostischen Verfahren in verschiedenen medizinischen Bereichen.

Die labormedizinische Diagnostik bildet eine wichtige Grundlage für medizinische Behandlungen. Durch die zunehmende Anzahl der zur Verfügung stehenden diagnostischen Marker-Moleküle werden die Möglichkeiten der labormedizinischen Diagnostik ständig erweitert. Wegen des Umfanges der vorzunehmenden Nachweisreaktionen, der hohen Dringlichkeit sowie aus wirtschaftlichen Gründen werden bevorzugt automatisierte Analyseverfahren eingesetzt, welche eine große Anzahl von verschiedenen Analysen in kurzer Zeit bewältigen können.

Ausgangsmaterial für die labormedizinische Analyse des Gesundheitszustandes eines Patienten sind in der Regel Körperflüssigkeiten, wie Vollblut, Plasma, Serum, Urin, Ascites, Fruchtwasser, Speichel, Liquor usw., oder Gewebeproben der verschiedenen Organe. Der behandelnde Arzt entnimmt dem

Patienten die Probe, unterwirft diese ggf. einer speziellen Behandlung, z. B. durch Zentrifugation, und überführt die Patientenprobe danach in ein Probenröhrchen, in welchem die Probe versendet oder bis zur Durchführung der Analyse gelagert werden kann.

Abhängig vom zu analysierenden Parameter, d. h. der zu analysierenden Komponenten (Analyten), kann die Probe entweder bei Raumtemperatur, oder sie muß gekühlt oder in gefrorenem Zustand gelagert werden. Bei Langzeitlagerung, d. h. bei Lagerung über eine Zeitdauer von mehreren Wochen, Monaten oder Jahren, müssen die Patientenproben bei -20°C oder bei tieferer Temperatur eingefroren werden, um eine Degradation der Analyte zu vermeiden. Hauptursache für die bei Raumtemperatur auftretende Degradation sind die in dem flüssigen Probenmaterial enthaltenen Enzymaktivitäten.

Typische Probenvolumina für die Langzeitlagerung liegen bei mindestens 500 μl . Falls nach einer ersten Analyse zu einem späteren Zeitpunkt oder zu unterschiedlichen späteren Zeitpunkten weitere analytische Bestimmungen durchgeführt werden sollen, dann müssen, ausgehend von der ursprünglich erfolgten Blutabnahme, mehrere 500- μl -Proben hergestellt und aufbewahrt bzw. tiefgefroren gelagert werden. Diese Proben nehmen relativ viel Platz in Anspruch, wodurch eine Lagerung über einen längeren Zeitraum relativ teuer wird. Aus diesem Grund wird eine Langzeitlagerung von Patientenproben in der Regel nicht praktiziert. Dadurch muß allerdings auf die Möglichkeit verzichtet werden, zu einem späteren Zeitpunkt auf eine früher entnommene Probe zurückgreifen zu können. Dies ist in vielen Fällen wünschenswert oder sogar notwendig, wenn es darauf ankommt, den aktuellen Zustand eines Patienten, bezogen auf einen bestimmten diagnostischen Parameter, mit einem früheren Zustand bei demselben Patienten zu vergleichen. Gegebenenfalls kann es auch sinnvoll sein, mehrere frühere Zustände eines Patienten von

verschiedenen Zeitpunkten zu erfassen, um eine Trendanalyse für den betreffenden Parameter durchzuführen. Solche Vergleiche sind allerdings nicht möglich, wenn der/die betreffende(n) diagnostische(n) Test(s) zu dem/den fraglichen früheren Zeitpunkt(en) nicht durchgeführt wurde(n) oder werden konnte(n), und eine Aufbewahrung der ursprünglichen Probe(n) nicht erfolgt war.

Für die Analyse des Gesundheitszustandes eines Patienten werden in der Labormedizin derzeit verschiedenste Verfahren angewandt. Hierzu gehören vor allem die Aktivitätsbestimmung von Enzymen, spezielle Färbereaktionen, immunochemische Verfahren, cytologische Verfahren und molekularbiologische Verfahren. In den letzten Jahren haben vor allem die immunochemischen Verfahren an Bedeutung gewonnen und viele konventionelle Verfahren abgelöst. Auch molekularbiologische Verfahren finden verstärkt Eingang in die Routinediagnostik.

Die gegenwärtig verwendeten immunochemischen Analysensysteme basieren auf Antigen-Antikörper-Reaktionen, welche meist in einem Volumen von ca. 10-500 µl ablaufen. Dabei wird die Patientenprobe (Körperflüssigkeit etc.), welche den zu bestimmenden Analyten, in diesem Fall ein Antigen, enthält, zusammen mit einem für diesen Parameter spezifischen Antikörper, welcher nur diesen Analyten erkennt und bindet, inkubiert. Das Produkt aus dieser Antigen-Antikörper-Reaktion ist ein Komplex, welcher Antikörper-gebundene Antigene enthält. Je höher die Antigen-Konzentration in einer Patientenprobe ist, desto höher ist auch die Konzentration an gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexen. Diese Antigen-Antikörper-Reaktionen finden in derzeitigen Testsystemen entweder frei in Lösung statt (Nachweis mittels Turbidimetrie oder Nephelometrie), oder sie werden auf antigenspezifischen Oberflächen durchgeführt (z. B. RIA, ELISA). Nach er-

folgter Antigen-Antikörper-Reaktion befinden sich im ersten Fall die Antigen-Antikörper-Komplexe in Lösung, im zweiten Fall sind sie an eine Festphase, meist eine Kunststoffoberfläche, gebunden. Die Detektion und Quantifizierung von Antigen-Antikörper-Komplexen erfolgt bei der Turbidimetrie bzw. Nephelometrie durch Trübungsmessung, beim RIA (Radioimmunoassay) durch Radioisotop-markierte Antikörper in Verbindung mit radiometrischer Detektion, beim ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) und LIA mit enzymmarkierten Antikörpern in Verbindung mit der Detektion enzymkatalysierter Farbreaktionen. Mittels dieser Testsysteme lassen sich Analyt- bzw. Antigenkonzentrationen im Bereich von bis zu 1 pg/ml nachweisen (Protein).

An der Miniaturisierung und Automatisierung der oben genannten, in der Labortechnik etablierten Analysesysteme wird derzeit intensiv geforscht. So sind im Laufe der letzten Jahre verschiedene miniaturisierte, festphasen-gebundene Testsysteme entwickelt worden, welche wegen ihrer geringen Größe in Anlehnung an Computer-Chips als "Biochips" bezeichnet werden. Die Größe eines solchen Biochips liegt typischerweise zwischen 0,25 und 9 cm². In der Literatur beschriebene Biochips bestehen aus einer festen Matrix aus Glas (S.P.A. Fodor et al.: Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis; *Science* 251 (Feb. 1991), S. 767-773); C.A. Rowe et al.: An array immunosensor for simultaneous detection of clinical analytes; *Analytical Chemistry* Vol. 71 (Jan. 15, 1999) S. 433-439; L.G. Mendoza et al.: High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); *BioTechniques* 27 (Oct. 1999), S. 778-788), Nylon- oder Nitrocellulose-Membran, Silikon (J. Cheng et al.: Chip PCR. *Nucleic Acids Research* Vol. 24 (1996) S. 380-385) oder Silicium. Über verschiedene Linkermoleküle können Biomoleküle, z. B. DNA, Peptide oder Proteine, kovalent an diese Matrices gekoppelt werden. Auf ei-

ner Fläche von 3,6 cm² können bis zu 10000 verschiedene Biomoleküle aufgebracht werden, was eine mikrometergenaue Adressierung der Biomoleküle auf spezielle, voneinander getrennte Areale der Matrix erfordert. Dies kann beispielsweise durch eine photolithographisch gesteuerte Synthese der Biomoleküle (S.P.A. Fodor et al.: Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis; *Science* 251 (Feb. 1991), S. 767-773) oder durch Aufspotten der Biomoleküle mittels feinmechanischer, mikroprozessorgesteuerter programmierbarer Pipettierroboter erreicht werden (L.G. Mendoza et al.: High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); *BioTechniques* 27 (Oct. 1999), S. 778-788; M. Eggers et al.: A microchip for quantitative detection of molecules utilizing luminiscent and radioisotope reporter groups; *BioTechniques* 17 (1994) S. 516-523).

Mittels der festphasengebundenen Biomoleküle können anschließend die in Patientenproben enthaltenen, zu analysierenden Analyte gebunden und mit geeigneten Detektionssystemen nachgewiesen und quantifiziert werden.

Als Detektionssysteme mit hoher Empfindlichkeit werden z. B. charge-coupled-device (CCD)-Kameras (L. G. Mendoza et al., M. Eggers et al.; a. a. O.), Phototransistoren (T. Vo-Dinh et al.: DNA biochip using a phototransistor integrated circuit; *Analytical Chemistry* 71 (1999) S. 358-363) und Fluoreszenz-Detektoren (S.P.A. Fodor et al.; a. a. O.) verwendet.

Die oben beschriebenen Biochips werden zur Zeit ausschließlich für Forschungszwecke eingesetzt, z. B. für die DNA-Sequenzierung, die Gen-Expressionsanalyse, die Genmutationsanalyse und Proteinbindungsstudien, z. B. Antikörperbindungsstudien.

