



**PCT**

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p><b>(51) Internationale Patentklassifikation 5 :</b> C12Q 1/00, G01N 33/543 C12N 11/04</p>	<p>A1</p>	<p><b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> WO 92/04465 <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 19. März 1992 (19.03.92)</p>
<p><b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP91/01628 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 27. August 1991 (27.08.91) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 40 27 728.3 31. August 1990 (31.08.90) DE <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-5090 Leverkusen (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) :</b> HAMPP, Norbert [DE/DE]; Ungererstrasse 43, D-8000 München 40 (DE). SCHOLZE, Juliane [DE/DE]; Görresstrasse 36, D-8000 München 40 (DE). BRÄUCHLE, Christoph [DE/DE]; Rotkäppchenweg 89a, D-8000 München 83 (DE).</p>	<p><b>(74) Anwälte:</b> VON KREISLER, Alek usw. ; Deichmannhaus am Hauptbahnhof, D-5000 Köln 1 (DE). <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US. <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	
<p><b>(54) Title:</b> IMMOBILIZATION OF ORGANIC MACROMOLECULES OR BIOPOLYMERS IN A POLYMER MEMBRANE <b>(54) Bezeichnung:</b> IMMOBILISIERUNG VON ORGANISCHEN MAKROMOLEKÜLEN ODER BIOPOLYMEREN IN EINER POLYMERMEMBRAN <b>(57) Abstract</b> The method proposed for immobilizing organic macromolecules or biopolymers, in particular enzymes, antibodies, antigens, DNA/RNA and microorganisms, comprises mixing the macromolecules or biopolymers with an aqueous, solvent-free polymer dispersion, applying this mixture in the form of a cohesive film to a substrate and carefully drying the film. In particular, the polymer film is applied in such a way that it lies over the measurement electrode of a biosensor transducer. <b>(57) Zusammenfassung</b> Das Verfahren zur Immobilisierung von organischen Makromolekülen oder Biopolymeren, insbesondere von Enzymen, Antikörpern, Antigenen, DNA/RNA und Mikroorganismen besteht darin, daß die zu immobilisierenden Makromoleküle oder Biopolymere mit einer wässrigen, lösungsmittelfreien Polymerdispersion vermischt werden und daß diese Mischung in Form eines zusammenhängenden Filmes auf ein Substrat aufgetragen wird, der anschließend schonend getrocknet wird. Insbesondere ist vorgesehen, daß der Polymerfilm auf die Meßelektrode eines Transducers für einen Biosensor aufgebracht wird.</p>		

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MN	Mongolei
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BJ	Benin	GR	Griechenland	PL	Polen
BR	Brasilien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU <sup>+</sup>	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TC	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

+ Die Bestimmung der "SU" hat Wirkung in der Russischen Föderation. Es ist noch nicht bekannt, ob solche Bestimmungen in anderen Staaten der ehemaligen Sowjetunion Wirkung haben.

5

10

Immobilisierung von organischen Makromolekülen oder Biopolymeren in einer Polymermembran

---

15

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Immobilisierung von organischen Makromolekülen oder Biopolymeren in einem Polymerfilm bzw. einer Polymermembran. Insbesondere handelt es sich dabei um die Immobilisierung von Enzymen, Antikörpern, Antigenen, DNA/RNA und von Mikroorganismen, z.B. Bakterienzellen. Derartige Membranen sind ein wichtiger Bestandteil von Transducern für Biosensoren und besitzen chemisch-selektive Eigenschaften. Ferner können solche Membranen optisch in Reflexion oder Transmission analytisch untersucht werden. Hauptanwendungsgebiete dieser analytischen Meßmethode mit Hilfe von Membranen liegen auf dem Gebiet der medizinischen Diagnostik, aber auch in der Umweltanalytik.

30

#### Stand der Technik

Bei Biosensoren, insbesondere solchen auf der Basis elektrochemischer Transducer, ist es ein technologisch bislang nur unzureichend gelöstes Problem, auf den eigentlichen Transducer die biologische(n) Komponente(n)

35

5 aufzubringen, die als Indikator (Antikörper, Antigene,  
DNA, RNA) oder Katalysator (Enzyme) benutzt werden.  
Diese Moleküle sind im allgemeinen empfindlich gegenüber  
organischen Lösungsmitteln. Bei Kontakt mit organischen  
Lösungsmitteln muß mindestens mit einer partiellen  
Denaturierung der Biopolymere gerechnet werden. Es ist  
10 notwendig, daß die Immobilisierung unter Ausschluß  
nichtwäßriger Lösungsmittel erfolgt. Die meist verwen-  
dete Technik ist eine kovalente Immobilisierung über  
Seitengruppen des Biopolymers mittels einer radikali-  
schen Reaktion. Dabei erfolgt Anbindung an ein bereits  
15 vorliegendes Polymer mit z.B. Aldehyd-Seitengruppen.  
Eine andere Möglichkeit ist die Erzeugung eines Polymers  
in situ (z.B. Polyacrylamidgele), was in einem physika-  
lischen Einschluß der Makromoleküle resultiert. Radika-  
lische Immobilisierungsreaktionen sind im allgemeinen  
20 mit einem hohen Verlust an biologischer Aktivität ver-  
bunden, die durch einen höheren kostenintensiven,  
Materialeinsatz kompensiert werden muß.

