



(10) **DE 10 2017 114 349 A1** 2019.01.03

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2017 114 349.1**
(22) Anmeldetag: **28.06.2017**
(43) Offenlegungstag: **03.01.2019**

(51) Int Cl.: **G01N 33/53** (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)
G01N 27/327 (2006.01)
G01N 27/447 (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)

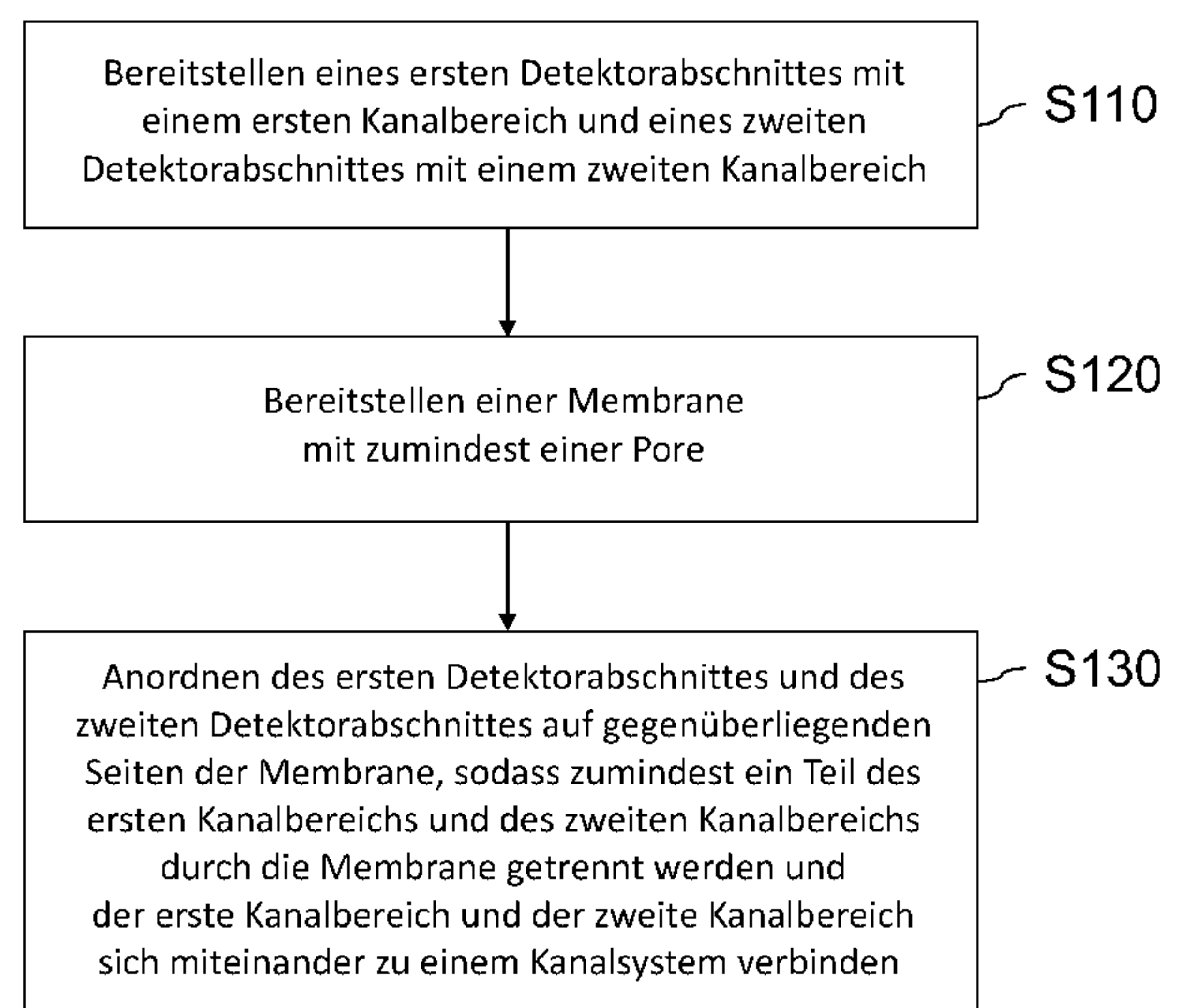
(71) Anmelder: Technische Universität Darmstadt, 64289 Darmstadt, DE	(72) Erfinder: El Khoury, Mario, 64285 Darmstadt, DE; Ensinger, Wolfgang, 64839 Münster, DE; Göringer, H. Ulrich, 64380 Roßdorf, DE; Quednau, Sebastian, 64297 Darmstadt, DE; Schlaak, Helmut F., 64372 Ober-Ramstadt, DE; Duznovic, Ivana, 55122 Mainz, DE
(74) Vertreter: Spies & Behrndt Patentanwälte PartG mbB, 80687 München, DE	(56) Ermittelter Stand der Technik: siehe Folgeseiten

Rechercheantrag gemäß § 43 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.

(54) Bezeichnung: **Detektionssystem und Verfahren zu dessen Herstellung**

(57) Zusammenfassung: Es ist ein Verfahren zur Herstellung eines Detektionssystems für Biomoleküle (114) in einem Medium (50) offenbart. Das Verfahren umfasst: Bereitstellen (S110) eines ersten Detektorabschnittes (210) mit einem ersten Kanalbereich (215) und eines zweiten Detektorabschnittes (220) mit einem zweiten Kanalbereich (225); Bereitstellen (S120) einer Membran (120) mit zumindest einer Pore (110); und Anordnen (S130) des ersten Detektorabschnittes (210) und des zweiten Detektorabschnittes (220) auf gegenüberliegenden Seiten der Membran (120), sodass zumindest ein Teil des ersten Kanalbereichs (215) und des zweiten Kanalbereichs (225) durch die Membran (120) getrennt werden und der erste Kanalbereich (215) und der zweite Kanalbereich (225) sich miteinander zu einem Kanalsystem verbinden, um einen Flusspfad (130) für das Medium (50) durch die zumindest eine Pore (110) der Membran (120) zu bilden. Entlang des Flusspfades (130) sind durch die Membran Biorezeptoren (112) an der Membran (120) gebunden und/oder gekoppelt, um eine Konzentration der Biomoleküle (114) in dem Medium (50) durch eine Messung des Flusses entlang der Flusspfades (130) zu bestimmen.



(56) Ermittelter Stand der Technik:

DE 10 2011 112 638 A1
WO 2012/ 104 429 A1

2017-12-04]. Bibliographieinformationen ermittelt
über: [http://www.sciencedirect.com/science/
article/pii/S095656631000432X](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095656631000432X) [abgerufen am
2017-12-04].

ALI, Mubarak ; NASIR, Saima ; ENSINGER, Wolfgang: Bioconjugation-induced ionic current rectification in aptamer-modified single cylindrical nanopores. In: Chemical Communications: ChemComm. 2015, Bd. 51, H. 16, S. 3454-3457. ISSN 0009-241X (p); 1364-548X (e). DOI: 10.1039/C5CC00257E. URL: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2015/cc/c5cc00257e> [abgerufen am 2017-12-04]. Bibliographieinformationen ermittelt über: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/cc/c5cc00257e#!divAbstract> [abgerufen am 2017-12-04].

DUAN, Minlan [u.a.]: Selection and characterization of DNA aptamer for metastatic prostate cancer recognition and tissue imaging. In: OncoTarget. 2016, Bd. 7, H. 24, S. 36436-36446. ISSN 1949-2553 (e). DOI: 10.18632/oncotarget.9262. URL: <http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path%5B%5D=9262&path%5B%5D=28499> [abgerufen am 2017-12-04]. Bibliographieinformationen ermittelt über: <http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path%5B%5D=9262> [abgerufen am 2017-12-04].

EL KHOURY, Mario, et al. Integration of Nanochannels for Lab-on-Chip-Systems. In: Micro-Nano-Integration; 6. GMM-Workshop; Proceedings of. VDE, 2016. S. 1-4.

JEONG, Sujin [u.a.]: Selection of RNA aptamers specific to active prostate-specific antigen. In: Biotechnology Letters. 2009, Bd. 32, H. 3, S. 379-385. ISSN 0141-5492 (p); 1573-6776 (e). DOI: 10.1007/s10529-009-0168-1. URL: https://www.researchgate.net/profile/Seong-Wook_Lee/publication/40036336_Selection_of_RNA_aptamers_specific_to_active_prostate-specific_antigen/links/0912f5020c0ccc7a34000000/Selection-of-RNA-aptamers-specific-to-active-prostate-specific-antigen.pdf [abgerufen am 2017-12-04]. Bibliographieinformationen ermittelt über: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10529-009-0168-1> [abgerufen am 2017-12-04].

SAVORY, Nasa [u.a.]: Selection of DNA aptamer against prostate specific antigen using a genetic algorithm and application to sensing. In: Biosensors and Bioelectronics. 2010, Bd. 26, H. 4, S. 1386-1391. ISSN 0956-5663 (p); 1873-4235 (e). DOI: 10.1016/j.bios.2010.07.057. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095656631000432X/pdf?md5=03193a193a85729172448b6df5e59663&pid=1-s2.0-S095656631000432X-main.pdf> [abgerufen am

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Detektionssystem und ein Verfahren zu dessen Herstellung und insbesondere auf die Detektion von (Bio-) Molekülen (Analyte, Liganden, etc.) in biotischen und abiotischen Systemen.

Hintergrund

[0002] Trotz enormer biomedizinischer Forschungsanstrengungen sind Krebserkrankungen nach wie vor mit hohen Sterblichkeitsraten behaftet. Zudem stellt jede Krebsart eine therapeutische und diagnostische Herausforderung an die behandelnden Ärzte dar. Verlässliche Voraussagen, inwieweit sich der Verlauf einer Krankheit im Kontext der angewendeten Therapiemaßnahmen entwickeln wird, sind leider immer noch mit hohen Fehlerquoten behaftet. In diesem Kontext kommt frühdiagnostischen Messmethoden eine große Bedeutung zu.

[0003] Prostatakrebs (PCa) ist beispielsweise die in der westlichen Welt bei Männern am häufigsten vorkommende Krebserkrankung. Allein in Deutschland werden pro Jahr etwa 63.000 Neuerkrankungen diagnostiziert. Eine schnelle Vor-Ort-Diagnostik, die präzise zu einem aussagekräftigen Ergebnis kommt, sollte die Heilungschancen für PCa-Patienten deutlich erhöhen und dadurch in vielen Fällen lebensrettend sein. Zur frühzeitigen Detektion von PCa kann die Konzentration des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) gemessen werden. Hierbei handelt es sich um ein glykosyliertes Eiweiß, dass im Blutserum detektiert werden kann. Der Nachweis von PSA greift im Routinebetrieb vornehmlich auf Antikörper-basierte Detektionsverfahren zurück, die neben hohen Kosten häufig auch falsch-positive Resultate produzieren. Dieser Umstand ist Ausgangspunkt für die Suche nach alternativen Messverfahren zur Detektion von PSA.

[0004] Ein Ansatz basiert auf Nukleinsäure-Biopolymere wie Aptamere, die in der Lage sind, PSA spezifisch zu erkennen und hochaffin zu binden. Sie können in einem handlichen Sensorsystem eingesetzt werden, um die PSA-Konzentration im Blut zu messen und somit ein mögliches Prostatakarzinom zu detektieren. Werden solche Aptamere an die Innenwand nanoskaliger Poren/Kanäle einer Filterfolie fixiert, kann ein einfacher Sensor zur PSA-Detektion hergestellt werden.

[0005] Ein Beispiel für diese Art von Detektion findet sich in der Veröffentlichung: Ali M, Nasir S, Ensinger W.: „Bioconjugation-induced ionic current rectification in aptamer-modified single cylindrical Pores“; Chem Commun 2015, 51: 3454-3459. Hierbei wird eine Potentialdifferenz zwischen beiden Seiten einer Kunststoffolie angelegt, um so einen messbaren Ionenstrom zu erzeugen. Beinhaltet das Blutserum die zu detektierende Biomoleküle, so werden diese Moleküle an den Aptameren in den Poren gebunden, was zu einer Verengung der Querschnittsfläche der Poren führt. Dadurch erhöht sich der elektrische Widerstand der einzelnen Poren in Abhängigkeit von einer Konzentration der Aptamer-Komplexe. Folglich lässt sich über die Abnahme des gemessenen Ionenstroms direkt auf die Konzentration des Biomoleküls schließen.

[0006] Bei der Herstellung dieser Sensoren werden an einer Multiporen-Folie - insbesondere im Bereich der Poren - die genutzten Aptameren aufgebracht. Dieser Schritt wird als Funktionalisieren bezeichnet, da die resultierende Folie dadurch für eine bestimmte Funktion (Detektion eines Biomoleküls) vorbestimmt ist. Bei dem bisher genutzten Herstellungsverfahren wurde die Folie zunächst funktionalisiert, dann zurückgeschnitten und schließlich in einem gewünschten Detektionsbereich angeordnet. Dieses sogenannte „pick-and-place“-Verfahren ist aufwendig und ist nur bedingt automatisierbar. Funktionalisierte Membranen können während des Integrationsprozesses (Einbaus) beschädigt werden und dadurch ihre Funktionalität wieder verlieren. Daher bietet die Funktionalisierung der geätzten Membran nach deren Integration Vorteile.

[0007] Daher besteht ein Bedarf nach einem verbesserten Herstellungsverfahren für diese Sensoren. Außerdem besteht ein Bedarf an verbesserten Aptameren, die hoch-sensitiv auf das PSA sind und somit die Resultate deutlich verbessern.

Zusammenfassung

[0008] Zumindest ein Teil der obengenannten Probleme wird durch ein Verfahren zur Herstellung eines Detektionssystems nach Anspruch 1, ein Detektionssystem nach Anspruch 10 und dessen Verwendung nach Anspruch 15 gelöst. Die abhängigen Ansprüche definieren weitere vorteilhafte Ausführungsformen der Gegenstände der unabhängigen Ansprüche.

[0009] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung eines Detektionssystems für Biomoleküle in einem Medium. Das Verfahren umfasst die Schritte:

- Bereitstellen eines ersten Detektorabschnittes mit einem ersten Kanalbereich und eines zweiten Detektorabschnittes mit einem zweiten Kanalbereich;
- Bereitstellen einer Membran mit zumindest einer Pore; und
- Anordnen des ersten Detektorabschnittes und des zweiten Detektorabschnittes auf gegenüberliegenden Seiten der Membranen, sodass zumindest ein Teil des ersten Kanalbereichs und des zweiten Kanalbereichs durch die Membranen getrennt werden und der erste Kanalbereich und der zweite Kanalbereich sich miteinander zu einem Kanalsystem verbinden, um einen Flusspfad für das Medium durch die zumindest eine Pore der Membran zu bilden,

wobei entlang des Flusspfades durch die Membranen Biorezeptoren an der Membran (z.B. im Porenbereich) ausgebildet sind, um eine Konzentration der Biomoleküle in dem Medium durch eine Messung des Flusses entlang der Flusspfades bestimmen zu können.

