



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 33/543, 27/414, C12Q 1/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/11402 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. April 1996 (18.04.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE95/01371 (22) Internationales Anmeldedatum: 30. September 1995 (30.09.95) (30) Prioritätsdaten: P 44 36 001.0 8. Oktober 1994 (08.10.94) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Wilhelm-Johnen Strasse, D-52425 Jülich (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): THUST, Marion [DE/DE]; Unkeler Strasse 19, D-50939 Köln (DE). SCHÖNING, Michael, Josef [DE/DE]; Düsseldorfer Strasse 34, D-52428 Jülich (DE). VETTER, Joachim [DE/DE]; Josephstrasse 34-36, D-50678 Köln (DE). KAUPP, Ulrich, Benjamin [DE/DE]; Saarstrasse 86, D-52062 Aachen (DE). KORDOS, Peter [SK/DE]; Trierer Strasse 4, D-52428 Jülich (DE). LÜTH, Hans [DE/DE]; Eupener Strasse 299B, D-52076 Aachen (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: BR, CA, CN, JP, KR, MX, SG, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: BIOSENSOR WITH BIOMATERIAL COVALENTLY FIXED ON A SIGNAL-ACTIVE SURFACE

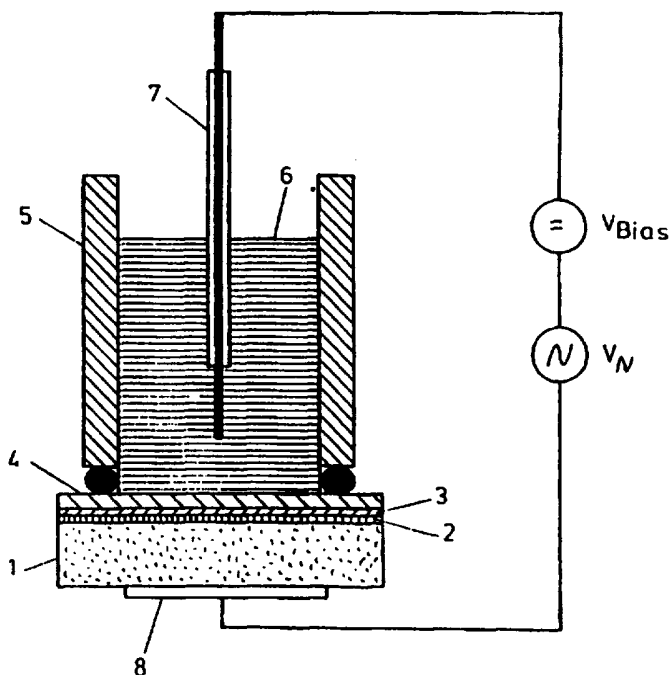
(54) Bezeichnung: BIOSENSOR MIT AUF EINER SIGNALAKTIVEN OBERFLÄCHE KOVALENT FIXIERTEM BIOMATERIAL

(57) Abstract

The successful bonding of bioactive material, especially enzymes, to the signal-active surface of a biosensor can be achieved by means of a heterobifunctional crosslinking agent having a group A reactive for the signal-active surface, e.g. a group reacting with -OH, -SH or -NH_x, and a photoactivatable, biomaterial-reactive group B. Known groups B are, in particular, azidophenyl and azidosalicylic groups. Crosslinking agents containing such groups B on the one hand and succinimide ester groups on the other are commercially available and hence particularly attractive. The signal-active surface can be especially a Si₃N₄ surface with reactive NH_x groups, as can be obtained from the gas phase by SiH₄/NH₃ reaction, especially on a fresh SiO₂ surface, and has been freed from oxides especially by treatment with dilute hydrofluoric acid.

(57) Zusammenfassung

Die erfolgreiche Anbindung von bioaktivem Material, insbesondere von Enzymen, an die signalaktive Oberfläche eines Biosensors kann mittels eines heterobifunktionellen Crosslinkers erreicht werden, der eine für die signalaktive Oberfläche reaktive Gruppe A - wie eine mit -OH, -SH oder -NH_x reagierende Gruppe - einerseits und eine photoaktivierbare, biomaterialreaktive Gruppe B andererseits aufweist. Bekannte Gruppen B sind insbesondere Azidophenyl- und Azidosalicylgruppen. Solche Gruppen B einerseits sowie Succinimidester-Gruppen andererseits enthaltende Crosslinker sind im Handel erhältlich und somit besonders attraktiv. Als signalaktive Oberfläche dient insbesondere eine Si₃N₄-Oberfläche mit reaktiven NH_x-Gruppen, wie sie aus der Gasphase durch SiH₄/NH₃-Umsetzung, insbesondere auf einer frischen SiO₂-Oberfläche erhalten werden kann und insbesondere durch Behandlung mit verdünnter Flußsäure von Oxiden befreit worden ist.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

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

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

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

Biosensor mit auf einer signalaktiven Oberfläche kovalent fixiertem Biomaterial

5 Die Erfindung bezieht sich auf Biosensoren, insbesondere auf dem Feldeffekt basierende Biosensoren, mit einer ggf. silanisierten signalaktiven Oberfläche, an die sensorisches Biomaterial mittels eines Crosslinkers gebunden ist.

