

(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
29. September 2011 (29.09.2011)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2011/116748 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
G01N 27/00 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2011/000275

(22) Internationales Anmeldedatum:
18. März 2011 (18.03.2011)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2010 012 840.6 25. März 2010 (25.03.2010) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH** [DE/DE]; 52425 Jülich (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **WOLFRUM, Bernhard** [DE/DE]; Alter Vaalser Str. 40 b, 52074 Aachen (DE). **OFFENHÄUSER, Andreas** [DE/BE]; Landwehr-ring 75, B-4731 Eynatten (BE). **HOFMANN, Boris** [DE/DE]; Bongardstr. 1a, 52428 Jülich (DE). **KÄTELHÖN, Friedrich, Enno** [DE/DE]; Marienbongard 26, 52062 Aachen (DE). **BANZET, Marko** [DE/DE]; Heinsberger Str. 53, 52511 Geilenkirchen (DE).

(74) Anwalt: **FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH**; Fachbereich Patente, 52425 Jülich (DE).

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

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe g)

(54) Title: DEVICE FOR DERIVING ELECTROPHYSIOLOGICAL SIGNALS FROM CELLS

(54) Bezeichnung : VORRICHTUNG ZUR ABLEITUNG ELEKTROPHYSIOLOGISCHER SIGNALE VON ZELLEN

(57) Abstract: The invention relates to a device for deriving electrophysiological signals from cells, comprising a layer structure that comprises a substrate and an electrode arranged on the substrate for deriving the signals by means of a deriving track connected to the electrode, the layer structure being passivated by a passivation layer, characterized in that the passivation layer has an aperture extending through the passivation layer above the electrode, and a gap is arranged between the electrode and the passivation layer as a lateral undercut. The invention further relates to a method for producing the device and to a use of the device produced in this way.

(57) Zusammenfassung: Vorrichtung zur Ableitung elektrophysiologischer Signale von Zellen, umfassend eine Schichtstruktur aus Substrat und einer auf dem Substrat angeordneten Elektrode zur Ableitung der Signale über eine mit der Elektrode verbundene Leiterbahn, wobei die Schichtstruktur durch eine Passivierungsschicht passiviert ist, dadurch gekennzeichnet, dass die Passivierungsschicht über der Elektrode eine durch die Passivierungsschicht verlaufende Apertur aufweist und zwischen der Elektrode und der Passivierungsschicht ein Spalt als seitlicher Unterätz angeordnet ist. Ein Verfahren zur Herstellung der Vorrichtung wird angegeben, sowie eine Verwendung der auf diese Weise hergestellten Vorrichtung.



WO 2011/116748 A2

B e s c h r e i b u n g

Vorrichtung zur Ableitung elektrophysiologischer Signale von Zellen

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Ableitung elektrophysiologischer Signale von Zellen.

Stand der Technik

- Intrazelluläre und extrazelluläre elektrische Zellableitungen werden in bekannter Weise mit elektrophysiologischen Methoden durchgeführt. Die bekannteste elektrophysiologische Methode ist das Patch-Clamp-Verfahren, bei dem eine elektrolytgefüllte Glasmikropipette auf
- 5 eine Zelle aufgesetzt wird. Die Pipette ist an der Öffnung kleiner als die Zelle und kann z. B. durch einen Unterdruck fest an die Membran der Zelle gekoppelt werden. Diese Kopplung führt zu einem hohen Abschlusswiderstand zwischen Zelle und Pipette, welcher eine gute elektrische Übertragung der Zellsignale ermöglicht. Auf diese Weise können durch eine
- 10 „makroskopische“ Elektrode innerhalb der Pipette elektrische Signale der Zelle aufgenommen werden. Dieses Verfahren hat erheblich zum grundlegenden Verständnis neurophysiologischer Prozesse geführt. So konnten z. B. das Öffnen und Schließen einzelner Ionenkanäle und die Auswirkungen von Pharmaka auf die Signalübertragungen untersucht werden. In der zellulären, neurophysiologischen Forschung ist dieses Verfahren zum Goldstandard geworden.
- 15 Es wird unterschieden zwischen intrazellulären und extrazellulären Ableitungen. Intrazelluläre Ableitungen sind gegeben, wenn die Elektrode direkt durch eine Elektrolytflüssigkeit mit dem Inneren der Zelle verbunden ist. Das bedeutet für das Patch-Clamp-Verfahren, dass die Zellmembran an der Mikropipettenöffnung durchbrochen ist, wodurch ein direkter Kontakt zum Inneren der Zelle gegeben ist. Intrazelluläre Messungen weisen für Potentialableitungen
- 20 an Zellen deutlich höhere Amplituden als extrazelluläre Messungen auf, da das Signal nahezu direkt aufgenommen und nicht durch die Zellmembran gefiltert wird. Extrazelluläre Messungen jedoch haben den Vorteil, dass sie nicht invasiv sind. So lassen sich z. B. mit extrazellulären Ableitungen leichter pharmakologische Langzeitstudien an Einzelzellen oder Zellnetzwerken durchführen.

Ein wesentlicher Entwicklungsschritt für extrazelluläre Signableitungen wurde durch die Etablierung chipbasierter Elektrodensysteme realisiert. Diese bieten den Vorteil, dass sich viele Elektroden auf einer kleinen Fläche integrieren lassen und so die gleichzeitige Ableitung mehrerer Zellen in einem Zellnetzwerk erlauben.

- 5 Für die meisten pharmakologischen oder neurophysiologischen Untersuchungen ist es wichtig, zum einen Signale mit einem möglichst großen Signal-zu-Rausch Verhältnis und hoher zeitlicher Auflösung zu realisieren. Zum anderen sollen die Elektroden klein genug sein, damit die Signale unterschiedlicher Zellen räumlich getrennt aufgelöst werden können.

- 10 Figur 1 zeigt ein Verfahren zur Herstellung einer Anordnung zur Messung der Zellsignale gemäß Stand der Technik. Gezeigt ist der Ausgangspunkt für die Herstellung eines Micro-electrodearrays (MEA). In einem ersten Schritt wird die Elektrode und die Leiterbahn lithographisch prozessiert (Figur 1a). Danach erfolgt die Passivierung (Figur 1b) und die Öffnung der Passivierung an der Mikroelektrode (Figur 1c). Links ist jeweils die Aufsicht und rechts der Schnitt entlang der Linie A-A' gezeigt. Figur 1b1) und 1c1) sind halbtransparent und zeigen daher die mit der Passivierung bedeckte Elektrode und / oder die Leiterbahn L sowie das Substrat.