[0010] Der Begriff „Biomolekül“ soll im Rahmen der vorliegenden Erfindung breit ausgelegt werden und insbesondere Liganden, Analyte, etc. umfassen. Das Medium kann jede beliebige Körperflüssigkeit sein (insbesondere Blut). Das System kann aber auch für die Wasseranalytik, Lebensmittelindustrie, Pharmaindustrie etc. verwendet werden, um bestimmte Stoffe zu detektieren. Die Membran kann ein- oder mehrteilig ausgebildet sein, sodass unter dem Begriff „Membran“ ebenfalls verschiedene Membranen umfasst sein sollen. Ebenso soll der Begriff „Pore“ breit ausgelegt werden und sich auf eine beliebige Öffnung oder einen beliebigen Kanal beziehen, solange die Öffnung/Kanal den Fluss erlaubt. Insbesondere soll die Pore nicht auf ein bestimmtes Aspektverhältnis (Länge-zu-Durchmesser) eingeschränkt werden.

[0011] Optional umfasst der Schritt des Anordnens Folgendes: Anordnen der Membran auf dem ersten Detektorabschnitt oder auf dem zweiten Detektorabschnitt; und danach Entfernen eines Teiles der Membran außerhalb eines Detektionsbereiches. Beispielsweise kann die Membran zunächst vollflächig auf einem der Detektorabschnitte aufgebracht werden und anschließend so strukturiert werden (z.B. zurechtgeschnitten werden), dass sie nur in einem Detektionsbereich zwischen dem ersten Kanalbereich und dem zweiten Kanalbereich angeordnet ist.

[0012] Optional umfasst das Verfahren weiter ein Ausbilden einer Klebeschicht, die in Kontakt zu der Membran steht. Die Klebeschicht kann derart in Kontakt zu der Membran gebracht werden, dass zumindest einige der Poren durch die Klebeschicht verschlossen werden, um dadurch eine Sensitivität der Membran durch eine Verringerung einer Anzahl von Poren für die Flussmessung des Mediums zu erhöhen. Beispielsweise kann die Klebeschicht genutzt werden, um gezielt einige Poren zu verschließen (zu zukleben).

[0013] Optional umfasst das Verfahren weiter ein Anbringen der Biorezeptoren an der Membran durch eine Funktionalisierung, wobei das Funktionalisieren vor oder nach dem Anordnen des ersten Detektorabschnittes und des zweiten Detektorabschnittes auf gegenüberliegenden Seiten der Membran ausgeführt wird. Es versteht sich, dass das Anbringen ebenfalls ein Ankoppeln und/oder Anbinden der Rezeptoren umfassen soll. Das Funktionalisieren kann beispielsweise zumindest die folgenden Funktionalisierungsschritte umfassen: Aktivieren einer Carboxy-Endgruppe, um ein Amin-reaktives Intermediat zu erhalten; und Amidisieren des Amin-reaktiven Intermediats, um gewünschte Biorezeptoren an der Membran auszubilden.

[0014] Dabei kann das Funktionalisieren in allen Bereichen der Membran gleich erfolgen. Es ist jedoch ebenfalls möglich, dass beim Funktionalisieren in verschiedenen Bereichen der Membran verschiedene Biorezeptoren in den Poren ausgebildet (oder angekoppelt oder angebunden) werden, sodass die Membran in verschiedenen Bereichen für verschiedene Biomoleküle sensitiv wird. Außerdem können die verschiedenen Funktionalisierungsschritte an einer einzigen Membran ausgeführt werden. Es ist jedoch ebenfalls möglich, dass die Membran mehrere Teile aufweist bzw. dass mehrere Membranen zur Detektion genutzt werden, die verschiedenen funktionalisiert werden sollen.

[0015] Optional umfasst das Verfahren weiter ein Laminieren der Membran auf den ersten Detektorabschnitt und/oder auf den zweiten Detektorabschnitt.

[0016] Der erste Detektorabschnitt und der zweite Detektorabschnitt können an den gegenüberliegenden Seiten der Membran durch eine thermische Behandlung bei einer Temperatur von zumindest 50°C oder zumindest

65°C miteinander verbunden werden. Dadurch kann eine ausreichende Dichtheit erreicht werden. Weiterhin ist es möglich, eine dichte Verbindung auch ohne eine Temperaturbehandlung zu erhalten, z.B. durch Verkleben.

[0017] Optional kann die Konzentration der Biomoleküle in dem Medium durch zumindest eine der folgenden Messungen bestimmt wird: (i) eine Flussmessung durch die zumindest eine Pore, (ii) eine Impedanzmessung, und (iii) eine elektrokinetische Messung, insbesondere eine Elektrophorese- oder eine Elektroosmose-Messung. Im einfachsten Fall kann eine elektrische Widerstandsmessung durchgeführt werden, die proportional zu dem Fluss des Mediums durch die Pore ist. Auf diese Weise kann eine Stromstärke und somit die Anzahl von Ladungsträgern (d.h. Ionen in Medium) gemessen werden, die pro Zeiteinheit die Pore passieren.

[0018] Optional umfassen die Biomoleküle ein Prostata-spezifisches Antigen (PSA) und die Biorezeptoren Aptamere. Die genutzten Aptamere können insbesondere eine der folgenden Aptamere sein:

- a) $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-CCGUCAGGUCACGGCAGCGAAGCUCUAGGCGCG GCCAGUUGC-OH}$;
- b) $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-TTTTTAATTAAAGCTCGCCATCAAATAGCTTT-OH}$;
- c) $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-ACGCTCGGATGCCACTACAGGTTGGGGTCGGGCATGCGTC CGGAGAAGGGCAAACGA-GAGGTCACCAGCACGTCCATGAG-OH}$.

[0019] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf ein Detektionssystem für Biomoleküle in einem Medium. Das Detektionssystem umfasst Folgendes: einen ersten Kanalbereich und einen zweiten Kanalbereich, in die das Medium einbringbar ist, und eine Membran, die zumindest eine Pore aufweist und den ersten Kanalbereich von dem zweiten Kanalbereich trennt. Außerdem ist eine erste Elektrode und eine zweite Elektrode entlang einer Flußrichtung des Mediums auf gegenüberliegenden Seiten der Membran ausgebildet. An oder in der Pore sind Biorezeptoren ausgebildet oder angekoppelt oder angebunden, die zumindest eines der folgenden Aptamere umfassen:

- (i) $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-CCGUCAGGUCACGGCAGCGAAGCUCUAGGCGCG GCCAGUUGC-OH}$;
- (ii) $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-TTTTTAATTAAAGCTCGCCATCAAATAGCTTT-OH}$;
- (iii) $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-ACGCTCGGATGCCACTACAGGTTGGGGTCGG GCATGCGTCCGGAGAAGGGCAAA-CGAGAGGTCAC CAGCACGTCCATGAG-OH}$.

[0020] Damit kann eine PSA-Konzentration im Medium über eine Widerstandsmessung entlang eines Flusspfades für das Medium zwischen der ersten Elektrode und der zweiten Elektrode gemessen werden. Im einfachsten Fall kann ein elektrischer Widerstand eines elektrolytischen Flusses (durch Anlegen einer Spannung zwischen den Elektroden) gemessen werden.

[0021] Die zumindest eine Pore in der Membran kann ein konisch zulaufendes oder ein zylindrisches Profil entlang des Flusspfades aufweisen.

[0022] Optional umfasst die Membran in verschiedenen Bereichen verschiedene Rezeptoren oder verschiedene Aptamere, um eine simultane Detektion verschiedener Biomoleküle zu ermöglichen.

[0023] Optional weist der erste Kanalbereich und/oder der zweite Kanalbereich senkrecht zum Flusspfad eine maximale Kanalbreite von 50 µm oder höchstens 10 µm auf. Dadurch wird es möglich, über eine Benetzung der Membran effektiv eine Ein-Porenmembran zu erreichen (z.B. wenn die Porendichte in der Membran entsprechend gewählt ist), wodurch sich die Sensitivität steigert. Die Kanalbreite kann aber auch bis zu 1 mm betragen. Eine Untergrenze liegt bei den verwendeten Materialien typischerweise bei 1 µm, sie könnte aber geringer werden sobald Silizium oder andere Materialien benutzt werden.

[0024] Optional umfasst das Detektionssystem weiter einen Elektrolyt-Einlass bei der zweiten Elektrode und einen Analyt-Einlass bei der ersten Elektrode, um das Medium in dem Analyt-Einlass und einen Elektrolyten in den Elektrolyt-Einlass einbringen zu können. Dadurch kann eine für die Detektion erforderliche Menge des Mediums verringert werden.

[0025] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf eine Verwendung oder ein Verfahren zur Verwendung eines der beschriebenen Detektionssysteme zur Detektion von Biomolekülen in einem Medium, wobei die Detektion durch ein Messen einer elektrischen Größe, die von einem elektrischen Widerstand zwischen der Elektrode und der zweiten Elektrode abhängt, durchgeführt wird.

[0026] Ausführungsbeispiele beziehen somit insbesondere auf einen elektrochemischen Sensor zur Detektion von biotischen und abiotischen Liganden (Biomoleküle). Dazu zählen unter anderem jede molekulare, organische und anorganische Verbindung jedweder Art, Umweltgifte, Agrarchemikalien, Hormone, Proteine, Antibiotika, Neurotoxine. Ebenso gehören dazu Bakterien, Viren und Parasiten, die Bestandteil von Organismengruppen sein können.

[0027] Ein Vorteil von Ausführungsbeispielen liegt darin, dass damit eine kostengünstige Alternative gegenüber dem Stand der Technik erreicht werden kann, die eine höhere Selektivität und Sensitivität aufweist. Die Erfindung ermöglicht weiter die Integration von Nanosensoren in einem mikrofluidischen System, welches als ein portables mobiles Analyt-System für diverse Anwendungen, wie sie beispielsweise oben genannt wurden, verwendet werden kann. Wegen der breiten Einsatzmöglichkeiten der Ausführungsbeispiele kann die vorliegende Erfindung insbesondere auch für Anwendungen genutzt werden, die bisher nicht oder apparativ nur sehr aufwendig analysiert werden konnten.

[0028] Außerdem besitzt die Funktionalisierung eine hohe Selektivität, so dass nur das PSA an der Pore angekoppelt/angebunden wird.

[0029] Insbesondere ermöglichen Ausführungsbeispiele, die Frühdiagnose von Prostatakrebs (PCa) signifikant zu vereinfachen und damit zu erleichtern.

Figurenliste

[0030] Die Ausführungsbeispiele der vorliegenden Erfindung werden besser verstanden anhand der folgenden detaillierten Beschreibung und den beiliegenden Zeichnungen der unterschiedlichen Ausführungsbeispiele, die jedoch nicht so verstanden werden sollten, dass sie die Offenbarung auf die spezifischen Ausführungsformen einschränken, sondern lediglich der Erklärung und dem Verständnis dienen.

Fig. 1 zeigt ein Flussdiagramm für ein Verfahren zur Herstellung eines Detektionssystems für Biomoleküle gemäß einem Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung.

Fig. 2 veranschaulicht das zugrundeliegende Messprinzip unter Nutzung einer Membran mit zumindest einer Pore.

Fig. 3A,B zeigen ein beispielhaftes Detektionssystem und die Messwerterfassung basierend auf dem Messprinzip aus der **Fig. 2**.

Fig. 4 veranschaulicht eine beispielhafte Funktionalisierung der Membran.

Fig. 5 zeigt ein Detektionssystem gemäß einem Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung.

Fig. 6A-M zeigen einen Prozessablauf zur Herstellung des Detektionssystems gemäß Ausführungsbeispielen.

Fig. 7A,B zeigen die mit dem Prozessablauf nach **Fig. 6** fertiggestellten Detektionssysteme nach weiteren Ausführungsbeispielen der vorliegenden Erfindung.

Detaillierte Beschreibung

[0031] **Fig. 1** zeigt ein Flussdiagramm für ein Verfahren zur Herstellung eines Detektionssystems für Biomoleküle gemäß einem Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung. Das Verfahren umfasst:

- Bereitstellen **S110** eines ersten Detektorabschnittes mit einem ersten Kanalbereich und eines zweiten Detektorabschnittes mit einem zweiten Kanalbereich;
- Bereitstellen **S120** einer Membran mit zumindest einer Pore; und
- Anordnen **S130** des ersten Detektorabschnittes und des zweiten Detektorabschnittes auf gegenüberliegenden Seiten der Membran, sodass zumindest ein Teil des ersten Kanalbereichs und des zweiten Kanalbereichs durch die Membran getrennt werden und der erste Kanalbereich und der zweite Kanalbereich sich miteinander zu einem Kanalsystem verbinden, um einen Flusspfad für das Medium durch die zumindest eine Pore der Membrane zu bilden.

[0032] Es versteht sich, dass diese Aufzählung keine Reihenfolge impliziert. Die genannten Herstellungsschritte können separat unabhängig voneinander bzw. parallel durchgeführt werden. Entlang des Flusspfades sind

durch die Membran-Biorezeptoren an der Membran ausgebildet, um eine Konzentration der Biomoleküle in dem Medium durch eine Messung des Flusses (z.B. des Widerstandes) entlang der Flusspfades zu bestimmen.

[0033] Fig. 2 veranschaulicht das zugrundeliegende Messprinzip unter Nutzung der Membran **120** mit der zumindest einen Pore **110**. Diese Pore **110** ist z.B. ein Nanokanal mit einem (maximalen) Durchmesser von weniger als 1 μm (kann beispielsweise nur einigen Nanometer oder weniger als 100 nm sein). Die Membran **120** ist beispielsweise eine Einzelpore-Kunststoffolie.

[0034] Auf der linken Seite der Fig. 2 ist eine Querschnittsdarstellung durch die Pore **110** gezeigt, wobei innerhalb der Pore **110** Biorezeptoren **112** angebracht oder ausgebildet sind. Diese Biorezeptoren **112** sind derart beschaffen, dass die zu detektierenden Moleküle **114** (Biomolekül oder Analyt-Moleküle) beim Ausbilden eines Ionenstroms **130** durch die Membran **120** daran haften bleiben oder daran gebunden werden (siehe rechte Seite auf der Fig. 2). Der Ionenstrom **130** kann beispielsweise durch ein elektrisches Feld erzeugt werden, das auf geladenen Ionen in dem Ionenstrom **130** wirkt. Durch das Ankoppeln und/oder Anbinden der Biomoleküle **114** an den Biorezeptoren **112** ändert sich der Widerstand für den Ionenstrom **130** durch die Pore **110**. Diese Änderung kann über eine elektrische Messung gemessen werden.