10

Biosensoren, die für einen selektiven Nachweis bestimmter Analyten von enzymatischen Reaktionen Gebrauch machen, befinden sich bereits seit längerer Zeit in umfänglicher Entwicklung.

15

Grundsätzlich umfassen solche Sensoren eine Biomaterial, wie z.B. Enzym, enthaltende Oberflächenschicht, die dem zu überprüfenden Medium - insbesondere Flüssigkeit - ausgesetzt wird. Die unter Einwirkung des Analyten

20

vom Biomaterial gelieferte Information wird von einem Transduktor-Element umgewandelt und mittels ggf. integrierter elektronischer Signalverarbeitung schließlich in registrierbarer Form erhalten. Als Transduktoren sind insbesondere potentiometrische und amperometrische

25

Elektroden, wie Feldeffektstrukturen usw., im Gespräch.

Ein besonderes Problem solcher biomaterialhaltigen Sensoren ist die ausreichende, d.h. insbesondere bleibende, Fixierung bzw. Immobilisierung des Biomaterials an der Sensoroberfläche mit hoher flächenspezifischer Aktivität unter bestmöglicher Vermeidung einer Aktivitätsminderung durch die Art der Immobilisierung.

Als sensorisches Biomaterial kommen unterschiedliche Formen wie z.B. Enzyme, Mikroorganismen, Zellen, Antikörper, Antigene, Organellen oder Gewebeschnitte in Betracht. Vornehmlich finden sich in der einschlägigen Literatur jedoch Arbeiten über enzymhaltige Biosensoren, so daß im nachfolgenden vereinfachend enzymhaltige Biosensoren behandelt werden.

Als Immobilisierungstechniken sind die rein adsorptive Anlagerung, die Einbindung in Polymerschichten, die Vernetzung der Enzymmoleküle untereinander und die kovalente Anbindung der Enzyme an den Sensor bekannt. Für das kovalente Anbinden des Enzyms an die vorwiegend oxidische Sensorfläche wird diese üblicherweise silanisiert (meist mit einem Aminoalkylalkoxysilan) und anschließend mittels Glutaraldehyd für eine Ankopplung des Enzyms an die silanisierte Oberfläche gesorgt (siehe Anal.Chim.Acta 245 (1991) Seiten 89 - 99). Es wurde aber auch bereits eine Silanisierung von Si_3N_4 -Oberflächen mit anschließender kovalenter Anbindung mittels unterschiedlicher Crosslinker beschrieben

(siehe R.A. Williams et al., Biosensors & Bioelectronics 9 (1994) 159-67).

Daneben wurde auch die Verwendung von thiol-terminierten Silanen empfohlen mit nachfolgender Protein-Immobilisierung mittels eines heterobifunktionellen Crosslinkers wie z.B. mit N-Hydroxy-succinimidestern wie N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat (SPDS), N-Succinimidyl-p-jodacetylamido-benzoat (SIAB),
10 N-Succinimidyl-4-(p-male-imido-phenyl)-butyrat (SMPB) oder N-Succinimidyl-m-maleimido-benzoat-derivaten (MBS-Derivaten) (siehe S.K. Bathia et al. Anal.Biochem. 178 (1989) 408-13).

15 Eine direkte Anbindung von Enzymen und Mikroorganismen an eine durch Plasmapolymerisation erzeugte Si_3N_4 -Oberfläche wird in der JP 61 087 699 von 1986 beschrieben, wofür Glutaraldehyd oder Diisocyanat verwendet werden sollen.

20

Die Reaktivität der funktionellen Gruppen sowohl der homo- oder bifunktionellen Crosslinker als auch der betroffenen Bindungspartner läßt Oligomerbildung und Diversifizierungen der Kopplungen zu, so daß die exakte
25 kovalente Anbindung eines Biomoleküls über ein Crosslinker-Molekül an die signalaktive Oberfläche nicht gewährleistet erscheint.

Es wurde daher eine neue Art der Biomaterialimmobilisierung an Sensoroberflächen entwickelt, die zu eindeutigen Produkten mit hoher Sensitivität und Standzeit führt.

5

Die erfindungsgemäßen Biosensoren der eingangs genannten Art sind im wesentlichen dadurch gekennzeichnet, daß der Crosslinker durch einen heterobifunktionellen Crosslinker mit einer für die signalaktive Oberfläche spezifisch reaktiven Gruppe (A) einerseits und einer
10 photoaktivierbaren biomaterial-reaktiven Gruppe (B) andererseits gebildet wird.

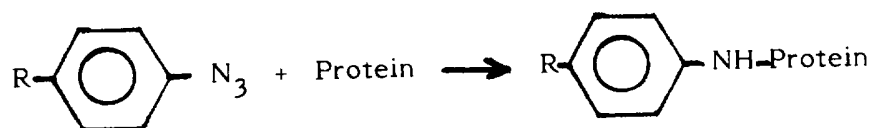
Mit einem solchen heterobifunktionellen Crosslinker,
15 dessen biomaterial-reaktive Gruppe erst durch Photoaktivierung zur Reaktion gebracht wird, kann eine eindeutige Kopplung des Biomaterials an der Oberfläche erreicht werden, indem zunächst unter Vermeidung der Photoaktivierung eine Umsetzung des Crosslinkers mit der
20 Oberfläche über eine entsprechend reaktive Gruppe vorgenommen wird. Nach Entfernung überschüssiger (nicht-gebundener) Crosslinker-Reste erfolgt dann die Umsetzung mit Biomaterial unter entsprechender Belichtung.