- 20 Als Substrat wird eine gut isolierende Schicht, z. B. Siliziumdioxid auf Silizium, verwendet. Darauf werden mit lithographischen Methoden Leiterbahnen und Elektroden aus leitendem Material aufgebracht. Am häufigsten kommen Materialien wie Gold, Platin, andere Edelmetalle oder Titanitrid, Iridiumoxid, oder für transparente Elektroden Indiumzinnoxid zum Einsatz. Die Leiterbahnen und Elektroden werden anschließend mit einer Passivierungsschicht aus z. B. SiO_2 , Si_3N_4 , nichtleitenden Polymerverbindungen oder mit einem anderen isolierenden Material passiviert. Danach wird die Passivierung wiederum lithographisch an definierten Stellen geöffnet, um die darunterliegenden Elektroden aus Gold freizulegen.

- 25 Für die Ableitung von extrazellulären Signalen auf Einzelzellebene ist es wichtig, dass die Größe der freigelegten Elektroden-Oberfläche dieselbe, oder besser noch kleinere Abmessungen hat als die zu untersuchende Zelle. Ansonsten besteht die Möglichkeit, Signale von einem Ensemble von Zellen, das heißt ohne lokale Auflösung zu messen. Eine kleinere Elektrode ermöglicht zusätzlich eine bessere Abdichtung der Elektrode durch die Zelle, wodurch sich
30 höhere Signalübertragungen realisieren lassen.

Diese Strukturen, wie in Figur 1 gezeigt, werden in Mikroelektrodenarrays eingesetzt, um eine Vielzahl an Zellableitungen gleichzeitig untersuchen zu können. Zu diesem Zweck werden z. B. 60 Elektroden auf einem Chip gleichzeitig integriert. Hierfür wird eine Flip-Chip-Technologie verwendet, bei der die Elektroden über Leiterbahnen und über Kontaktstellen mit den Leiterbahnen des Chips elektrisch verbunden werden. Alternativ werden MEAs auf so großen Chips angeordnet, dass sich die äußeren Kontakte direkt an eine Peripherie-Elektronik anschließen lassen. Hier entfällt demnach der Flip-Chip- oder Bond-Prozess.

Nachteilig weisen die im Stand der Technik aufgeführten Elektroden im Betrieb aufgrund der genannten Notwendigkeit von möglichst kleinen Elektroden bzw. Elektroden-Elektrolyt-Grenzflächen an die Zelle regelmäßig eine hohe Impedanz auf, was die Ableitung der Zellsignale erschwert. Dies ist besonders problematisch, wenn sich Restkapazitäten der Leiterbahnen auf den Chips nicht vermeiden lassen, z. B. durch direkte kapazitive Kopplung benachbarter Leiterbahnen auf dem Chip.

Neuere Entwicklungen im Stand der Technik treten diesem Nachteil entgegen, indem nanostrukturierte Materialien eingesetzt werden, wie z. B. Platinum black, TiN, IrO_x, welche die Oberfläche der Elektrode vergrößern und so eine geringere Impedanz im Betrieb aufweisen.

Aus Kim et al. (Ju-Hyun Kim, Gyumin Kang, Yoonkey Nam and Yang-Kyu Choi (2010). Surface-modified microelectrode array with flake nanostructure for neural recording and stimulation. Nanotechnology, 21: 085303 (8pp)) ist bekannt, eine modifizierte Goldelektrode mit vergrößerter Oberfläche in Form einer Flockenstruktur zu verwenden. Diese Maßnahme senkt die Impedanz und erhöht die Signalextraktion im Vergleich zu einer Elektrode mit identischer Grundfläche und im Übrigen identischer lokaler Auflösung.

Nachteilig weisen aber diese Elektroden auf Grund der Instabilität der Strukturen eine schlechte Langzeitstabilität auf. Außerdem bewirken sie nur eine begrenzte Verringerung der Impedanz im Vergleich zu der Elektrode ohne die Strukturen. Nachteilig ist ferner die schlechte Reproduzierbarkeit sowohl der Impedanzverringerung, als auch der Bildung der Strukturen selbst, denn diese lassen sich nicht in beliebiger Menge auf identische Art und Weise erzeugen.

Aufgabe der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, eine Vorrichtung zur Ableitung elektrophysiologischer Signale von Zellen mit hoher lokaler Auflösung und hoher Sensitivität für die Signale bereit zu stellen.

- 5 Ferner ist es eine Aufgabe der Erfindung, ein reproduzierbares Verfahren zur Herstellung der Vorrichtung bereit zu stellen.

Die Aufgaben der Erfindung werden gelöst durch die Vorrichtung nach Patentanspruch 1 und das Verfahren zur Herstellung gemäß dem Nebenanspruch. Vorteilhafte Ausgestaltungen hierzu ergeben sich jeweils aus den hierauf rückbezogenen Patentansprüchen.

10 Lösung der Aufgabe

- Die Erfindung betrifft das Feld der extrazellulären Messungen von elektrisch aktiven Zellen und Zellnetzwerken auf einem planaren Substrat und im Speziellen lokal hoch aufgelöste Potentialableitungen von einzelnen Zellen auf einem Chip in Form von Einzell-Einsignal-Ableitungen mit hoher Sensitivität. Die Nachteile hoher Impedanzen bei geforderten kleinen und damit hochauflösenden Elektroden herkömmlicher „micro electrode arrays“ (MEAs) wird
15 in der vorliegenden Patentanmeldung durch die Herstellung von Elektrodensensoren mit integrierten Nanospalten gelöst.

- Die Vorrichtung zur Ableitung elektrophysiologischer Signale von Zellen umfasst eine Schichtstruktur aus Substrat und eine auf dem Substrat angeordnete Elektrode zur Aufnahme
20 und Ableitung der Signale über eine mit der Elektrode verbundene Leiterbahn, wobei die Schichtstruktur durch eine Passivierungsschicht passiviert ist. Die Schichtstruktur ist dadurch gekennzeichnet, dass die Passivierungsschicht eine durch die Passivierungsschicht hindurch verlaufende Apertur zur Elektrode aufweist, die sich zwischen der Elektrode und der Passivierungsschicht zu einem Spalt öffnet. Der Spalt weist größere Abmessungen auf als die Apertur.
25 An der dem Spalt gegenüberliegenden Seite der Apertur wird im Betrieb der Vorrichtung die zu untersuchende Zelle angeordnet.