Halbleitertransducer für Biosensoren, wie z.B. ISFETs,  
25 sind zudem häufig instabil gegenüber radikalischen  
Immobilisierungsreaktionen auf ihren "Gate"-zonen. Dies  
führt zu hohen Ausfallraten, da die radikalischen  
Agentien auch mit den dünnen Schichten z.B. der "Gate"-  
isolatoren reagieren und deren Struktur angreifen.

30 Für die Immobilisierung von Enzymen kommen heute zum  
Einsatz:

35

1. Die kovalente Anbindung an aktivierte wasserunlös-  
5 liche Trägermaterialien. Diese sind meist Poly-  
saccharide, Silikate oder leitfähige Polymere.
2. Die Einbettung in eine Matrix, z.B. Polyacryl-  
amidgele,  
10
3. die Adsorption an Oberflächen.

Eine Übersicht der klassischen Immobilisierungstechniken  
für Enzyme und andere Biopolymere findet sich u.a. bei  
15 P.W. Carr, L.D. Bowers "Immobilized Enzymes in Analyti-  
cal and Clinical Chemistry" in "Chemical Analysis", Vol.  
56 (eds. P.J. Elving, J.D. Winefordner), J. Wiley &  
Sons, New York.

20 Für chemische Sensoren bzw. Biosensoren sind zwei  
spezielle Varianten beschrieben. Zum einen die Immobili-  
sierung von Enzymen mittels bzw. an leitfähigen Poly-  
meren wie z.B. Polypyrrol (N.C. Foulds, C.R. Lowe  
"Enzyme Entrapment in Electrically Conducting Polymers",  
25 J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1, 82 (1986) 1259-1264)  
sowie die Verwendung von Kohleschlämmen bzw. Pasten, die  
mit Enzymen gemischt werden und z.B. mittels Siebdruck  
auf Oberflächen aufgebracht werden (EP 0 351 891 A2).

30 In Abhängigkeit der verwendeten Immobilisierungsmethode  
muß das Verfahren zur Applikation der Biopolymer-halti-  
gen Schichten auf den Substraten gewählt werden. Meist  
kann für die Aufbringung der biologischen Komponenten

35

5 auf die Transducer und die eigentliche Transducerher-  
stellung nicht die gleiche Technik bzw. das gleiche Ver-  
fahren (z.B. der Siebdruck) verwendet werden.

Eine Übersicht der geläufigen Transducer und deren  
Konstruktion und Gestaltung findet sich in:

10 J. Janata, A. Bezegh, "Chemical Sensors", Anal. Chem.  
60 (1988) 62R-74R.

C. Nylander, "Chemical and biological sensors", J. Phys.  
E: Sci. Instrum. 18 (1985) 736-750.

15 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Biopolymere  
in einer Polymermembran unter Erhaltung der biologischen  
Aktivität zu immobilisieren. Der auf ein Festkörpersub-  
strat, z.B. Papier, Keramik, Metall, Glas oder Kunst-  
stoff, aufgebrachte Polymerfilm mit dem immobilisierten  
20 Biopolymer soll trocken lagerfähig sein und nach Re-  
hydratisierung eine hohe biologische Aktivität auf-  
weisen. Für die Anwendung solcher Membranen bei der  
Herstellung von Biosensoren ist es ferner wesentlich,  
daß die Membranen hinsichtlich der Meßempfindlichkeit  
25 eine hohe Reproduzierbarkeit aufweisen und bei der Her-  
stellung der Membranen mit den gleichen Maschinen und  
Vorrichtungen gearbeitet werden kann wie bei der Her-  
stellung der Transducer für die Biosensoren.

30 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß  
die zu immobilisierenden Makromoleküle oder Biopolymere  
mit einer flüssigen lösungsmittelfreien, nicht ionogenen  
Polymerdispersion vermischt werden und daß diese  
35 Mischung in Form eines zusammenhängenden Filmes auf ein

5 Substrat aufgetragen wird, der anschließend schonend ge-  
trocknet wird. Die wäßrige, flüssige Phase der Disper-  
sion soll also weder organische noch anorganische Lö-  
sungsmittel enthalten. Unter "schonender Trocknung" ist  
dabei zu verstehen, daß die Trocknungstemperatur und die  
Trockenzeit so niedrig bzw. so klein gehalten wird, daß  
10 eine Schädigung des Biopolymers vermieden wird. Eine  
Schädigung des Biopolymers kann anhand des Aktivitäts-  
verlustes festgestellt werden. In der Regel werden gute  
Ergebnisse erzielt, wenn der Polymerfilm bei Zimmertem-  
peratur getrocknet wird. Ziel der Immobilisierung ist  
15 also eine hohe Biopolymermenge, z.B. ein Enzym, mit  
hoher Aktivitätsausbeute in einer Membran zu fixieren.  
Erwünscht ist dabei die Aufnahmefähigkeit der Membran  
für Wasser, um die Enzyme in aktiver Form zu erhalten,  
die Durchlässigkeit für Enzymsubstrate und gegebenen-  
20 falls der Ausschluß von bestimmten Komponenten, wie z.B.  
rote Blutkörperchen. "Nicht ionogen" heißt, daß außer  
den grundsätzlich vorhandenen Polymerseiten- und End-  
gruppen keine anionischen oder kationischen Gruppen vor-  
handen sind. Dies bedeutet, daß mit global ungeladenen  
25 Polymeren gearbeitet wird. Ionogene Gruppen können zu  
empfindlichen Störungen führen, wenn die Polymermembran  
bei elektrochemischen Meßverfahren eingesetzt wird.

