



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

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

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : G01N 27/327, 27/40, C12M 1/40 C12Q 1/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/10560 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. Mai 1994 (11.05.94)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT93/00168 (22) Internationales Anmeldedatum: 29. Oktober 1993 (29.10.93) (30) Prioritätsdaten: A 2142/92 29. Oktober 1992 (29.10.92) AT (71)(72) Anmelder und Erfinder: URBAN, Gerald [AT/AT]; Rembrandtstrasse 19, A-1020 Wien (AT). JOBST, Gerhard [AT/AT]; Talstrasse 122, A-3491 Strass (AT). JACHIMOWICZ, Artur [AT/AT]; Markomannenstrasse 18/4/8, A-1220 Wien (AT). SVASEK, Peter [AT/AT]; Hafengasse 1/3, A-1030 Wien (AT). RAKOHL, Manfred [AT/AT]; Breitenfurterstrasse 453, A-1238 Wien (AT). (74) Anwälte: KRETSCHMER, Adolf usw. ; Schottengasse 3a, A-1014 Wien (AT).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: SENSOR FOR DETECTING BIOLOGICALLY DECOMPOSABLE SUBSTANCES (54) Bezeichnung: SENSOR ZUR ERFASSUNG VON BIOLOGISCH UMSETZBAREN SUBSTANZEN (57) Abstract <p>A sensor which detects biologically, in particular enzymatically, decomposable substances in a biological substrate by means of an electrode (2) and at least one membrane which covers the electrode (2), has at least three membranes (3, 4, 5, 6), of which at least two contain each at least one enzyme for reacting with the biological substance to be determined and/or a reactant for a reaction product of the enzymatic reaction. At least one additional membrane (3, 5) sets the distance between said membranes (4, 6) and/or is arranged as a permselective membrane.</p> (57) Zusammenfassung <p>Bei einem Sensor zur Erfassung von biologisch, insbesondere enzymatisch, umsetzbaren Substanzen eines biologischen Substrates mit einer Elektrode (2) und wenigstens einer die Elektrode (2) abdeckenden Membran, sind wenigstens drei Membranen (3, 4, 5, 6) vorgesehen, von welchen wenigstens zwei jeweils wenigstens ein Enzym für die Umsetzung der zu bestimmenden biologischen Substanz und/oder einen Reaktanten für ein Umsetzungsprodukt der enzymatischen Umsetzung enthalten, wobei wenigstens eine weitere Membran (3, 5) für die Einstellung eines Abstandes zwischen den vorgenannten Membranen (4, 6) und/oder als permselektive Membran angeordnet ist.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes die 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	Slowakenien
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

Sensor zur Erfassung von biologisch umsetzbaren Substanzen

5 Die Erfindung bezieht sich auf einen Sensor zur Erfassung von biologisch, insbesondere enzymatisch, umsetzbaren Substanzen eines biologischen Substrates mit einer Elektrode und wenigstens einer die Elektrode abdeckenden Membran.

10 Sensoren der eingangs genannten Art sind beispielsweise als Glucosesensoren bereits vorgeschlagen worden. Eine besonders geeignete Art der Bestimmung von Glucose ist hierbei die enzymatische Umsetzung der Glucose mit Glucoseoxidase, bei welcher unter Verbrauch von Sauerstoff Gluconolacton und Wasserstoffperoxid gebildet wird. Das auf diese Weise gebildete Wasserstoffperoxid läßt sich an einer Anode unter Ableitung von
15 Elektronen zu Sauerstoff rückbilden, wobei der Anodenstrom gemessen werden kann und als Maß für die durch die Glucoseoxidase umgesetzte Glucose angesehen werden kann. Analog sind andere biologische bzw. enzymatische Umsetzungen denkbar, bei welchen das enzymatische Umsetzungsprodukt zur Gewinnung eines
20 entsprechenden Signals an einer Elektrode herangezogen werden kann.

25 Wenn ein derartiger Sensor, welcher prinzipiell in vivo oder in vitro verwendbar sein soll, in vivo Verwendung findet, muß naturgemäß dafür Sorge getragen werden, daß kritische Umsetzungsprodukte, wie beispielsweise Wasserstoffperoxid, nicht in das Substrat bzw. Meßmedium gelangen, sondern tatsächlich an der Elektrode unter Elektronenabgabe zersetzt werden können. Um in solchen Fällen sicherzustellen, daß eine Rückdiffusion von H_2O_2 in das biologische Substrat ausgeschlossen
30 werden kann, wurde bereits eine zusätzliche, Katalase enthaltende Membran vorgeschlagen. Gleichfalls bekannt sind Multienzymmembranen für komplexe Umsetzungen.

35 Die Erfindung zielt nun darauf ab, einen Sensor der eingangs genannten Art dahingehend weiterzubilden, daß bei hohen Meßsignalen und guter Linearität über einen großen Konzentrati-

onsbereich auch über die zu erwartende Lebensdauer der Enzymmembranen weitestgehend konstante und reproduzierbare Meßergebnisse erzielt werden können.

5

10

15

20

25

30

35

Zur Lösung dieser Aufgabe ist der erfindungsgemäße Sensor im wesentlichen dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens drei Membranen vorgesehen sind, von welchen wenigstens zwei jeweils wenigstens ein Enzym für die Umsetzung der zu bestimmenden biologischen Substanz und/oder einen Reaktanten für ein Umsetzungsprodukt der enzymatischen Umsetzung enthalten und daß wenigstens eine weitere Membran für die Einstellung eines Abstandes zwischen den vorgenannten Membranen und/oder als permselektive Membran angeordnet ist. Dadurch, daß zwei voneinander getrennte Membranen vorgesehen sind, welche jeweils wenigstens ein Enzym für die Umsetzung der zu bestimmenden biologischen Sustanz bzw. einen Reaktanten für ein Umsetzungsprodukt der enzymatischen Umsetzung enthält, wird es möglich, die Umsetzung bei Verwendung bekannter permselektiver Membranen so zu steuern, daß eine Rückdiffusion in das Substrat verhindert werden kann und daß gleichzeitig eine hohe Empfindlichkeit erreicht wird. Insbesondere dann, wenn beispielsweise in der zweiten Membran ein Reaktant für das Umsetzungsprodukt der enzymatischen Umsetzung vorgesehen ist, wird es möglich, das Reaktionsprodukt eines derartigen Reaktanten mit dem Umsetzungsprodukt der enzymatischen Reaktion zu speichern und auf diese Weise ein akkumuliertes Signal nach bestimmten Zeitintervallen zu gewinnen. Bei Verwendung von jeweils voneinander verschiedenen Enzymen in voneinander getrennten Membranen wird es möglich, in einer Membran die gewünschte enzymatische Umsetzung zur Bildung des die Messung an der Elektrode ermöglichenden Umsetzungsproduktes und in der zweiten Membran eine Reaktion durchzuführen, welche eine Rückdiffusion des Umsetzungsproduktes ohne Zersetzung desselben in das umgebende Substrat gleichfalls verhindert. Dadurch, daß nun wenigstens eine weitere Membran für die Einstellung eines Abstandes zwischen den vorgenannten Membranen oder als permselektive oder semipermeable Membran angeordnet ist, wird