Der hier vorgeschlagene Ansatz zur Behebung des oben geschilderten Problems beruht auf der Ausnutzung dieses Nanospalts mit einer Höhe von etwa 10 nm bis etwa 10000 nm zwischen der Elektrode und der Passivierungsschicht. Dieser Nanospalt wird für den Betrieb durch Kontakt mit dem extrazellulären Elektrolyt, dem Zell- bzw. Puffermedium, mit Flüssigkeit angefüllt und vergrößert dabei die Elektroden-Elektrolyt-Grenzfläche. Der Nanospalt ist am gegenüberliegenden unteren Ende einer zur Zelle hinggerichteten kleinen Apertur, die durch die Passivierungsschicht verläuft, angeordnet.

Dies bewirkt vorteilhaft eine gezielte und durch die Herstellung bedingte, exakt einstellbare, Vergrößerung dieser Grenzfläche, welche unmittelbar auf die Impedanz der Vorrichtung durchschlägt. Die Impedanz ist im Vergleich zu einer lokal hochauflösenden Vorrichtung ohne den Spalt deutlich verringert.

Auf diese Weise wird die Impedanz der Elektrode nahezu unabhängig von der Größe der zur Zelle gerichteten Apertur bzw. Öffnung in der Passivierungsschicht herabgesetzt. Die Impedanz der Elektrode wird während der Herstellung der Vorrichtung auf einfache Weise durch die Vergrößerung der Elektroden-Elektrolyt-Grenzfläche am Nanospalt unterhalb der Passivierung verringert. Durch eine im Vergleich zum Stand der Technik viel kleinere, zur Zelle hinggerichteten Öffnung, bzw. Apertur, in der Passivierungsschicht ist gleichzeitig eine sehr hohe lokale Auflösung der Vorrichtung gegeben.

Je größer die Elektroden-Elektrolyt-Grenzfläche ist, umso kleiner ist die Impedanz der Elektrode bzw. des Gesamtsystems.

Der Lösungsvorschlag ermöglicht wegen der kleinen Abdichtfläche der Passivierung gegenüber der Zelle, der Apertur, lokal hoch aufgelöste Ableitungen und damit eine bisher unerreichte lokale Auflösung. Die Apertur in der Passivierung weist einen Öffnungsdurchmesser von nur etwa 20 nm bis etwa 10 μm Durchmesser auf. Die Apertur sollte kleiner als 10 μm im Durchmesser sein, denn dies ist die maximal aus dem Stand der Technik (Figur 1c2)) bekannte Größe, bei der noch Signale abgeleitet werden können. Die Fläche der Apertur beträgt vorteilhaft etwa 10 μm^2 . Die Grundfläche der Apertur sollte annähernd kreisförmig bzw. quadratisch sein.

Die Fläche der Apertur liegt damit in der Regel viel niedriger als im Stand der Technik.

Im Rahmen der Erfindung wurde erkannt, dass Vorrichtungen nach Stand der Technik, wie in Figur 1 gezeigt, bei einer derartigen Auflösung durch eine kleine Apertur und die dadurch bedingte kleine Elektrode-Elektrolyt-Grenzfläche eine so große Impedanz aufweisen, dass Zelleleitungen nicht mehr möglich sind.

- 5 Im Rahmen der Erfindung wurde ferner erkannt, dass über die Bildung des Nanospalts an der zur Elektrode gerichteten Seite der Apertur die Elektroden-Elektrolyt-Grenzfläche groß und damit die Impedanz der Vorrichtung klein gehalten wird. Gleichzeitig ermöglicht die Apertur eine lokale Auflösung bis in den Nanometerbereich an der gegenüberliegenden Seite, das heißt zur Zelle hin. Die erfindungsgemäße Vorrichtung weist daher vorteilhaft eine viel geringere Impedanz auf, als dies nach dem Stand der Technik wie in Figur 1 mit einer derartig
10 kleinen Apertur möglich wäre.

Das Aspektverhältnis des Spalts zu dem sich die Apertur aufweitet, soll nicht zu groß gewählt werden. Es sollte bis maximal zwei betragen.

- 15 Die Impedanz ist abhängig von der freigelegten Fläche der Elektrode und der Fläche des Nanospalts, das heißt der Elektroden-Elektrolyt-Grenzfläche im Spalt. Die Fläche der Leiterbahn an die Elektrode ist hierfür nicht erheblich, da der Widerstand an der Grenzfläche gegenüber den Widerständen in den Leiterbahnen dominiert.

- 20 Die Herstellung solcher Nanospalt-Elektroden-Sensoren erfolgt vorteilhaft über ein Opfer-schichtverfahren und im Übrigen durch photolithographische Basistechnologie. Sie kann mit ganz verschiedenen Materialien realisiert werden. Es kann z. B. eine Chromopferschicht verwendet werden, die sodann durch selektive Ätzung herausgelöst wird. Die Fläche und die Höhe (bzw. Dicke) der Opferschicht bestimmt bei vollständiger Ätzung im Nachgang die spätere Geometrie des Nanospalts oberhalb der Elektrode. Da photolithographische Prozessie-
25 rungen in der Regel gut steuerbar sind, sind eine sehr genaue Positionierung des Spalts über der Elektrode einerseits, und eine exakt vorhersagbare Verringerung der Impedanz bei einer vorgegebenen kleinen Apertur andererseits möglich. Die Einstellung der Impedanz der Elektrode ist ebenfalls sehr gut reproduzierbar.

Die Gesamtimpedanz der Sensorvorrichtung wird im Wesentlichen durch diese Elektroden-Elektrolyt-Grenzfläche bestimmt. Weniger wichtig sind die Art des Elektrolyten, die Größe

der Öffnung in der Passivierung, Apertur genannt, die Spalthöhe und –Breite, sowie die freigelegte Elektrodenfläche als solches.

Vorteilhaft kann die Vorrichtung auf diese Weise lokal aufgelöst Ableitungen an einzelnen Zellen vornehmen (kleine Apertur) und gleichzeitig die Zellsignale (kleine Impedanz) vollständig ableiten.

Die Vorrichtung zur Ableitung elektrophysiologischer Signale lebender Zellen umfasst somit im Rahmen der photolithographischen Prozessierung zunächst ein Substrat und eine auf dem Substrat angeordnete Elektrode.