Vorteilhaft wird zur Herstellung des Films bzw. der  
30 Membran eine polydisperse Polymerdispersion verwendet,  
die einen Anteil von 60 % bis 99 %, vorzugsweise 90 %  
bis 97 % an Teilchen mit einem Durchmesser von 0,1 bis

35

1  $\mu\text{m}$  aufweist und deren restlicher Anteil einen Teil-  
5 chendurchmesser von 1  $\mu\text{m}$  bis 10  $\mu\text{m}$  besitzt. Vorzugsweise  
liegt dabei der Durchmesser des Hauptanteils der Teil-  
chen im Bereich von 0,3  $\mu\text{m}$  bis 0,8  $\mu\text{m}$ , während der  
Durchmesser des Restanteils im Bereich von 2  $\mu\text{m}$  bis 5  $\mu\text{m}$   
10 liegt. Es wurde gefunden, daß die kleinen Teilchen auf-  
grund ihrer großen Gesamtoberfläche für die Absorption  
der Biopolymeren bzw. für deren Matrixeinschluß von  
wesentlicher Bedeutung sind. Sie sind auch für die  
eigentliche Filmbildung und die Filmhaftung und damit  
15 für die Biopolymerenimmobilisierung verantwortlich.  
Dagegen dienen die Anteile mit größeren Teilchendurch-  
messern, d.h. 1  $\mu\text{m}$  bis 10  $\mu\text{m}$  (vorzugsweise 2  $\mu\text{m}$  bis  
5  $\mu\text{m}$ ) der Strukturbildung des Films, bestimmen die  
Wasseraufnahmefähigkeit und sind maßgeblich verantwort-  
lich für die durchschnittliche Porengrößenverteilung der  
20 Filme, welche wiederum für die Substratpermeabilität  
z.B. für immobilisierte Enzyme wichtig ist.

Durch die Einstellung des Verhältnisses der Teilchenkon-  
zentrationen in den beiden Größenklassen lassen sich die  
25 sensorrelevanten Eigenschaften (Substratpermeabilität),  
Hydrathöhlen für Biopolymere, Immobilisierungskapazität  
etc.) variieren und anpassen.

Eine weitere Verbesserung besteht darin, daß der Poly-  
30 merdispersion innere und/oder äußere, Weichmacher zuge-  
setzt werden. Innere Weichmacher, die z.B. durch Copoly-  
merisation mit Ethylen in Polymere eingeführt werden

35

5 können, erhöhen die Flexibilität des Filmes und wirken sich positiv auf die Dauerhaftigkeit auch bei Temperaturschwankungen aus.

10 Äußere Weichmacher, z.B. Dibutylphthalat = DBP, bringen zwar die Gefahr der Ausdiffusion mit sich, haben sich jedoch insbesondere bei "Sandwich-Membranen", z.B. bei einer darunterliegenden potentiometrischen auf einer PVC-Matrix basierenden Membran, die ebenfalls mit DBP weich gemacht ist, als vorteilhaft erwiesen.

15 Durch Kombination innerer und äußerer Weichmacher können die Membraneigenschaften im Hinblick auf die Laminierungsfähigkeit mit anderen Membranen/-typen und die Kälte- und Wärmeausdehnungseigenschaften (Dauerflexibilität) und damit die Haftfähigkeit auf Oberflächen mit abweichenden Wärmeausdehnungskoeffizienten, z.B. Keramik, Epoxide, Papier etc., verbessert werden.

25 Oberflächenaktive Substanzen haben durch ihren Tensidcharakter im allgemeinen eine schädliche Wirkung auf Biopolymere, da sie häufig zur Denaturierung und damit zum Aktivitätsverlust führen.

30 Polyvinylalkohol hat sich als ein sehr gut enzymverträgliches, zur Stabilisierung der Polymerdispersion beitragendes Schutzkolloid erwiesen.

Nach der Trocknung kann der Polymerfilm vom Substrat abgezogen werden und bildet dann eine geschlossene zusammenhängende Membran mit einer auf die Fläche bezogenen, konstanten Porosität. Auf diese Weise können

5 Membranen mit hoher Dehnbarkeit (ca. 550 %) und Reiß-  
festigkeit (ca. 4 N/mm<sup>2</sup>) hergestellt werden. Für die  
meisten Anwendungen wird die Membran jedoch nicht  
abgelöst, sondern bleibt auf dem Substrat. Insbesondere  
kann die Meßelektrode eines Transducers für einen  
10 Biosensor, der in diesem Fall das Substrat darstellt,  
nach dem erfindungsgemäßen Verfahren mit einer Polymer-  
membran beschichtet werden. Geeignete Transducer für  
Biosensoren können mit Hilfe von Dickschicht- oder  
Dünnschichtschaltungen hergestellt werden und mit Halb-  
15 leiterbausteinen, wie Feldeffekttransistoren und deren  
Modifikationen (ISFET, ChemFET) kombiniert werden.