25 Als Oberflächen kommen insbesondere Halbleitermaterialien wie Germanium oder Silicium sowie oxidische Materialien wie Siliciumoxid, Aluminiumoxid, Tantaloxid u. dgl. in reaktiver Form oder silanisiert in Frage, wobei insbesondere Mercapto- oder Aminogruppen aufweisende

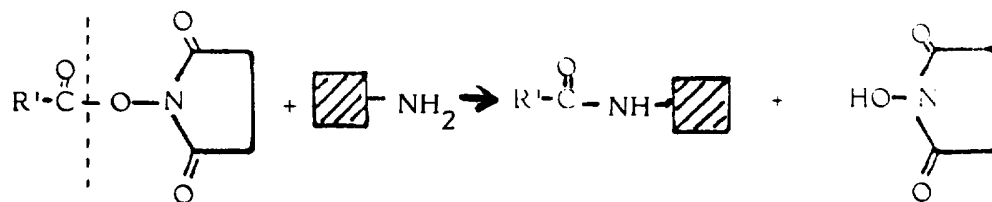
Silanisierungsschichten, z.B. auf Siliciumdioxid aufgebracht werden. Zweckmäßig ist auch eine Si_3N_4 -Oberflächenschicht mit reaktiven Gruppen, insbesondere NH_x -Gruppen, die für eine Kopplung insbesondere mit Aldehydgruppen, Estergruppen oder Imidoestergruppen zur Verfügung stehen.

Als photoaktivierbare, mit Biomaterial umsetzbare Gruppen eignen sich insbesondere alicyclisch oder aromatisch gebundene Nitro- oder Azidogruppen, die mit proteinischem Material unter Belichtung reagieren. Bekannt sind diesbezüglich Azidophenylreste oder Azidosalicylreste als Gruppe B enthaltende Crosslinker mit N-Hydroxy-succinimidoester-Gruppe als Gruppe A. Solche Crosslinker sind im Handel erhältlich (s. z.B. „immunoTechnology Catalog & Handbook“ der Fa. Pierce von 1992/3; E 34-46).

Die photoaktivierte Umsetzung einer Azidophenylverbindung mit Protein unter Lichteinstrahlung der Wellenlänge 265-275 nm erfolgt z.B. nach der Gleichung:



Als R eignen sich auf Grund ihrer Verfügbarkeit insbesondere Reste mit einer N-Hydroxy-succinimidoestergruppe als endständige Gruppe A, die mit NH_x -Gruppen in folgender Weise reagieren kann



5

Als mit SH-Gruppen reagierende Funktionen A des Crosslinkers sind Disulfidgruppen bekannt.

Die Bildung von Siliciumnitridoberflächen kann insbesondere durch Abscheidung in CVD Technik aus einem SiH_4/NH_3 -Gemisch erreicht werden (siehe A. Garde et al. in ESSDERC 1994 - 11.-15. Sept. 1994 Ed. C. Hill & P. Ashburn). Sie nehmen an Luft Sauerstoff auf und neigen bei Einwirkung von Feuchtigkeit zur Hydrolyse unter Bildung von Si-OH, Si-NH und Si-NH₂ Gruppen. Diese mit der Gruppe A des Crosslinkers reaktiven Gruppen können für die Ankupplung von Biomaterial an die Nitridoberfläche ausgenutzt werden.

Besonders zweckmäßig wird bei der Realisierung der erfindungsgemäßen Sensoren eine durch Behandlung mit verdünnter Flußsäure von Oxiden befreite Si_3N_4 -Oberfläche benutzt, mit deren NH₂-Gruppen oder auch NH-Gruppen ein Crosslinker reagiert, dessen photoaktivierbare Funktion B nachfolgend mit dem Protein zur Reaktion gebracht wird.

Als NH₂-reaktive Gruppen A des Crosslinkers bieten sich neben den bereits genannten auch Halogenid-, Epoxid-,

Imid- oder Isocyanatfunktionen an. Eine Vielzahl von Reaktionsmöglichkeiten mit Aminogruppen findet sich im übrigen z.B. in der US-PS 5 234 820.

5

Die nachfolgend im einzelnen angegebenen aminospezifischen Reaktionen laufen bei Raumtemperatur in neutralem bis leicht alkalischem pH-Wert ab. Erhöhung sowohl der Temperatur als auch des pH-Werts steigert die Reaktionsgeschwindigkeit, jedoch auch die Hydrolyserate des Crosslinkers. Der benutzte Puffer sollte weder Amine noch andere Verbindungen enthalten, mit denen die funktionellen Gruppen des Crosslinkers reagieren könnten.