Die Schichtstruktur aus vorzugsweise runder oder quadratischer Elektrode sowie die von der Elektrode abführende Leiterbahn auf dem Substrat werden durch eine Passivierungsschicht ganzflächig passiviert. Zwischen der Elektrode und der Passivierungsschicht ist der erfindungsgemäße Spalt als seitlicher Unterätz angeordnet. Der Spalt kann durch die Selektivität des Ätzprozesses seitlich unter die Passivierungsschicht unterätzt sein, wohingegen die übrigen Schichten des Schichtsystems, insbesondere aber die Elektrode und die Passivierungsschicht, während dieser Ätzung nicht angegriffen werden.

Die freigelegte Elektrodenoberfläche ohne die Leiterbahn sollte eine Fläche von etwa $4\ \mu\text{m}^2$ bis etwa $40000\ \mu\text{m}^2$ aufweisen. Dadurch wird vorteilhaft bewirkt, dass die Elektrodenfläche einerseits klein genug ist, um eine geeignete Sensordichte auf dem Chip erreichen zu können, und andererseits groß genug ist, um eine zu hohe Impedanz im Betrieb zu vermeiden.

Das Verhältnis zwischen der Spaltfläche und der darunter angeordneten Elektrodenfläche kann z. B. etwa 1 betragen. Dadurch wird vorteilhaft bewirkt, dass die volle Elektrodenfläche ausgenutzt wird und keine unnötige Spaltfläche erzeugt wird, die die Stabilität der Vorrichtung reduzieren könnte. Je größer das Verhältnis aus Spaltfläche-zu-Elektrodenfläche ist (bis etwa 4), umso kleiner ist die Impedanz der Elektrode im Vergleich zur Impedanz der Elektrode ohne den Spalt. Die Verringerung der Impedanz der erfindungsgemäßen Vorrichtung im Vergleich zu einer Vorrichtung ohne den Spalt mit gleicher, das heißt kleiner Apertur, ist direkt abhängig von der durch den Nanospalt erzeugten Elektroden-Elektrolyt-Grenzfläche.

Das Verhältnis aus Spaltfläche zu Aperturfläche kann zwischen 2 und 10000 liegen.

Die Höhe des Spalts ist abhängig von der Dicke der auf der Elektrode angeordneten Opferschicht. Sie kann bis zu 10000 nm betragen. Sie sollte nicht zu dick gewählt werden, da der Spalt ansonsten instabil werden könnte, bzw. die Passivierung schwieriger zu realisieren ist.

Das Verfahren zur Herstellung der Vorrichtung ist entsprechend gekennzeichnet durch die nachfolgenden Schritte:

5

- auf einer Anordnung aus Substrat und Elektrode wird lokal oberhalb im Bereich der Elektrode eine Opferschicht angeordnet,
- auf das Substrat und die Elektrode und die Opferschicht wird ganzflächig eine Passivierungsschicht angeordnet,
- 10 - die Passivierungsschicht wird lokal geöffnet, so dass die Oberfläche der Opferschicht freigelegt wird. Dies geschieht vorzugsweise durch Trockenätzen, wobei eine Apertur bis an die Opferschicht gebildet wird,
- die Opferschicht wird selektiv zunächst bis zur Oberfläche der Elektrode und sodann seitlich unter der Passivierungsschicht geätzt, z. B. nasschemisch, so dass ein Spalt als
15 seitlicher Unterätz zwischen der Elektrode und der Passivierungsschicht gebildet wird.

Es versteht sich, dass im Rahmen moderner Prozessierungen und photolithographischer Techniken eine Vielzahl an Elektroden auf einem Chip bzw. Wafer gleichzeitig hergestellt werden können.

Die Ätzung erfolgt vorzugsweise vollständig, so dass die Opferschicht vollständig entfernt
20 wird.

Der Spalt ragt auf Grund der größeren Fläche der Opferschicht im Vergleich zu der für die Apertur verwendeten Fläche unter der Passivierung vorzugsweise gleichmäßig hinaus. Der Spalt bildet als seitlicher Unterätz einen Hohlraum zwischen der Passivierung und der Elektrode.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung wird für die Ableitung elektrophysiologischer Signale lebender Zellen auf der Elektrode herangezogen. Hierzu wird der Spalt mit der Apertur mit Elektrolyt gefüllt und die Apertur mit einer Zelle verschlossen. Als Zelle kann eine HL1-Herzmuskelzelle oder ein Neuron gewählt werden. Die Signale der auf der Apertur vereinzelt

5 ten Zelle sind lokal ableitbar.

Spezieller Beschreibungsteil

Erstes Ausführungsbeispiel:

In Figur 2 ist links die Aufsicht und rechts der Querschnitt an der jeweiligen Stelle A-A' gezeigt.

10

Zur Herstellung eines Feldes von Mikroelektroden mit optischer Lithographie wird in einem ersten Schritt ein Substrat aus einem 100 mm Siliziumwafer mit einer 1 μm SiO_2 -Isolierungsschicht gewählt. Es kann auch ein durchsichtiger Borofloatwafer gewählt werden. Grundsätzlich kann auch jedes andere planare und isolierende Substrat, oder ein leitendes Substrat mit

15 einer Isolierungsschicht hierauf aus z. B. Si_3N_4 , SiC , Al_2O_3 , und so weiter gewählt werden. Die Größe des Substrats bestimmt die Anzahl an Chips je Wafer.

Zur Herstellung der Elektrodenfelder aus Gold wird ein Layout mit 30 oder 64 Elektroden, wie in Figur 2 gezeigt, je Chip hergestellt. Auf einem Wafer werden 40 Chips mit 11 mm x 11 mm Kantenlänge prozessiert. Ein Standard Lift off Prozess mit Gold wird durchgeführt. Hier-

20 durch werden Elektroden und deren Leiterbahnen L auf dem Substrat angeordnet. Für eine Elektrode und eine Leiterbahn L ist dies in Figur 2a gezeigt.

Die runden Elektroden haben einen Durchmesser von 15 μm oder z. B. 30 μm . Beide Durchmesser wurden realisiert. Größere und kleinere Elektroden sind im Rahmen der Erfindung ebenso möglich. Allerdings wird bei Elektroden unterhalb von 4 μm^2 Fläche die Impedanz

25 sehr hoch, so dass Signale nicht oder nur schlecht ableitbar sind.

Größere Elektroden verringern nachteilig die maximale erreichbare Sensordichte auf den Chips.