Eine vorteilhafte Methode zur reproduzierbaren Beschich-  
tung des Substrats besteht darin, daß eine vorgegebene  
Menge der Biopolymer-/Polymerdispersionsmischung zeit-  
20 gesteuert mittels Druckluft aus einer Kartusche auf die  
Substratoberfläche dosiert wird. Zur Durchführung dieses  
Verfahrens können die in der elektronischen Fertigungs-  
technik üblichen SMD-Dosierer benutzt werden. Durch die  
exakte Positionierung der Austrittsöffnung der Dosier-  
25 einrichtung kann die Auftragsstelle auf dem Substrat mit  
hoher Präzision festgelegt werden. Die Reproduzier-  
barkeit der Dosiermenge ist typischerweise 1 %. Ein  
wesentlicher Vorteil dieses Verfahrens besteht darin,  
daß durch die geringe Fläche der Dosierspitze ein  
30 Verlust an Wasser praktisch ausgeschlossen ist und die  
Zusammensetzung der Biopolymer-/Polymerdispersions-  
mischung sich auch während längerer Verarbeitungs-  
perioden nicht ändert. Außerdem ermöglicht diese Technik  
praktisch eine vollständige Verarbeitung der aufgrund  
35

5 des Biopolymergehalts gegebenenfalls sehr wertvollen  
Mischung. Die Flexibilität dieses Verfahrens ermöglicht  
ferner die Beschichtung eines Transducers mit verschie-  
denen Membranen in einem einzigen Arbeitsgang. Die Ver-  
wendung von Mehrfachdosierern (z.B. mit Revolverhalte-  
10 rung) erlaubt es nach einmaliger Positionierung des  
Transducers, alle Elektrodenpunkte mit den unterschied-  
lichen Membranen in einem Arbeitsgang zu beschichten.

Durch Zusatz von lipophilen Farbstoffen zu der Biopoly-  
mer-/Polymerdispersionsmischung kann man erreichen, daß  
15 die Membran lichtundurchlässig wird, wodurch störende  
Photoeffekte an den Elektrodenoberflächen eliminiert  
werden können. Des weiteren kann durch Zusatz von  
Metall- oder Graphitstaub die elektrische Leitfähigkeit  
der Membran heraufgesetzt werden. Die elektrische Leit-  
20 fähigkeit ist von Bedeutung, wenn Ladungsträger, die  
z.B. aus Redox-Prozessen stammen, abgeführt werden  
müssen.

Gemäß einer Weiterentwicklung der Erfindung wird eine  
25 laminierte Schichtfolge von Membranen mit hoher wechselseitiger  
Adhäsion durch sukzessives Auftragen der lösungsmittelfreien  
Polymerdispersion hergestellt, wobei mindestens eine Schicht mit dem Zusatz von Makromole-  
külen bzw. Biopolymeren versehen ist. Die Herstellung  
30 derartiger laminiertes Membranschichten erfolgt zweckmäßig  
mit der oben beschriebenen SMD-Dosiertechnik oder durch  
Siebdruck. Anwendungsbeispiele für Biosensoren mit  
laminierten Membranschichten werden weiter unten  
beschrieben.

35

Die erfindungsgemäß hergestellten biopolymerhaltigen  
5 Membranen weisen folgende vorteilhafte Eigenschaften  
auf: Sie sind

- 10 - dauerelastisch; d.h. sie bleiben auch bei mechanischer Beanspruchung in innigem Kontakt mit dem Substrat
- trockenlagerfähig; d.h. während der Lagerung tritt kein Verlust an Enzymaktivität auf
- 15 - dauerhaftfähig; d.h. sie sind kaum oder nur schwer vom Substrat abzulösen
- wasserunlöslich; d.h. sie zeigen bei dem Kontakt mit dem Analyten keinerlei Auflösungserscheinungen, was einen Dauereinsatz verbieten würde
- 20 - wasseraufnahmefähig; d.h. eine Rehydratisierung der immobilisierten Biopolymere ist gewährleistet und
- 25 - in reproduzierbarer Weise porös, d.h. für den Durchtritt kleiner Moleküle, wie z.B. Enzymsubstrate, geeignet, aber andererseits undurchlässig für makroskopische Komponenten, z.B. rote Blutkörperchen oder Feststoffanteile im Analyten.

30 Ein weiterer wichtiger Vorteil liegt ferner darin, daß die Beschichtung der Transducer mit der gleichen Technik und den gleichen Einrichtungen erfolgen kann wie die Herstellung der biopolymerhaltigen Membran. Auf diese  
35 Weise kann die Herstellung des kompletten Biosensors

vereinfacht werden, was zu einer Kostenreduktion führt  
5 und ein Konzept für einen "Einweg-Sensor" für einen ein-  
maligen Gebrauch eröffnet.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Zeichnungen  
und Ausführungsbeispielen näher erläutert.

10

Es zeigen

Fig. 1 und Fig. 2

die Beschichtung einer Meßelektrode in einem  
15 Biosensor mit einer Biopolymer-/Polymerdis-  
persion

Fig. 3 ein aus zwei Schichten bestehendes Polymer-  
membranlaminat für einen Glukose-Sensor

20

Fig. 4 die prinzipielle Meßfeldanordnung bei einem  
Dickschicht-Hybrid-Sensor und

Fig. 5 ein nach dem Totalreflexionsprinzip arbeiten-  
25 der optischer Sensor mit einer Biopolymer-/  
Polymerschicht.