[0035] Fig. 3A zeigt ein beispielhaftes Detektionssystem basierend auf dem beschriebenen Messprinzip aus der Fig. 2, wobei beispielhaft der Aufbau einer elektrochemischen Messzelle mit einer Einzelporen-Kunststoffolie **120** gezeigt ist. Eine damit messbare Stromspannungscharakteristik (I/U-Kennlinie) ist in der Fig. 3B gezeigt, wobei die Änderung der Kennlinie durch die Analyt-Konzentration in dem Medium **50** verursacht wird. Die Bindung von Analyt/Liganden-Molekülen **112** + **114** an der funktionalisierten Nanopore **110** ist daher mit einer (qualitativen) I/U-Messung ermittelbar.

[0036] Das Detektionssystem umfasst im Detail einen ersten Kanalbereich **215** und einen zweiten Kanalbereich **225** mit der dazwischen angeordneten Membran **120** (siehe Fig. 3A). Auch wenn die Erfindung darauf nicht eingeschränkt werden soll, versteht es sich, dass der erste und zweite Kanalbereich **215**, **225** typischerweise Teile eines Kanalsystems darstellen, durch welches das Medium **50** sich bewegt. Das Medium kann beispielsweise ein Elektrolyt (z.B. 0,1 M KCl, $M = \text{mol/L}$) mit oder ohne Biomolekülen sein. Der Messaufbau kann auch einen Elektrolyt-Behälter aufweisen, der durch die Membran **120** in zwei Hälften **215**, **225** geteilt ist. Die Membran **120** kann einen oder mehrere Nanokanäle **110** als Poren enthalten, die auf der Oberfläche mit kovalent gebundenen Rezeptormolekülen **112** derivatisiert sein können. Die kovalent gebundenen Rezeptormolekülen **112** können optional (nahezu) überall auf der Membran **120** vorhanden sein. Die Rezeptoren **112** sind in der Lage, die Biomoleküle (Analyte, Liganden) **114** selektiv und hochaffin zu binden, wodurch der elektrische Widerstand der Nanokanäle **110** in Abhängigkeit zur Konzentration der Liganden-Moleküle **114** steigt.

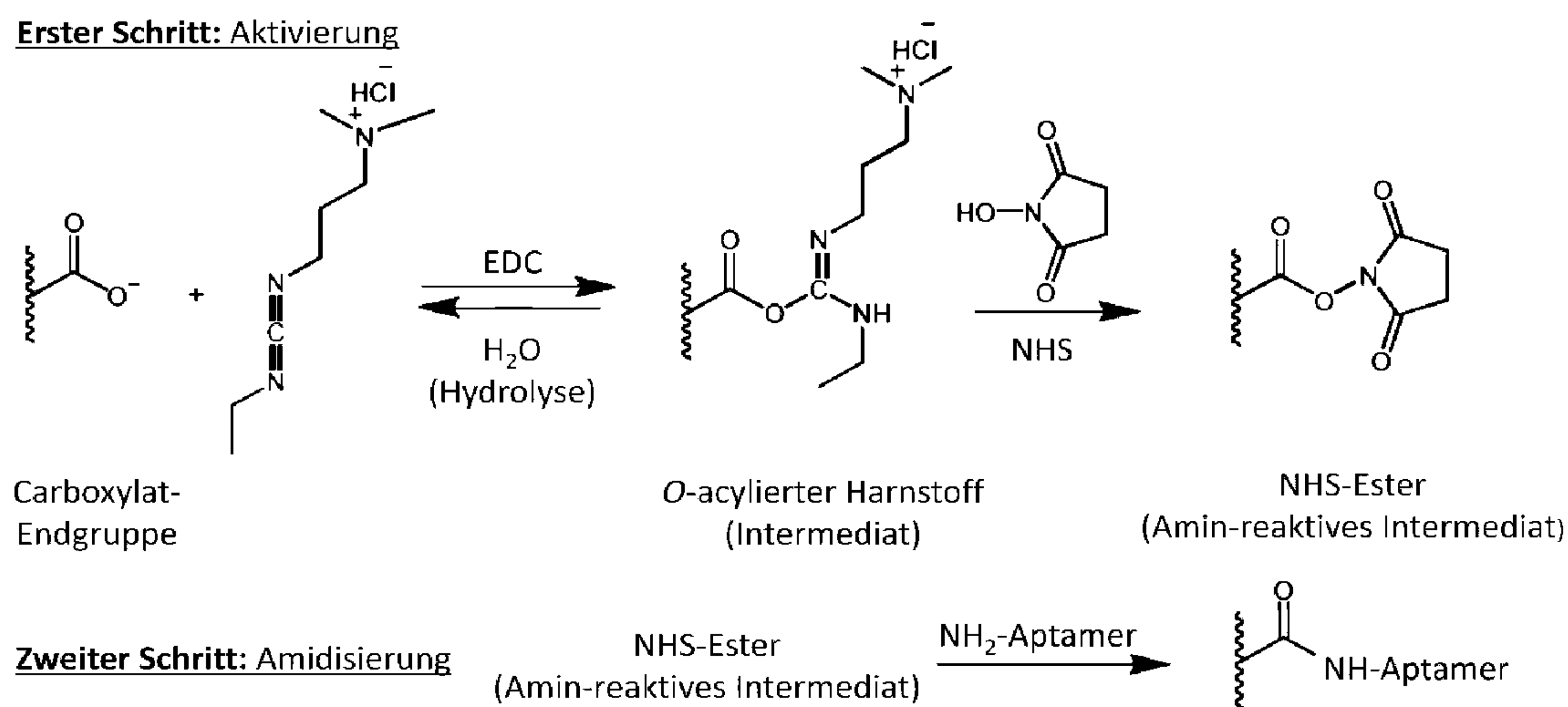
[0037] In dem Medium **50** befinden sich Ionen (z.B. als Teil des Elektrolyten) und die zu detektierenden Biomoleküle **114**, die ebenfalls Ionen sein können (müssen es aber nicht). In dem ersten Kanalbereich des **215** befindet sich außerdem eine erste Elektrode **315** und in den zweiten Kanalbereich **225** befindet sich eine zweite Elektrode **325**. Durch das Anlegen der Spannung **U** zwischen der ersten Elektrode **315** und der zweiten Elektroden **325** fließt ein Strom **I** durch den Nanokanal **110** (siehe Fig. 2). Der Strom **I** führt dazu, dass die Biomoleküle **114** an den Rezeptormolekülen **112** in der Pore **110** haften bleiben und wie gesagt einen elektrischen Widerstand in Abhängigkeit von einer Menge der vorhandenen Biomoleküle **114** ändern. Je mehr Biomoleküle **114** vorhanden sind, umso mehr bleiben potentiell in der Pore **110** haften und verringern somit deren Querschnitt, der dem Ionenstrom **130** zur Verfügung steht.

[0038] Die Änderung des elektrischen Widerstandes kann durch eine Stromspannungsmessung ermittelt werden. Die entsprechende Charakteristik ist in der Fig. 3B dargestellt. Beispielhaft sind zwei Kennlinien gezeigt. Eine erste Kennlinie **310** zeigt einen gemessenen Strom **I** in Abhängigkeit der angelegten Spannung **U**, wenn keine Biomoleküle **114** in dem Medium **50** vorhanden sind. Die zweite Kennlinie **320** zeigt die Strom-Spannungsabhängigkeit für den Fall, dass eine größere Anzahl von Biomolekülen **114** in dem Medium **50** vorhanden ist. Wie dargestellt verringert sich als Folge der Biomoleküle **114** der Strom **I** für eine gegebene Spannung **U**, was eine Folge des erhöhten Widerstandes beim Passieren der Pore **110** ist.

[0039] Wie eingangs erwähnt, ist eine entsprechende Funktionalisierung der Membran erforderlich, bei der innerhalb der Pore **110** entsprechende Biorezeptoren **112** anbringt werden, sodass eine hohe Sensitivität der Membran für bestimmte zu detektierende Moleküle erreicht wird. Auch die Pore(n) selbst kann/können während der Funktionalisierung erzeugt werden.

[0040] Fig. 4 veranschaulicht eine beispielhafte Funktionalisierung. Zunächst erfolgt eine Generierung der Carbonsäure/Carboxylat-Endgruppen auf der Porenoberfläche durch einen Bestrahlungs- und einen Ätzprozess. Dies kann beispielsweise in den gezeigten drei Schritten (i) - (iii) durchgeführt werden. Im ersten Schritt (i) wird die Membran **120** beispielsweise mit Schwerionen bestrahlt, sodass die Ionen in die Membran **120** eintreten und die gesamte Membran **120** durchdringen können und so eine Öffnung erzeugen oder zumindest die chemischen Bindungen dort aufbrechen. Als zweiter Schritt (ii) erfolgt ein Ätzschritt, der dazu führt, dass die Ionenspur verbreitert wird und sich eine konisch zulaufende Pore **110** ergibt. Schließlich kann auf der Oberfläche der Pore **110** eine Carboxylat-Endgruppe ausgebildet werden, die sensitiv für die zu detektierenden Moleküle **114** ist bzw. die als Ankerpunkt für eine Anbringung der Rezeptoren der zu detektierenden Moleküle **114** dienen kann/dient.

[0041] Die Oberflächeneigenschaften sind durch eine kovalente Verknüpfung mit unterschiedlichen Rezeptormolekülen **112** wie zum Beispiel Nukleinsäure-Aptameren (DNA/RNA) einstellbar. Nach Ali et al. (Ali M, Nasir S, Ensinger W. 2015. Bioconjugation-induced ionic current rectification in aptamer-modified single cylindrical nanopores. Chem Commun **51**: 3454-3459) kann die Kopplung in einer Zweischrittreaktion unter Verwendung von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und Sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimid) erfolgen. Der Reaktionsmechanismus der Verknüpfung eines biologischen Rezeptors **112** (z.B. eines Aptamers) mit an der Oberfläche lokalisierten Carbonsäure/Carboxylat-Gruppen durch EDC/NHS-Kopplungschemie kann wie folgt dargestellt werden:



[0042] Gemäß Ausführungsbeispielen der vorliegenden Erfindung findet die Reaktion in dem mikrofluidischen System statt, dessen Aufbau und Fertigung weiter unten näher erläutert wird.

[0043] Erster Schritt (Aktivierung): Hier werden die Carboxy-Endgruppen durch die Veresterung von NHS mittels EDC aktiviert. Es entsteht zunächst ein O-acyliertes Harnstoff-Zwischenprodukt, welches in einen Amin-reaktiven NHS-Ester umgewandelt wird. Hierfür wird die Membran **120** in das mikrofluidische System integriert. Anschließend wird das System mit einer frisch hergestellten wässrigen Lösung (pH 7) von 0,2 mM EDC und 0,4 mM NHS befüllt. Nach einer Stunde ist die Aktivierung der Oberfläche der Poren **110** abgeschlossen.

[0044] Zweiter Schritt (Amidisierung): Hier erfolgt die Funktionalisierung mit den Rezeptormolekülen **112** (Aptameren), deren chemische Struktur mindestens eine primäre Aminogruppe (-NH₂) enthält. Diese Aminogruppe reagiert bei Raumtemperatur mit dem aktivierten Carbonsäure-Ester unter Ausbildung einer Amid-Bindung (-C(=O)-NH-). Hierzu wird das mikrofluidische System mit einer 0,1 mM wässrigen Lösung des Rezeptormoleküls **112** (Aptamers) befüllt und über Nacht stehen gelassen.

[0045] Die erfolgreiche Funktionalisierung wird über die Messung einer Strom-Spannungs-Kennlinie verifiziert, da unfunktionalisierte und funktionalisierte Poren **110** sich bei gleichem Potential durch unterschiedliche Stromstärken unterscheiden. Dieses sensorische Prinzip wurde bereits mit den Fig. 2 und Fig. 3 erläutert.

[0046] Als PSA-spezifische Aptamere als Biorezeptoren **112** sollen nachfolgende Moleküle Verwendung finden sollen:

1. RNA Aptamer (Referenz: Jeong S, Han SR, Lee YJ, Lee SW. 2010. Selection of RNA aptamers specific to active prostate-specific antigen. *Biotechnol Lett* 32:379-385) Sequenz (5'-3'):
NH₂-C₆-CCGUCAGGUCACGGCAGCGAAGCUCUAGGCGCGGCCAGUUGC-OH
2. DNA Aptamer-01 (Referenz: Savory N, Abe K, Sode K, Ikebukuro K. 2010. Selection of DNA aptamer against prostate specific antigen using a genetic algorithm and application to sensing. *Biosens Bioelectron* 26:1386-1391) Sequenz (5'-3'):
NH₂-C₆-TTTTTAATTAAAGCTCGCCATCAAATAGCTTT -OH
3. DNA Aptamer-02 (Referenz: Duan M, Long Y, Yang C, Wu X, Sun Y, Li J, Hu X, Lin W, Han D, Zhao Y, Liu J, Ye M, Tan W. 2016. Selection and characterization of DNA aptamer for metastatic prostate cancer recognition and tissue imaging. *Oncotarget* 7:36436-36446) Sequenz (5'-3'):
NH₂-C₆-ACGCTCGGATGCCACTACAGGTTGGGGTCGG GCATGCGTCCGGAGAAGGGCAAACGA-GAGGTCACCAGCACGTCCATGAG-OH

[0047] Die sensorischen Eigenschaften der funktionalisierten (Einzelporen-) Kunststofffolien **120** können in einer Makrozelle untersucht werden. Hierzu kann die beispielhafte Einzelporen-Kunststofffolien **120** genutzt werden, die vor jeder Untersuchung manuell zwischen zwei Flüssigkeitskammern **215**, **225** eingespannt werden. Die vorteilhaften Einzelporen-Kunststofffolien **120** sind nur aufwendig herzustellen. Im Gegensatz dazu können Multiporen-Kunststofffolien als Massenprodukte gefertigt werden. Allerdings haben sie eine geringere Sensitivität gegenüber den Einzelporen.

[0048] Um die Vorteile beider Folien zu kombinieren, wird gemäß Ausführungsbeispielen die Benetzungsfläche der Multiporen-Folie **120** so weit verkleinert, dass eine einzelne Pore noch Kontakt mit der Flüssigkeit hat. Diese erfolgt durch die Integration in ein Mikrosystem und ermöglicht somit die Verwendung des Detektionssystems von ungeschulten Anwendern.