die Möglichkeit geschaffen, die Empfindlichkeit wesentlich zu steigern und gleichzeitig die Meßwerte zu linearisieren und über die Zeit ohne Nachkalibrierung vergleichbare Meßergebnisse zu erhalten. Insbesondere dann, wenn als Enzym eine Oxidase oder Peroxidase, insbesondere Glucoseoxidase oder Lactatoxidase, eingesetzt wird, und weiters, wie es einer bevorzugten Weiterbildung entspricht, eine Katalase enthaltende Membran in größerem Abstand von der Elektrode angeordnet ist als eine Oxidase enthaltende Membran, ergibt sich durch die Einstellbarkeit dieses Abstandes zwischen den beiden Membranen die Möglichkeit, das erhältliche Signal zu optimieren und sicherzustellen, daß der größere Teil des gebildeten Wasserstoffperoxides tatsächlich an der Anode zu Sauerstoff rückgebildet wird und nicht etwa unmittelbar den Rückweg über die Katalase enthaltende Membran unter Zersetzung des Wasserstoffperoxides zu Wasser und Sauerstoff nimmt. Die Umsetzung an der Anode führt bei Zersetzung eines Moleküles von Wasserstoffperoxid zu einem Molekül Sauerstoff, wohingegen die Katalasereaktion bei zwei Molekülen Wasserstoffperoxid lediglich ein Molekül Sauerstoff in das umgebende Substrat rücktreten läßt. Wenn somit die Glucoseoxidase ebenso wie beispielsweise eine Lactatoxidase jeweils unter Verbrauch eines Moleküles Sauerstoff ein Molekül Wasserstoffperoxid bildet, würde der Umstand, daß ein größerer Teil des umgesetzten Wasserstoffperoxides unter Einwirkung der Katalase direkt rückgewandelt wird, zu einer Abreicherung von Sauerstoff in der Umgebung führen und gleichzeitig naturgemäß zu einer wesentlichen Verringerung des Nutzsignales an der Anode, oder einer Verringerung des linearen Meßbereiches. Durch die Einstellung des Abstandes zwischen den beiden Membranen läßt sich somit ein größeres Signal messen und es wird gleichzeitig eine verbesserte und vergleichmäßigte Umsetzung in der die Oxidase enthaltenden Membran sichergestellt. Diese verbesserte Umsetzung bleibt auch dann voll erhalten, wenn bereits Teilbereiche der Oxidase enthaltenden Membran als verbraucht zu bezeichnen sind, da immer noch hinreichend Zeit für den Durchtritt des Wasserstoffperoxides zur Elektrode verbleibt und die

jeweils für die Rückdiffusion und die für die Umsetzung mit der Katalase zur Verfügung stehende Zeit im wesentlichen unverändert bleibt. Wenn zusätzlich, wie erfindungsgemäß vorgeschlagen, eine permselektive Membran Verwendung findet, läßt sich sicherstellen, daß zum einen lediglich die gewünschten Umsetzungsprodukte, wie beispielsweise H_2O_2 , bis zur Elektrode gelangen, so daß eine Vergiftung der Elektrode vermieden werden kann. Weiters läßt sich durch Verwendung derartiger permselektiver Membrane naturgemäß auch der Durchtritt von höhermolekularen Inhibitoren für die enzymatische Reaktion verhindern.

Eine besonders stabile und hohe Empfindlichkeit läßt sich erfindungsgemäß dadurch erreichen, daß die den Abstand zwischen den Enzyme enthaltenden Membranen bestimmende weitere Membran etwa 5 bis 250 %, vorzugsweise 50 bis 150 %, der Stärke der näher der Elektrode gelegenen, ein Enzym tragenden Membran be trägt.

Um sicherzustellen, daß an die Elektrode selbst lediglich die gewünschten Umsetzungsprodukte gelangen, ist die Ausbildung mit Vorteil so getroffen, daß die Elektrode von einer semipermeablen Membrane mit einer Ausschlußgrenze zwischen 50 und 150 Dalton abgedeckt ist.

Für einen ungestörten und sicheren Betrieb des Sensors über lange Zeiträume können besonders bevorzugte Materialien für die einzelnen Membranen eingesetzt werden. Mit Vorteil ist beispielsweise die Ausbildung so getroffen, daß die den Abstand zwischen den Enzyme tragenden Membranen bestimmende Membran aus Hydrogelen besteht, wobei weiters vorzugsweise die Enzyme tragenden Membranen aus radikalisch vernetzten Polymeren, insbesondere aus photovernetzten Polymeren bestehen. Insbesondere die Verwendung von radikalisch vernetzten Polymeren als Matrix für die Enzyme tragende Membranen hat hierbei den Vorzug, daß die Enzyme bei ihrem Einbau in die Membranen

besonders geschont werden und ihre hohe Aktivität ungehindert beibehalten.

5 Eine Verbesserung der Stabilität des Signals sowie eine größere Unabhängigkeit des Signals von der Sauerstoffkonzentration im Meßmedium läßt sich durch die Ausführung der den Abstand zwischen den beiden Enzymmembranen herstellenden Membran aus einem zwar für Gase, wie z.B. Sauerstoff, permeablen, für die umzusetzende Substanz, insbesondere Glucose aber
10 impermeablen Material, vorzugsweise Polysiloxanen, erreichen, wobei eine derartige Membran für den Durchtritt von Glucose Öffnungen aufweisen muß, die vorzugsweise größer als die Dicke der darunterliegenden Membran sind. In derartige Öffnungen kann eine sowohl für Sauerstoff als auch z.B. Glucose permeable Membran eingesetzt sein.
15

Eine Verbesserung der Stabilität der Enzyme in der Herstellung der Membranen läßt sich dadurch erreichen, daß die Enzyme mit polymeren Substanzen, wie z.B. Polyethylenglykol, in einer
20 Membranvorstufe gelöst bzw. dispergiert werden und in dieser Form bei der Herstellung der Membran eingesetzt werden.