Bei der Auswahl einer geeigneten Polymerdispersion zur  
Immobilisierung von Biopolymeren in einer Membran  
30 spielen folgende Gesichtspunkte eine Rolle:

1. Während der Filmbildung dürfen keine chemischen  
Reaktionen, insbesondere keine Quervernetzung  
stattfinden, da sonst Aktivitätsverluste durch  
35 kovalente Enzymimmobilisierung eintreten würden.

- 5 2. Eine polydisperse Partikelgrößencharakteristik bedingt auch eine inhomogene Porenweitenverteilung innerhalb des ganzen Polymers.
- 10 3. Die Polymerdispersion darf keine Monomere enthalten (Unverträglichkeit mit Enzymaktivität).
- 15 4. Die Filme bzw. Membranen lassen sich mit sehr guter Reproduzierbarkeit herstellen, da als Verfahrensparameter nur die Luftfeuchtigkeit und die Temperatur zu beachten sind und keine chemischen Reaktionsparameter eingestellt bzw. kontrolliert werden müssen.
- 20 5. Die Polymere sollen elektrisch ungeladen sein, d.h. keine ionogenen Gruppen enthalten, die bei einer Verwendung der Membran in einem elektrochemischen Sensor zu Interaktionen und Störungen führen können.
- 25 6. Die Lagerfähigkeit bleibt auch im tiefgefrorenen Zustand erhalten. Die Filme werden nicht spröde sondern bleiben dauerelastisch.

30 Für die nachfolgenden Beispiele wurde eine lösungsmittelfreie wäßrige Vinnapas<sup>®</sup>-Dispersion M54/25C der Firma Wacker-Chemie verwandt. Es handelt sich dabei um eine äußerlich weichgemachte homopolymere Polyvinylacetat-Dispersion mit Dibutylphthalat als Weichmacher

35

und Teilchengrößen im Bereich von 0,5 bis 2 µm. Zur  
5 Herstellung der Biopolymer-/Polymermischung werden die  
in einer Pufferlösung befindlichen Enzyme mit der  
Vinnapas<sup>®</sup>-Dispersion vermischt. Diese Enzym-/Polymer-  
mischung ist lagerfähig.

10 Gemäß Fig. 1 wird mit Hilfe einer Mikrodosiereinrichtung  
1 ein Tropfen 2 der Enzym-/Polymermischung auf die mit  
einer Passivierungsschicht 3 abgegrenzte Meßelektrode  
4 eines Biosensors aufgebracht. Die Meßelektrode 4 ist  
auf einem Keramikträger 5 angeordnet. Ein Biosensor die-  
15 ser Bauart ist ausführlich in DE 3 827 314 beschrieben.  
Nach der Benetzung der Meßelektrode 4, die durch Klopfen  
bzw. Vibration unterstützt werden kann, bildet sich ein  
gleichmäßiger Polymerfilm auf der Oberfläche aus, der  
bei Zimmertemperatur ca. 5 bis 20 min getrocknet wird  
20 und dann eine gleichmäßige Membran 6 (siehe Fig. 2)  
bildet, in der die Enzyme immobilisiert sind.

Alternativ kann die Enzym-/Polymerdispersionsmischung  
auch mittels Siebdruck appliziert werden. Die ge-  
25 trocknete Polymerschicht 6 bildet einen wasserunlös-  
lichen Film, der ausreichend porös ist, um den Zutritt  
von Molekülen, z.B. Glukose, an die immobilisierten  
biologischen Komponenten zu gestatten, jedoch einen  
Ausschluß von z.B. roten Blutkörperchen gewährleistet.  
30 Die Trockenlagerfähigkeit dieser Enzymmembranen ist sehr  
gut. Durch geeignete Wahl der Seitenketten der Polymere  
kann ein lokales Puffersystem erzeugt werden, welches  
für die enzymatischen Reaktionen vorteilhaft ist. Eine  
höhere Trockentemperatur kann gewählt werden, wenn die

35

5 Biokompatibilität des Enzyms gewährleistet bleibt; d.h.  
wenn sichergestellt ist, daß keine Schädigung der biolo-  
gischen Aktivität während der Trocknung eintritt.

10 Gemäß Fig. 3 wird eine die Elektrodenzone 7 abdeckende  
Doppelschichtmembran (Laminat aus Schichten 8 und 9)  
dadurch hergestellt, daß auf die Oberfläche einer  
ersten, bereits getrockneten Membranschicht 8 eine  
zweite Membranschicht 9 aufgetragen wird. Die Elek-  
trodenzone 7 befindet sich wiederum auf einem Keramik-  
15 substrat 5 und ist nach außen hin durchkontaktiert (An-  
schluß 10). Nachfolgend werden drei Anwendungsbeispiele  
für derart aufeinander laminierte Membranschichten bei  
Biosensoren beschrieben.

20 1. Glukose-Sensor mit größenselektiver Schutzschicht zur  
Abtrennung von Serum aus Vollblut

25 Über eine Glukose-Oxidase (GOD)-haltige Membran 8 wird  
eine zweite enzymfreie Membran 9 mit größerer Porosität  
laminiert. Durch die obere Membran 9 wird eine Ab-  
trennung von Serum aus Vollblut erzielt und die Ver-  
fälschung der Glukose-Bestimmung durch unspezifische  
Effekte minimiert.