Für den Lift off zur Herstellung der Elektroden, Leiterbahnen und Bond Pads wird ein standard double layer resist Ansatz basierend auf den Lacken LOR3b /nLof 2020 verwendet, da dieser das Überstehen der Kanten minimiert, und somit die Passivierung verbessert. In einem ersten Schritt wird dazu der LOR3b Lack mit 3000 Umdrehungen/Minute aufgeschleudert
5 (entspricht 3,5 μm Dicke) und danach 5 Minuten bei 180°C auf einer Heizplatte gehärtet. Anschließend wird der nLof 2020 Lack mit 3000 Umdrehungen/Minute aufgeschleudert (entspricht 2 μm Dicke) und bei 120°C für 90 Sekunden ausgehärtet.

Der belackte Wafer wird durch eine vorher angefertigte Maske belichtet und in dem Entwickler MIF326 für 45 Sekunden entwickelt. Anschließend wird das Metall mittels Elektronenstrahlverdampfer oder Sputtern oder durch thermische Verdampfung aufgebracht. Im letzten
10 Schritt wird ein Lift-Off in Aceton durchgeführt.

Prinzipbedingt ließe sich auch jedes andere Mikrostrukturierungsverfahren benutzen, z. B. Elektronenstrahlolithographie, oder thermisches oder optisches Imprint-Verfahren. Alternativ zum Lift-Off kann auch der Metallfilm zuerst aufgebracht werden und anschließend nach der
15 Lithographie die Strukturen nass- oder trocken geätzt werden.

Anschließend wird die Opferschicht aus Chrom hergestellt (Figur 2b). Es wurde für die Prozessierung der Opferschicht Chrom verwendet, da dieses besonders gut elektrochemisch in dünnen Schichten zu ätzen ist. Opferschichten aus Aluminium oder Silizium sind möglich. Die Strukturierung der Schicht erfolgt über optische Lithographie und Lift-Off, wobei wiederum andere Verfahren denkbar sind. Bevorzugt ist nasschemisches Ätzen, da der Trockenätzansatz hier schlecht funktionieren würde, da Chrom sehr stabil gegenüber Trockenätzen ist und zudem die darunterliegende Goldschicht der Elektrode angegriffen werden könnte. Die verwendete Dicke für die Chromschicht liegt zwischen 20 nm und 100 nm oder einer Zwischengröße. Man kann aber auch Dicken von bis zu 10 nm sowie jede Zwischengröße realisieren. Unterhalb von 10 nm wird es sehr schwer eine homogene Schicht zu erreichen, zudem wächst der Widerstand im Spalt. Man könnte die Schichten dicker anordnen, sofern man größere Spalte haben wollte. Allerdings muss man dann auch die Passivierung am Ende dicker machen, was technisch relativ schwierig ist. Bis 500 nm Opferschichtdicke ist dies kein Problem.

Vorliegend wurden Opferschichten im Durchmesser immer 5 μm kleiner oder größer als die darunterliegende Elektrode gewählt. Beides funktioniert. Es macht wenig Sinn, den Durchmesser der Opferschicht viel kleiner oder größer als die Elektrode zu wählen: Zu klein führt zu größeren Impedanzen; zu groß verringert die Stabilität des Spalts und bringt keinen Vorteil mehr für die Impedanz. Empfehlenswert ist also ein Durchmesser im Bereich der Elektrodengröße ($< +10\%$, $> -50\%$).

Die Strukturierung der Passivierung erfolgt sodann. Hierzu wird zur Passivierung eine Schicht aus Siliziumnitrid und Siliziumoxid jeweils mit 400 nm Dicke übereinander angeordnet. Neben der Passivierung und der elektrischen Isolation muss die Passivierung stabil genug sein, um den Spalt nicht kollabieren zu lassen. Es wurden auch Polymere wie PMMA, SU8, verwendet, die funktionieren, aber weniger langzeitstabil sind.

Abwechselnde Nitrid- und Oxid-Schichten benutzt man, um den Stress innerhalb der Passivierung zu minimieren. Allerdings funktionieren auch reine SiO_2 -Schichten, z. B. mit einer Dicke von 600 nm. Es wurden sowohl gesputterte Schichten, als auch PECVD-Schichten eingesetzt. Die Passivierung sollte mindestens doppelt so dick sein wie die Strukturhöhe, die abgedeckt werden soll, um eine gute Kantenbedeckung zu erreichen. Am besten funktioniert Atomic Layer Deposition (ALD), die aber vergleichsweise teuer ist.

Die Strukturierung der Passivierung erfolgt über optische Lithografie mit Lack AZ 5214 und mit anschließender Trockenätzung durch reaktives Ionenätzen. Hierdurch wird die Apertur 21 gebildet (Figur 2c2)). Als Gase kommen hierfür CHF_3 und CF_4 mit O_2 zum Einsatz, wobei zahlreiche Alternativen sowohl für Trockenätzen, als auch für Nassätzen denkbar sind.

Die verwendeten Größen der Aperturöffnung 21, siehe seitlicher Doppelpfeil unter Bezugszeichen 21 in Figur 2c2), das heißt des Durchmessers der Öffnung 21, die verwendet werden können, lagen im Experiment zwischen 2 μm und 5 μm . Stand der Technik ist normalerweise 30 μm für gewöhnliche Mikroelektrodenarrays, wobei nachteilig nur selten Potentiale von einzelnen Zellen, das heißt lokal, gemessen werden können. Bei 2 μm bis 5 μm Aperturgröße wird vorteilhaft bewirkt, dass die örtliche Auflösung hoch ist, verbunden mit einer „sauberen Signalqualität“, was insbesondere für Untersuchungen von Pharmaka interessant ist. Hiermit kann die Kinetik einzelner Komponenten des Aktionspotentials der Zelle aufgenommen und

abgeleitet werden, sofern, wie oben beschrieben, die Öffnung nicht so klein ist, dass die Impedanz zu stark steigt.

Eine bessere Abdichtung der Zelle (nicht dargestellt) erfolgt über eine Adhäsion der Zelle auf der die Elektrode umgebenden Passivierung, was zu einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis führt, sofern die Elektrode nicht zu hohe Impedanzen aufweist.

Kleine Öffnungen, bis hin zu etwa 100 nm, sind ideal für die Zellkopplung, sind aber technisch anspruchsvoller zu realisieren. Größere Aperturen als 20 µm machen für orts aufgelöste Anwendungen keinen Sinn, da in diesem Bereich die Standardkapazitäten aus dem Stand der Technik wie in Figur 1 ohne Nanospalt ausreichend für Signableitungen sind.