Bei der Genexpressionsanalyse (M. Schena et al.: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a comple-

mentary DNA microarray; Science 270 (20 Oct 1995) S. 467-470) werden DNA-Sequenzen, die zu bestimmten Genen komplexiert sind, mit Hilfe eines Pipettierroboters auf die Matrix eines Chip-Rohlings aufgespottet, wobei jeder einzelne Spot ein bestimmtes Gen repräsentiert. Anschließend wird aus der zu untersuchenden Gewebeprobe mRNA isoliert, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und auf den gesamten Biochip aufgetragen. Danach kann die Bindung von markierten mRNA-Molekülen an bestimmten Stellen des Biochips nachgewiesen werden. Nach erfolgter Analyse wird der Biochip verworfen, da er mit der mRNA-Probe kontaminiert ist. Auf ähnliche Weise können Biochips zur DNA-Sequenzanalyse und zur Genmutationsanalyse verwendet werden.

Für die immunchemische Analyse von Probenmaterial ist von Mendoza et al. (a. a. O.) ein Prototyp eines miniaturisierten Testsystems beschrieben worden. Die Autoren verwendeten eine spezielle Glasobjektträger mit 96 Vertiefungen ("wells"), wobei jede Vertiefung mittels eines Pipettierroboters und eines Kapillar-Druckverfahrens mit einem Punktmuster, bestehend aus 144 verschiedenen Antigenen, bedruckt wurde. Nach Inkubation mit antikörperhaltiger Lösung können diejenigen Punkte, an denen Antigen-Antikörper-Komplexe gebildet wurden, mittels einer CCD-Kamera nachgewiesen werden.

Somit beschränken sich die aus dem Stand der Technik bekannten Biochips auf solche Ausführungsformen, bei denen spezifische, ausgewählte oder speziell synthetisierte Moleküle auf einer festen Matrix in einer definierten, miniaturisierten Anordnung aufgetragen und gebunden werden. Diese Moleküle dienen dazu, in einem heterogenen Gemisch, z. B. der Patienten-Probe, die Anwesenheit bestimmter Analyte nachzuweisen. Das bedeutet, daß diese Biochips testspezifisch sind, d. h. sie ermöglichen nur diejenigen Nachweis-

reaktionen, die durch die auf dem Chip befindlichen Nachweis-Moleküle vorgegeben sind.

Diese Vorgehensweise ist im Hinblick auf labordiagnostische Anwendung mit verschiedenen Nachteilen verbunden. Zwar ist es dadurch möglich, eine Vielzahl von verschiedenen Bestimmungen gleichzeitig vorzunehmen, allerdings ist für eine konkrete Fragestellung meist nur eine limitierte Anzahl von Parametern, d. h. von Analyten, relevant. Dies bedeutet, daß die Mehrzahl der auf einem solchen Chip befindlichen Nachweis-Moleküle ungenutzt bleibt oder nicht von Interesse ist. Zudem ist zu bedenken, daß ein derartiger Biochip nach Inkubation mit der Patientenprobe in der Regel unbrauchbar für weitere Analysen ist. Aus diesen Gründen ist die Verwendung von Biochips der beschriebenen Art für Routinenachweisverfahren in der Labormedizin wenig geeignet und nicht kosteneffektiv einzusetzen.

Ferner wird bei den bisher bekannten Biochips für jede weitere durchzuführende Analyse erneut Patienten-Probenmaterial benötigt. Dies hat zur Folge, daß der Patient gegebenenfalls mehrmals zur Blutentnahme erscheinen muß, was sowohl für den Arzt als auch für den Patienten mit gewissem Aufwand verbunden ist. Falls eine bestimmte Untersuchung mit einem bereits gewonnenen Probenmaterial zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt werden soll, ist eine zwischenzeitliche Lagerung des Probenmaterials in flüssigem bzw. gefrorenem Zustand erforderlich, mit den eingangs beschriebenen Nachteilen.

Infolge der fortschreitenden Entwicklung werden laufend neuartige Nachweisreaktionen zugänglich gemacht. Um die aus dem Stand der Technik bekannten Biochips für solche neuentwickelten Nachweisreaktionen einsetzbar zu machen, müßten diese ständig aktualisiert werden, was ziemlich aufwendig

ist und zudem nur mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung möglich ist.

Häufig steht zum Zeitpunkt des Verfügbarwerdens einer neuartigen Nachweismethode das ursprüngliche Probenmaterial eines bestimmten Patienten nicht mehr zur Verfügung, so daß eine zeitliche Veränderung des interessierenden labormedizinischen Parameters meist nicht untersucht werden kann, da die längerfristige Aufbewahrung von Patienten-Probenmaterial problematisch ist. Die im Stand der Technik bekannten Biochips können zur Lösung dieses Problems keinen Beitrag leisten.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand deshalb darin, ein miniaturisiertes Analysensystem in Form eines Biochips für diagnostische Zwecke zur Verfügung zu stellen, welches die mehrmalige Durchführung von analytischen Nachweisverfahren, auch in größeren zeitlichen Abständen, an demselben Patienten-Probenmaterial ermöglicht. Ferner soll dieser Biochip eine platzsparende Aufbewahrung und Archivierung des Probenmaterials über einen längeren Zeitraum hinweg ermöglichen.

Ferner bestand die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe darin, ein Verfahren bereitzustellen, welches die automatisierte Durchführung von Nachweisreaktionen mit einem Biochip, der die obigen Voraussetzungen erfüllt, ermöglicht. Das Verfahren sollte in hohem Maße flexibel sein, d. h. leicht auf andere, ursprünglich nicht vorgesehene Nachweisreaktionen adaptierbar sein. Außerdem sollte das Verfahren die wiederholte Untersuchung desselben Probenmaterials in zeitlichen Abständen ermöglichen.

Überraschenderweise hat sich herausgestellt, daß die genannten Probleme durch einen Biochip nach Anspruch 1 und durch ein diagnostisches Nachweisverfahren gemäß Anspruch 17 gelöst werden. Die Unteransprüche betreffen weitere Aus-

führungsformen der Erfindung, welche ebenfalls die genannte Aufgabe lösen.

Gemäß Anspruch 1 umfaßt der erfindungsgemäße Biochip einen Probenträger aus einer festen Matrix, auf dessen Oberfläche das zu analysierende, aus einem biologischen Organismus stammende Probenmaterial gebunden ist. Das zu analysierende Probenmaterial ist also an eine Festphase gebunden.

Im Gegensatz zu den durch den Stand der Technik bekannten Biochips sind im vorliegenden Fall nicht spezifisch ausgewählte oder synthetisierte Moleküle an die Chip-Oberfläche gebunden, sondern das Probenmaterial selbst, z. B. eine Körperflüssigkeit, welches eine heterogene Mischung verschiedener Biomoleküle darstellt. Der erfindungsgemäße Biochip stellt folglich einen patienten- oder patientenproben-spezifischen Chip dar, während es sich bei den bisher bekannten Biochips um testspezifische, d. h. nachweis-spezifische Biochips handelt.

Die Bindung des Probenmaterials kann direkt an die Oberfläche der Matrix des Probenträgers erfolgen. Vorzugsweise ist die Matrix bzw. die Oberfläche des Probenträgers durch chemische oder physikalische Verfahren vorbehandelt, um die Bindungsfähigkeit der Oberfläche für das Probenmaterial zu verbessern. Geeignete Methoden hierfür sind dem Fachmann bekannt, z. B. Ätzung oder Anrauhern.

Der allgemeine Aufbau der erfindungsgemäßen Biochips ist aus Fig. 1 A ersichtlich, welche einen Biochip (a) im Schnitt darstellt, bestehend aus einem Probenträger (b) und darauf gebundenem Probenmaterial (2). Der Probenträger besteht im wesentlichen aus einer festen Matrix (1).

Die Bindung des Probenmaterials kann optional auch mittels einer auf der Oberfläche des Probenträgers aufgebrachtten Schicht von Linker-Molekülen (Linker-Schicht) erfolgen.

Der schematische Aufbau eines derartigen Biochips (a) ist aus Fig. 1 B ersichtlich, welche einen aus einer festen Matrix (1) und einer darauf befindlichen Linker-Schicht (3) bestehenden Probenträger (b) im Schnitt darstellt, auf dessen Oberfläche das Probenmaterial (2) über die Linker-Schicht gebunden ist.

Die diagnostische Nachweisreaktion wird bei den erfindungsgemäßen Biochips prinzipiell auf die Weise durchgeführt, daß die zum Nachweis geeigneten Moleküle auf sehr kleine Areale des mit dem Probenmaterial beschichteten Biochips aufgebracht werden, wie weiter unten ausführlich beschrieben wird. Auf diese Weise ist es möglich, gleichzeitig oder nacheinander verschiedene Areale der Oberfläche des Biochips mit unterschiedlichen diagnostischen Nachweisreagenzien zu behandeln.

Da bei den erfindungsgemäßen Biochips das zu analysierende Probenmaterial, und nicht die zum Nachweis dienenden Moleküle, an die Oberfläche des die Matrix des Biochips bildenden Probenträgers gebunden sind, ist die Verwendung und das Einsatzgebiet eines solchen Chips nicht herstellungsbedingt auf bestimmte ausgewählte diagnostische Moleküle beschränkt. Vielmehr erfolgt die Auswahl der sinnvollen oder benötigten diagnostischen Nachweisreagenzien erst während der Anwendung des Nachweisverfahrens. Dadurch wird eine hohe Anwendungsflexibilität erreicht.