15 N-Hydroxysuccinimidester reagiert insbesondere spezifisch mit primären Aminen. Unter Abspaltung von N-Hydroxysuccinimid entsteht eine Amidbindung zwischen dem primären Amin und der Restgruppe des verwendeten Esters. Sofern kein wasserlösliches Analogon verwendet
20 wird, muß ein Crosslinker, der diese funktionelle Gruppe besitzt zuerst in einer kleinen Menge eines organischen Lösungsmittels (z.B. DMSO) gelöst und erst dann auf die Endkonzentration in wäßrigem Puffer verdünnt werden. Die Ionenstärke des Puffers sollte nicht zu
25 hoch sein um Aussalzungseffekte zu vermeiden. Ein leicht alkalischer pH-Wert (7-9) garantiert, daß sich die primären Amine in unprotoniertem Zustand befinden.

Aldehyde verfügen über eine stark reduzierende Carbonylgruppe. Diese reagiert mit primären Aminen unter Wasserabspaltung.

- 5 Die Reaktion von primären Aminen mit Imidoestern läuft im pH-Bereich zwischen 8 und 9 ab. Der Ester wird dabei abgespalten und das primäre Amin bildet mit der Imidogruppe eine Guanidinoverbindung.
- 10 Besitzt der Crosslinker als funktionelles Ende A eine thiol-spezifische Gruppe wie Maleimid, aktiviertes Halogenid oder Pyridyldisulfid, so muß die anzukoppelnde Oberfläche eine freie Sulfhydrylgruppe (überlicherweise eine Mercaptoalkylgruppe eines Alkoxysilans) besitzen.
- 15 Um eine Oxidation dieser Gruppen zu vermeiden, muß der verwendete Puffer entgast werden.

Maleimid reagiert in leicht saurem bis neutralem Milieu (pH 6,5 - 7,5), während für Halogenide und Pyridylsulfid pH-Werte größer oder gleich 7 zu empfehlen sind.

20

Die Erfindung ist für die Anbindung von Biomaterial, insbesondere proteinischem Biomaterial, speziell unterschiedlichster Enzyme wie Hydrolasen, Oxidoreduktasen, Transferasen, Lyasen, Isomerasen und Ligasen bzw. Synthetasen, insbesondere Penicillinase, Urease, Glukoseoxidase, Urokinase, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase oder Lactatoxidase für Biosensoren brauch-

25

bar. Sie wurde speziell am Beispiel von Penicillinsensoren getestet, weshalb sich die nachfolgende Beschreibung auf solche bezieht. Dabei wird auf die angefügten Bezeichnungen Bezug genommen. Diese zeigen schematisch:

- 5 **Fig. 1** ein Sensorprinzip (Meßanordnung),
Fig. 2 eine typische Meßkurve für einen Konzentrationsbereich von 10^{-4} bis 10^{-1} Mol/l
Penicillin und
Fig. 3 die Kalibrierungskurve eines erfindungsgemäßen
10 Sensors.

Beispiel:

- 15 Auf p- bzw. p⁺-dotierten Siliciumwafern (1 mOhm.cm - 30 Ohm.cm) wurde zuerst eine elektrisch nicht leitende Schicht von Siliciumdioxid mit einer Dicke von 5 - 100 nm durch thermische Trockenoxidation zwischen 700 und 1200 °C (hier bei 1000 °C) in einem Diffusionsofen erzeugt.
20 Darauf wurde ebenfalls nicht leitendes Siliciumnitrid mit einer Dicke von 10-100 nm durch chemische Abscheidung in der Gasphase (PECVD) aufgebracht. Das Verhältnis SiH₄/NH₃ im Reaktionsgas betrug 2/1, die Substrattemperatur 200 - 500 °C (hier 300 °C) und der
25 Druck während der Abscheidung 1 - 3 Torr (hier 1,5 Torr). Es folgte ein Temperschnitt unter N₂-Atmosphäre (5-60 Minuten bei 700-1000 °C). Schließlich wurde die unpolierte Substratseite mit einem Ohmschen Kontakt (z.B. 10 - 1000 nm Al, Au) versehen. Das verwendete Ma-

terial wurde durch thermisches Aufdampfen im Vakuum bei einem Basisdruck $<10^{-3}$ mbar aufgebracht. Die Abscheidungsrate lag zwischen 0,1 und 10 nm/s. Anschließend wurde der Wafer in einem RTA-Ofen bei 150 - 500 °C
5 (hier 400 °C) in N₂-Atmosphäre getempert.

Unmittelbar vor Beginn des Enzymimmobilisierungsprozesses wurden die Wafer in Aceton, 2-Propanol und destilliertem Wasser im Ultraschallbad gereinigt und 10 - 60
10 s (hier 30 s) in verdünnter Flußsäure (1-10% HF) geätzt.