Um, wie bereits eingangs erwähnt, auch bei überaus geringen Signalen reproduzierbare Meßwerte zu erlangen, kann es vorteilhaft sein, das Umsetzungsprodukt der enzymatischen Reaktion, beispielsweise über eine nachgeschaltete Reaktion mit einem Reaktanten zwischenzuspeichern und nur nach gewissen Zeitabständen eine Messung vorzunehmen. Mit Vorteil ist die
25 Ausbildung für diese Zwecke so getroffen, daß zwischen einer ein Enzym enthaltenden Membran und der Elektrode wenigstens eine einen Reaktanten für ein enzymatisches Umsetzungsprodukte enthaltende Membran angeordnet ist, wobei die Reaktion zwischen den genannten Reaktanten und dem enzymatischen Umsetzungsprodukt elektrisch reversierbar sein muß.
30

35 Insbesondere zur Messung von Glucose ist mit Vorteil die Ausbildung so getroffen, daß die Elektrode zur anodischen Um-

setzung von H_2O_2 in O_2 unter Ableitung von Elektronen ausgebildet ist, wobei als geeignete Materialien für eine derartige Elektrode Edelmetall, insbesondere Platin vorteilhaft sind. Die Arbeitselektroden können hierbei gegenüber einer Referenzelektrode polarisiert sein, wobei als Referenzelektrode beispielsweise eine Silber-Silberchlorid-Elektrode zum Einsatz gelangen kann.

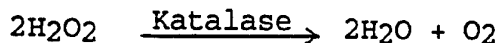
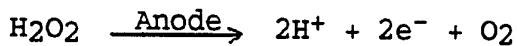
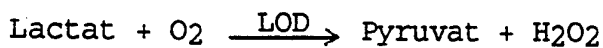
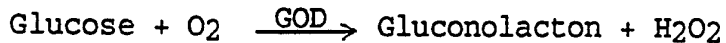
Um sicherzustellen, daß beispielsweise bei Verwendung von zwei Enzymen enthaltenden Membranen, bei welchen die äußere Membran Katalase enthält, tatsächlich die gewünschten Reaktanten in die innenliegende Membrane eintreten können, um auf diese Weise beispielsweise die Umsetzung einer Glucose mit Glucoseoxidase zu gewährleisten und andererseits sicherzustellen, daß in der außenliegenden Membran zumindest gegebenenfalls rückdiffundierendes Wasserstoffperoxid enzymatisch zersetzt werden kann, ist die Ausbildung bevorzugt so getroffen, daß die außenliegende, Enzyme, insbesondere Katalase, enthaltende Membran für die höhermolekularen Umsetzungsprodukte einer innenliegenden, Enzyme tragenden Membran, insbesondere Glucosylacton oder Pyruvat, permeabel ist.

Die Erfindung wird nachfolgend an Hand von in der Zeichnung schematisch dargestellten Ausführungsbeispielen näher erläutert. In dieser zeigen Fig.1 einen Schnitt durch eine erste Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Sensors; Fig.2 eine schematische Darstellung der einzelnen Schichten des in Fig.1 dargestellten Sensors, wobei die wesentlichsten Umsetzungsreaktionen angedeutet sind; Fig.3 in einer zu Fig.1 ähnlichen Darstellung einen Schnitt durch eine abgewandelte Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Sensors; Fig.4 einen Schnitt durch eine insbesondere als Immunosensor geeignete Ausbildung eines erfindungsgemäßen Sensors und Fig.5 einen Schnitt durch eine abgewandelte Ausbildung eines Sensors.

Bei dem in den Fig.1 und 2 dargestellten Sensor ist auf einem Substrat 1 eine beispielsweise aus Platin bestehende Arbeits-

elektrode 2 angeordnet. Der Arbeitselektrode 2 unmittelbar benachbart ist eine semipermeable Membran 3, an welche ein Enzym, beispielsweise Glucoseoxidase oder Lactatoxidase enthaltende Membran 4 anschließt. An diese Membran 4 schließt eine weitere Membran 5 an, welche den Abstand zwischen der ersten, ein Enzym enthaltenden Membran 4 und einer zweiten ein weiteres Enzym, beispielsweise Katalase, enthaltenden Membran 6 zu vergrößern bestimmt ist. In Fig.1 sind weiters Isolierungen, beispielsweise aus einem Polyimid 7 angedeutet.

Die wesentlichen in dem Sensor gemäß Fig.1 und 2 ablaufenden Reaktionen sind folgende:



GOD ... Glucoseoxidase

LOD ... Lactatoxidase

Bei der Bestimmung von Glucose im Blut erfolgt in der Glucoseoxidase enthaltenden Membran 4 eine Umsetzung der Glucose mit Sauerstoff in Gluconolacton + Wasserstoffperoxid, während bei der Bestimmung von Lactat bei Einsatz von Lactatoxidase in der Membran 4 eine Umsetzung in Pyruvat und Wasserstoffperoxid erfolgt. Das Wasserstoffperoxid gelangt durch die semipermeable Membran 3 an die beispielsweise von Platin gebildete Anode, wobei an dieser Elektrode 2 eine Umsetzung des Wasserstoffperoxid erfolgt und der durch die freigesetzten Elektronen bewirkte Strom zu einem Meßsignal verarbeitet werden kann.

Um bei der Anwendung des Sensors in vivo zu verhindern, daß das das Meßsignal liefernde Wasserstoffperoxid wiederum in die Blutbahn gelangt ist die außenliegende, beispielsweise Kata-

lase enthaltende Membran 6 vorgesehen, in welcher eine Umsetzung von Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff erfolgt.

5 Um das Meßsignal und dessen Stabilität zu verbessern ist weiters eine zusätzliche Membran 5 vorgesehen, welche die Diffusion des in der Membran 4 gebildeten Wasserstoffperoxid in die Katalase enthaltende Membran 6 verzögert, so daß relativ gesehen mehr Wasserstoffperoxidmoleküle zur Arbeitselektrode gelangen als derartige Moleküle in der Membran 6 wiederum abgebaut werden. Die Membran 5 weist hierbei eine Dicke auf, welche zwischen etwa 5 und 250 % der Stärke der näher der Elektrode gelegenen Membran 4 beträgt, so daß sich unmittelbar ergibt, daß die in der Zeichnung dargestellten relativen Abmessungen nicht maßstäblich sind.