Bei den erfindungsgemäßen Biochips ist das zu analysierende Probenmaterial auf der Oberfläche des Probenträgers gebunden. Das Probenmaterial liegt dabei im getrockneten Zustand vor und ist deshalb selbst bei Raumtemperatur stabil lagerfähig. Da es sich bei den erfindungsgemäßen Biochips um miniaturisierte Systeme handelt, wird auf diese Weise eine raumsparende und kostengünstige Aufbewahrung und Archivie-

zung von Patienten-Probenmaterial ermöglicht. Auf diese Weise kann eine große Zahl der erfindungsgemäßen patientenspezifischen Biochips auf kleinem Raum aufbewahrt werden und steht für die Durchführung von mehrfachen analytischen Nachweisreaktionen zur Verfügung.

Die Archivierbarkeit, in Verbindung mit der Möglichkeit, mehrere Nachweisreaktionen an verschiedenen Stellen der Chip-Oberfläche unabhängig voneinander vorzunehmen, gestattet es, die Anwesenheit eines bestimmten diagnostischen Markers bei einem bestimmten Patienten oder in einer bestimmten Probe eines Patienten in verschiedenen Zeitabständen zu untersuchen. Insbesondere ist es von Vorteil, daß solche diagnostischen Untersuchungen selbst dann noch zu einem späteren Zeitpunkt möglich sind, wenn diese nicht ursprünglich, d. h. zum Zeitpunkt der Probenentnahme, geplant waren. Dies trifft besonders auf solche Nachweisreaktionen zu, die erst zu einem späteren Zeitpunkt entwickelt worden sind.

Vorzugsweise enthält jedes einzelne Exemplar eines erfindungsgemäßen Biochips Probenmaterial, welches jeweils aus einem bestimmten, individuellen biologischen Organismus gewonnen wurde, z. B. Probenmaterial, welches aus einem bestimmten Patienten stammt. Als weitere biologische Organismen, aus welchen geeignetes Probenmaterial gewonnen werden kann, kommen neben dem Menschen auch Tiere, Pflanzen, Pilze und Mikroorganismen in Frage.

Als Probenmaterial, welches an die Oberfläche des Biochips gebunden ist, werden vorzugsweise Körperflüssigkeiten verwendet, wie z. B. Vollblut, Plasma, Serum, Urin, Ascites, Fruchtwasser, Speichel, Liquor, Lavagematerial aus Körperhöhlräumen oder bronchoalveoläre Lavage. Ebenso können Gewebe- oder Organproben, oder Bestandteile, Zellen, Fraktionen, Zellaufschluß-Material, Konzentrate oder Extrakte aus

den genannten Flüssigkeiten oder Gewebe- oder Organproben verwendet werden. In bestimmten Fällen kann es angebracht sein, die Probe so vorzubehandeln, daß die interessierenden Analyten, sofern in der Probe vorhanden, darin angereichert werden. Beispielsweise werden für eine Serumanalyse die festen Bestandteile der Blutprobe durch Zentrifugation abgetrennt; anschließend kann das so gewonnene Serum als Probenmaterial auf die Oberfläche des Probenträgers aufgetragen und gebunden werden.

Bei einer besonders vorteilhaften Ausführungsform ist die Oberfläche des erfindungsgemäßen Probenträgers, welche mit dem Probenmaterial beladen ist, in Mikroareale untergliedert. Dabei handelt es sich um sehr kleine Flächenbereiche, die eng nebeneinander angeordnet sind, aber voneinander abgegrenzt sind. Üblicherweise ist die Oberfläche in eine Vielzahl solcher Mikroareale untergliedert, bevorzugt in mindestens 100 Mikroareale pro cm^2 . Für bestimmte Anwendungszwecke kann auch eine geringere Anzahl von Mikroarealen pro Flächeneinheit ausreichend sein, z. B. 10 bis 100 Mikroareale pro cm^2 . Die Mikroareale können vorzugsweise als Vertiefungen ausgestaltet oder durch hydrophobe oder nicht benetzbare Grenzbereiche voneinander abgegrenzt sein. Durch die Ausstattung des Probenträgers mit hydrophoben oder nicht benetzbaren Grenzbereichen kann erreicht werden, daß in diesen Bereichen keine Bindung von Probenmaterial stattfindet, so daß diese zwischen den einzelnen Mikroarealen befindlichen Grenzbereiche frei von Probenmaterial sind. Die Ausbildung der Mikroareale wird in den Fig. 2 und 3 weiter unten beispielhaft erläutert.

Durch die Unterteilung der Chip-Oberfläche in Mikroareale wird die Durchführung der analytischen Nachweisreaktionen verbessert, da durch diese Maßnahme das Auffinden und Behandeln einzelner Stellen durch einen Pipettierroboter er-

leichtert wird. Insbesondere, wenn die Mikroareale in Form eines regelmäßigen Gitters oder Rasters angeordnet sind, können einzelne Mikroareale anhand ihrer Koordinaten identifiziert und adressiert werden. Dadurch wird das selektive Auftragen von Nachweisreagenzien auf einzelne Stellen des Biochips unter Verwendung eines Pipettierroboters vereinfacht. Gleichzeitig wird durch die Unterteilung der mit Probenmaterial beschichteten Chip-Oberfläche die Nachweis-sicherheit erhöht bzw. das Risiko von unerwünschten Reaktionen oder Kontaminationen verhindert, da die einzelnen Mikroareale durch Grenzbereiche voneinander abgetrennt sind, oder in Form von Vertiefungen vorliegen.

Der Probenträger des erfindungsgemäßen Biochips, an dessen Oberfläche das Probenmaterial gebunden werden kann, besteht im wesentlichen aus einer festen Matrix. Als Grundmaterial für die Matrix des Probenträgers kommen beispielsweise Silikon, Kunststoffe (z. B. Polyvinylchlorid, Polyester, Polyurethane, Polystyrol, Polypropylen, Polyethylen, Polyethylenterephthalat, Polyamide, Nitrocellulose) oder Glas in Frage, jedoch können auch andere feste Materialien verwendet werden. Bevorzugt werden transparente feste Materialien verwendet. Allerdings ist bei der Auswahl des Matrix-Materials darauf zu achten, daß dieses für die dauerhafte Bindung des beabsichtigten Probenmaterials geeignet ist. Der Probenträger kann auch ein Laminat aus mindestens zwei unterschiedlichen Matrixmaterialien sein, wobei vorzugsweise eine der beiden Schichten eine starre Trägerschicht bildet, und die andere Schicht als Oberfläche für die Bindung des Probenmaterials dient.

Wie bereits erörtert, ist es besonders vorteilhaft, wenn die Oberfläche des Probenträgers, an welche das Probenmaterial gebunden werden soll, in Mikroareale untergliedert ist.

Die äußeren Abmessungen des erfindungsgemäßen Biochips werden so gewählt, daß das Erfordernis der Miniaturisierung erfüllt wird. Die Fläche eines solchen Biochips, oder eines Probenträgers für die Herstellung eines solchen Biochips, sollte höchstens 10 cm², vorzugsweise höchstens 4 cm², besonders bevorzugt höchstens 1 cm² betragen.

Bevorzugt ist der Probenträger bzw. der Biochip als flächiges Gebilde, besonders bevorzugt mit quadratischem oder rechteckigem Umriss, ausgestaltet. Aber auch andere geometrische Formen können in Frage kommen, z. B. runde bzw. kreisförmige Probenträger bzw. Biochips.

Die Dicke des flächigen Probenträgers beträgt vorzugsweise weniger als 3 mm, besonders bevorzugt weniger als 1 mm. Im Einzelfall können die äußeren Abmessungen des Biochips so gewählt werden, daß diese kompatibel zu bereits vorhandenen Pipettierrobotern bzw. Analysenautomaten sind und die Verwendung der erfindungsgemäßen Biochips in solchen Geräten ermöglichen.

Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Biochips wird die Oberfläche eines Probenträgers mit dem biologischen Probenmaterial beschichtet und dieses Material an die Oberfläche des Probenträgers gebunden, wobei es sich um eine kovalente oder nicht-kovalente Bindung handeln kann. Um bei Verwendung bestimmter Matrixmaterialien als Probenträger die Fähigkeit zur Bindung von Probenmaterial bzw. von Biomolekülen zu verbessern, kann es angebracht sein, diese Materialien bzw. die Oberfläche des Probenträgers einer Vorbehandlung mittels chemischer oder physikalischer Methoden zu unterziehen (z. B. Ätzung), wodurch das Bindungsvermögen erhöht wird. Des Weiteren kann durch chemische oder physikalische Vorbehandlung die Oberfläche des Probenträgers vergrößert werden, welches zu einer Erhöhung der Bindungskapazität führt. Hierfür geeignete Methoden sind dem Fachmann bekannt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann die Oberfläche des Probenträgers vor dem Auftragen des Probenmaterials mit einer Linker-Schicht versehen werden, um die Bindung des Probenmaterials bzw. der darin enthaltenen Analyten (z. B. Biomoleküle oder Zellen) an die Oberfläche des Probenträgers zu verbessern, oder um eine selektive oder bevorzugte Bindung bestimmter Analyte oder Gruppen bzw. Klassen von Analyten zu bewirken. Auf diese Weise kann eine Anreicherung oder Vorselektion bestimmter Analyte oder Gruppen von Analyten erreicht werden. Als Linker werden dabei solche chemischen Verbindungen verstanden, die einerseits in der Lage sind, eine feste Bindung mit der Oberfläche des Probenträgers, d. h. mit dessen Matrixmaterial, einzugehen, und andererseits in der Lage sind, biologisches Probenmaterial zu binden oder selektiv bzw. bevorzugt zu binden.