Bei Verwendung des heterobifunktionellen Crosslinkers ANB-NOS (N-5-Azido-2-nitrobenzoyloxysuccinimide) wurde
15 dieser zunächst in einer kleinen Menge DMSO gelöst und dann mit 0,2 M Triethanolaminpuffer (pH 5-9) auf eine Endkonzentration von 0,5-10 mM verdünnt. Diese Lösung wurde auf die Si₃N₄-Oberfläche aufgebracht und zwischen 5 und 40 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Bei
20 niedrigerer Temperatur muß länger inkubiert werden. Nichtan die Siliciumnitridoberfläche gebundene Moleküle wurden durch Abspülen mit Triethanolaminpuffer (TEA) entfernt. Danach wurde das Enzym (Penicillinase, Typ 1 aus Bacillus Cereus, Sigma P 0389) in einem Puffer, der
25 keine Aminogruppen enthält (z.B. TEA, insbesondere nicht TRIS- oder Glycinpuffer) gelöst (1000-5000 Units/ml) und auf die mit Crosslinker vorbehandelte Siliciumnitridoberfläche gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 - 240 min (hier 15 min) bei Temperaturen

zwischen 4 und 60 °C, insbesondere bei Raumtemperatur wurde die Anbindung der Enzymmoleküle an die noch freie funktionelle Gruppe des Crosslinkers durch Licht im Wellenlängenbereich von 320-350 nm induziert. Nach Abschluß des Immobilisierungsverfahrens wurden die ein-

5 satzfähigen Penicillinsensoren mit 0,1 M TRIS-Puffer (pH 7-8) und destilliertem Wasser gespült und mindestens 10 Minuten an Luft bzw. unter N₂- oder Inertgasatmosphäre getrocknet.

10

Mit den auf diese Weise hergestellten Feldeffektsensoren wurden Messungen zur Bestimmung der Penicillinkonzentration in wäßrigen Lösungen durchgeführt.

15 In **Fig. 1** ist die Meßanordnung schematisch dargestellt. Der erfindungsgemäß hergestellte Feldeffektsensor bestehend aus dem Siliciumsubstrat 1, der Isolatorschicht 2 (Siliciumdioxid und Siliciumnitrid), der Crosslinkerschicht 3 und der Enzymschicht (Penicillinschicht) 4

20 wurden in eine Meßzelle integriert. Die Meßzelle wurde mit einer wäßrigen Meßlösung befüllt, die Penicillin G in einer Konzentration zwischen 10⁻⁵ und 1 Mol/l enthielt. In die Meßlösung 6 taucht eine Referenzelektrode (z.B. Ag/AgCl) 7 ein. Die Potentiale werden über die

25 Referenzelektrode 7 und eine Kontaktelektrode 8 am Siliciumsubstrat abgegriffen.

In **Fig. 2** ist eine typische Meßkurve dargestellt, die im CONCAP (CONstant CAPacitance)-Modus im Konzentrati-

onsbereich zwischen 10^{-4} und 10^{-1} Mol/l Penicillin aufgenommen wurde. Penicillin G Natriumsalz (Sigma P 3032) wurde dazu in 10 mM TRIS-HCl Puffer, pH 7 gelöst. Mit steigender Penicillinkonzentration steigt die Konzentration der gebildeten Penicilloinsäure und somit die Konzentration der Wasserstoffionen in unmittelbarer Nähe der als pH-Transduktor wirkenden Siliciumnitridfläche. Dies hat eine Verschiebung des Potentials an der Grenzfläche Siliciumnitrid/Elektolyt zu positiveren bzw. negativeren Spannungswerten hin zur Folge. Die Auftragung über der Zeit erlaubt eine Beobachtung des konzentrationsabhängigen Potentialverlaufs der Enzymreaktion. Zu gekennzeichneten Zeiten fand der Wechsel der Meßlösungen statt.

15

Fig. 3 zeigt die aus **Fig. 2** ermittelte chemische Übertragungskennlinie. Sie stellt die Kalibrierungskurve des erfindungsgemäß hergestellten Feldeffektsensors dar. Angaben über die Sensitivität eines potentiometrischen Chemo- oder Biosensors werden im Hinblick auf den zugrundeliegenden Nernstschen Zusammenhang im linearen Bereich dieser Kurve, d.h. in dem Bereich, in dem ein logarithmischer Zusammenhang zwischen der Penicillinkonzentration und dem anliegenden Potential besteht, gemacht. Dieser Bereich liegt im erfindungsgemäß hergestellten Sensor zwischen pPenicillin G 2,3 und 3,3, was 0,5 und 5 mM entspricht. Die Empfindlichkeit beträgt 50 mV pro Dekade.

- Die exakte Lage des linearen Meßbereichs und die absolute Empfindlichkeit hängen wesentlich von der Wahl der Pufferzusammensetzung, dessen Konzentration, d.h. der Pufferkapazität und dem pH-Wert ab. Durch geeignete
- 5 Wahl dieser Parameter kann der für eine Messung erforderliche Meßbereich gezielt eingestellt werden. Beispielsweise liegt der lineare Meßbereich bei Verwendung von IMIDAZOL-Puffer (pH 7) zwischen 2 und 20 mM Penicillin, für HEPES-Puffer etwa zwischen 1 und 10 mM. Er-
- 10 höhung des pH-Werts verschiebt die Lage der linearen Bereiche der Kalibrationskurven zu höheren Penicillinkonzentrationen hin, Erniedrigung entsprechend zu niedrigeren.
- 15 Die erfindungsgemäß hergestellten Sensoren weisen eine hohe Langzeitstabilität von mehr als 250 Tagen auf. Die Empfindlichkeit liegt bei 50 mV pro Penicillindekade.
- Die Herstellung eines Feldeffekttransistors, der im Gatebereich einen gleichartigen Aufbau wie die in der Er-
- 20 findung beschriebene kapazitive Schichtstruktur aufweist, ist möglich.