15 Die der Elektrode 2 unmittelbar benachbarte semipermeable Membran 3 dient hierbei im wesentlichen dazu, zu verhindern, daß andere Moleküle als Wasserstoffperoxid an die Oberfläche der Elektrode gelangen und diese somit vergiften. Diese Wirkungsweise der Membran 3 ist hierbei in Fig.2 durch den Pfeil 8 angedeutet, wobei der Pfeil 8 beispielsweise Acetaminophen, Harnsäure od.dgl., darstellt. Diese Stoffe gelangen unverändert durch die Membranen 4, 5 und 6 und werden von der Membran 3 vor der Elektrode 2 zurückgehalten, um eine Vergiftung derselben zu verhindern.

20 Die Membran 5, deren Stärke in Abhängigkeit von den zu bestimmenden Stoffen und den weiteren Randbedingungen im Hinblick auf eine Optimierung des Signals gewählt wird, kann beispielsweise auch hydrophobe Eigenschaften aufweisen, so daß die Diffusion von Sauerstoff weniger behindert wird als die Diffusion von Glucose, so daß insgesamt im Bereich der Membran 4 immer für ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen Glucose und Sauerstoff gesorgt wird, um eine vollständige Umsetzung der Glucose sicherzustellen.

35

Anstelle von Katalase kann in der äußersten Membran 6 auch Peroxidase oder eine poröse leitfähige Membran vorgesehen sein, wobei in dieser Membran 6 jeweils sichergestellt sein muß, daß ein Abbau von Peroxid erfolgt. Bevor sie in einer porösen leitfähigen Membran kann somit das Wasserstoffperoxid elektrisch durch katalytische Spaltung abgebaut werden. Insgesamt bewirkt die Membran 5 eine Verflachung des Gradienten für die Diffusion von Wasserstoffperoxid durch bzw. an die Katalasemembran, so daß einerseits mehr Wasserstoffperoxid an die Elektrode 2 gelangt. Darüberhinaus erfolgt, wie aus den obigen wichtigsten Reaktionsgleichungen unmittelbar ersichtlich, an der Elektrode eine Umsetzung von 100 % des Sauerstoffes, während durch die Umsetzung in der Katalasemembran nur 50 % des ursprünglich vorhandenen Sauerstoffes wiederum nutzbar werden.

Bei der Ausführungsform gemäß Fig.3 sind die Bezugszeichen der vorangehenden Figuren beibehalten worden, wobei unmittelbar ersichtlich ist, daß bei dieser Ausführungsform eine der Membran 5 gemäß dem Beispiel der Fig.1 und 2 entsprechende Membran nicht vorgesehen ist. Auch bei diesem Sensor sind zwei voneinander verschiedene Enzyme enthaltende Membranen 4 und 6 vorgesehen, wobei beispielsweise ebenfalls die zu Fig.1 und 2 erläuterten Reaktionen ablaufen können. Anstelle von Enzymen kann jedoch bei der Ausführungsform gemäß Fig.3 die Membran 4 einen Reaktanten für ein enzymatisches Umsetzungsprodukt enthalten, so daß die Membran 4 als Speichermedium für eine zu messende Größe eingesetzt werden kann, wobei das Umsetzungsprodukt in der außenliegenden Membran 6 entsteht. In vorteilhafter Weise wird bei dieser Ausführungsform zwischen den beiden oben erwähnten Schichten eine Membran, welche zwar für das Umsetzungsprodukt der enzymatischen Reaktion auf der Substratseite permeabel, für das zu akkumulierende Reaktionsprodukt des zweiten Reaktanten jedoch impermeabel ist, eingesetzt.

5 Eine wesentliche Verbesserung der Stabilität der Enzyme bei der Herstellung der Membranen läßt sich dadurch erreichen, daß die Lösung, welche die Membranenvorstufe darstellt und das Enzym enthält, abgesehen von Wasser und dem Enzym überwiegend polymere Komponenten enthält. Vorzugsweise sind die Membranbildner in einer Mischung aus Wasser und Polyethylenglycol gelöst und das Enzym darinnen ebenfalls gelöst bzw. dispergiert.

10 Bei der Ausführungsform gemäß Fig.4 sind die Bezugszeichen der vorangegangenen Figuren beibehalten worden, wobei ersichtlich ist, daß bei dieser spezifischen Ausführungsform eine der semipermeablen Membran 3 entsprechende Membran zur Abdeckung der Elektrode 2 nicht vorgesehen ist. Die in dieser spezifischen Ausführungsform vorgesehene Membran 5 ist für Gase wie O₂ und H₂O₂ permeabel nicht jedoch für die Reaktanten und stellt somit in bezug auf die Reaktanten eine Sperrschicht zwischen den Membranen 4 und 6 dar. Bei dieser spezifischen Ausführungsform wird in der Membran 4 eine Akkumulation der Umsetzungsprodukte erreicht und in der Membran 6 sind Reaktanten für die Umsetzungsprodukte enthalten. Eine derartige Ausbildung ist besonders vorteilhaft für die Bestimmung von Antigen/Antikörperreaktionen, wobei die Enzymaktivität in der Enzyme enthaltenden Membran durch geeignete Immobilisierung unter Verwendung von Antigen/Antikörperreaktionen den Antigenen oder Antikörpern proportional geführt wird.

Fig.5, welche eine spezifische Ausführungsform darstellt, weist eine nicht einheitliche Membran 5 auf. Die Membran 5 besteht hierbei aus einer hydrophoben siebartig ausgebildeten Membran 9, welche lediglich für Gase durchlässig ist. In die Öffnungen der siebartigen Membran 9 sind bei dieser Ausbildungsform Pfropfen 10 eingesetzt, welche insbesondere aus Polyhydroxyethylmethacrylat bestehen und welche Pfropfen sowohl für Gase als auch für Glucose durchlässig sind. Die weiteren Bezugszeichen der Fig.5 wurden wie in der Fig.1 gewählt. Durch den kanalisierten Durchtritt der zu bestimmenden Sub-

stanzen in die Enzyme enthaltenden Membran wird die Umsetzung über lange Zeit vergleichmäßig.