[0049] **Fig. 5** zeigt beispielhaft ein mögliches Detektionssystem, welches zwei Detektorbereiche **500A** und **500B** umfasst, die für unterschiedliche Analysen (Detektion verschiedener Biomoleküle) genutzt werden können. Jeder der zwei Detektorbereiche **500A**, **500B** umfasst drei Anschlusselektroden **510**, einen Einlass **520** für einen Elektrolyten und jeweils zwei Einlässe **530** für einen Analyten. Der Analyt ist beispielsweise das zu untersuchende Medium **50** mit den Biomolekülen **114** (Analyte) und der Elektrolyt kann jede Flüssigkeit sein, die Ionen enthält (um den elektrischen Strom zu unterstützen) und das Ergebnis nicht verfälscht.

[0050] In dem Mikrofluidik-System aus der **Fig. 5** ist zwischen den Kanälen für die Elektrolyt-Moleküle und für die Biomoleküle **114** eine Multiporen-Kunststofffolie **120** integriert. Alle Einzelteile werden durch eine Klebeschicht zusammengefügt. Das Mikrofluidik-System kann in ein elektronisches Messsystem in Form eines Tischgeräts integriert werden.

[0051] Auf der rechten Seite der **Fig. 5** ist der zweite Detektorbereich **500B** vergrößert dargestellt, wobei die Membran **120** zwischen zwei Analyt-Einlässen **530** ausgebildet ist und ein Kanal **521** zu dem betreffenden Elektrolyt-Einlass **520** führt. Es versteht sich, dass alle Einlässe auch Auslässe sein können. Dazu braucht lediglich die Strömungsrichtung umgedreht werden. Daher können die Analyt-Einlässe **530** und Elektrolyt-Einlass **520** auch entsprechende Auslässe darstellen. Die Erfindung soll nicht auf eine bestimmte Strömungsrichtung eingeschränkt werden. Beispielsweise besteht eine fluide Verbindung zwischen den beiden Analyt-Einlässen **530** zu einer Seite der Membran **120**. Die gegenüberliegende Seite der Membran **120** kann beispielsweise fluid mit dem Elektrolyt-Einlass **520** verbunden sein. Außerdem sind in den Analyt-Einlässen **530** Elektroden ausgebildet, die mit jeweils einer der Anschlusselektroden **510** verbunden sind. Ebenso ist in dem Elektrolyt-Einlass **520** eine Elektrode ausgebildet, die mit einer der Anschlusselektroden **510** verbunden ist. Durch ein gezieltes Anlegen einer Spannung zwischen der Elektrode in dem Elektrolyt-Einlass **520** und einem der Elektroden in den Analyt-Einlässen **530** wird ein Fluss des Analyts **50+114** von dem jeweiligen Einlass **530** hin zu dem Elektrolyteinlass **520** erzeugt.

[0052] Die Membran **120** ist dabei beispielhaft horizontal ausgebildet und der Analytfluss von einem der Analyt-Einlässe **530** erfolgt beispielsweise in vertikaler Richtung durch die Membran **120** hindurch hin zu dem Kanal **521**, der zu dem Elektrolyt-Einlass **520** führt. Dieser Fluss kann entweder vertikal nach unten oder vertikal nach oben durch eine angelegte Spannung an den entsprechenden Elektroden erzeugt werden. Die Funktionsweise des Detektionssystems wird nachfolgend über die Darstellung der Herstellung weiter veranschaulicht. Da mehrere Analyt-Einlässe **530** vorhanden sind, können parallel oder nacheinander verschiedene Messungen durchgeführt werden (z.B. für verschiedene Biomoleküle **114**). So können die verschiedenen Analyt-Einlässe

530 zu verschiedenen Bereichen der Membran **120** geführt werden, die unterschiedlich funktionalisiert sind, um so eine Analyse für verschiedene Biomoleküle **114** parallel zu erlauben.

[0053] **Fig. 6A** bis **Fig. 6M** veranschaulichen die verschiedenen Schritte bei der Herstellung des beispielhaften Detektionssystems, wie es zum Beispiel in der **Fig. 5** dargestellt ist.

[0054] Die **Fig. 6A** bis **Fig. 6C** veranschaulichen zunächst die Herstellung der Elektroden. Dazu wird auf einem Substrat **610** (zum Beispiel einem Glassubstrat) abschnittsweise eine Photoresistschicht **620** aufgebracht. Im Anschluss wird auf die Photoresistschicht **620** und den freiliegenden Glassubstratabschnitten **610** eine Zwischenschicht (z.B. eine Chromschicht) **630** und eine Elektrodenerschicht **640** (z.B. eine Silberschicht) abgeschieden. Das Abscheiden kann beispielsweise durch eine physikalische Gasphasenabscheidung (PVD), z.B. durch Sputtern oder Aufdampfen, geschehen. Schließlich wird die Photoresistschicht **620** zusammen mit den darauf ausgebildeten beispielhaften Chrom- und Silberschichten entfernt, sodass, wie in der **Fig. 6C** gezeigt, das Glassubstrat **610** mit strukturierten Elektroden **315**, **325** entsteht. Die Elektroden können beispielsweise die erste Elektrode **315** und/oder die zweite Elektrode **325** darstellen.

[0055] Die **Fig. 6D** bis **Fig. 6F** veranschaulichen eine weitere Möglichkeit, um Elektroden auszubilden. Auch hier wird auf einem Substrat **610** zunächst eine beispielhafte Zwischenschicht **630** (z.B. eine Chromschicht) und darauf eine Elektrodenerschicht **640** aufgebracht, die in diesem Ausführungsbeispiel Gold aufweisen kann. Das Aufbringen der Schichten auf dem Substrat **610** kann flächenweise erfolgen. Anschließend wird eine Strukturierung vorgenommen, d.h. die beispielhaften Gold- und Chromschichten **630**, **640** werden in verschiedenen Bereichen entfernt, sodass wiederum lediglich die Elektroden **315**, **325** übrigbleiben.

[0056] Die so erzeugte Elektrodenstruktur ist ebenfalls in der **Fig. 5** zu sehen, wo die verschiedenen Anschlusselektroden **510** mit Elektroden in den entsprechenden Einlässen **520**, **530** für den Elektrolyten und den Analyten verbunden sind. Die Elektroden können wiederum die erste Elektrode **315** und/oder die zweite Elektrode **325** darstellen.

[0057] Die **Fig. 6G** bis **Fig. 6M** veranschaulichen die Herstellung des Detektionssystems. Gemäß Ausführungsbeispielen wird dabei ein erster Detektorabschnitt **210** und ein zweiter Detektorabschnitt **220** erzeugt (siehe **Fig. 6I**), die daran anschließend aufeinander gebracht werden, um so das Detektionssystem zu bilden. Dazu werden in dem ersten Detektorabschnitt **210** und in dem zweiten Detektorabschnitt **220** Kanalstrukturen ausgebildet, die schließlich die Kanäle für den Analyten und/oder den Elektrolyten darstellen.

[0058] In der **Fig. 6G** ist zunächst auf der linken Seite beispielhaft das Substrat **610** mit der darauf ausgebildeten ersten Elektrode **315** und zweiten Elektrode **325** zu sehen, wie sie mit den Schritten aus den **Fig. 6A** bis **Fig. 6F** hergestellt werden können. Dies kann später der erste Detektorabschnitt **210** werden. Auf der rechten Seite wird in der **Fig. 6G** der zweite Detektorabschnitt **220** gefertigt, wobei wiederum zunächst das Substrat **610** dargestellt ist. Auf die dargestellten Abschnitte wird als nächstes eine Haftmittelschicht **660** ausgebildet. Die Haftmittelschicht **660** kann beispielsweise ein Titanmaterial aufweisen und eine beispielhafte Dicke von 0,5 µm umfassen.

[0059] In dem Herstellungsschritt aus der **Fig. 6H** wird auf den Strukturen aus der **Fig. 6G** eine Maskenschicht **670** (z.B. Trockenresist aus Epoxid) aufgebracht.

[0060] In dem folgenden Herstellungsschritt aus der **Fig. 6I** wird die Maskenschicht **670** strukturiert, wobei an den Stellen der Elektroden **315**, **325** in dem ersten Detektorabschnitt **210** und in einem zentralen Bereich des zweiten Detektorabschnittes **220** die Maskenschicht **670** entfernt wird. Als Resultat werden die erste Elektrode **315** und die zweite Elektrode **325** in dem ersten Detektorabschnitt **210** und das Substrat **610** in dem zweiten Detektorabschnitt **220** freigelegt. Die Eigenschaften der resultierenden Kanäle (insbesondere die Hydrophilität) können durch eine Beschichtung modifiziert werden

[0061] Das Ergebnis ist in der Raumdarstellung der **Fig. 6J** dargestellt. Somit ist in dem ersten Detektorabschnitt **210** eine Vielzahl von Elektroden ausgebildet, wie sie beispielsweise in der **Fig. 5** dargestellt sind.

[0062] In der **Fig. 6K** wird beispielhaft eine Klebeschicht **680** (z.B. eine Haftmittel- oder Laminatschicht insbesondere eine Trocken-Epoxid-Laminatschicht) auf die Strukturen aus der **Fig. 6I** aufgebracht.

[0063] In dem folgenden Schritt (siehe **Fig. 6L**) wird die Membran **120** auf die hergestellten Strukturen aus der **Fig. 6K** aufgebracht. Gemäß Ausführungsbeispielen kann die Membran **120** beispielsweise vollflächig

aufgebracht und thermisch laminiert werden (bei ca. $T=65\text{ }^{\circ}\text{C}$); siehe rechte Seite der **Fig. 6L**. Sie braucht aber auch nur teilweise aufgebracht zu werden (siehe linke Seite der **Fig. 6L**), wobei die Mutliporen-Membran **120** zwischen die Kanäle oder Kanalbereiche positioniert und anschließend thermisch laminiert wird.

[0064] Falls die Membran **120** vollflächig auf die Strukturen der **Fig. 6K** aufgebracht wird (siehe rechte Seite von **Fig. 6L**), erfolgt anschließend eine Strukturierung oder ein Entfernen der Membran **120**, zum Beispiel an jenen Abschnitten, die anschließend eine Verbindung zwischen den Kanalbereichen (z.B. der erste und zweite Kanalbereich **215**, **225**) der erste Detektorabschnitt **210** und der zweite Detektorabschnitt **220** bilden sollen (siehe **Fig. 6M**). Abschließend wird der erste Detektorabschnitt **210** und der zweite Detektorabschnitt **220** aufeinander gesetzt, sodass die (strukturierte) Membran **120** zwischen dem ersten Detektorabschnitt **210** und dem zweiten Detektorabschnitt **220** angeordnet ist. Schließlich kann ein Laminieren des hergestellten Detektors erfolgen, um alle Schichten miteinander zu verbinden und dicht zu verschließen.

[0065] Die in der **Fig. 6M** gezeigten Kanalbereiche **215**, **225** stellen beispielsweise die fluide Verbindung zwischen dem Analyt-Einlass **530**, durch die Membran **120**, über den Kanal **521** hin zu dem Elektrolyt-Einlass **520** dar (siehe **Fig. 5**). Die erste Elektrode **315** ist beispielsweise unterhalb dem Analyt-Einlasses **530** in der **Fig. 5** ausgebildet, und die zweite Elektrode **325** ist beispielsweise die mittlere Elektrode, die über den Kanal **521** hin zu dem Elektrolyt-Einlass **520** geführt ist.

[0066] Gemäß Ausführungsbeispielen erfolgt abschließend (z.B. während des Herstellungsschrittes aus der **Fig. 6M**) die zuvor beschriebene Funktionalisierung der Membran **120**.

[0067] **Fig. 7A,B** zeigen fertiggestellte Detektionssysteme nach Ausführungsbeispielen der vorliegenden Erfindung.

[0068] Das Ausführungsbeispiel der **Fig. 7A** zeigt ein Detektionssystem, bei dem zwischen dem ersten Detektorabschnitt **210** und dem zweiten Detektorabschnitt **220** die Membran **120** ausgebildet ist, und zwar im Wesentlichen (z.B. zu mehr als 50% oder zu mehr als 80%) nur in einem Detektionsbereich **125**, wo sie den ersten Kanalbereich **215** und den zweiten Kanalbereich **225** trennt (bis auf Auflageflächen zur Fixierung).

[0069] Wie mit der **Fig. 6** beschrieben, umfassen sowohl der erste Detektorabschnitt **210** als auch der zweite Detektorabschnitt **220** jeweils ein Substrat **610a**, **610b**, zwischen denen alle weiteren Schichten ausgebildet sind. Der zweite Detektorabschnitt **220** kann auch ohne Substrat hergestellt werden. Beginnend mit dem ersten Detektorabschnitt **210** ist auf dem entsprechenden Substrat **610a** (siehe **Fig. 6G-6I**) zunächst eine Haftmittelschicht **660a** ausgebildet, darauf ist eine Maskenschicht **670a** ausgebildet und darauf ist eine Klebeschicht **680a** ausgebildet. Unterhalb des Substrates **610b** des zweiten Detektorabschnittes **220** ist wiederum zunächst eine Haftmittelschicht **660b** aufgebracht, darunter eine Maskenschicht **670b**, auf die wiederum die Klebeschicht **680b** aufgebracht.

[0070] Außerdem sind auf dem Substrat **610a** des ersten Detektorabschnittes **210** die erste Elektrode **315** und die zweite Elektrode **325** ausgebildet (siehe **Fig. 6A-C**). Dementsprechend ist zwischen der ersten Elektrode **315** und der zweiten Elektrode **325** ein Flusspfad **130** durch die Membran **120** ausgebildet, der einen Strom beim Anlegen einer Spannung zwischen der ersten Elektrode **315** und der zweiten Elektrode **325** auslöst, dessen Widerstand durch die Pore (in der **Fig. 7A** nicht gezeigt) gemessen werden kann und zur Feststellung der Konzentration der Biomoleküle **114** in dem Medium **50** genutzt werden kann.

[0071] Das Ausführungsbeispiel der **Fig. 7B** unterscheidet sich von dem Ausführungsbeispiel der **Fig. 7A** lediglich dadurch, dass die Membran **120** beim Anordnen zwischen dem ersten Detektorabschnitt **210** und dem zweiten Detektorabschnitt **220** (im Wesentlichen) nur an der Stelle entfernt wurde, wo der Flusspfad **130** ausgehend von der ersten Elektrode **315** hin zu der Membran **120** den ersten Detektorabschnitt **210** verlässt und in den zweiten Detektorabschnitt **220** eintritt. Ansonsten ist die Membran **120** insbesondere zwischen den Klebeschichten **680a,b**, die als Teil des ersten Detektorabschnittes **210** und des zweiten Detektorabschnittes **220** ausgebildet wurde, immer noch vorhanden.

[0072] Somit ist in dem Ausführungsbeispiel der **Fig. 7B** die erste Klebeschicht **680a** von der zweiten Klebeschicht **680b** durch die Membran **120** zumindest teilweise oder überwiegend getrennt - insbesondere auch außerhalb des Detektionsbereiches **125**.