30 2. Glukose-Sensor mit erhöhtem Linearitätsbereich

35 Über einen analog aufgebauten Glukose-Sensor wird eine  
zweite Membran 9 mit dem Enzym Katalase laminiert. Frei-



5 Sensor nach dem Totalreflexionsprinzip. Die Enzym-/Poly-  
merdispersionsschicht 11 wird hier auf die Unterseite  
eines Glasprismas 12 aufgebracht. Das an der Meßober-  
fläche wirksame immobilisierte Enzym ist mit 13 bezeich-  
net. Das Sensorprinzip beruht darauf, daß die Intensität  
10 eines vielfach an der Meßoberfläche total reflektierten  
Lichtstrahls 14 in charakteristischer Weise durch Enzym-  
Reaktionen in dem zu untersuchenden, an die Meßober-  
fläche angrenzenden Medium verändert wird. Als Meßwert  
dient dabei in bekannter Weise das Intensitätsverhältnis  
15 von austretendem Lichtstrahl 15 und eintretendem Licht-  
strahl 14.

20

25

30

35

Patentansprüche

- 5
1. Verfahren zur Immobilisierung von organischen Makromolekülen oder Biopolymeren, insbesondere von Enzymen, Antikörpern, Antigenen, DNA/RNA und von Mikroorganismen, dadurch gekennzeichnet, daß die
- 10 zu immobilisierenden Makromoleküle oder Biopolymere mit einer wäßrigen, lösungsmittelfreien, nicht ionogenen Polymerdispersion vermischt werden und daß diese Mischung in Form eines zusammenhängenden Filmes auf ein Substrat aufgetragen wird, der anschließend schonend getrocknet wird.
- 15
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine polydisperse Polymerdispersion verwendet wird, die einen Anteil von 60 % bis 99 %, vorzugsweise 90 % bis 97 % an Teilchen mit einem Durchmesser von 0,1 µm bis 1 µm aufweist und deren restlicher Anteil einen Teilchendurchmesser von 1 µm bis 10 µm besitzt.
- 20
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Hauptanteil der Teilchen einen Durchmesser von 0,3 µm bis 0,8 µm und der Restanteil der Teilchen einen Durchmesser von 2 µm bis 5 µm aufweist.
- 25
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymerdispersion innere und/oder äußere, vorzugsweise mit einem Enzym-verträglichen Schutzkolloid versehene Weichmacher enthält.
- 30
- 35

- 5 5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß als Substrat die Meßelektrode eines Transducers für einen Biosensor verwendet wird.
- 10 6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß zur reproduzierbaren Beschichtung des Substrats eine vorgegebene Menge der Biopolymer-/ Polymerdispersionsmischung zeitgesteuert mittels Druckluft aus einer Kartusche auf die Substrat- oberfläche dosiert wird.
- 15 7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Biopolymer-/Polymermischung lipophile Farbstoffe zugesetzt werden.
- 20 8. Verfahren nach Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Biopolymer-/Polymermischung durch Zusätze von Metall- oder Graphitstaub leitfähig gemacht wird.
- 25 9. Verfahren nach Anspruch 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß eine laminierte Schichtfolge von Membranen mit hoher wechselseitiger Adhäsion durch sukzessives Auftragen einer lösungsmittelfreien Polymerdispersion hergestellt wird, wobei mindestens eine Schicht mit dem Zusatz von Makromole-  
30 külen bzw. Biopolymeren versehen ist.
- 35