Der letzte Schritt ist das Ätzen der Opferschicht (Figur 2d). Es wird hierfür „chrome etch“ von BASF oder Merck gewählt. Die Ätzlösung dringt über die Apertur 21 bis zur Opferschicht vor und ätzt diese seitlich unter der Passivierung fort, siehe seitlicher Doppelpfeil an Bezugszeichen 22. Dadurch entsteht zwischen Passivierung und Elektrode der Spalt als seitlicher Unterätz. Die Apertur 21 öffnet sich also zum Spalt und schafft auf diese Weise Platz für eine große Elektroden-Elektrolyt-Grenzfläche. Dadurch wird die Impedanz im Vergleich zur Vorrichtung ohne diesen seitlichen Unterätz bzw. Spalt wieder deutlich verringert.

Der Ätzprozess kann rein chemisch erfolgen, was allerdings abhängig von der Geometriegröße lange dauern kann.

In der Regel wird für die Ätzung ein Potential an die Elektroden gegenüber der Ätzlösung angelegt, z. B. eines von 400 mV gegen eine Ag/AgCl Referenzelektrode. Das beschleunigt den Ätzprozess.

Es wird darauf hingewiesen, dass die Aufsicht von Figur 2c1) und Figur 2d1) auf Grund der dunkel dargestellten Farben für die Opferschicht und die Elektrode und auf Grund der gepunkteten Struktur für die Passivierung halbtransparent ist und Strukturen auch unterhalb der Passivierung zeigt, die eigentlich nicht sichtbar sind, nämlich die schwarz dargestellte Opferschicht in Figur 2c1) und die dunkelgrau dargestellte Elektrode in Figur 2d1), sowie das hellgrau dargestellte Substrat. Tatsächlich aber ist die Passivierung ganzflächig auf der Schichtenfolge abgeschieden.

- Figur 3 zeigt die Aufnahme elektrischer Signale von HL-1 Zellen durch die Elektrode nach Figur 2. Trotz der geringen Aperturgröße 21 von nur 2 μm und der damit verbundenen hohen lokalen räumlichen Auflösung war es möglich, extrazelluläre Signale der Zellen mit hohen Amplituden $> 1 \text{ mV}$ Peak-to-Peak zu detektieren. Diese Experimente demonstrieren das
- 5 Potential der entwickelten Sensoren. Da der Prozess parallelisiert ist und lediglich eine weitere Lithographie benötigt, ist es möglich, die Sensoren auch kommerziell zu nutzen.

Es besteht die Möglichkeit, die Opferschicht direkt mit der Elektrode zu deponieren. Für diesen Prozess ist dann keine weitere Lithographie erforderlich. Allerdings muss die Ätzung der Opferschicht in diesem Fall zeitlich genauer überwacht werden.

- 10 Figur 4 zeigt einen CAD file des Sensorlayouts eines Chips. Auf einem Chip befinden sich nanofluidische Elektroden 1 bis 28 und 30 und eine große Elektrode 29, die als Referenzelektrode benutzt werden kann.

P a t e n t a n s p r ü c h e

-
1. Vorrichtung zur Ableitung elektrophysiologischer Signale von Zellen, umfassend eine Schichtstruktur aus Substrat und eine auf dem Substrat angeordnete Elektrode zur Ableitung der Signale über eine mit der Elektrode verbundene Leiterbahn (L), wobei die Schichtstruktur durch eine Passivierungsschicht passiviert ist, dadurch gekennzeichnet, dass die Passivierungsschicht eine durch die Passivierungsschicht verlaufende Apertur (21) zur Elektrode aufweist, die sich zwischen der Elektrode und der Passivierungsschicht zu einem Spalt (22) öffnet.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch eine freigelegte Elektrodenfläche von 4 bis 40000 μm^2 zur Ausbildung einer Elektroden-Elektrolyt-Grenzfläche.
3. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis zwischen der Spaltfläche (22) und der Elektrodenfläche bis zu maximal 4 beträgt.
4. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Höhe des Spalts 10 nm bis 10000 nm beträgt.
5. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Apertur einen Durchmesser von etwa 20 Nanometer bis zu etwa 10 Mikrometer aufweist.

6. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
das Verhältnis aus Spaltfläche (22) zu Aperturfläche (21) etwa 2 bis etwa 10000 beträgt.
- 5 7. Mikroelektrodenarray,
gekennzeichnet durch
eine Vielzahl an Vorrichtungen nach einem der vorhergehenden Ansprüche.
8. Verfahren zur Herstellung einer Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
gekennzeichnet durch die Schritte:
10 – auf einer Anordnung aus Substrat und Elektrode wird lokal im Bereich der Elektrode
eine Opferschicht angeordnet,
– auf das Substrat, die Elektrode und die Opferschicht wird ganzflächig eine Passivie-
rungsschicht angeordnet,
– die Passivierungsschicht wird lokal geöffnet, so dass eine Apertur (21) bis an die un-
15 ter der Passivierungsschicht angeordnete Opferschicht gebildet wird,
– die Opferschicht wird selektiv seitlich unterätzt, so dass sich die Apertur (21) zu ei-
nem Spalt (22) zwischen der Elektrode und der Passivierungsschicht aufweitet.