[0073] Vorteilhafte Aspekte von Ausführungsbeispielen der vorliegenden Erfindung beziehen sich insbesondere auf das Folgende:

- Die groß-/ganzflächige Poren-Kunststoffolie **120** wird in ein Lab-on-Chip-System zwischen zwei Fluidkanälen **215**, **225** integriert (z.B. in einem Batch-Verfahren).
- Die Folie **120** wird im Bereich der Fluidkanäle **215**, **225** durch Laserschneiden, Xurography oder Ätzen entfernt (siehe **Fig. 6L**, **Fig. 6M** rechts).
- Die verwendete Porenfolie **120** umfasst konische Poren **110**, mit reproduzierbarer Geometrie.
- Die Klebeschicht **680** dient sowohl der Integration der Pore **110**, als auch zu ihrer Dysfunktionalisierung (Schließen) der Poren. Somit kann statistisch gesehen jeweils nur eine Pore in Kontakt mit dem Elektrolyten vorhanden sein. So wird die hohe Sensitivität von Einzelporen-Kunststoffolien **120** mithilfe von Multiporen-Kunststoffolien erreicht.
- Die Funktionalisierung der Poren **110** erfolgt nach der Chipherstellung, kann aber auch vor der Funktionalisierung erfolgen.

[0074] Die Funktionalisierung nach der Chipherstellung hat gegenüber den vorfunktionalisierten Poren folgende Vorteile:

- Nur geringe Mengen an Rezeptormolekülen **112** wird für die Funktionalisierung der Multiporen-Kunststoffolien **120** nach der Integration benötigt.
- Durch die Integration vorab funktionalisierter Poren besteht die Möglichkeit Poren zu kontaminieren bzw. zu verstopfen.

[0075] Ausführungsbeispiele bieten außerdem die folgenden Vorteile:

- Das neue System hat das Potential auf ein Micro Total Analysis System (μ TAS) erweitert zu werden. Dies ermöglicht die simultane Detektion mehrerer Ligandenmoleküle **114**.
- Die Sensitivität des Mikrosystems ist vergleichbar zu den Einzelporen-Messungen.
- Eine konventionelle Kleberschicht ist ein flüssiger UV-Kleber. Dieser führt zur Verstopfung der Poren und ist deshalb für die Integration von Poren bzw. funktionalisierten Poren nicht geeignet. Mit Hilfe dieser konventionellen Verfahren kann die Dichtigkeit des Systems nicht gesichert werden. Außerdem kann die Funktionalisierung der Folie durch die UV-Belichtung zerstört werden. Im Gegensatz hierzu wird bei Ausführungsbeispielen der Erfindung die Multiporen-Kunststoffolie **120** thermisch integriert (bei $T=65\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- Die verwendeten Multiporen-Kunststoffolien können sowohl nach, als auch vor der Integration funktionalisiert werden. Mit dieser Methode wurde eine Ausbeute von 100 % erreicht.

[0076] Eine Kanalbreite von $50\text{ }\mu\text{m}$ kann genutzt werden, was einer Benetzungsfläche von $2.500\text{ }\mu\text{m}^2$ entspricht. Die Benetzungsfläche kann auf $100\text{ }\mu\text{m}^2$ weiter reduziert werden. In konventionellen Verfahren ist nur eine Benetzungsfläche von $31.416\text{ }\mu\text{m}^2$ erreicht worden.

[0077] Das bisher beschriebene Funktionsprinzip basiert auf einem voltametrischen Verfahren. Bei weiteren Ausführungsbeispielen werden andere Messprinzipien genutzt. Diese sind zum Beispiel:

- Fluss-Messung durch die Pore **110**;
- Impedanz-Messungen; und
- Elektrokinetische Messungen (Elektrophorese, Elektroosmose, etc.).

[0078] Aber auch diese Messprinzipien messen letztlich einen Widerstand, der den Fluss der Biomoleküle **114** durch die Pore **110** behindert. Es ändert sich lediglich die erfasste Messgröße: in (i) die Flussgeschwindigkeit des Mediums **50**; in (ii) eine elektrische Impedanz; in (iii) eine elektrokinematische Größe.

[0079] Im Vergleich zu gegenwärtigen Verfahren, die aufwendig die jeweiligen Analyt-/Ligandenmoleküle detektieren, ermöglichen Ausführungsbeispiele der vorliegenden Erfindung eine Konzentrationsmessung mit höherer Selektivität und Sensitivität gegenüber den derzeit vorhandenen Analysemethoden. Verschiedene Liganden in biotischen und abiotischen Systemen können hiermit detektiert werden. Dazu zählen folgende Organismengruppen und deren Bestandteile:

- Niedermolekulare organische und anorganische Verbindungen jedweder Art
- Umweltgifte
- Agrarchemikalien
- Hormone
- Proteine
- Antibiotika
- Neurotoxine
- Bakterien
- Viren
- Parasiten

[0080] Die Integration der Nanosensoren in ein massenfertigbares Lab-on-Chip-System wird durch diese Erfindung ermöglicht, welches als kompaktes, portables Analysesystem für die obengenannten Anwendungen verwendbar ist. Dadurch kann die Messung innerhalb weniger Minuten durchgeführt werden, was in ausgewählte Fällen lebensrettend sein kann. Das Detektionssystem kann als Einweg-Mikrofluidik-System verwendet werden, sodass es für jeden einzelnen Test einmalig verwendet wird. Das System kann daher in großen Stückzahlen hergestellt werden.

[0081] Die in der Beschreibung, den Ansprüchen und den Figuren offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination für die Verwirklichung der Erfindung wesentlich sein.

Bezugszeichenliste

50	Medium
110	Pore
112	Biorezeptoren
114	Biomoleküle
120	Membran
125	Detektionsbereich
130	Flusspfad
210, 220	Detektorabschnitte
215, 225	Kanalbereiche
310, 320	Stromspannungscharakteristiken
315	erste Elektrode
325	zweite Elektrode
500A, 500B	Detektorbereiche
510	Anschlusselektroden
520	Elektrolyt-Einlass
521	Kanal
530	Analyt-Einlässe
610	Substrat
620	Photoresistschicht
630	Zwischenschicht (z.B. aus Chrom)
640	Elektrodenschicht (z.B. aus Silber oder Gold)

660	Haftmittelschicht
670	Maskenschicht
680	Klebeschicht

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Ali M, Nasir S, Ensinger W.: „Bioconjugation-induced ionic current rectification in aptamer-modified single cylindrical Pores“; Chem Commun 2015, 51: 3454-3459 [0005]

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Detektionssystems für Biomoleküle (114) in einem Medium (50), mit folgenden Schritten:

Bereitstellen (S110) eines ersten Detektorabschnittes (210) mit einem ersten Kanalbereich (215) und eines zweiten Detektorabschnittes (220) mit einem zweiten Kanalbereich (225);

Bereitstellen (S120) einer Membran (120) mit zumindest einer Pore (110); und

Anordnen (S130) des ersten Detektorabschnittes (210) und des zweiten Detektorabschnittes (220) auf gegenüberliegenden Seiten der Membran (120), sodass zumindest ein Teil des ersten Kanalbereichs (215) und des zweiten Kanalbereichs (225) durch die Membran (120) getrennt werden und der erste Kanalbereich (215) und der zweite Kanalbereich (225) sich miteinander zu einem Kanalsystem verbinden, um einen Flusspfad (130) für das Medium (50) durch die zumindest eine Pore (110) der Membran (120) zu bilden,

wobei entlang des Flusspfades (130) durch die Membran-Biorezeptoren (112) an der Membran (120) ausgebildet sind, um eine Konzentration der Biomoleküle (114) in dem Medium (50) durch eine Messung des Flusses entlang der Flusspfades (130) zu bestimmen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Schritt des Anordnens (S130) Folgendes umfasst:

- Anordnen der Membran (120) auf dem ersten Detektorabschnitt (210) oder auf dem zweiten Detektorabschnitt (220); und danach

- Entfernen eines Teiles der Membran (120) außerhalb eines Detektionsbereiches (125).

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, das weiter ein Ausbilden einer Klebeschicht (680) umfasst, die in Kontakt zu der Membran (120) steht, wobei die Klebeschicht (680) derart in Kontakt zu der Membran (120) gebracht wird, dass zumindest einige der Poren (110) durch die Klebeschicht (680) verschlossen werden, um dadurch eine Sensitivität der Membran (120) durch eine Verringerung einer Anzahl von Poren (110) für die Flussmessung des Mediums (50) zu erhöhen.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, welches außerdem Folgendes umfasst:

Anbringen der Biorezeptoren (112) an der Membran (120) durch eine Funktionalisierung, wobei das Funktionalisieren vor oder nach dem Anordnen des ersten Detektorabschnittes (210) und des zweiten Detektorabschnittes (220) auf gegenüberliegenden Seiten der Membran (120) ausgeführt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei das Funktionalisieren zumindest folgende Funktionalisierungsschritte umfasst:

- Aktivieren einer Carboxy-Endgruppe, um ein Amin-reaktives Intermediat zu erhalten; und

- Amidisieren des Amin-reaktive Intermediats, um gewünschte Biorezeptoren (112) an der Membran (120) auszubilden, wobei das Funktionalisieren in allen Bereichen der Membran (120) gleich erfolgt oder beim Funktionalisieren in verschiedenen Bereichen verschiedene Biorezeptoren (112) in den Poren (110) ausgebildet werden, sodass die Membran (120) in verschiedenen Bereichen für verschiedene Biomoleküle (114) sensitiv wird.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, das weiter ein Laminieren der Membran (120) auf den ersten Detektorabschnitt (210) und/oder auf den zweiten Detektorabschnitt (220) umfasst.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der erste Detektorabschnitt (210) und der zweite Detektorabschnitt (220) mit den gegenüberliegenden Seiten der Membran (120) durch eine thermische Behandlung bei einer Temperatur von zumindest 50°C oder zumindest 65°C miteinander verbunden werden.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Konzentration der Biomoleküle (114) in dem Medium (50) durch zumindest eine der folgenden Messungen bestimmt wird: (i) eine Flussmessung durch die zumindest eine Pore (110), (ii) eine Impedanzmessung, und (iii) eine elektrokinetische Messung, insbesondere eine Elektrophorese- oder eine Elektroosmose-Messung.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Biomoleküle (114) Prostata-spezifisches Antigene (PSA) sind und die Biorezeptoren (112) Aptamere umfassen, die insbesondere eine der folgenden Aptamere sind:

d) NH₂-C₆-CCGUCAGGUCACGGCAGCGAAGCUCUAGGCGCG GCCAGUUGC-OH;

e) NH₂-C₆-TTTTTAATTAAAGCTCGCCATCAAATAGCTTT-OH;

f) NH₂-C₆-ACGCTCGGATGCCACTACAGGTTGGGGTCGGGCATGCGTC CGGAGAAGGGCAAACGA-GAGGTCACCAGCACGTCCATGAG-OH.

10. Detektionssystem für Biomoleküle (114) in einem Medium (50), wobei das Detektionssystem Folgendes umfasst:

einen ersten Kanalbereich (215) und einen zweiten Kanalbereich (225), in die das Medium (50) einbringbar ist und die eine erste Elektrode (315) und eine zweite Elektrode (325) aufweisen;

eine Membran (120), die zumindest eine Pore (110) aufweist und den ersten Kanalbereich (215) von dem zweiten Kanalbereich (225) trennt und fluid zwischen der ersten Elektrode (315) und der zweiten Elektrode (325) angeordnet ist,

wobei an oder in der Pore (110) Biorezeptoren (112) ausgebildet sind, die unter anderem eines der folgenden Aptamere umfassen:

(iv) $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-CCGUCAGGUCACGGCAGCGAAGCUCUAGGCGCG GCCAGUUGC-OH}$;

(v) $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-TTTTTAATTAAAGCTCGCCATCAAATAGCTTT-OH}$;

(vi) $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-ACGCTCGGATGCCACTACAGGTTGGGGTCGG GCATGCGTCCGGAGAAGGGCAAACGA-GAGGTCAC CAGCACGTCCATGAG-OH}$,

sodass eine PSA-Konzentration im Medium (50) über eine Widerstandsmessung entlang eines Flusspfades (130) für das Medium (50) zwischen der ersten Elektrode (315) und der zweiten Elektrode (325) messbar ist.

11. Detektionssystem nach Anspruch 10, wobei die zumindest eine Pore (110) in der Membran (120) ein konisch zulaufendes oder zylindrisches Profil entlang des Flusspfades (130) aufweist.

12. Detektionssystem nach Anspruch 10 oder Anspruch 11, wobei die Membran in verschiedenen Bereichen verschiedene Rezeptoren (112) oder Aptamere umfasst, um eine simultane Detektion verschiedener Biomoleküle (114) zu ermöglichen.

13. Detektionssystem nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei der erste Kanalbereich (215) und/oder der zweite Kanalbereich (225) senkrecht zum Flusspfad (130) eine maximale Kanalbreite von bis zu 1 mm oder bis zu 50 μm oder höchstens 10 μm aufweisen.

14. Detektionssystem nach einem der Ansprüche 10 bis 13, das weiter einen Elektrolyt-Einlass (520) bei der zweiten Elektrode (325) und einen Analyt-Einlass (530) bei der ersten Elektrode (315) umfasst, um das Medium (50) in dem Analyt-Einlass (530) und einen Elektrolyten in den Elektrolyt-Einlass (520) einbringen zu können, um so eine für die Detektion erforderliche Menge des Mediums (50) zu verringern.

15. Verwendung eines Detektionssystems nach einem der Ansprüche 10 bis 14 zur Detektion von Biomolekülen (114) in einem Medium (50) durch ein Messen einer elektrischen Größe, die von einem elektrischen Widerstand zwischen der Elektrode (315) und der zweiten Elektrode (325) abhängt.