Vorzugsweise kann die Oberfläche des Probenträgers mit einer Schicht aus Linker-Molekülen versehen werden, welche die selektive Bindung oder Anreicherung bestimmter Gruppen von biologischen Makromolekülen, vorzugsweise von Proteinen, Peptiden, Glykoproteinen, Zuckern, Lipiden, Nucleinsäuren, oder die Bindung oder Anreicherung von Zellen oder bestimmten Zelltypen oder Zellpopulationen ermöglichen. Ferner kann es auch vorteilhaft sein, wenn verschiedene Teilbereiche der Oberfläche eines Probenträgers mit unterschiedlichen Typen von Linkermolekülen beschichtet werden. Auf diese Weise ist es möglich, eine Vorselektion und räumliche Trennung der z. B. in einer Patientenprobe vorhandenen Analyten (z. B. verschiedene Klassen biologischer Makromoleküle) vorzunehmen.

Als Linker-Moleküle lassen sich beispielsweise (L.C. Shriver-Lake; Antibody immobilization using heterobifunc-

tional crosslinkers; Biosensors & Bioelectronics Vol. 12 (1997), S. 1101-1106) einsetzen: N-succinimidyl-4-maleimidobutyrat (CMBS; zur Bindung von Aminogruppen), 4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylhydrazid-HCl (M2C2H; zur Bindung von Zuckerresten), oder Antikörper mit bekannten Bindungsspezifitäten zur Bindung verschiedenster Makromoleküle oder Zellen bzw. Zelltypen.

Wie bereits erwähnt, ist es vorteilhaft, wenn die Oberfläche des Probenträgers bzw. des Biochips in Mikroareale unterteilt ist. Diese Unterteilung kann, außer durch die bereits beschriebenen Methoden, auch durch eine diskontinuierlich ausgebildete Linker-Schicht erreicht werden. Dabei werden Mikroareale aus linkerhaltigen Flächen und dazwischenliegenden linkerfreien Zonen gebildet, wobei vorzugsweise mindestens 100 Mikroareale pro cm^2 vorhanden sind.

Die Herstellung eines Probenträgers, dessen Oberfläche zur Bindung von Probenmaterial geeignet und vorzugsweise in Mikroareale unterteilt ist, kann auf verschiedene Weise erfolgen. Für die Herstellung von Flächenstücken mit den für Biochips geeigneten Ausmaßen wird das üblicherweise großformatig vorliegende, flächenförmige Matrix-Rohmaterial (Glas, Kunststoff etc.) mittels bekannter mechanischer Verfahren auf entsprechende Weise zerteilt, wodurch Probenträger erhalten werden. Alternativ kann das entsprechende Matrix-Rohmaterial auch verflüssigt werden und anschließend in entsprechende Formen gegossen werden, z. B. durch Spritzgießverfahren, um Probenträger herzustellen.

Die genannten Mikroareale bzw. die dazwischen liegenden Grenzbereiche lassen sich beispielsweise durch physikalische Methoden erzeugen, z. B. durch Gravur, Stanzung, Prägung oder Druck, oder durch chemische Methoden, wie Ätzung oder Auftragung hydrophober Schichten. Ferner ist es mög-

lich, unter Zuhilfenahme eines Pipettierroboters Linkerschichten in Form von Mikroarealen auf die Oberfläche von Probenträgern aufzutragen. Auch verschiedene bekannte Druckverfahren können adaptiert werden, um die Erzeugung der erfindungsgemäßen Mikroareale zu ermöglichen. Schließlich lassen sich die genannten Methoden auch kombiniert einsetzen. Ferner kann die Untergliederung in Mikroareale schon an dem flächig vorliegenden Matrix-Rohmaterial vorgenommen werden, welches anschließend auf beschriebene Weise in einzelne Probenträger zerteilt wird.

Die erfindungsgemäßen Biochips sind besonders für die Archivierung und mehrmalige diagnostische Analyse von Probenmaterial aus jeweils einem bestimmten Patienten geeignet ("patientenspezifischer" Biochip). Um die Archivierung solcher Chips und deren automatische Prozessierung und Auswertung in Analysenautomaten zu erleichtern bzw. zu ermöglichen, wird gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung vorgeschlagen, daß der Biochip bzw. ein entsprechender Probenträger mit Mitteln ausgestattet ist, die eine Identifizierung des Biochips oder die Speicherung von patientenbezogenen Daten oder die Speicherung von Analysendaten ermöglichen. Dies kann vorzugsweise mittels eines maschinenlesbaren Bar-Codes, eines maschinenlesbaren Magnetstreifens, eines digitalen Speicherelements oder eines anderen computerlesbaren Speichermediums erfolgen. Insbesondere wenn große Zahlen von patientenspezifischen Biochips archiviert oder prozessiert werden müssen, ist die vorstehend beschriebene Ausführungsvariante vorteilhaft.

Das Vorhandensein eines Mittels zur Datenspeicherung auf dem Biochip ermöglicht es beispielsweise dem Arzt oder Laborarzt, der die Probenentnahme und gegebenenfalls das Auftragen des Probenmaterials auf den Probenträger vornimmt, z. B. patientenbezogene Daten oder Daten zur Probenentnahme

auf dem Biochip zu speichern. Ferner ist es dadurch auch möglich, Analyseergebnisse bzw. deren Auswertung zu speichern, so daß auch die Informationen über bereits früher durchgeführte Analysen gespeichert werden können.

Die Erfindung umfaßt ferner diagnostische Nachweisverfahren, welche Verfahrensschritte zur Herstellung eines Biochips unter Verwendung von Probenmaterial, sowie Verfahrensschritte zur Durchführung diagnostischer Nachweisreaktionen und zu deren Auswertung umfaßt.

Zunächst werden Körperflüssigkeiten, Gewebeprobe oder dgl. aus einem Patienten oder einem anderen Organismus gewonnen und, falls erforderlich, einer Vorbehandlung unterzogen (z. B. Zentrifugation, Konzentration usw.). Falls erforderlich, wird das Probenmaterial in einem geeigneten Puffer oder Lösungsmittel suspendiert oder gelöst. Zur Herstellung eines Biochips wird dieses Probenmaterial, vorzugsweise in flüssiger Form, auf die Oberfläche eines erfindungsgemäßen Probenträgers aufgetragen, z. B. mittels Pipette oder durch Eintauchen. Nach einer kurzen Inkubationszeit von wenigen Minuten, z. B. 1 bis 10 min, wird gegebenenfalls das überschüssige Probenmaterial entfernt (z. B. durch Absaugen). Anschließend wird eine Trocknung durchgeführt, vorzugsweise bei leicht erhöhten Temperaturen (30-60 °C), wodurch die Bindung des Probenmaterials bzw. der darin enthaltenen Analyte (z. B. Biomoleküle) an die Oberfläche des Probenträgers oder gegebenenfalls an die Linker-Schicht erfolgt. Die vorstehend genannten Verfahrensschritte können von dem Arzt, welcher das Probenmaterial entnimmt, vorgenommen werden, oder von medizinischem Hilfspersonal.

Die so erhaltenen patienten- oder probenspezifischen Biochips können anschließend trocken bei Raumtemperatur gelagert werden und stehen für eine sofortige oder spätere Analyse bereit.

Zur Durchführung von analytischen Nachweisreaktionen an einem solchen mit Probenmaterial beschichteten Biochip werden in den nachfolgenden Schritten die gewünschten Nachweisreagenzien vorzugsweise unter Verwendung eines Pipettierroboters auf einzelne Stellen oder auf einzelne Mikroareale dieses Biochips aufgetragen. Als Nachweisreagenzien kommen beispielsweise Antikörper, Antigene, sequenzspezifische Antikörper, Lektine, DNA-Sonden, niedermolekulare Liganden, Hormone, Biomolekül-bindende Farbstoffe oder andere spezifisch bindende Moleküle in Frage.

Die genannten Stellen oder Mikroareale des Biochips werden für eine bestimmte Zeit und bei einer bestimmten Temperatur mit den gewählten Nachweisreagenzien in bestimmten Konzentrationen inkubiert, wobei die jeweils zu wählenden Versuchsparameter von der Art der verwendeten Nachweisreagenzien und dem jeweiligen Probenmaterial abhängen. Der Fachmann ist in der Regel mit der Auswahl geeigneter Versuchsparameter vertraut.

Nach Ende der festgelegten Inkubationszeit wird das flüssige Nachweisreagens mittels Pipettierroboter durch Absaugen wieder entfernt. Anschließend werden in einem nächsten Schritt, ebenfalls mittels Pipettierroboter, Waschlösungen und erforderlichenfalls weitere Nachweisreagenzien in sequentieller Folge auf die zu analysierenden Stellen bzw. Mikroareale des Biochips aufgetragen und danach wieder abgesaugt. Die dabei verwendbaren Waschlösungen und die zusätzlich einzusetzenden Nachweisreagenzien, z. B. fluoreszenzmarkierte Antikörper, sowie die geeigneten Reaktionsbedingungen, sind dem Fachmann grundsätzlich bekannt.

Schließlich werden diejenigen Stellen oder Mikroareale, in denen eine positive Nachweisreaktion stattgefunden hat, durch einen geeigneten Detektor identifiziert. Vorzugsweise erfolgt die Registrierung dieser Meßsignale mit Hilfe von

CCD-Kameras, Phototransistoren oder Radioaktivitäts-, Lumineszenz- oder Fluoreszenzdetektoren, wobei sich die Auswahl der Detektionsmethode nach der Art der eingesetzten Nachweisreagenzien richtet. Die von den Detektoren gelieferten primären Meßdaten können anschließend einer computergestützten Auswertung unterworfen werden.