1/5

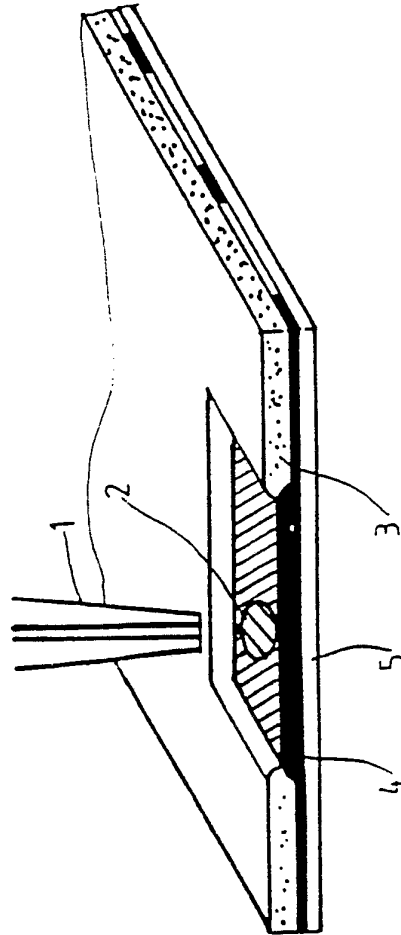


FIG.1

2/5

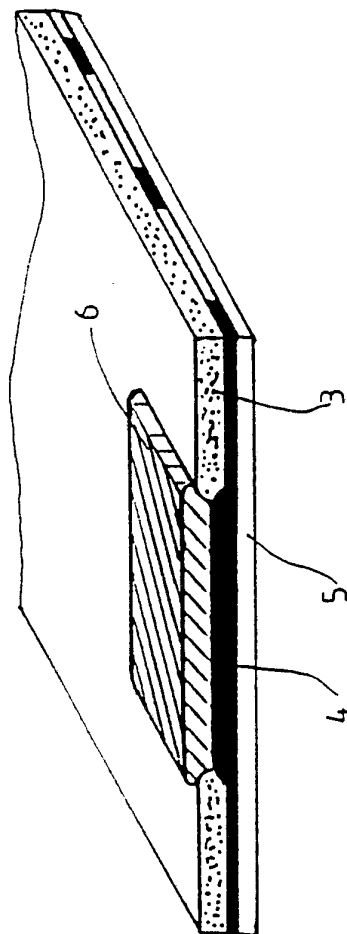


FIG. 2

3/5

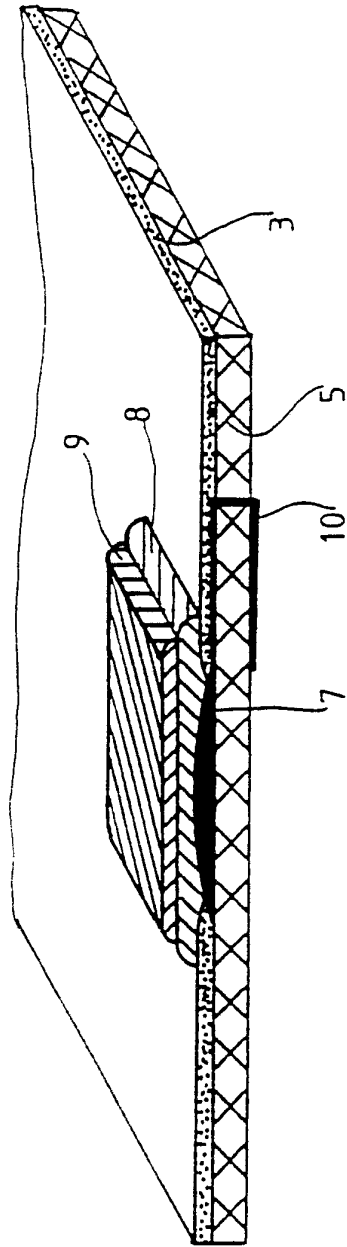


FIG. 3

415

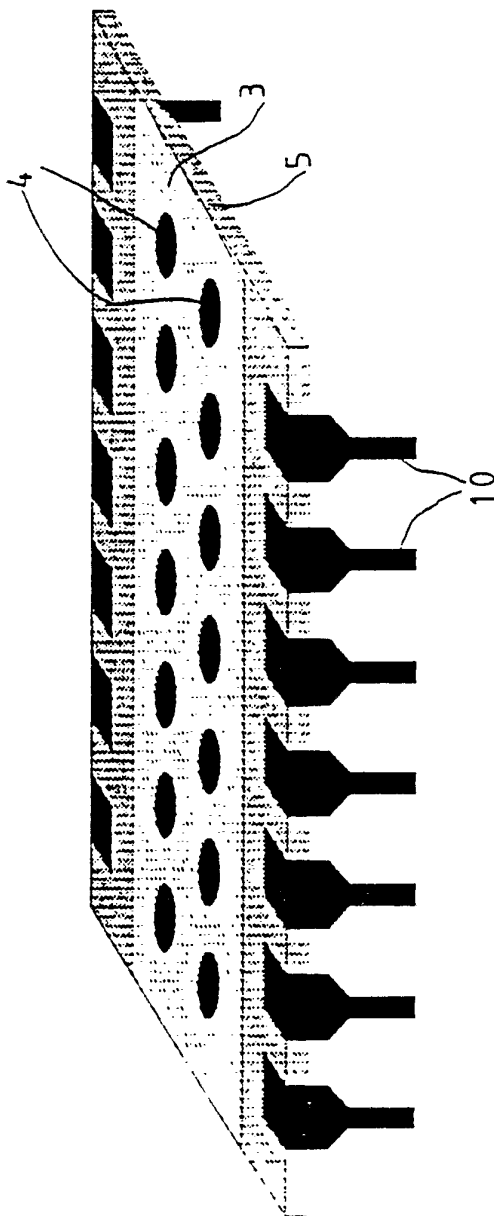


FIG. 4

5/5

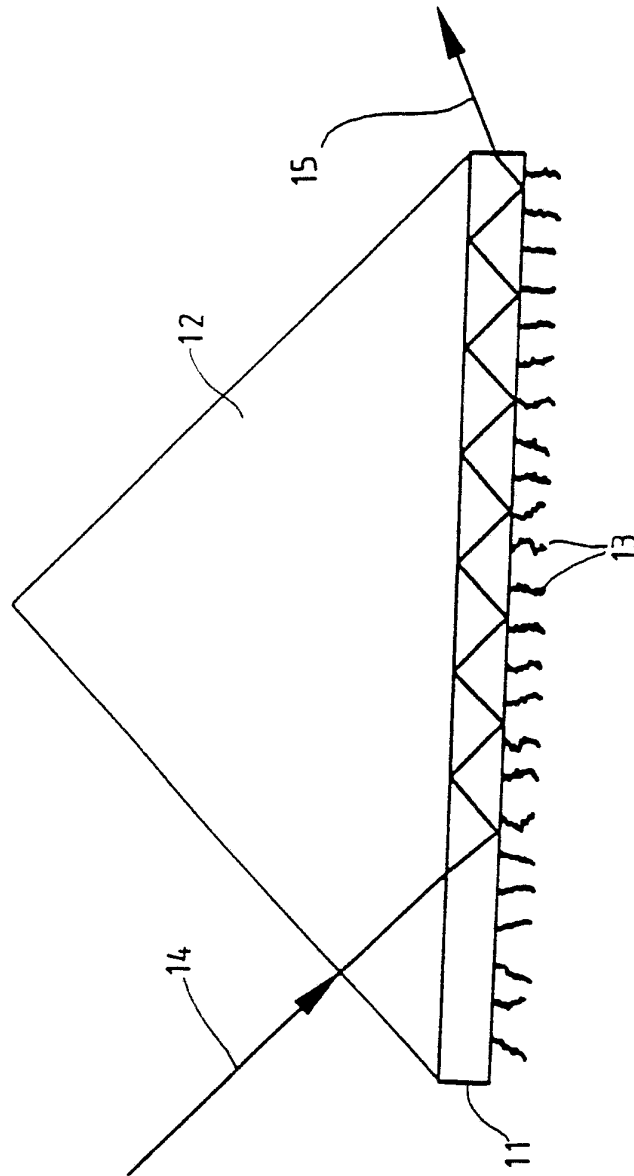


FIG. 5

ERSATZBLATT

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 91/01628

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl. <sup>5</sup> C12Q1/00;    G01N33/543;    C12N11/04		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
Int. Cl. <sup>5</sup>	C12Q ;    G01N ;    C12N	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are included in the Fields Searched <sup>8</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b>		
Category <sup>9</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X	WO, A, 8 907 139 (NOVO INDUSRI A/S) 10 August 1989 see page 3, line 33 - page 4, line 2 see page 5, line 5 - line 15 see page 17, line 6 - page 18, line 30 see examples 1,2	1,9
Y	The whole	2-8
Y	EP, A, 0 238 951 (MERCK PATENT) 30 September 1987 see page 3, line 33 - page 4, line 2 see example 2	2-8
A	EP, A, 0 075 215 (BOEHRINGER MANNHEIM) 30 March 1983 The whole	1-9
<p><sup>9</sup> Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"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.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
17 December 1991 (17.12.91)		14 January 1992 (14.01.92)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
EUROPEAN PATENT OFFICE		

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. EP 9101628  
SA 50553**

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 17/12/91

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8907139	10-08-89	AU-A- 3064689	25-08-89
		EP-A- 0397784	22-11-90
		JP-T- 3503480	08-08-91
EP-A-0238951	30-09-87	US-A- 4820627	11-04-89
		JP-A- 62232567	13-10-87
		US-A- 5009994	23-04-91
		ZA-A- 8702161	17-09-87
EP-A-0075215	30-03-83	DE-A- 3136695	09-06-83
		JP-C- 1488799	23-03-89
		JP-A- 58060999	11-04-83
		JP-B- 63039239	04-08-88

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 91/01628

<b>I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS</b> (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) <sup>6</sup>		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int. Kl. 5 C12Q1/00;                      G01N33/543;                      C12N11/04		