5 Für die nachfolgenden Ausführungsbeispiele werden folgende Substanzen verwendet:

Precursor 1:

19% Hydroxyethylmethacrylat

19% Poly-Hydroxyethylmethacrylat

10 1% Tetraethylenglycolmethacrylat

1% w.w'-Dimethoxy w-Phenylacetophenon

30% Polyethylenglycol

30% Wasser

Precursor 2:

15 96% Precursor 1 und 4% Glukoseoxidase

Precursor 3:

98% Precursor 1 und 2% Lakatatoxidase

20 Precursor 4:

98% Precursor 1 und 2% Katalase

Precursor 5:

96% Precursor 1 und 2% Glutamatoxidase und 2% Glutaminase

25

Precursor 6:

96% Precursor 1 und 2% Glutamatoxidase und 2% Catalase

Precursor 7:

30 49% PS851 (Poly(Dimethyl- 2-3% Methyl Methacryloxypropyl Siloxan); Petrarch), 1% w.w'-Dimethoxy w-Phenylacetophenon und 50% Toluol

Precursor 8:

35 5% Gelatin

15% Silikondispersion SLM (Wacker)

80% Wasser

Precursor 9:

98% Precursor 8 und 2% Glukoseoxidase

5

Precursor 10:

99% Precursor 8 und 1% Katalase

Precursor 11:

10

98% Precursor 1 und 2% Meerrettichperoxidase

Precursor 12:

99.8% Precursor 1 und 0,2% Methacrylsäure g-Aminopropylester

15

Beispiel 1: Integrierter Glucose/Laktat Sensor für den in-vivo Einsatz

20

Als elektrochemischer Transducer wird eine flexible Elektrodenstruktur verwendet welche in Urban G., Jobst G., Keplinger F., Aschauer E., Jachimowicz A., Kohl F. (1992); Biosensors & Bioelectronic 7:733-739 beschrieben ist und zwei Platin-Arbeits Elektroden mit einer Fläche von 0,4 mm² welche mit einer elektropolymerisierten permselektiven Schicht versehen sind, einer Platin-Gegenelektrode und einer Silber/Silberchlorid Quasireferenzelektrode enthält, welche auf einer flexiblen Polymerfolie vorliegen und mit einem photostrukturierbaren Polyimidisolationsslack isoliert sind.

25

30

35

Der Wafer, welcher eine Vielzahl oben beschriebener Elektrodenstrukturen enthält, wird mit Precursor 2 mittels eines Schleuderverfahrens beschichtet. Durch eine Photomaske werden mittels eines Maskenjustiergerätes jene Arbeitselektroden mit ultraviolettem Licht eine Minute lang bestrahlt welche als Glukoseelektroden ausgebildet werden sollen. Durch diesen Prozeß bildet sich ein unlösliches polymeres Netzwerk aus, welches die enthaltenen Enzyme physikalisch einschließt. Die nicht belichteten und damit nicht vernetzten Teile des

Precursors werden in einer Mischung aus Polyethylenglycol/Wasser 1:1 mit Ultraschallunterstützung wieder weggelöst.

5 Der beschriebene Vorgang wird mit Precursor 3 unter Verwendung einer Photomaske welche die Ausformung der Laktatoxidase-membran auf der zweiten Arbeitselektrode erlaubt wiederholt.

10 Unter Verwendung von Precursor 1 und Wiederholung des beschriebenen Vorgangs unter Verwendung einer Photomaske welche die Ausformung von Membranen auf den zwei bereits bestehenden Enzymmembranen erlaubt, wird die, einen Abstand einstellende, Membran erzeugt.

15 Die Katalasemembran wird nach selbigem Verfahren unter Verwendung von Precursor 4 hergestellt und bedeckt den gesamten Multisensor.

20 Durch Variation der Umdrehungszahl beim Schleuderbeschichten lassen sich in einfacher Weise die Schichtdicken der Membranen steuern welche im beschriebenen Beispiel 4 μm für die Glukoseoxidase-membran, 6 μm für die Laktatoxidase-membran, 6 μm für die Zwischenmembran und 6 μm für die Katalasemembran betragen.

25 Beispiel 2: Glutamatunabhängiger Glutaminsensor

30 Als elektrochemischer Transducer findet eine mit einer permselektiven Schicht versehene Platinarbeitselektrode mit einer Fläche von 0,96 mm² Verwendung welche zusammen mit einer Platingegelektrode und einer Silber/Silberchlorid Quasireferenz-elektrode mittels dünnschichttechnologischer Verfahren auf Siliziumwafern hergestellt wird.

35 Auf die Arbeitselektroden des Wafers, welcher eine Vielzahl oben beschriebener Elektrodenstrukturen enthält, werden mittels einer computergesteuerten Nanoliterdosiereinrichtung und einem computergesteuerten X-Y Tisch welcher die Dosiereinrich-

5 tung über die einzelnen Arbeitselektroden positioniert, 80 nl Precursor 5 aufgebracht und anschließend der ganze Wafer ultraviolettem Licht ausgesetzt. Nach dem Herauslösen nicht vernetzten Precursormaterials mit einer Mischung von Polyethylenglycol/Wasser 1:1 verbleibt eine Enzymmembran mit einer Schichtdicke von 8 μm . Dieser Prozeß wird mit 40 nl Precursor 1 und 40nl Precursor 6 wiederholt welches zur Ausbildung der gewünschten Zwischenschicht mit einer Dicke von 4 μm und zur Ausbildung der gewünschten Glutamat und Wasserperoxid zerstörenden Membran mit einer Dicke von 4 μm führt.

10 Die Sensoren gemäß diesem Ausführungsbeispiel zeigen die erwünschte Selektivität gegen Glutamin auch in Beisein von Glutamat, wodurch keine gleichzeitige Glutamatbestimmung notwendig ist, um zur korrekten Glutaminkonzentration zu gelangen.

Beispiel 3: Glukosesensor mit Peroxidaseableitung

20 Als elektrochemischer Transducer findet eine mittels konventioneller Siebdrucktechnologie hergestellte Elektrodenanordnung Verwendung, welche Arbeitselektroden aus einer Mischung von Graphitpaste mit Meerretichperoxidase und Bindemittel und Silberchloridgegenelektroden aufweist. Auf die Arbeitselektroden wird mittels Siebdruckverfahren der thixotrope Precursor 9 aufgebracht und bei Raumtemperatur getrocknet. In gleicher Weise werden die Zwischenmembran aus Precursor 8 und die Katalasemembran aus Precursor 10 hergestellt.

30 Bei Sensoren gemäß diesem Ausführungsbeispiel wird das elektrische Signal nicht durch Oxidation von Wasserstoffperoxid gewonnen sondern durch Reduktion des der Graphitelektrode anhaftenden Enzyms Merretichperoxidase welche ihrerseits von Wasserstoffperoxid oxidiert wird.