Es folgen 10 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

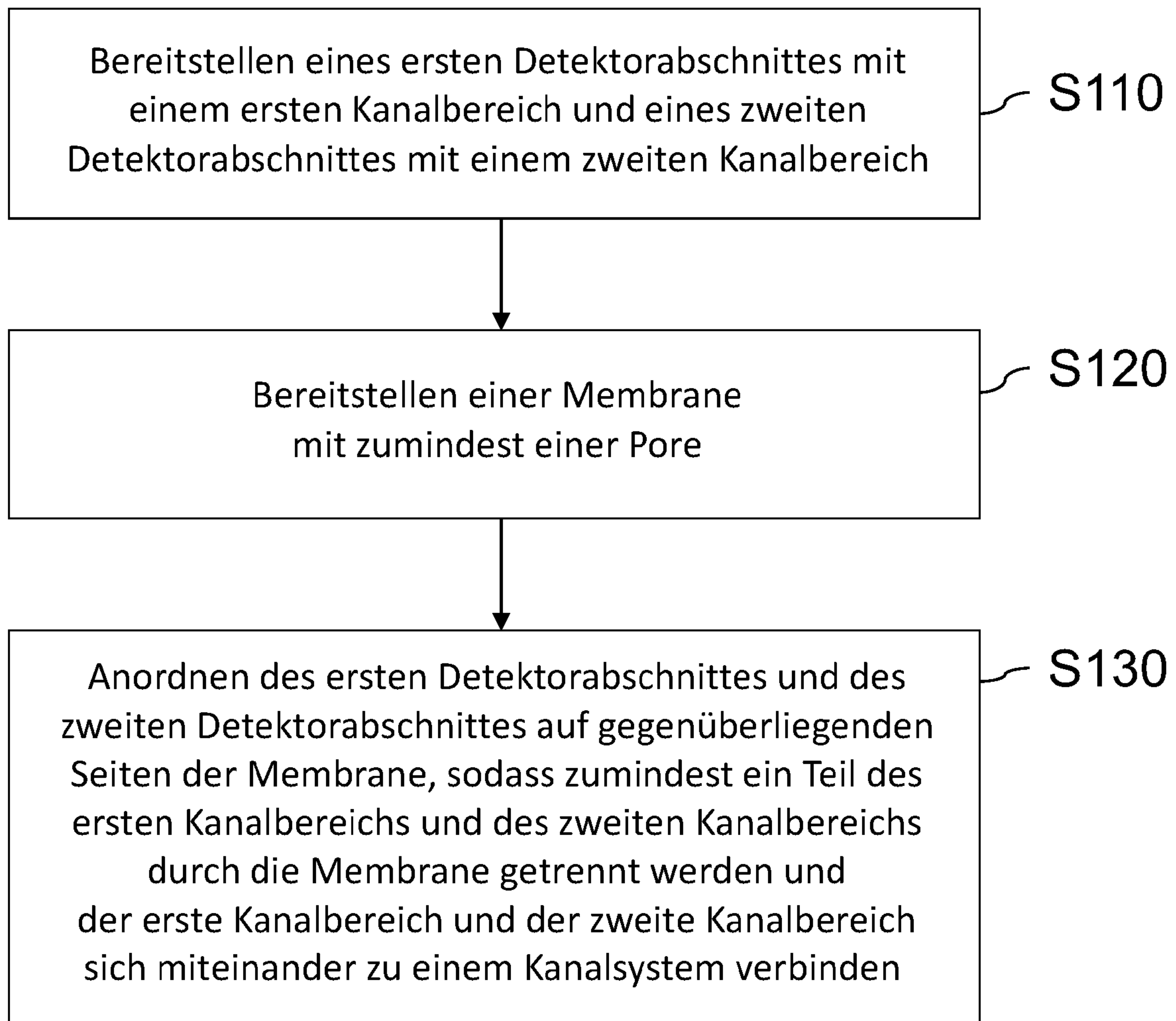


Fig. 1

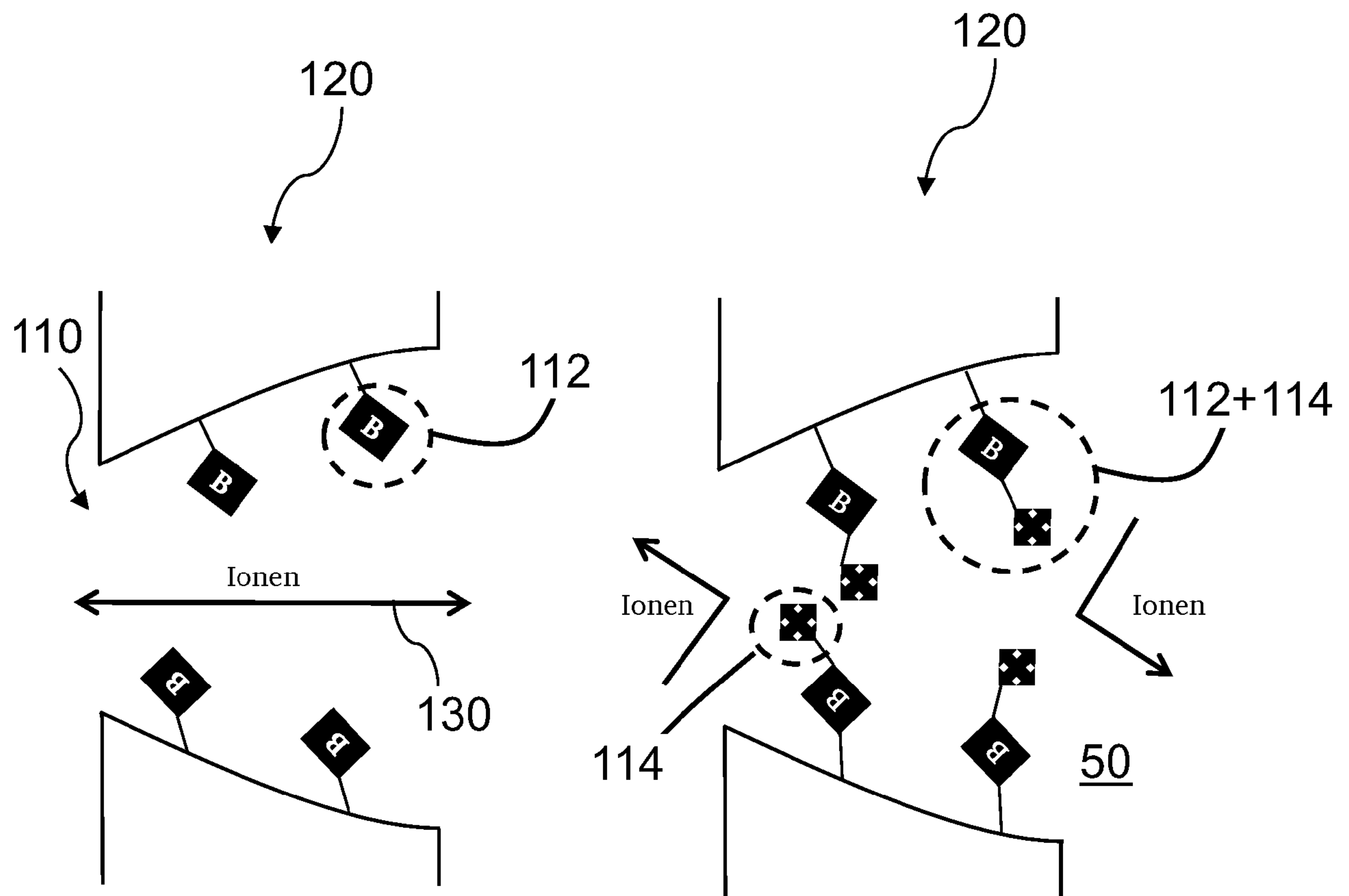


Fig. 2

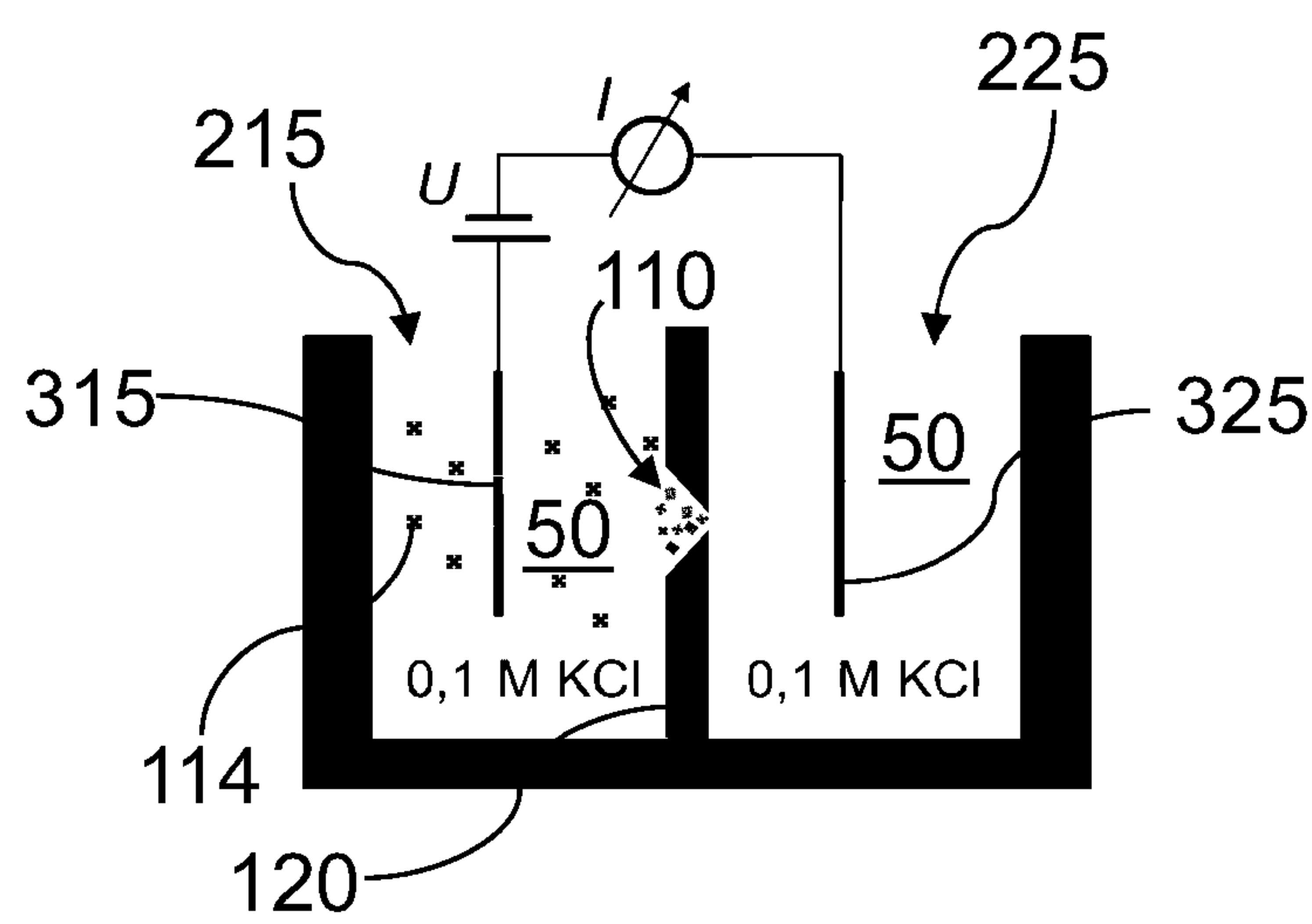


Fig. 3A