<b>II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE</b>		
Recherchierter Mindestprüfstoff <sup>7</sup>		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int. Kl. 5	C12Q ;                      G01N ;                      C12N	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen <sup>8</sup>		
<b>III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN</b> <sup>9</sup>		
Art. <sup>9</sup>	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>
X	WO,A,8 907 139 (NOVO INDUSRI A/S) 10. August 1989 siehe Seite 3, Zeile 33 - Seite 4, Zeile 2 siehe Seite 5, Zeile 5 - Zeile 15 siehe Seite 17, Zeile 6 - Seite 18, Zeile 30 siehe Beispiele 1,2	1,9
Y	---	2-8
Y	EP,A,0 238 951 (MERCK PATENT) 30. September 1987 siehe Seite 3, Zeile 33 - Seite 4, Zeile 2 siehe Beispiel 2	2-8
A	---	1-9
A	EP,A,0 075 215 (BOEHRINGER MANNHEIM) 30. März 1983 Gesamt.	1-9
	---	
<p><sup>9</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen <sup>10</sup> :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"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</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
<b>IV. BESCHEINIGUNG</b>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts	
17. DEZEMBER 1991	14. 01. 92	
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten	
EUROPAISCHES PATENTAMT	Van Bohemen Ch G <i>Ch Van Bohemen</i>	

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT  
 ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

EP 9101628  
 SA 50553

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am  
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

17/12/91

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-8907139	10-08-89	AU-A- 3064689	25-08-89
		EP-A- 0397784	22-11-90
		JP-T- 3503480	08-08-91
-----			
EP-A-0238951	30-09-87	US-A- 4820627	11-04-89
		JP-A- 62232567	13-10-87
		US-A- 5009994	23-04-91
		ZA-A- 8702161	17-09-87
-----			
EP-A-0075215	30-03-83	DE-A- 3136695	09-06-83
		JP-C- 1488799	23-03-89
		JP-A- 58060999	11-04-83
		JP-B- 63039239	04-08-88
-----			

EPO FORM P0473

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82