35

Beispiel 4: Affinitätssensor mit Zwischenproduktakkumulation

Als elektrochemischer Transducer findet die in Beispiel 2 beschriebene Elektrodenstruktur Verwendung. Über der Arbeitselektrode, welche in diesem Fall keine permselektive Membran aufweist, wird gemäß dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren unter Verwendung von Precursor 11 eine 3 µm dicke Meerretichperoxidase-Membran ausgebildet. Diese Membran wird mit einer 1%igen wäßrigen Lösung von 2,5-Dihydroxy Benzoessäure getränkt und ihrerseits mit einer 2 µm dicken gaspermeablen Membran welche aus Precursor 7 erzeugt wird bedeckt. Unter Verwendung von Precursor 12 wird nach selbigem Verfahren über der gaspermeablen Membran eine dritte ca. 0,5 µm dicke Membran ausgebildet an deren primäre Aminogruppen mittels Glutardialdehydkopplung der gewünschte Antikörper oder Antigen gebunden wird. Die enzymatische Aktivität dieser Membrane bildet sich erst im Laufe des Affinitätstests aus, welcher als klassischer "Sandwich" Test mit Glukoseoxidase als Markerenzym ausgeführt ist.

] -Anti Hasen IgG <-> Hasen IgG <-> Anti-Hasen IgG--GOD
Konjugat

Bei Sensoren gemäß diesem Ausführungsbeispiel wird das elektrische Signal durch Reduktion der p-Benzochinoncarbonsäure, welche ihrerseits durch Wasserstoffperoxid unter der katalytischen Wirkung von Merretichperoxidase oxidiert wird, erhalten.

Vorteilhaft an der beschriebenen Anordnung ist die Möglichkeit das entstehende oxidierte Zwischenprodukt zu akkumulieren indem die verwendete Arbeitselektrode stromlos gehalten wird. Nach Verstreichen einer gewissen Zeitdauer, mittels welcher auf einfachste Weise die Empfindlichkeit des Sensors gesteuert werden kann, wird eine entsprechend kathodische Polarisationsspannung an die Arbeitselektrode angelegt und damit das Chinon

reduziert, wobei gleichzeitig das Meßsignal gewonnen wird und der Sensor in seinen Ausgangszustand zurückkehrt.

5

10

15

20

25

30

35

Patentansprüche:

- 5 1. Sensor zur Erfassung von biologisch, insbesondere enzymatisch, umsetzbaren Substanzen eines biologischen Substrates mit einer Elektrode und wenigstens einer die Elektrode abdeckenden, mehrschichtigen Membran, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens drei Membranen (3,4,5,6) vorgesehen sind, von welchen wenigstens zwei jeweils wenigstens ein Enzym für die Umsetzung der zu bestimmenden biologischen Substanz und/oder 10 einen Reaktanten für ein Umsetzungsprodukt der enzymatischen Umsetzung enthalten und daß wenigstens eine weitere Membran (3,5) für die Einstellung eines Abstandes zwischen den vorgenannten Membranen (4,6) und/oder in an sich bekannter Weise als permselektive Membran angeordnet ist.
- 15 2. Sensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Enzyme eine Oxidase oder Peroxidase, insbesondere Glucoseoxidase oder Lactatoxidase, eingesetzt wird.
- 20 3. Sensor nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine Katalase enthaltende Membran (6) in größerem Abstand von der Elektrode angeordnet ist als eine Oxidase enthaltende Membran (4).
- 25 4. Sensor nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die den Abstand zwischen den Enzyme enthaltenden Membrane (4,6) bestimmende weitere Membran (5) etwa 5 bis 250 %, vorzugsweise 50 bis 150 % der Stärke der näher der Elektrode (2) gelegenen ein Enzym tragenden Membran (4) beträgt.
- 30 5. Sensor nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektrode (2) von einer semipermeablen Membrane (3) mit einer Ausschlußgrenze zwischen 50 und 150 Dalton abgedeckt ist.
- 35 6. Sensor nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die den Abstand zwischen den Enzyme tragenden

Membranen (4,6) bestimmende Membran (5) aus Hydrogelen besteht.

5 7. Sensor nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzyme tragenden Membranen (4,6) aus radikalisch vernetzten Polymeren, insbesondere aus photovernetzten Polymeren bestehen.

10 8. Sensor nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen einer ein Enzym enthaltenden Membran (6) und der Elektrode (2) wenigstens eine einen Reaktanten für ein enzymatisches Umsetzungsprodukt enthaltende Membran (4) angeordnet ist, wobei die Reaktion zwischen den genannten Reaktanten und dem enzymatischen Umsetzungsprodukt elektrisch
15 reversierbar sein muß.

9. Sensor nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektrode (2) zur anodischen Umsetzung von H_2O_2 in O_2 unter Ableitung von Elektronen ausgebildet ist.

20 10. Sensor nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die außenliegende, Enzyme, insbesondere Katalase, enthaltende Membran (6) für die höhermolekularen Umsetzungsprodukte einer innenliegenden, Enzyme tragenden Membran (4), insbesondere Gluconolacton oder Pyruvat, permeabel
25 ist.