Patentansprüche

1. Biosensor, insbesondere auf dem Feldeffekt basierender Biosensor, mit einer ggf. silanisierten signalaktiven Oberfläche, an die sensorisches Biomaterial mittels eines Crosslinkers gebunden ist, dadurch gekennzeichnet,
5 daß der Crosslinker durch einen heterobifunktionellen Crosslinker mit einer für die signalaktive Oberfläche spezifisch reaktiven Gruppe (A) einerseits und einer photoaktivierbaren biomaterial-reaktiven Gruppe (B) andererseits gebildet wird.
- 10 2. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Crosslinker an die signalaktive Oberfläche über eine Kopplungsreaktion seiner Gruppe (A) mit -OH, -SH oder -NH_x Gruppen der signalaktiven Oberfläche gebunden ist.
- 15 3. Biosensor nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Crosslinker an eine silanierte Oberfläche oder an eine Si₃N₄-Oberfläche mit reaktiven NH_x-Gruppen mittels einer Kopplungsreaktion seiner Gruppe (A) gebunden ist.
20
4. Biosensor nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Crosslinker an das Protein des Biomaterials über eine photoaktivierte Kopplungsreaktion einer Azido- oder Nitro-Gruppe (B) des
25 Crosslinkers gebunden ist.

5. Biosensor nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß die photoaktivierte Kopplungsreaktion mit einer aromatisch gebundenen
Nitro- oder Azido-Gruppe (B) erfolgt ist.

5

6. Biosensor nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Kopplung vermittelt eines Crosslinkers mit einer Azidophenyl-
Gruppe erfolgt ist.

10

7. Biosensor nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Crosslinker an die Oberfläche vermittelt einer Kopplungsreaktion
einer Aldehyd-, Ester- oder Imidoester-Gruppe (A) gebunden ist

15

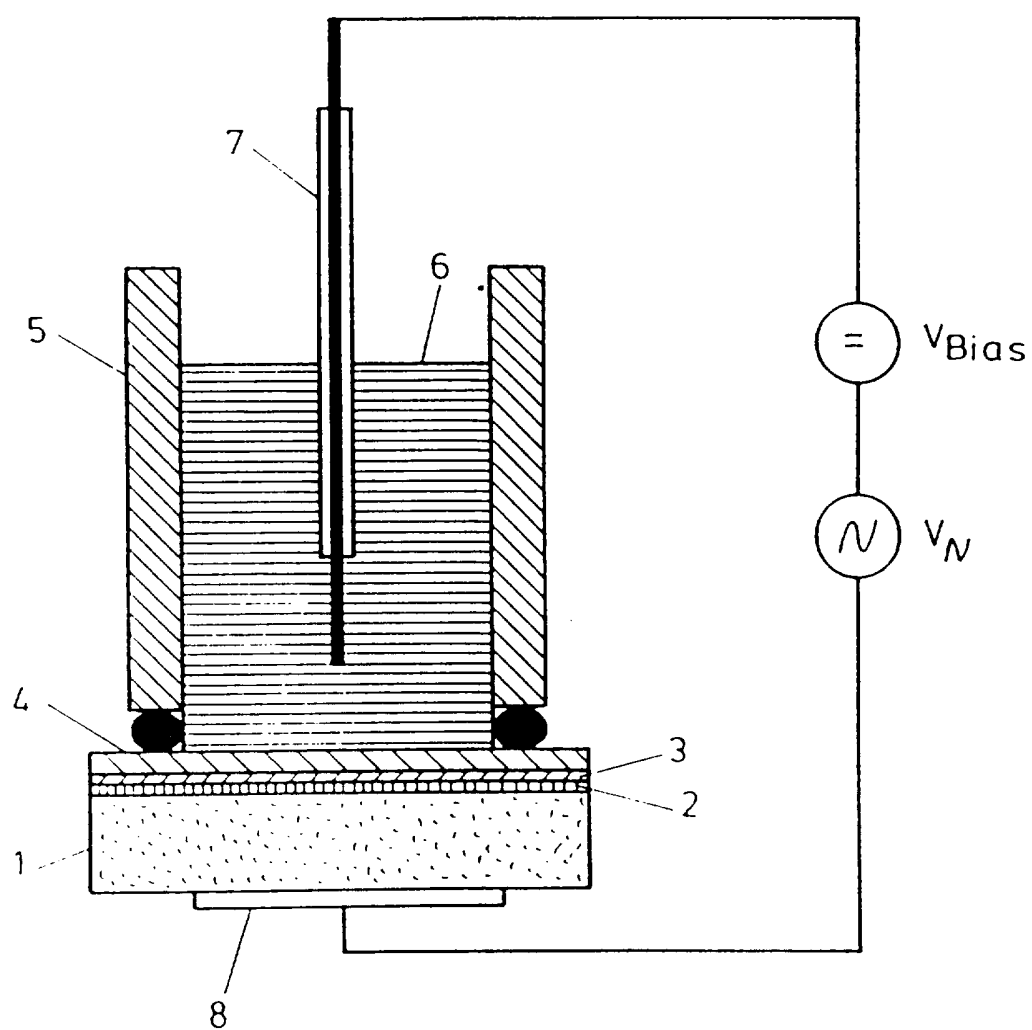
8. Biosensor nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Crosslinker an die Oberfläche vermittelt einer Kopplungsreaktion
einer N-Hydroxy-succinimidester-Gruppe (A) gebunden ist.