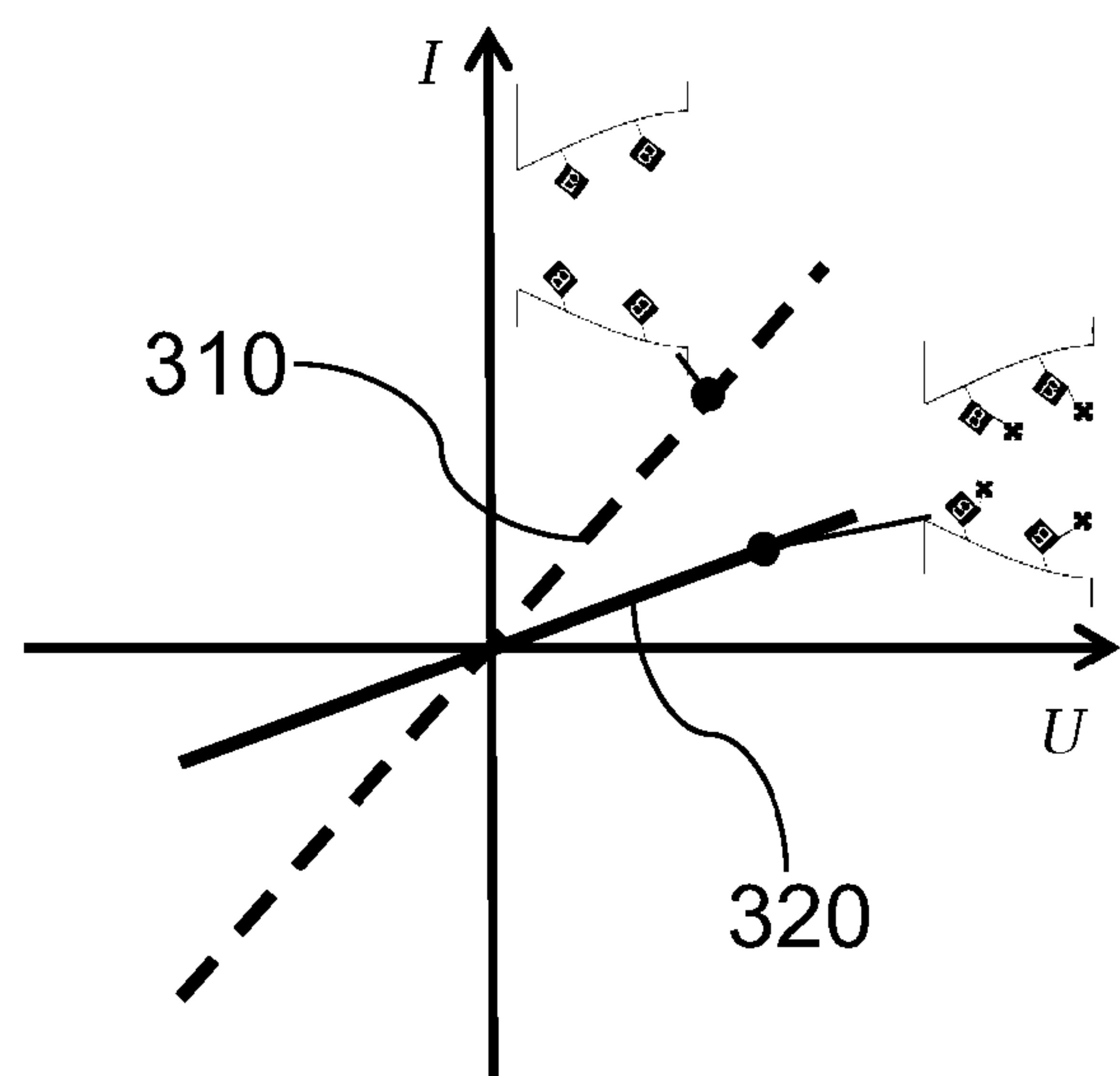


Fig. 3B

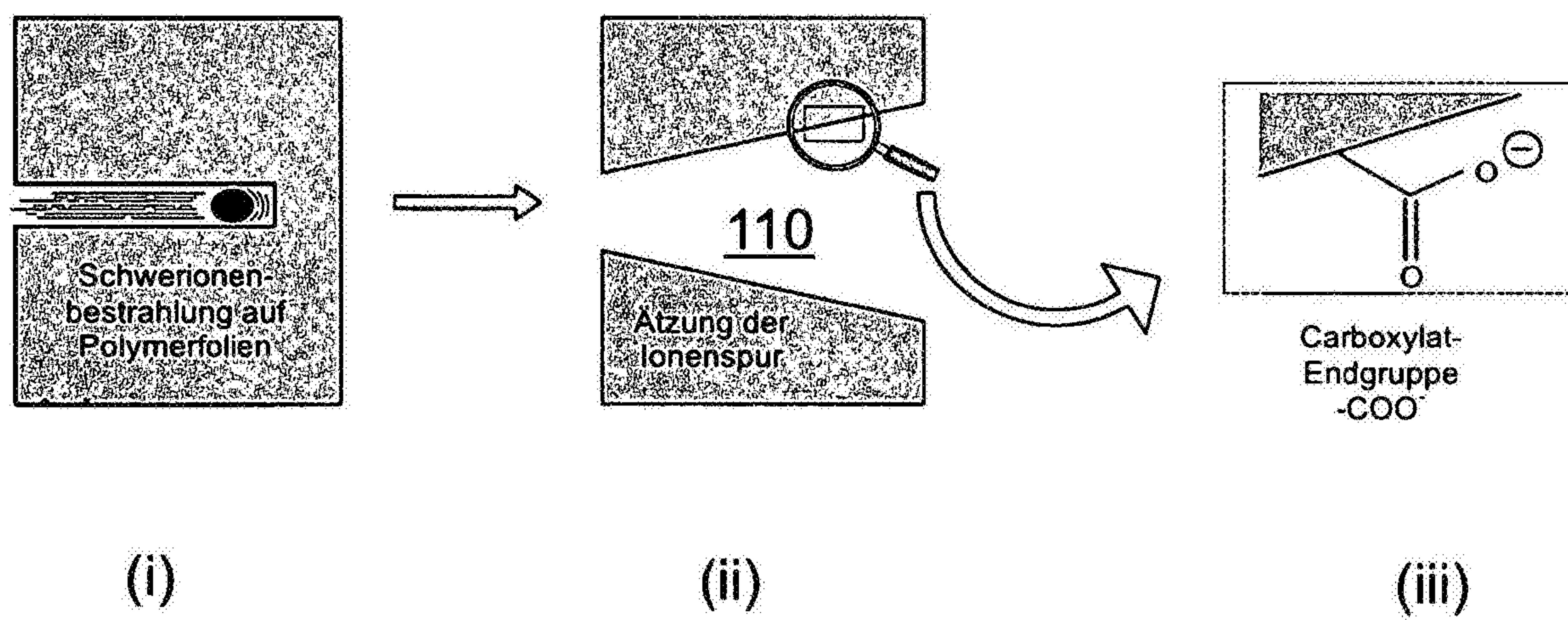


Fig. 4

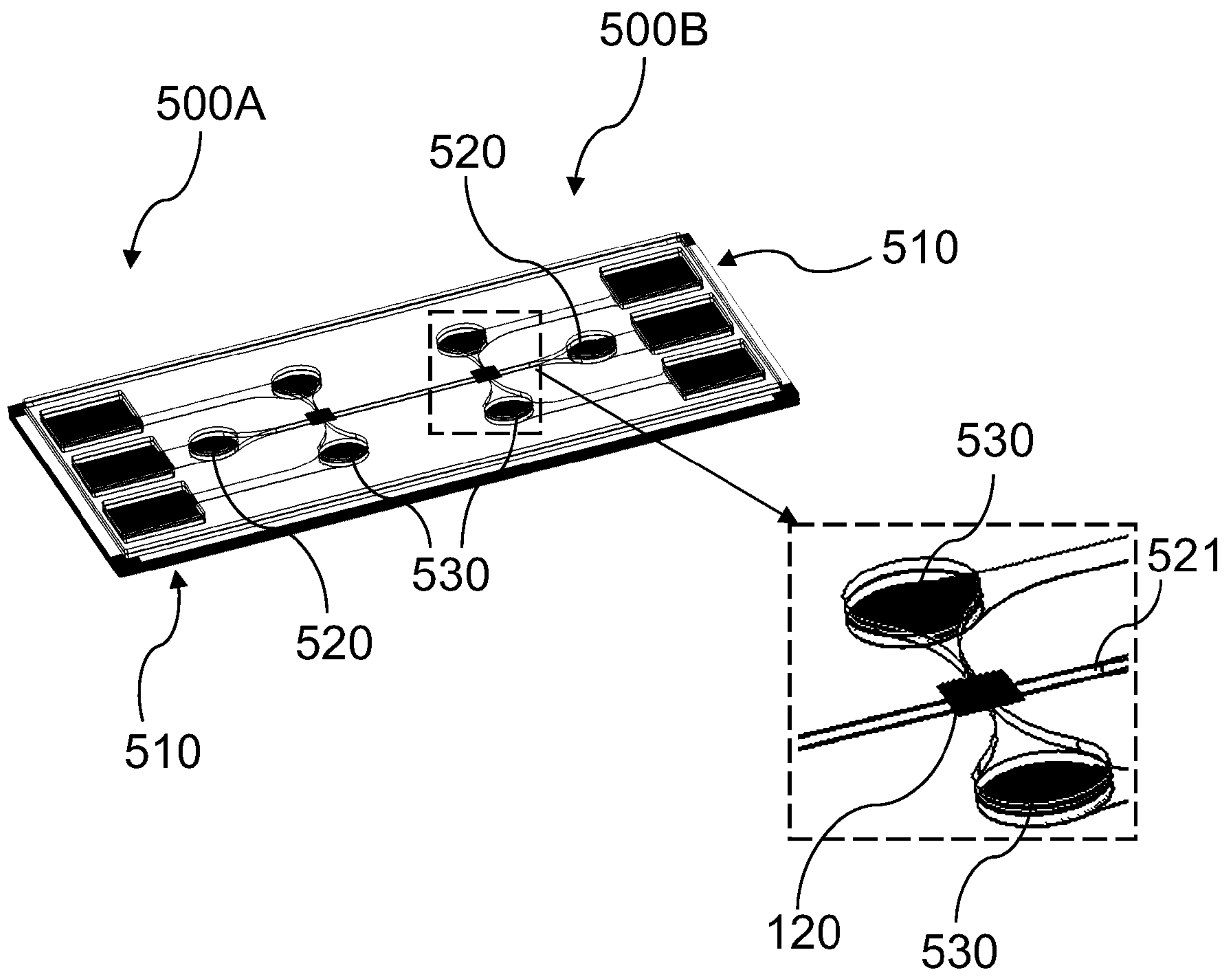


Fig. 5

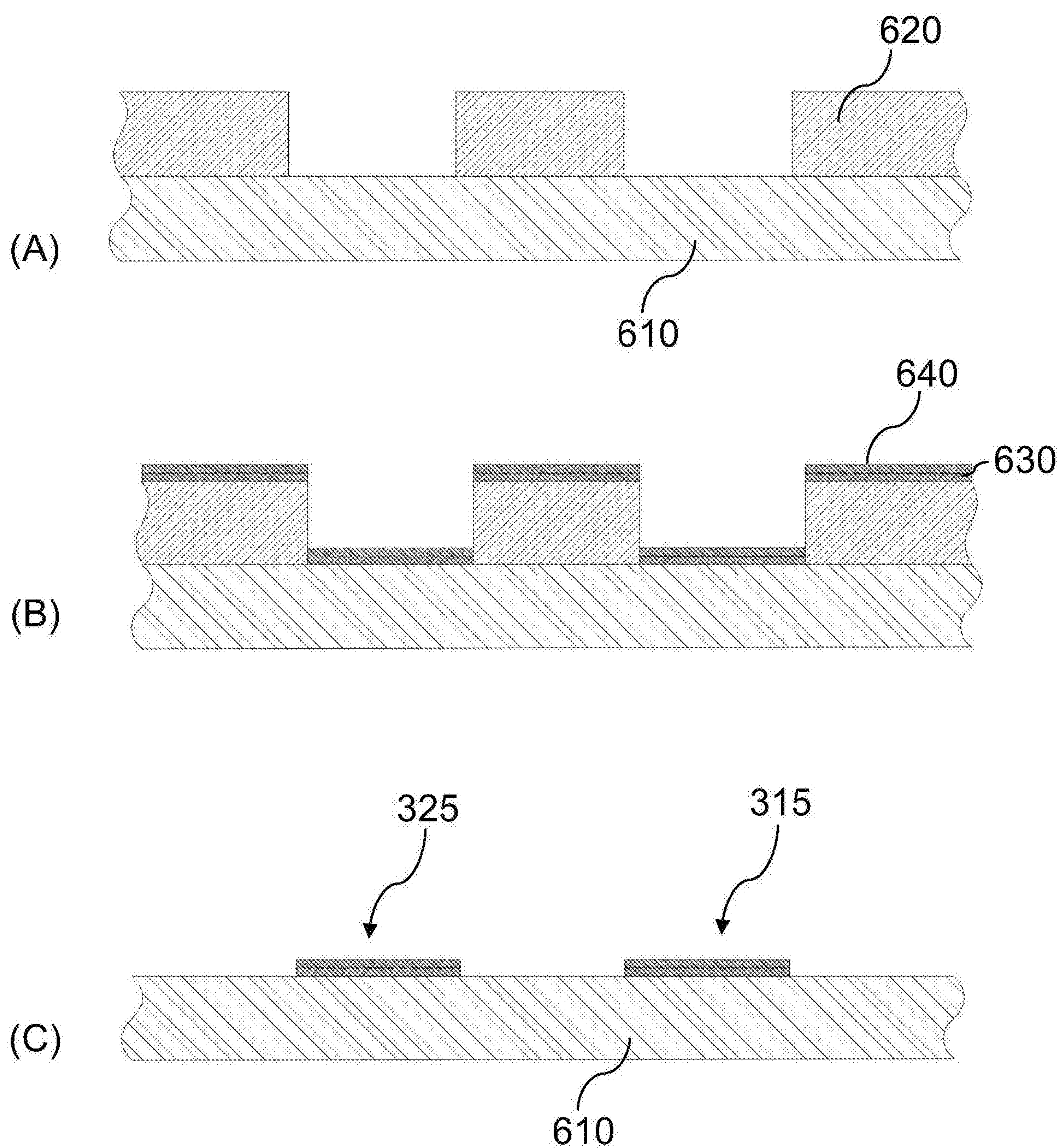


Fig. 6

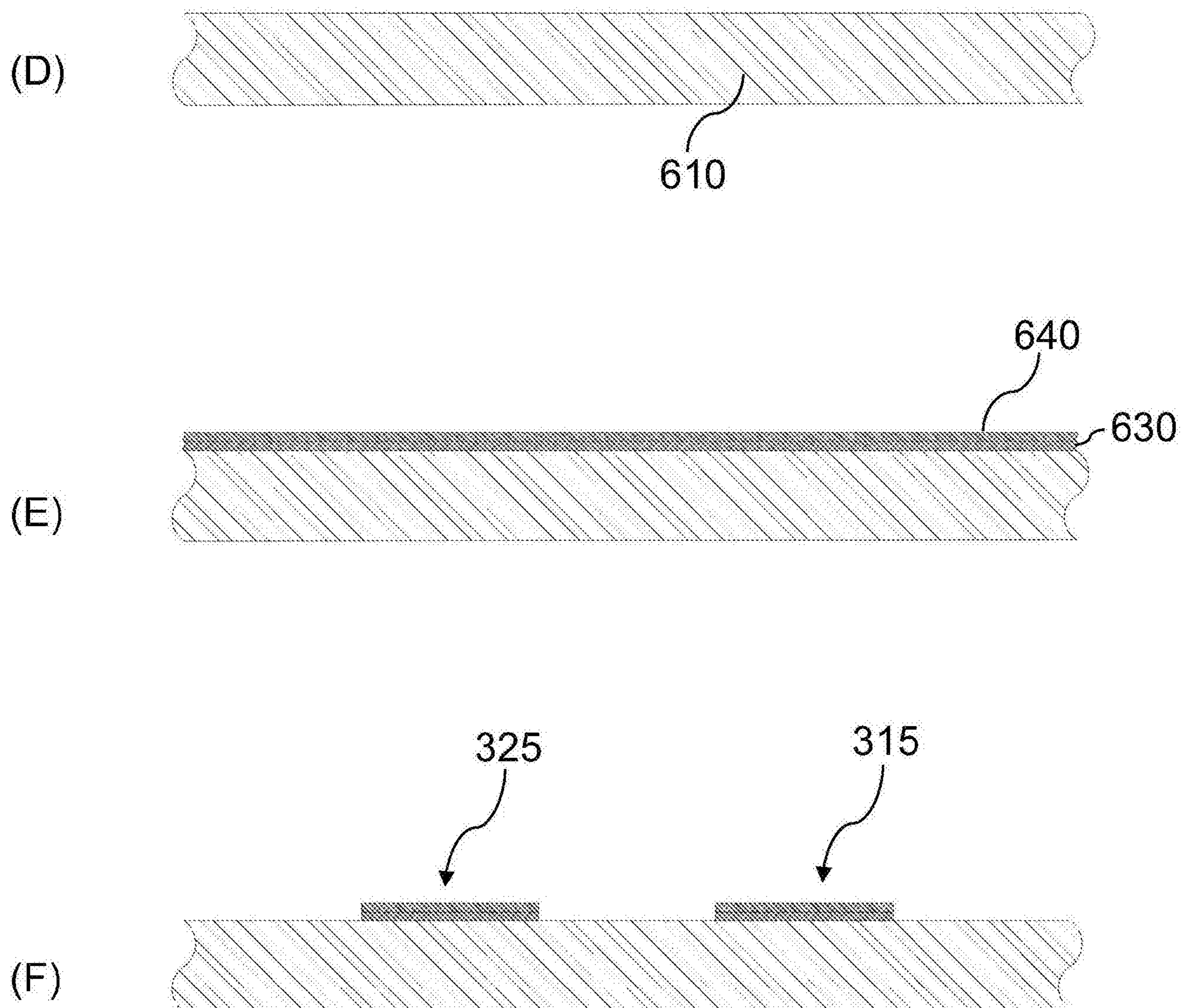