30

35

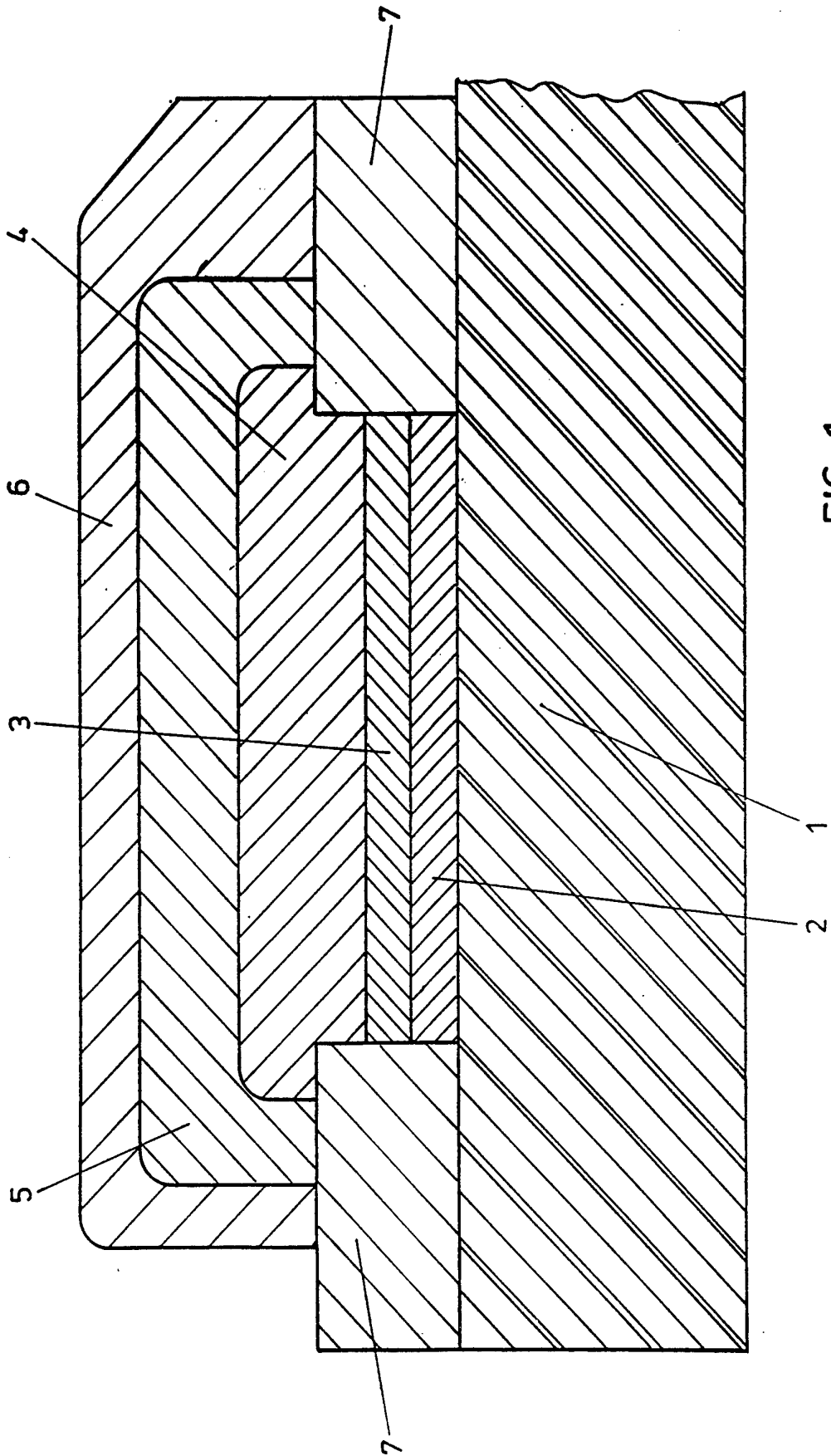


FIG. 1

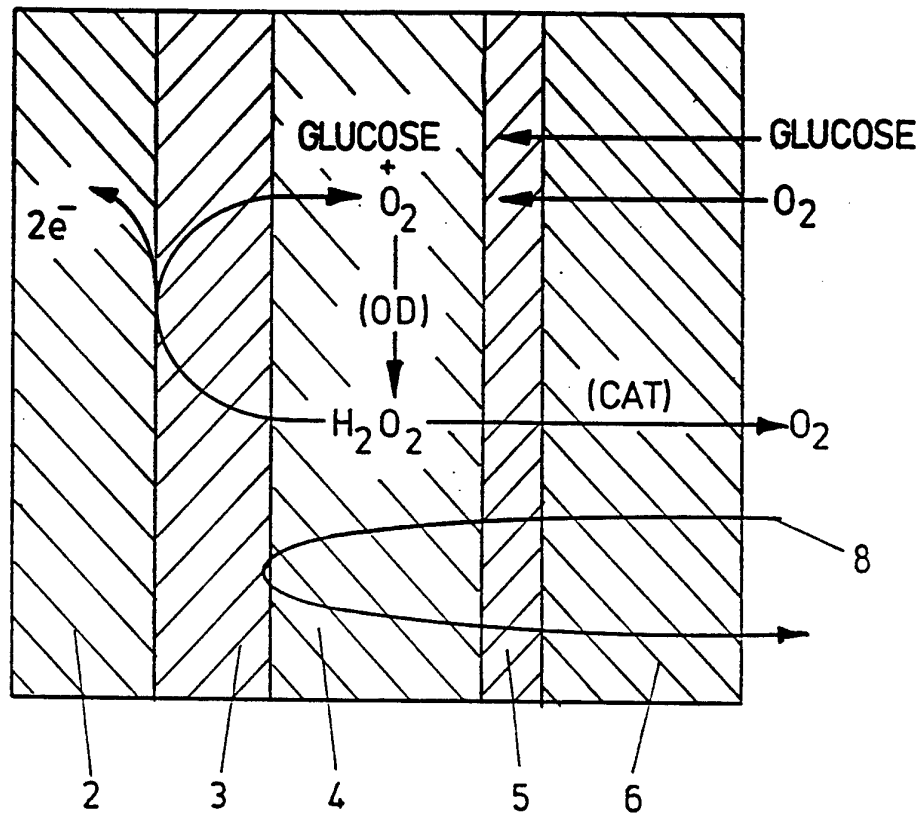