Die positiven Nachweisreaktionen kommen grundsätzlich durch eine spezifische Wechselwirkung oder Bindung zwischen den Analyten (z. B. bestimmte Antigene in der Patienten-Probe) und dem eingesetzten Nachweisreagens zustande, z. B. Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen. Diese werden durch weitere Reaktionsschritte bzw. Reagenzien, welche dem Fachmann bekannt sind, detektierbar gemacht.

Besonders vorteilhaft ist es, wenn eine größere Anzahl der erfindungsgemäßen Biochips, z. B. von verschiedenen Patienten, gleichzeitig oder parallel auf die beschriebene Weise analysiert werden, d. h. wenn die Nachweisreaktionen und die Detektion gleichzeitig oder parallel an mehreren Biochips durchgeführt wird.

Ferner ist es vorteilhaft, wenn der bzw. die Biochips parallel (gleichzeitig) oder sequentiell nacheinander mit verschiedenen Nachweisreagenzien mit unterschiedlichen Erkennungsspezifitäten behandelt werden, wobei diese Nachweisreagenzien jeweils an noch nicht vorher untersuchte Stellen oder Mikroareale des Biochips aufgetragen werden. Auf diese Weise läßt sich in kürzester Zeit die An- oder Abwesenheit bestimmter diagnostischer Markermoleküle in mehreren patientenspezifischen Biochips testen. Um zu verhindern, daß eine bestimmte Stelle oder Mikroareal eines Biochips mehrfach für Nachweisreaktionen herangezogen wird, kann vorgesehen sein, daß die Position der bereits "verbrauchten" Stellen oder Areale registriert und auf dem Speichermedium des Biochips gespeichert wird.

Des weiteren können auch unterschiedliche Stellen oder Mikroareale desselben Biochips mit dem gleichen Nachweisreagens, ggf. in unterschiedlichen Konzentrationen, analysiert werden. Auf diese Weise läßt sich durch Mehrfach- bzw. Parallelmessungen die Nachweissicherheit erhöhen.

Nach erfolgter Nachweisreaktion und Detektion können die Biochips wieder der Archivierung zugeführt und aufbewahrt werden. Sie stehen für weitere Nachweisreaktionen zur Verfügung. Dies bedeutet, daß derselbe Biochip, welcher mit Probenmaterial eines bestimmten Patienten beschichtet ist, zweimal oder mehrmals nacheinander einer Analyse, bestehend aus Nachweisreaktion, Detektion und Auswertung, nach den oben beschriebenen Schritten unterzogen werden kann, wobei der Biochip in der Zeit zwischen den aufeinanderfolgenden Analysen aufbewahrt bzw. archiviert wird. Dabei werden bei den aufeinanderfolgenden Analysen unterschiedliche Mikroareale des Biochips mit unterschiedlichen Nachweisreagenzien behandelt.

Durch die Möglichkeit, an jeweils einem Biochip, der mit Probenmaterial eines bestimmten Patienten beschichtet ist, eine Vielzahl von diagnostischen Nachweisreaktionen, auch in größerem zeitlichen Abstand, durchführen zu können, wird der Bedarf an Probenmaterial erheblich verringert, d. h. ausgehend von einer anfänglichen relativ kleinen Probenmenge (z. B. 0,5 ml) lassen sich Biochips herstellen, die eine große Anzahl von Nachweisreaktionen über einen längeren Zeitraum hinweg ermöglichen.

Die erfindungsgemäßen Biochips mit dem darauf gebundenen Probenmaterial sind im trockenen Zustand bei Raumtemperatur über mehrere Jahre, mindestens über einen Zeitraum von 5 Jahren hinweg lagerfähig und können während dieser Aufbe-

wahrungszeit zwischenzeitlich mehrfach zur Durchführung der beschriebenen Nachweisreaktionen verwendet werden. Die erfindungsgemäßen Biochips sind deshalb immer dann von Vorteil, wenn es auf eine Aufbewahrung bzw. Archivierung von Probenmaterial aus Patienten, mit der Möglichkeit zur Durchführung diagnostischer Nachweisreaktionen ankommt. In speziellen Fällen, wenn die Stabilität gewisser Analyte im Probenmaterial kritisch erscheint, kann auch eine Lagerung der Biochips bei tieferen Temperaturen, z. B. bei 0 °C bis 15 °C oder bei noch niedrigeren Temperaturen, z. B. unterhalb von 0 °C erfolgen. Grundsätzlich ist davon auszugehen, daß nach einer längerandauernden oder mehrjährigen Aufbewahrung der Biochips im trockenen Zustand eine weitgehende Inaktivierung von potentiell degradierenden Enzymen, wie Nukleasen oder Proteasen, stattgefunden hat. Die Lagerung bzw. Archivierung der erfindungsgemäßen Biochips kann zweckmäßigerweise mit einem verschließbaren Kasten erfolgen, welcher an seinen inneren Seitenwänden Führungsschienen aufweist, entlang welcher die Biochips in den Kasten eingeführt werden können und mittels derer sie im Kasten arretiert sind. Durch Anbringen mehrerer solcher Führungsschienen lassen sich mehr als 100 Biochips platzsparend in einem einzigen Kasten aufbewahren. Eine größere Anzahl der genannten Kästen kann wiederum als fester oder beweglicher Bestandteil in ein Schubladensystem oder Schranksystem integriert werden.

Aufgrund ihrer Lagerfähigkeit und der Möglichkeit, eine große Zahl unabhängiger Nachweisreaktionen vorzunehmen, eignen sich die erfindungsgemäßen Biochips bzw. die erfindungsgemäßen diagnostischen Nachweisverfahren für eine Vielzahl von Nutzenanwendungen. Im Folgenden werden einige beispielhafte Anwendungsmöglichkeiten beschrieben.

Die erfindungsgemäßen Biochips können im Bereich der Tumordiagnostik eingesetzt werden, um beispielsweise das Auftreten bestimmter Tumormarker im Serum oder in Gewebeprobe zu beobachten. Diese Tumormarker werden von Tumoren gebildet und in Körperflüssigkeiten des Erkrankten sezerniert, oder sie werden vom Organismus infolge seiner Reaktion auf den Tumor gebildet. Hingegen fehlen diese Markermoleküle im Serum oder anderen Körperflüssigkeiten von Gesunden, oder sind dort nur in geringen Mengen vorhanden. Im Verlauf des Tumorstadiums kann es zu einem Ansteigen der Serumkonzentrationen des Markers kommen. Problematisch ist allerdings die Beurteilung "mittlerer" Serumkonzentrationen hinsichtlich einer Diagnose, da dieser Befund sowohl auf einen zwar abnormen, aber dennoch unbedenklichen Normalwert (z. B. genetisch bedingt) als auch auf ein beginnendes Tumorstadium hindeuten kann. Entscheidend ist deshalb die Frage, ob zu einer bestimmten Zeit ein Anstieg der Serumkonzentration eines solchen Tumormarkers stattgefunden hat. Diese Frage läßt sich beantworten, wenn in bestimmten Zeitabständen die Serumkonzentration dieses Tumormarkers untersucht wird. Nur auf diese Weise läßt sich frühzeitig und mit relativer Sicherheit ein beginnendes Tumorstadium erkennen. Grundsätzlich müssen bei einem jeden Probanden derartige Markernachweise in zeitlichen Abständen durchgeführt werden (d. h. eine sequentielle Bestimmung), so daß eine Trendanalyse durchgeführt werden kann.

Die erwähnten Trendanalysen bzw. sequentiellen Bestimmungen von Tumormarkern unter Verwendung der erfindungsgemäßen Biochips können auch zur Verlaufskontrolle von Tumoren eingesetzt werden, z. B. zur postoperativen Rezidivkontrolle oder zur Kontrolle einer cytostatischen Therapie.

Mit den bekannten Archivierungsmethoden für Patientenproben lassen sich die genannten Testreihen nicht oder nur unter hohem Aufwand realisieren. Hingegen wird es durch die er-

findungsgemäßen Biochips und dem erfindungsgemäßen Verfahren möglich, dieses Probenmaterial in großer Zahl und raumsparend längerfristig aufzubewahren, und eine Vielzahl von diagnostischen Nachweisreaktionen, z. B. zur Bestimmung von Tumormarkern, durchzuführen. Dadurch werden retrospektive Trendanalysen ermöglicht, welche die Diagnosefindung wesentlich beschleunigen. Durch die Archivierbarkeit der erfindungsgemäßen Biochips wird es auch möglich, bei neu bekannt werdenden Tumormarkern deren An- oder Abwesenheit in älteren Biochips eines bestimmten Probanden zu testen. Die Erfindung kann somit dazu beitragen, das Wachstum von Tumoren frühzeitig zu erkennen und entsprechend zu intervenieren.

Des weiteren eignen sich die erfindungsgemäßen Biochips für Zwecke der klinischen Forschung, wo die Archivierung von Patienten-Probenmaterial ebenfalls eine wichtige Rolle spielt. Dies ist vor allem von Bedeutung, wenn - beispielsweise bei Änderung der wissenschaftlichen Fragestellung - Nacherhebungen an früheren Patientenproben erforderlich sind. Gegenüber der derzeitig verwendeten Methoden - Einfrieren von Proben (in der Regel mindestens 0,5 ml) und späteres Wiederauftauen - sind die erfindungsgemäßen Biochips viel besser geeignet, da sie eine wesentlich größere Zahl von Nachweisreaktionen bei gleichzeitig wesentlich geringem Platzbedarf und einfacherer Lagerung ermöglichen. Wegen der großen Anzahl der Nachweisreaktionen, die ein Biochip ermöglicht, entfällt auch die Notwendigkeit, zu einem bestimmten Zeitpunkt mehrere parallele Proben eines Patienten herzustellen und zu lagern.