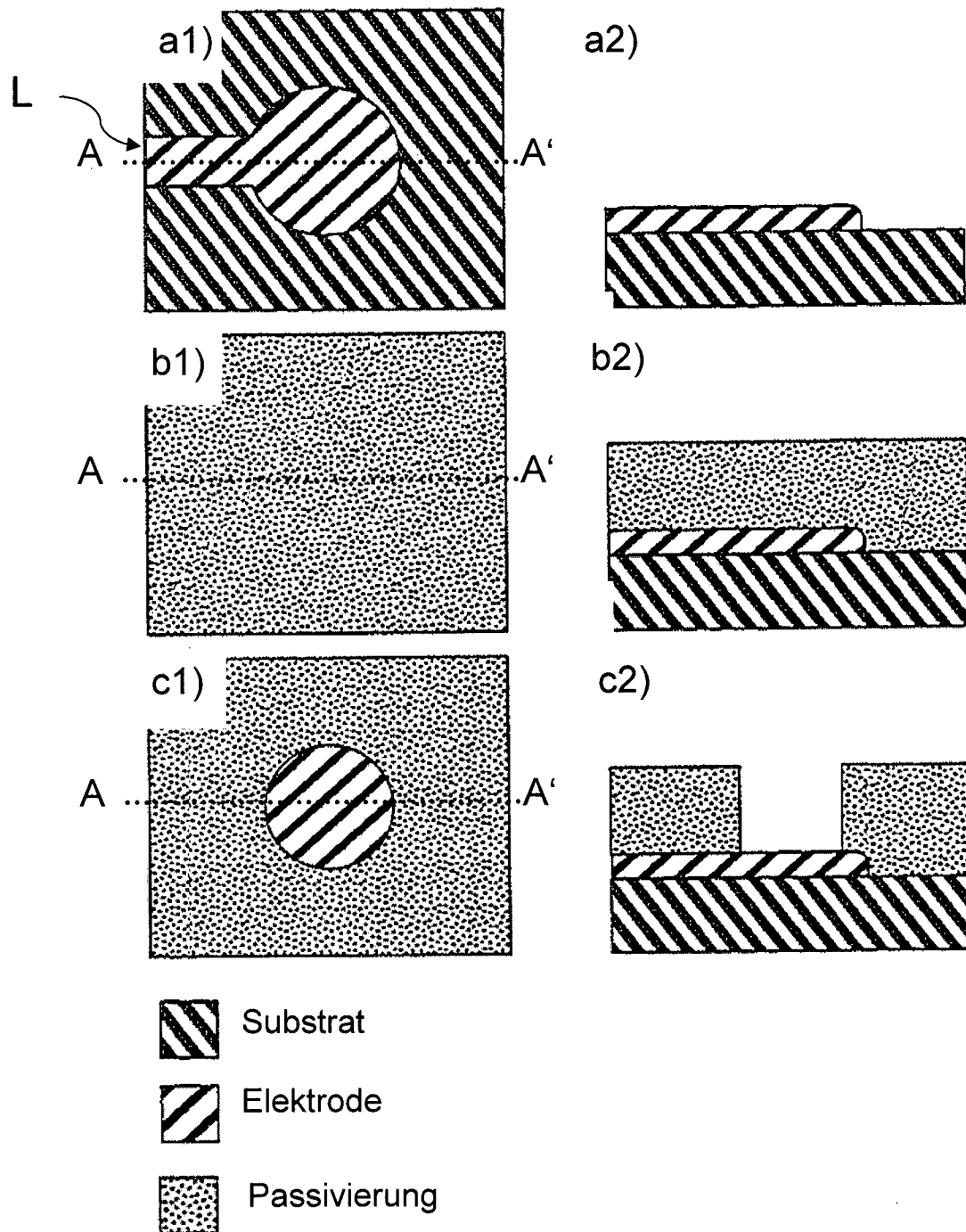


Fig. 1 (Stand der Technik)