20

9. Biosensor nach einem der vorangehenden Ansprüche,
gekennzeichnet
durch eine signalaktive Oberfläche mit einer 10 - 1000 nm dicken,
durch CVD aus einer SiH_4/NH_3 -Mischung auf einer SiO_2 -Fläche abgeschiedenen
 Si_3N_4 -Oberflächenschicht.

25

Fig. 1



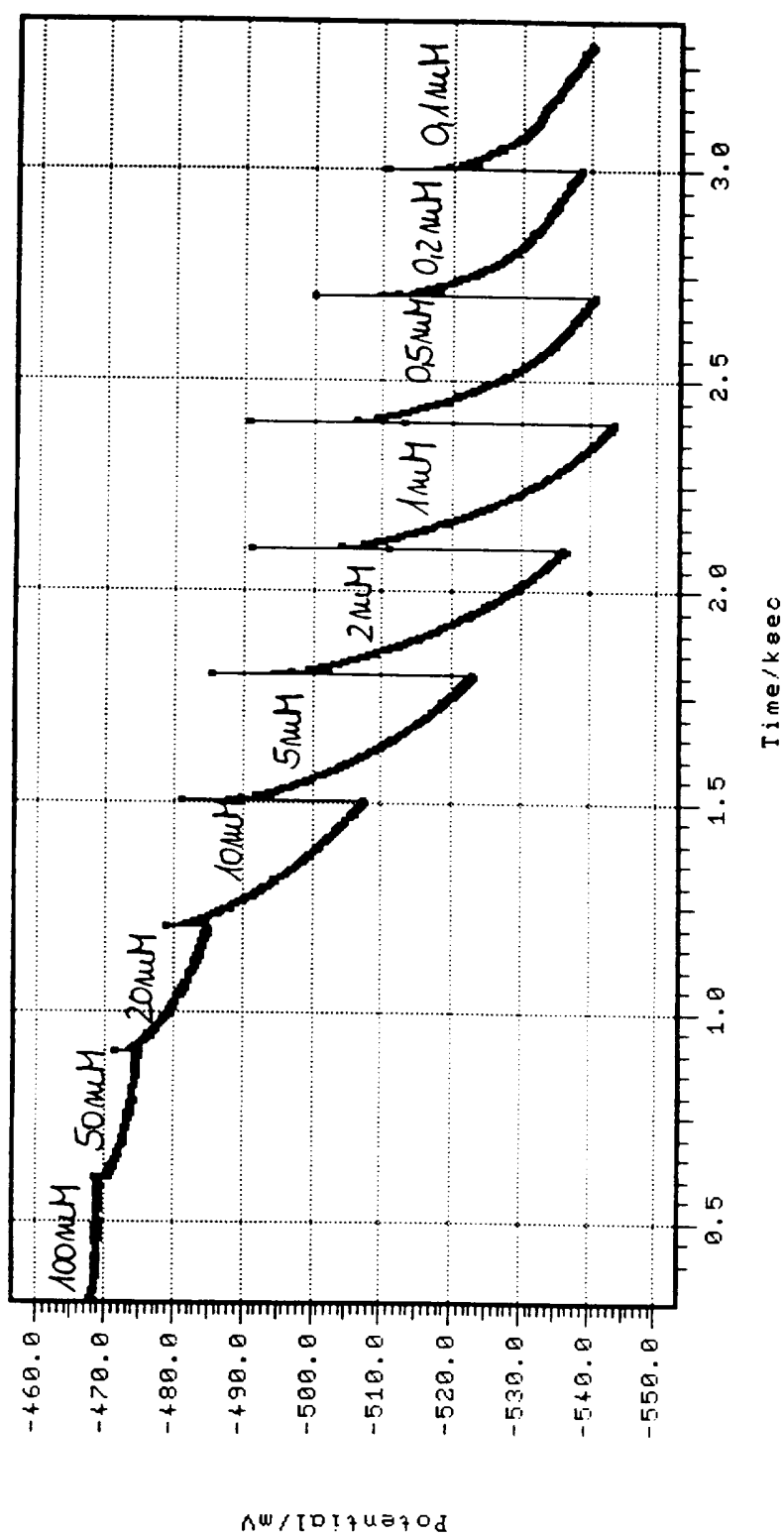


Fig.2

Potential (mV)