Ein weiterer Anwendungsbereich der erfindungsgemäßen Biochips sind Blutbanken oder Firmen oder andere Organisationen, die humanes Spendermaterial (z. B. Körperflüssigkeiten, Zellen, Gewebe) verarbeiten, und bei welchen Proben

des Spendermaterials und gegebenenfalls von daraus hergestellten Produkten für diagnostische Nachweisreaktionen zu Kontrollzwecken aufbewahrt werden müssen oder sollten. Gewöhnlich werden lediglich die Analysenergebnisse, nicht aber die Proben selbst aufbewahrt, da dies zu viel Platz beanspruchen würde. Allerdings kann es im Zusammenhang mit auftretenden Kontaminationen auch von Vorteil sein, solche Proben einer erneuten Analyse, gegebenenfalls unter Verwendung anderer Nachweismethoden, zu unterziehen, z. B. zur rechtlichen Absicherung. Eine erneute Analyse solcher Proben kann auch vorteilhaft sein, wenn der Nachweis erbracht werden soll, daß ein Roh-, Zwischen- oder Endprodukt aus humanem Material in seiner Zusammensetzung den Vorgaben oder gesetzlichen Bestimmungen genügt hat. Die erfindungsgemäßen Biochips können vorteilhaft zur Archivierung und nachfolgenden Analyse von Proben aus Spenderblut oder anderem Spendermaterial von Blutbanken, Firmen und anderen Organisationen verwendet werden. Die archivierten Biochips ermöglichen es, im Falle einer aufgetretenen Kontamination, oder eines Verdachtes einer Non-Konformität, die verdächtigsten Spenderproben oder Proben darauf basierender Produkte im Nachhinein zu analysieren. So kann im Nachhinein der Nachweis der Konformität einer Spender- oder Produktprobe mit den Vorgaben, Normen oder gesetzlichen Bestimmungen erbracht werden. Dies kann insbesondere bei juristischen Auseinandersetzungen von großer Bedeutung und Hilfe sein. Ferner können die erfindungsgemäßen Biochips oder Proben-träger zur Aufbewahrung und Archivierung von Patienten-Probenmaterial für Zwecke der Routinediagnostik von Patientenproben verwendet werden.

Die erfindungsgemäßen Biochips lassen sich auch vorteilhaft bei epidemiologischen Studien einsetzen, beispielsweise um die Ausbreitung von Infektionskrankheiten zu untersuchen. Bisher scheiterten solche Untersuchungen oft an dem nicht

mehr vorhandenen Probenmaterial aus der zurückliegenden Zeit, da es aus praktischen Gründen nicht möglich war, die erforderliche Anzahl von Blutproben oder dgl. aufzubewahren. Hingegen ermöglichen die hier beschriebenen Biochips eine raumsparende und kostengünstige Langzeitlagerung bzw. Archivierung. Damit kann eine große Anzahl von Proben archiviert werden. Diese Proben stehen für spätere epidemiologische Studien zur Verfügung; somit können diese Studien ein viel größeres Patientenkollektiv berücksichtigen, da sie auch auf archivierte Proben aus der Vergangenheit zurückgreifen können.

Die erfindungsgemäßen Biochips bzw. die erfindungsgemäßen Verfahren können im Zusammenhang mit verschiedenen Fragestellungen im Bereich der Medizin oder der Tiermedizin vorteilhaft eingesetzt werden. Neben den bereits genannten Anwendungsbeispielen kommen auch Anwendungen für Zwecke der Gewebstypisierung oder im Bereich der forensischen Medizin in Betracht.

Nachfolgend werden anhand der Fig. 1-3 sowohl das Grundprinzip sowie beispielhaft einige bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung näher erläutert. Die Erfindung ist jedoch nicht auf die dargestellten Ausführungsformen beschränkt. Die Bezugszeichen werden in allen Figuren in gleicher Weise verwendet und haben jeweils die gleiche Bedeutung.

Fig. 1 A zeigt einen Schnitt durch einen erfindungsgemäßen Biochip (a), welcher aus einem Probenträger (b) und dem auf seiner Oberfläche gebundenen biologischen Probenmaterial (2) besteht. Der Probenträger (b) besteht im wesentlichen aus einer festen Matrix (1).

Fig. 1 B zeigt in Schnittdarstellung eine Ausführungsform des erfindungsgemäßen Biochips (a), bei welchem der Probenträger (b) eine feste Matrix (1) und zusätzlich eine darauf befindliche Linkerschicht (3) umfaßt. Das Probenmaterial (2) ist über die Linkerschicht (3) an die Matrix des Probenträgers (1) gebunden.

Fig. 2 zeigt Schnittdarstellungen von verschiedenen Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Biochips, wobei diese Ausführungsformen die oben erwähnten Mikroareale (c) aufweisen. In den Fig. 2 A bis H ist jeweils ein Bereich eines Biochips dargestellt, in welchem sich ein solches Mikroareal befindet.

Fig. 2 A zeigt einen Schnitt durch einen Biochip im Bereich eines Mikroareals (c), wobei (b) wiederum den aus der festen Matrix (1) bestehenden Probenträger bezeichnet. Wie ersichtlich, ist das biologische Probenmaterial (2) nur im Bereich des Mikroareals (c) an die Oberfläche des Probenträgers gebunden. Die benachbarten Bereiche der Probenträger-Oberfläche sind frei von Probenmaterial.

Fig. 2 B zeigt ebenfalls einen Schnitt durch einen Biochip im Bereich eines Mikroareals (c), ähnlich wie Fig. 2 A, wobei jedoch das Probenmaterial (2) über eine Linkerschicht (3) an die Matrix (1) des Probenträgers (b) gebunden ist. Die Linkerschicht ist jeweils nur im Bereich eines Mikroareals vorhanden; die benachbarten Bereiche sind frei von Linkermolekülen.

Fig. 2 C zeigt ebenfalls einen Schnitt durch einen Biochip im Bereich eines Mikroareals (c), ähnlich wie Fig. 2 A, wobei allerdings die die Mikroareale jeweils umgebenden Grenzbereiche (4) mit hydrophoben Eigenschaften ausgestat-

tet sind oder nicht benetzbar sind, so daß in diesen Grenzbereichen kein Probenmaterial (2) gebunden werden kann.

Fig. 2 D zeigt eine Ausführungsform in einer Darstellung wie in Fig. 2 A, bei welcher die in den Fig. 2 B und 2 C gezeigten Maßnahmen mit einander kombiniert werden. Das Probenmaterial (2) ist über eine im Bereich des Mikroareals (c) befindliche Linkerschicht (3) an die Matrix des Probenträgers gebunden. Zusätzlich sind die die Mikroareale jeweils umgebenden Grenzbereiche (4) mit hydrophoben Eigenschaften ausgestattet oder unbenetzbar gemacht worden.

Fig. 2 E zeigt eine weitere Ausführungsform in einer Darstellung wie in Fig. 2 A, wobei ein Mikroareal (c) gezeigt ist, welches in Form einer Vertiefung (5) ausgestaltet ist, in welcher das Probenmaterial (2) an die Matrix (1) des Probenträgers (b) gebunden ist.

Fig. 2 F zeigt eine Variation der in Fig. 2 E gezeigten Ausführungsform, wobei ein Mikroareal (c) gezeigt ist, welches in Form einer Vertiefung (5) ausgebildet ist, deren Boden mit einer Linkerschicht (3) beschichtet ist, mittels welcher das Probenmaterial (2) an die Matrix (1) des Probenträgers (b) gebunden werden kann.

Fig. 2 G zeigt eine Variante der in Fig. 2 E gezeigten Ausführungsform, wobei die Vertiefung (5) des Mikroareals (c) in Form eines gerundeten Napfes gestaltet ist.

Fig. 2 H zeigt eine Variante der in Fig. 2 F gezeigten Ausführungsform, wobei die Vertiefung (5) des Mikroareals (c) in Form eines gerundeten Napfes gestaltet ist.

Fig. 3 zeigt beispielhaft einige Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Biochips bzw. Probenträger in der Aufsicht.

Fig. 3 A zeigt die Grundform eines erfindungsgemäßen Biochips bzw. Probenträgers (b), wobei die zur Beschichtung mit Probenmaterial vorgesehene Fläche mit (6) bezeichnet ist. Die außerhalb der Fläche (6) befindlichen Bereiche, insbesondere die Randbereiche, können hydrophob oder nicht benetzbar ausgestattet sein.

Fig. 3 B zeigt eine Variation des in Fig. 3 A gezeigten Probenträgers (b), welcher zusätzlich (8) mit einem Barcode, Magnetstreifen oder einem sonstigen Speichermedium versehen ist.

Fig. 3 C zeigt einen Probenträger (b) bzw. Biochip in der Aufsicht, wobei beispielhaft die Anordnung der erwähnten Mikroareale (c) dargestellt ist. Wie in Fig. 3 A und B können auch hier die Randbereiche hydrophob oder nicht benetzbar ausgestattet sein.