2/4

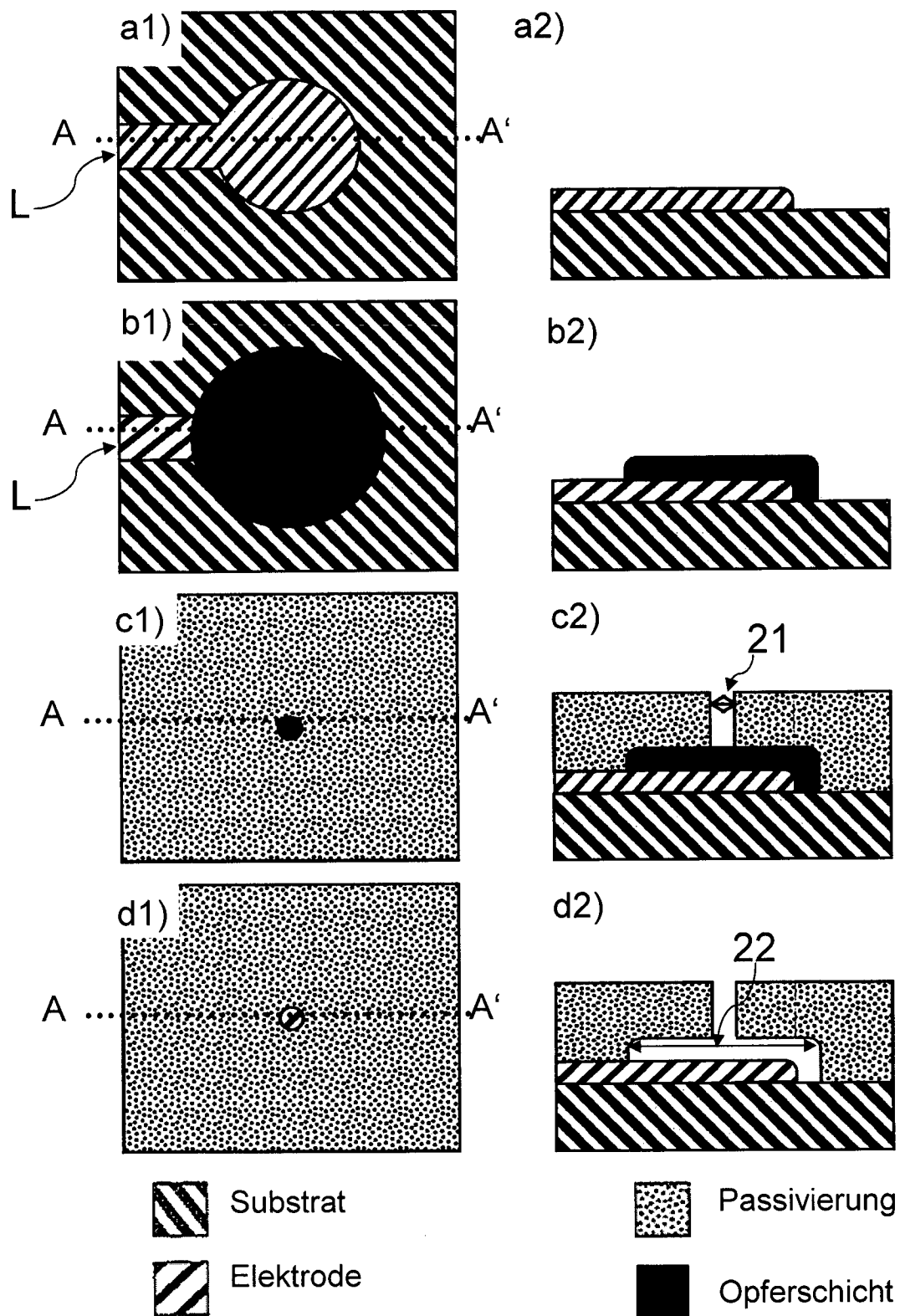


Fig. 2

3/4

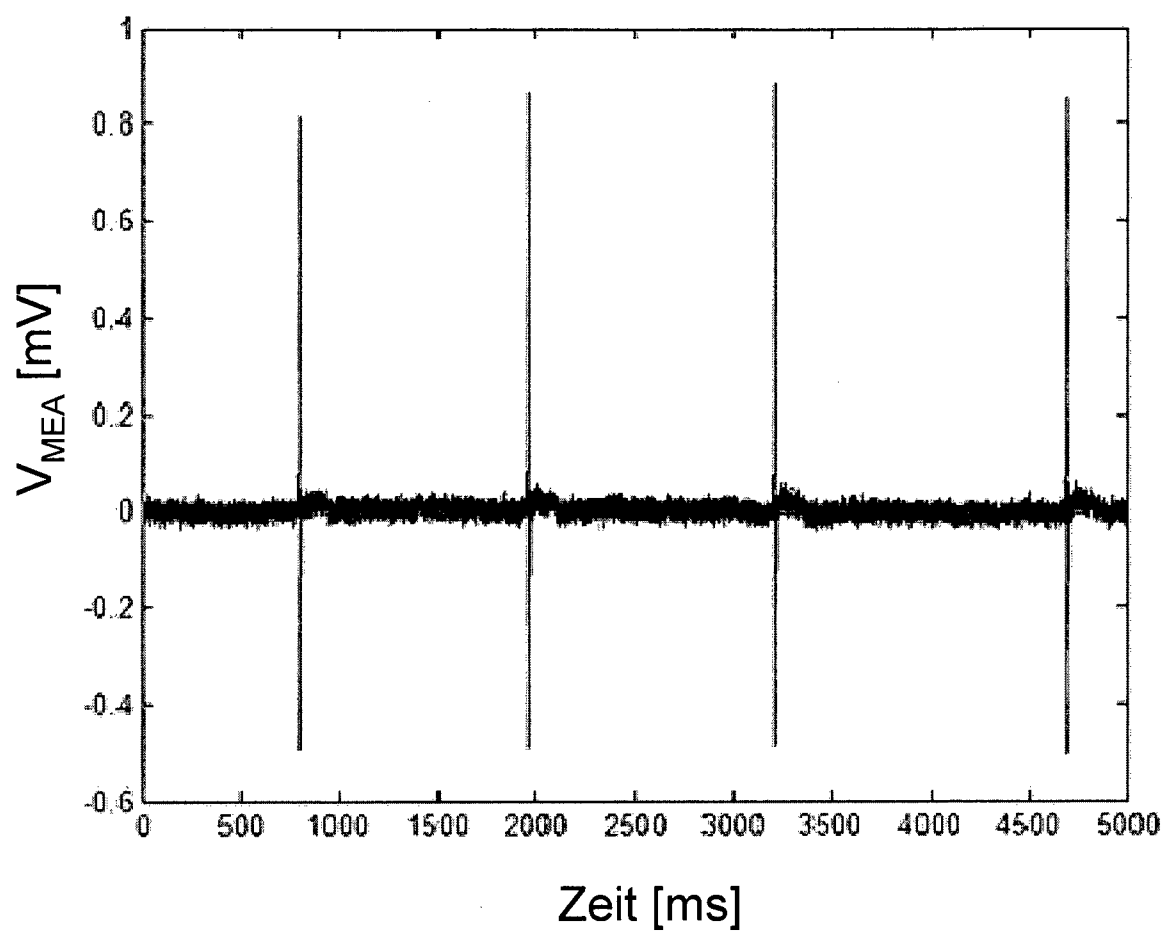
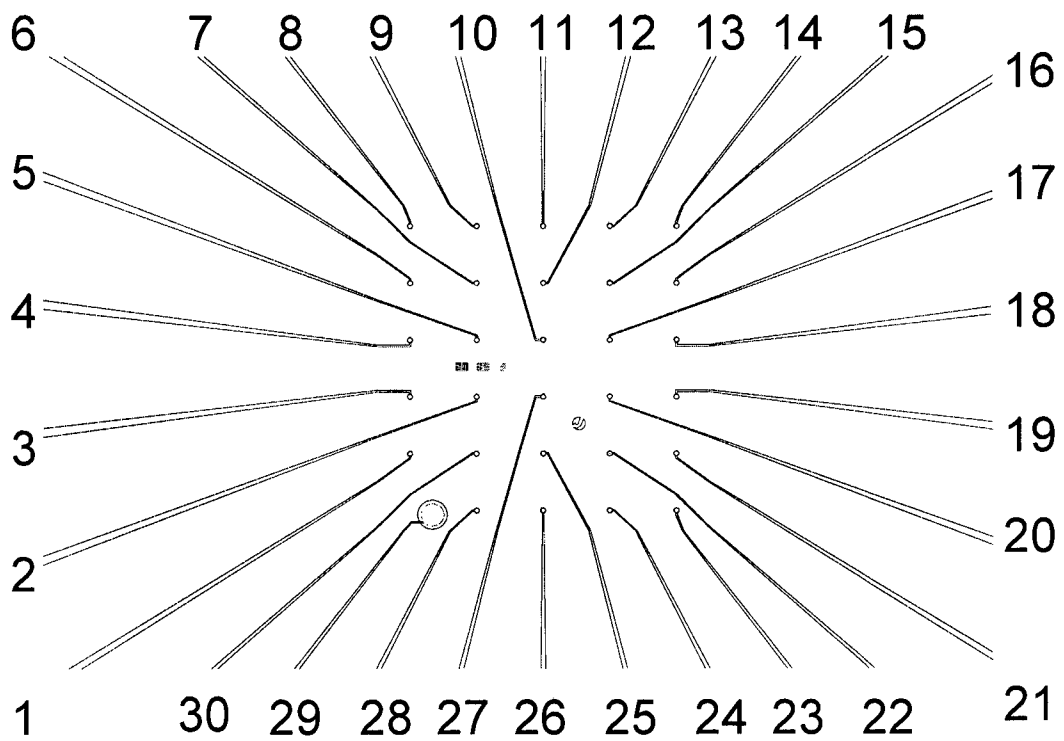


Fig. 3

4/4



Figur 4