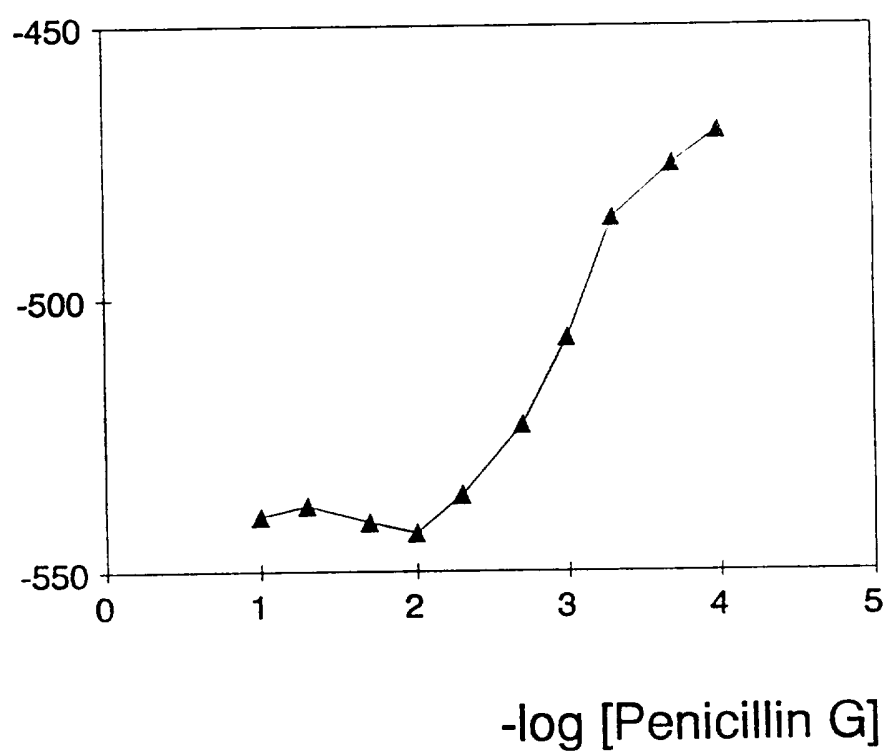


Fig. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 95/01371

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 G01N33/543 G01N27/414 C12Q1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 G01N C12Q

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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 127 438 (NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 5 December 1984	1-6
A	see page 6 - page 12; examples 1-5	8,9

P,A	US,A,5 405 766 (HER MAJESTY THE QUEEN IN RIGHT OF CANADA) 11 April 1995	8
	see figures 1-B	

X	WO,A,88 08875 (THE WASHINGTON TECHNOLOGY CENTER) 17 November 1988	1,2,4-6
	see page 4, line 1 - page 4, line 15	

P,A	US,A,5 412 083 (NORTHEASTERN UNIVERSITY) 2 May 1995	1-9
	see the whole document	

	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 March 1996

Date of mailing of the international search report

22.03.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hoekstra, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 95/01371

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF PHYSICS E SCIENTIFIC INSTRUMENTS., vol. 18, no. 9, September 1985 BRISTOL GB, pages 736-749, C. NYLANDER 'Chemical and biological sensors' see page 741, left column, paragraph 2.3 - page 742, right column, paragraph 2.4 -----	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 95/01371

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-127438	05-12-84	CA-A- 1229883	01-12-87
		DE-A- 3468146	28-01-88
		GB-A,B 2141544	19-12-84
		JP-B- 6050316	29-06-94
		JP-A- 59225343	18-12-84
		US-A- 4562157	31-12-85
US-A-5405766	11-04-95	CA-A- 2064683	27-09-93
WO-A-8808875	17-11-88	CA-A- 1316212	13-04-93
US-A-5412083	02-05-95	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationaler Aktenzeichen

PCT/DE 95/01371

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 6 G01N33/543 G01N27/414 C12Q1/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G01N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP,A,0 127 438 (NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 5.Dezember 1984	1-6
A	siehe Seite 6 - Seite 12; Beispiele 1-5	8,9

P,A	US,A,5 405 766 (HER MAJESTY THE QUEEN IN RIGHT OF CANADA) 11.April 1995	8
	siehe Abbildungen 1-B	

X	WO,A,88 08875 (THE WASHINGTON TECHNOLOGY CENTER) 17.November 1988	1,2,4-6
	siehe Seite 4, Zeile 1 - Seite 4, Zeile 15	

P,A	US,A,5 412 083 (NORTHEASTERN UNIVERSITY) 2.Mai 1995	1-9
	siehe das ganze Dokument	

	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher 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

1.März 1996

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

22.03.96

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hoekstra, S

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Patentzeichen

PCT/DE 95/01371

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	JOURNAL OF PHYSICS E SCIENTIFIC INSTRUMENTS., Bd. 18, Nr. 9, September 1985 BRISTOL GB, Seiten 736-749, C. NYLANDER 'Chemical and biological sensors' siehe Seite 741, linke Spalte, Absatz 2.3 - Seite 742, rechte Spalte, Absatz 2.4 -----	1-9

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die selben Patentfamilie gehören

Internationales Patentzeichen

PCT/DE 95/01371

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-127438	05-12-84	CA-A- 1229883 DE-A- 3468146 GB-A,B 2141544 JP-B- 6050316 JP-A- 59225343 US-A- 4562157	01-12-87 28-01-88 19-12-84 29-06-94 18-12-84 31-12-85
US-A-5405766	11-04-95	CA-A- 2064683	27-09-93
WO-A-8808875	17-11-88	CA-A- 1316212	13-04-93
US-A-5412083	02-05-95	KEINE	