Fig. 3 D zeigt schließlich eine Variante der in Fig. 3 C vorgestellten Ausführungsform, bei welcher - wie in Fig. 3 B - zusätzlich ein Mittel zur Datenspeicherung vorgesehen ist, z. B. Barcode, Magnetstreifen oder ein anderes Speichermedium.

Patentansprüche

1. Biochip für diagnostische Zwecke, welcher einen Probenträger aus einer festen Matrix umfaßt, auf dessen Oberfläche das zu analysierende, aus einem biologischen Organismus stammende Probenmaterial gebunden ist.

2. Biochip nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das biologische Probenmaterial direkt an die Oberfläche der Matrix des Probenträgers gebunden ist, wobei vorzugsweise die Matrix oder Oberfläche des Probenträgers durch chemische oder physikalische Verfahren vorbehandelt ist, um die Bindungsfähigkeit der Oberfläche für das Probenmaterial zu verbessern.

3. Biochip nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß ein einzelnes Exemplar eines Biochips jeweils Probenmaterial aus einem individuellen biologischen Organismus, vorzugsweise eines individuellen Patienten, auf seiner Oberfläche gebunden hat.

4. Biochip nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem an die Oberfläche gebundenen biologischen Material um Körperflüssigkeiten, vorzugsweise um Vollblut, Plasma, Serum, Urin, Ascites, Fruchtwasser, Speichel, Liquor, Lavagematerial aus Körperhöhlräumen oder bronchoalveoläre Lavage, oder um Gewebe- oder Organproben, oder um Bestandteile, Zellen, Fraktionen, Konzentrate oder Extrakte aus den genannten Flüssigkeiten oder Gewebe- oder Organproben handelt.

5. Biochip nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche des Probenträgers in Mikroareale untergliedert ist, vorzugsweise mindestens 100 Mikroareale pro cm^2 , wobei die Mikroareale vorzugsweise als Vertiefungen ausgestaltet sind oder durch hydrophobe oder nicht benetzbare Grenzbereiche voneinander abgegrenzt sind.

6. Probenträger aus einer festen Matrix, dadurch gekennzeichnet, daß er eine zur Bindung von biologischem Material geeignete Oberfläche aufweist und für die Herstellung eines Biochips nach Anspruch 1 geeignet ist.

7. Probenträger nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Bindung von biologischem Material geeignete Oberfläche in Mikroareale untergliedert ist.

8. Probenträger nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Probenträger vorzugsweise mindestens 100 Mikroareale pro cm^2 aufweist, und daß die Mikroareale als Vertiefungen ausgestaltet sind oder durch hydrophobe oder nicht benetzbare Grenzbereiche voneinander abgegrenzt sind.

9. Biochip nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder Probenträger nach einem der Ansprüche 6-8, dadurch gekennzeichnet, daß die Fläche des Biochips oder Probenträgers höchstens 10 cm^2 , vorzugsweise höchstens 4 cm^2 beträgt, wobei der Probenträger vorzugsweise als flächiges Gebilde, besonders bevorzugt mit quadratischem oder rechteckigem Umriß, ausgestaltet ist, und wobei die Dicke des flächigen Probenträgers vorzugsweise weniger als 3 mm, besonders bevorzugt weniger als 1 mm, beträgt.

10. Biochip oder Probenträger nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix oder die Oberfläche des Probenträgers durch chemische oder physikalische Methoden vorbehandelt ist, oder daß durch chemische oder physikalische Vorbehandlung die Oberfläche des Probenträgers vergrößert worden ist.

11. Biochip oder Probenträger nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche des Probenträgers zur Verbesserung der Bindung des Probenmaterials an besagte Oberfläche mit einer Linker-Schicht beschichtet ist, durch welche das Probenmaterial gebunden wird.

12. Biochip oder Probenträger nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Linker-Schicht aus Linker-Molekülen aufgebaut ist, welche eine selektive Bindung oder Anreicherung bestimmter Gruppen von biologischen Makromolekülen, vorzugsweise von Proteinen, Peptiden, Glycoproteinen, Zuckern, Lipiden oder Nukleinsäuren, oder die Bindung oder Anreicherung von Zellen oder bestimmten Zelltypen oder Zellpopulationen ermöglichen, wobei vorzugsweise verschiedene Teilflächen der Linker-Schicht unterschiedliche Typen von Linker-Molekülen enthalten.

13. Biochip oder Probenträger nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Linker-Schicht auf der Oberfläche des Probenträgers diskontinuierlich ausgebildet ist, wobei Mikroareale aus linkerhaltigen Flächen und dazwischenliegenden linkerfreien Zonen gebildet werden, wobei vorzugsweise mindestens 100 Mikroareale pro cm^2 vorhanden sind.

14. Biochip oder Probenträger nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß er mit Mitteln ausgestattet ist, die eine Identifizierung des Biochips oder die Speicherung von patientenbezogenen Daten oder die Speicherung von Analysendaten ermöglichen, vorzugsweise mittels eines maschinenlesbaren Bar-Codes, eines maschinenlesbaren Magnetstreifens, eines digitalen Speicherelements oder eines anderen maschinenlesbaren Speichermediums.

15. Verfahren zu Herstellung eines Probenträgers nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß flächenförmiges Matrix-Rohmaterial auf mechanischem Wege zerteilt wird, so daß Flächenstücke mit den für Biochips geeigneten Ausmaßen entstehen, oder daß das Matrix-Rohmaterial verflüssigt wird und anschließend durch Gießverfahren in entsprechende Formen gegossen wird, vorzugsweise durch Spritzgießverfahren.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche des so erhaltenen Probenträgers in Mikroareale unterteilt wird, wobei diese Unterteilung

- a) durch physikalische Behandlung der Oberfläche, oder
- b) durch chemische Behandlung der Oberfläche, oder
- c) durch Druckverfahren, oder
- d) durch Aufbringen von Linker-Molekülen im Bereich der Mikroareale unter Verwendung eines Pipettierroboters, oder
- e) durch eine Kombination von mindestens zwei der vorstehend genannten Methoden

erzielt wird.

17. Diagnostisches Nachweisverfahren, welches die folgenden Schritte umfaßt:

- a) Gewinnung von biologischem Probenmaterial in Form von Körperflüssigkeiten oder Gewebeproben aus dem zu untersuchenden Organismus;
- b) Herstellung eines Biochips durch Bindung des Probenmaterials an die Oberfläche eines Probenträgers durch Beschichten mit dem flüssigen oder suspendierten Probenmaterial, erhalten aus Körperflüssigkeiten oder Zell- oder Gewebeproben, und nachfolgender Trocknung;
- c) Auftragen von spezifischen, diagnostischen Nachweisreagenzien auf einzelne Mikroareale des Biochips unter Verwendung eines Pipettierroboters, und Inkubation unter den für die jeweilige Nachweisreaktion geeigneten Bedingungen;
- d) Auftragen von Waschlösungen zur Unterdrückung unspezifischer Reaktionen, und nachfolgendem Absaugen dieser Waschlösungen;
- e) falls erforderlich, Wiederholung der Schritte c) und d);
- f) Detektion der Meßsignale von positiv reagierenden Mikroarealen;
- g) computergestützte Auswertung der Meßdaten sowie Speicherung der Meßdaten.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt a) das biologische Probenmaterial vor der Bindung an die Oberfläche des Probenträgers aufbereitet wird, vorzugsweise durch Zentrifugation, Zellaufschluß oder Extraktion.

19. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Schritte c) bis g) an mehreren Biochips parallel oder gleichzeitig durchgeführt werden.

20. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß einzelne Mikroareale eines Biochips gleichzeitig oder sequentiell mit verschiedenen spezifischen diagnostischen Nachweisreagenzien behandelt werden.

21. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß als spezifische diagnostische Nachweisreagenzien in Schritt c) vorzugsweise Antikörper, Antigene, Lektine, DNA-Sonden, Biomolekül-bindende Farbstoffe oder andere spezifisch bindende Moleküle eingesetzt werden.

22. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion der Meßsignale unter Verwendung von CCD-Kameras, Phototransistoren oder Radioaktivitäts-, Fluoreszenz- oder Luminiszenzdetektoren erfolgt.

23. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß derselbe Biochip, welcher mit Probenmaterial eines bestimmten Patienten beschichtet ist, zweimal oder mehrmals nacheinander einer Analyse nach den Schritten c) bis f) oder c) bis g) unterzogen wird, wobei der Biochip in der Zeit zwischen den aufeinanderfolgenden Analysen aufbewahrt wird, und wobei bei den aufeinanderfolgenden Analysen unterschiedliche Mikroareale des Biochips mit Nachweisreagenzien behandelt werden.

24. Verwendung eines Biochips oder eines Probenträgers nach einem der Ansprüche 1 bis 14 oder eines Verfahrens nach den Schritten a) und b) des Anspruchs 17 oder 18 für diagnostische Nachweisreaktionen und/oder zur Aufbewahrung und Archivierung von aus Patienten gewonnenem Probenmaterial.

25. Verwendung nach Anspruch 24 zur Aufbewahrung und Archivierung von Patienten-Probenmaterial für Zwecke der Routinediagnostik von Patientenproben, der klinischen Forschung oder bei epidemiologischen Studien, zur Qualitätssicherung und -kontrolle bei Blutbanken, Firmen oder anderen Organisationen, oder bei der Tumordiagnostik oder für forensische Zwecke.