Fig. 6

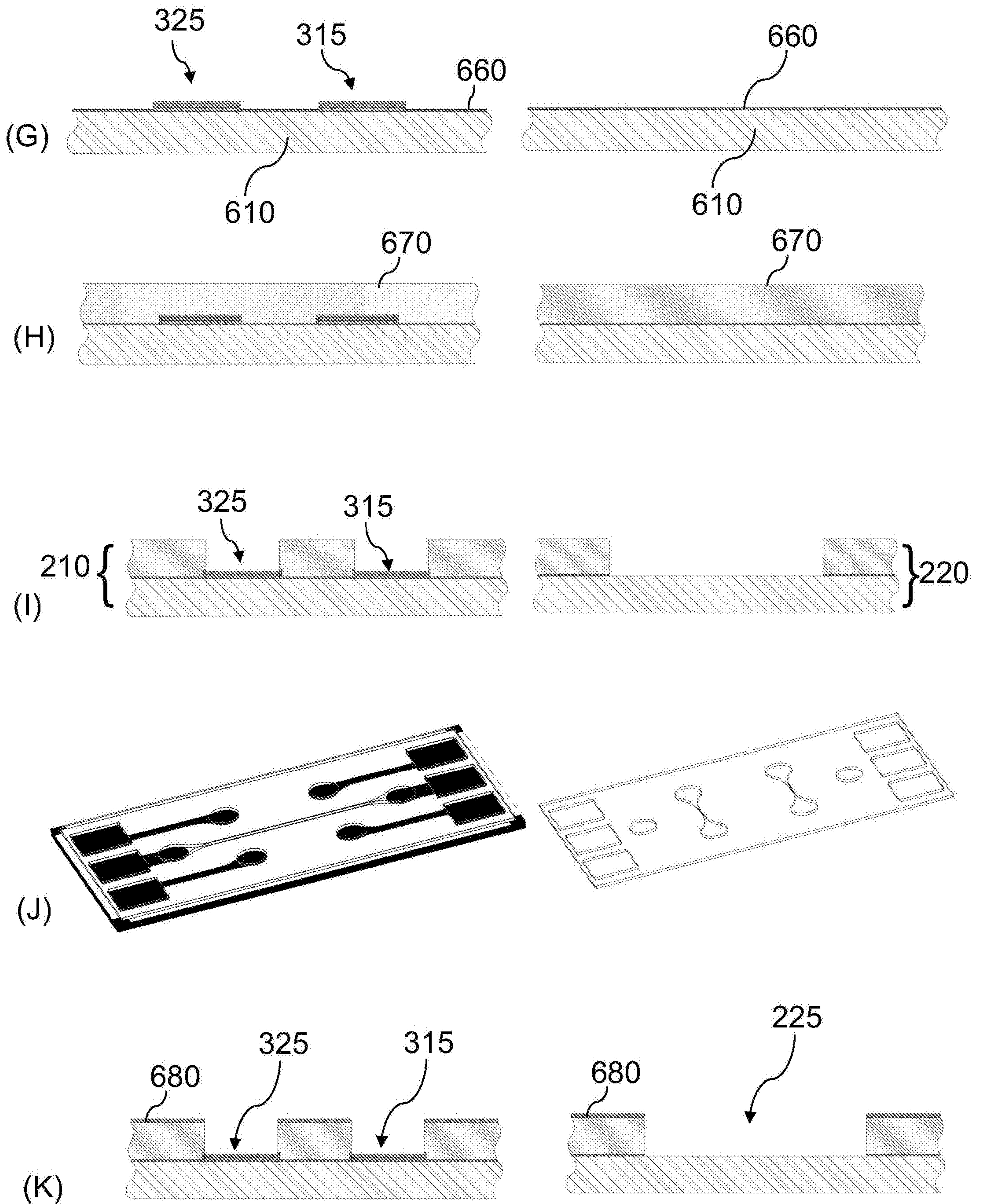


Fig. 6

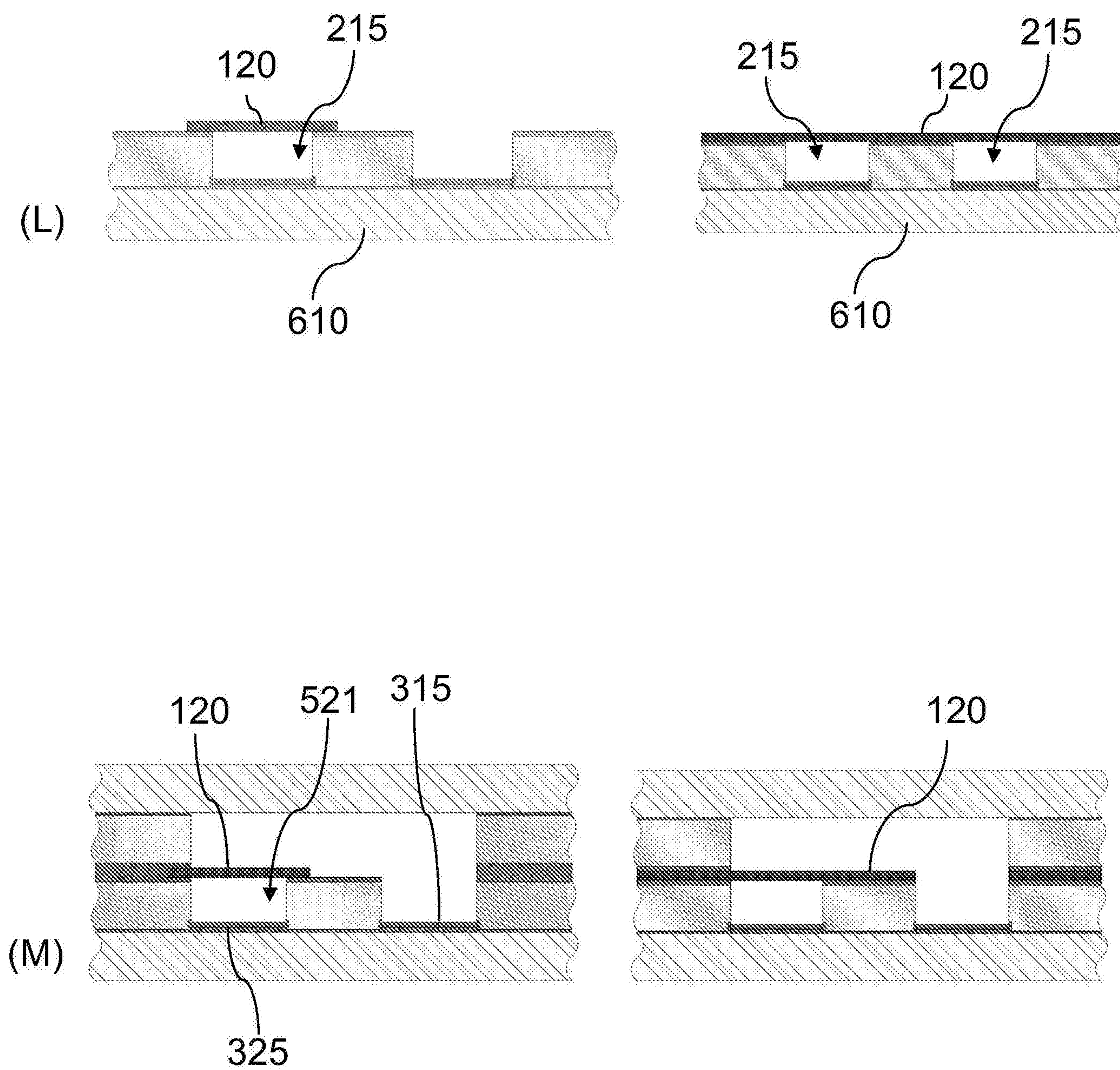


Fig. 6

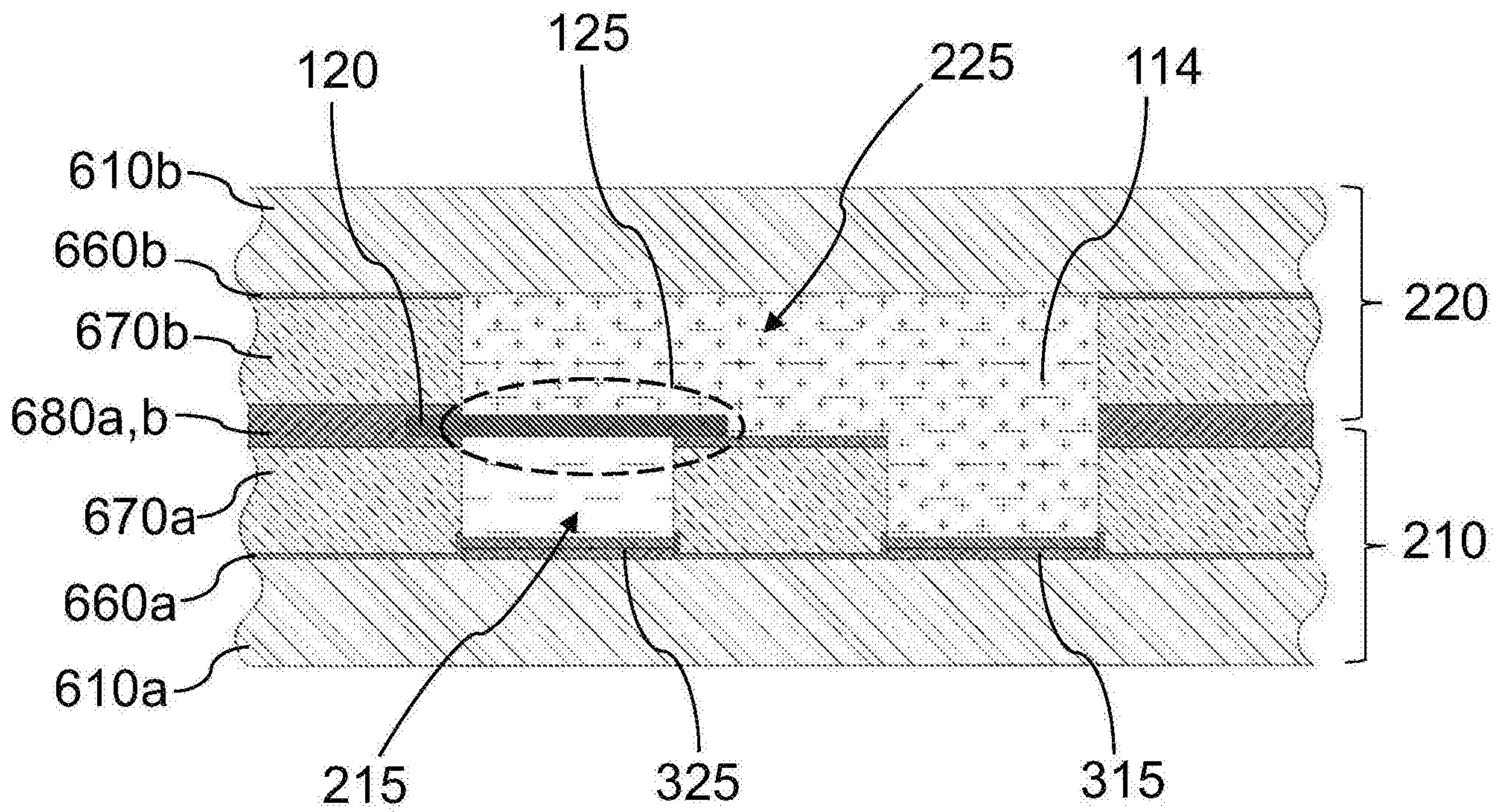


Fig. 7A

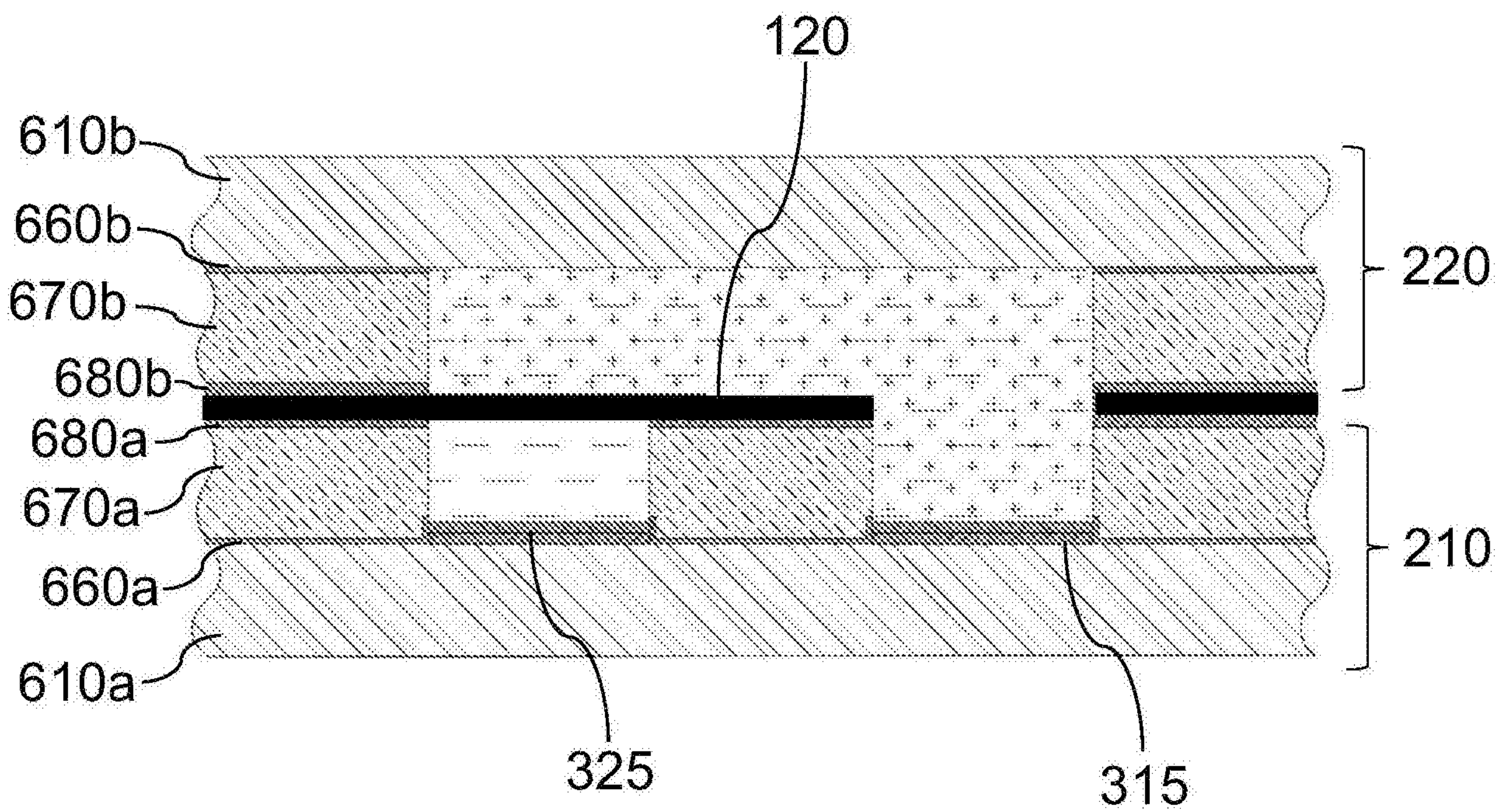


Fig. 7B