26. Verwendung eines Verfahrens nach den Ansprüchen 17-23 für medizinische oder tiermedizinische Zwecke, für die Tumordiagnostik, für die Tumormarkeranalyse, in der klinischen Forschung, zur Qualitätssicherung bei Blutbanken, Firmen oder anderen Unternehmen, für epidemiologische Studien, zur Gewebstypisierung oder für forensische Zwecke.

FIG. 1 A



FIG. 1 B

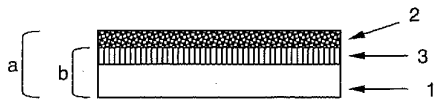
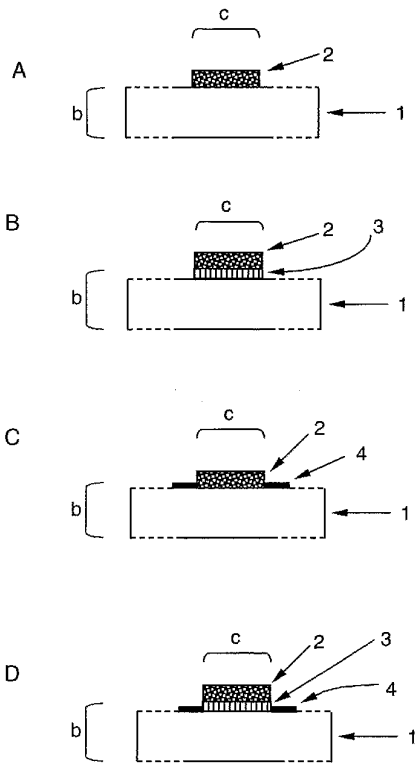


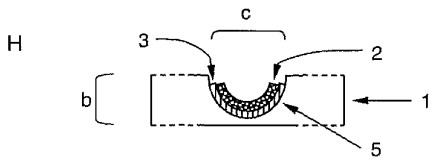
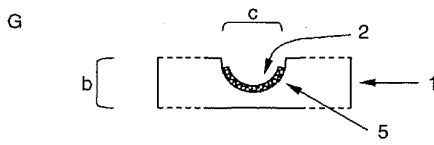
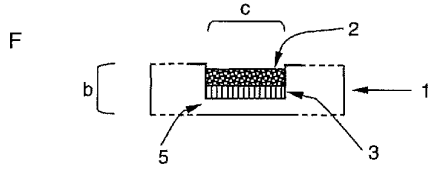
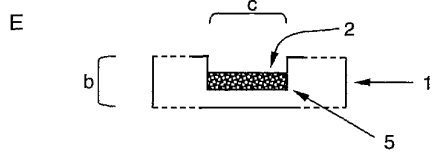
FIG. 2



WO 01/84150

PCT/EP01/02851

3/4

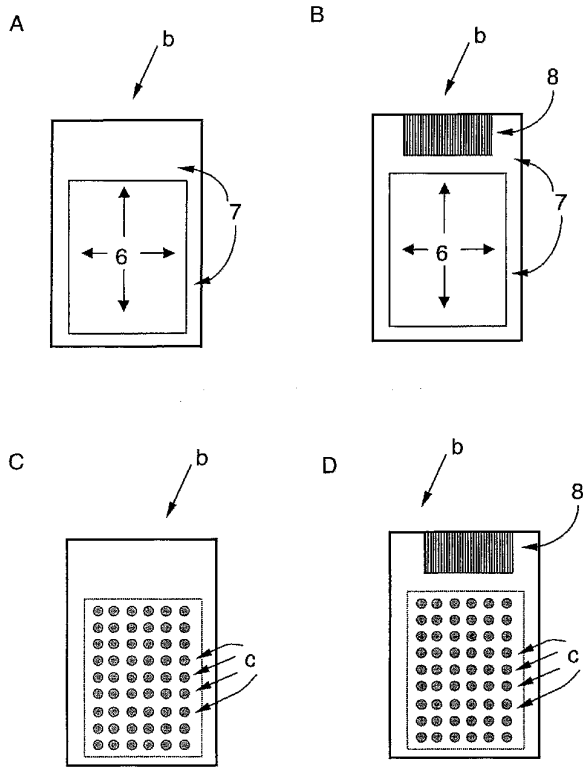


WO 01/84150

PCT/EP01/02851

4/4

FIG. 3



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/EP 01/02851
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/543		
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 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 972 626 A (DOXSEY STEPHEN J) 26 October 1999 (1999-10-26) the whole document ---	1-26
A	MENDOZA L G ET AL: "High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)." BIOTECHNIQUES, vol. 27, no. 4, October 1999 (1999-10), pages 778-788, XP000992893 ISSN: 0736-6205 cited in the application the whole document ---	1-26
A	US 4 959 308 A (OGDEN DARYL M) 25 September 1990 (1990-09-25) column 5, paragraph 7 -column 6, paragraph 2 ---	1-26
-/-		
<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		*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
E earlier document but published on or after the international filing date		*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
L document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)		*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.
O document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 10 September 2001	Date of mailing of the international search report 17/09/2001	
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. 91 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Pellegrini, P	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/02851

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 296 16 373 U (FURTMAYR L.) 19 December 1996 (1996-12-19) claims -----	1-26

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No.	
information on patent family members				PCT/EP 01/02851	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
US 5972626 A	26-10-1999	AU 8596998 A	22-02-1999		
		WO 9906828 A	11-02-1999		
US 4959308 A	25-09-1990	AU 2420888 A	31-03-1989		
		EP 0386015 A	12-09-1990		
		JP 3500087 T	10-01-1991		
		WO 8902079 A	09-03-1989		
		US 5110726 A	05-05-1992		
DE 29616373 U	07-11-1996	NONE			

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 01/02851

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N33/543		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RESEARCHIERTE GEBIETE Recherchiertes Mindestprüfobjekt (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 G01N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfobjekt gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 972 626 A (DOXSEY STEPHEN J) 26. Oktober 1999 (1999-10-26) das ganze Dokument	1-26
A	MENDOZA L G ET AL: "High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)." BIOTECHNIQUES, Bd. 27, Nr. 4, Oktober 1999 (1999-10), Seiten 778-788, XP000992893 ISSN: 0736-6205 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-26
A	US 4 959 308 A (ORDEN DARYL M) 25. September 1990 (1990-09-25) Spalte 5, Absatz 7 -Spalte 6, Absatz 2	1-26
-/-		
<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 zweifelhafte Erscheinungen zu beseitigen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchereizzeit genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung ohne Benützung, 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	Abschließendes Datum des internationalen Recherchenberichts	
10. September 2001	17/09/2001	
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.O. 5818 Patentbau 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-3040, Tx. 31 651 epo nl. Fax. (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Studienleiter Pellegrini, P	

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 01/02851

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Bez. Anspruch Nr.
A	DE 296 16 373 U (FURTMAYR L.) 19. Dezember 1996 (1996-12-19) Ansprüche -----	1-26

Formblatt PCTISA210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentsfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 01/02851

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentsfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5972626 A	26-10-1999	AU 8596998 A	22-02-1999
		WO 9906828 A	11-02-1999
US 4959308 A	25-09-1990	AU 2420888 A	31-03-1989
		EP 0386015 A	12-09-1990
		JP 3500087 T	10-01-1991
		WO 8902079 A	09-03-1989
		US 5110726 A	05-05-1992
		KEINE	
DE 29616373 U	07-11-1996	KEINE	

Formblatt PCT/ISA210 (Anhang, Patentsfamilie), Juli 1992

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 37/00 1 0 2	
	C 1 2 N 15/00 F	

F ターム(参考) 4B029 AA07 AA23 BB11 BB15 BB20 CC03 CC08 FA15
4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QR31 QR55 QR63 QR84 QR85
QS10 QS11 QS24 QS36 QX01 QX04 QX10

专利名称(译)	生物芯片用于生物样品材料的归档和临床分析		
公开(公告)号	JP2004517297A	公开(公告)日	2004-06-10
申请号	JP2001581123	申请日	2001-03-14
[标]申请(专利权)人(译)	毕利门的Em-基于硬		
申请(专利权)人(译)	Biorefu有限公司		
[标]发明人	シュターブハンスユールゲン		
发明人	シュターブ,ハンス-ユールゲン		
IPC分类号	G01N33/53 B01J19/00 C12M1/00 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 C40B40/06 C40B60/14 C40B70/00 G01N33/543 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/54366 B01J19/0046 B01J2219/00317 B01J2219/00497 B01J2219/00527 B01J2219/00529 B01J2219/00533 B01J2219/00542 B01J2219/00547 B01J2219/00563 B01J2219/00565 B01J2219/00585 B01J2219/00596 B01J2219/00605 B01J2219/00608 B01J2219/0061 B01J2219/00612 B01J2219/00617 B01J2219/00619 B01J2219/00621 B01J2219/00626 B01J2219/00637 B01J2219/00659 B01J2219/00689 B01J2219/00722 B01J2219/0074 B01J2219/00743 C40B40/06 C40B60/14 C40B70/00		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.M C12M1/00.A C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N37/00.102 C12N15/00.F		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/HA12 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB11 4B029/BB15 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QR31 4B063/QR55 4B063/QR63 4B063/QR84 4B063/QR85 4B063/QS10 4B063/QS11 4B063/QS24 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX04 4B063/QX10		
代理人(译)	伊藤忠彦		
优先权	10020704 2000-04-27 DE		
其他公开文献	JP4695812B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

生物芯片所使用的诊断具有由固体基质样品材料的样品支持待分析从生物源区得到的被耦合到的表面。