FIG. 2

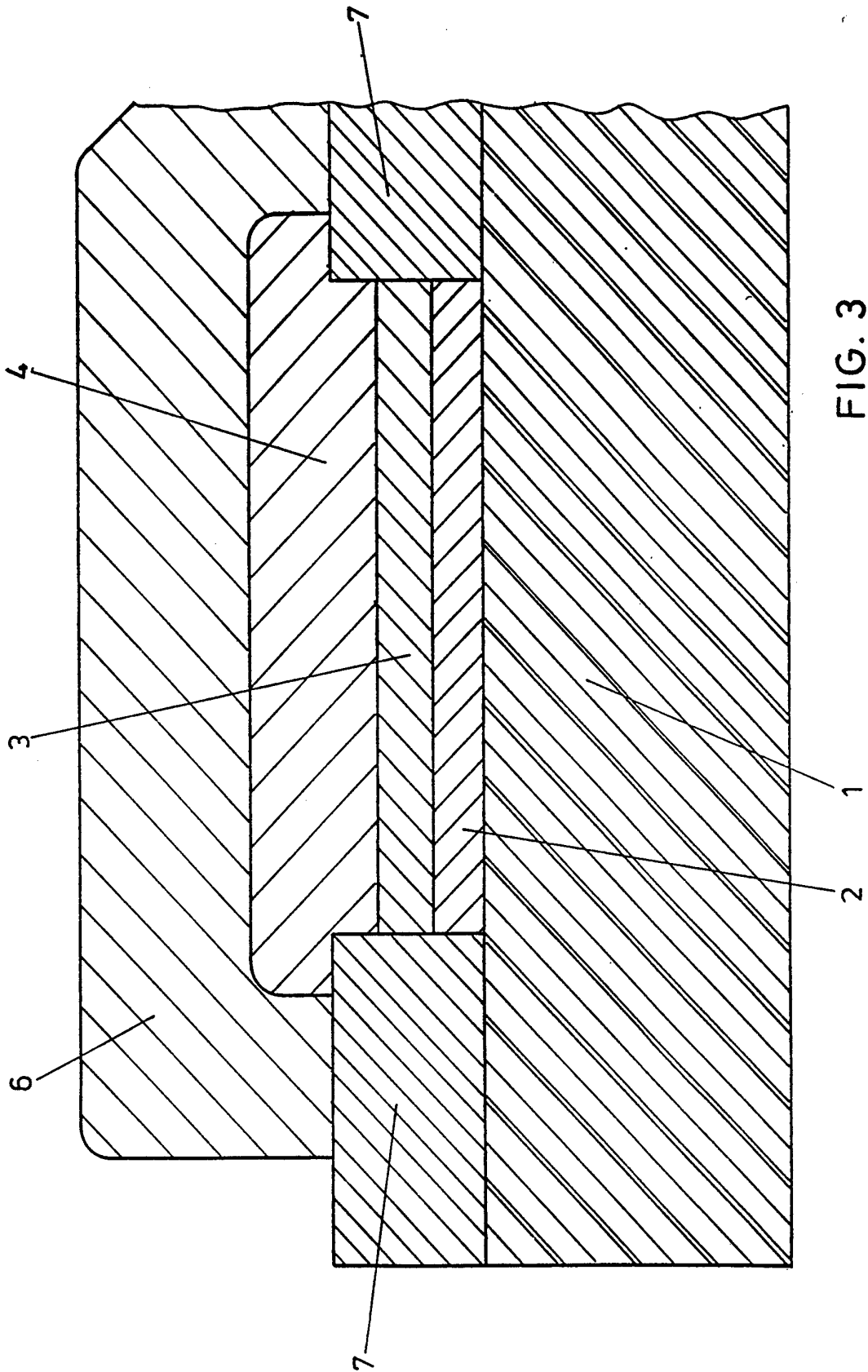


FIG. 3

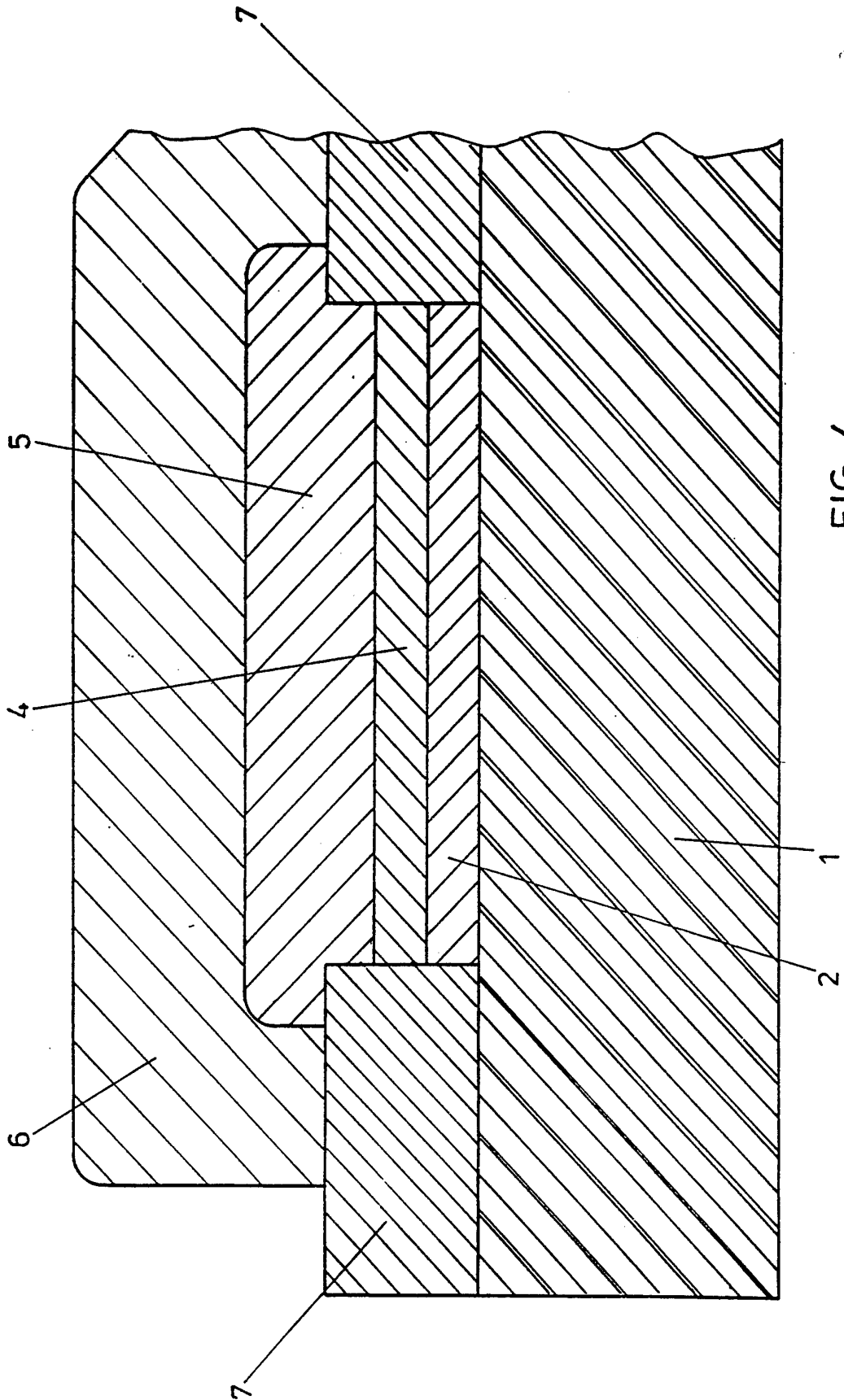


FIG. 4

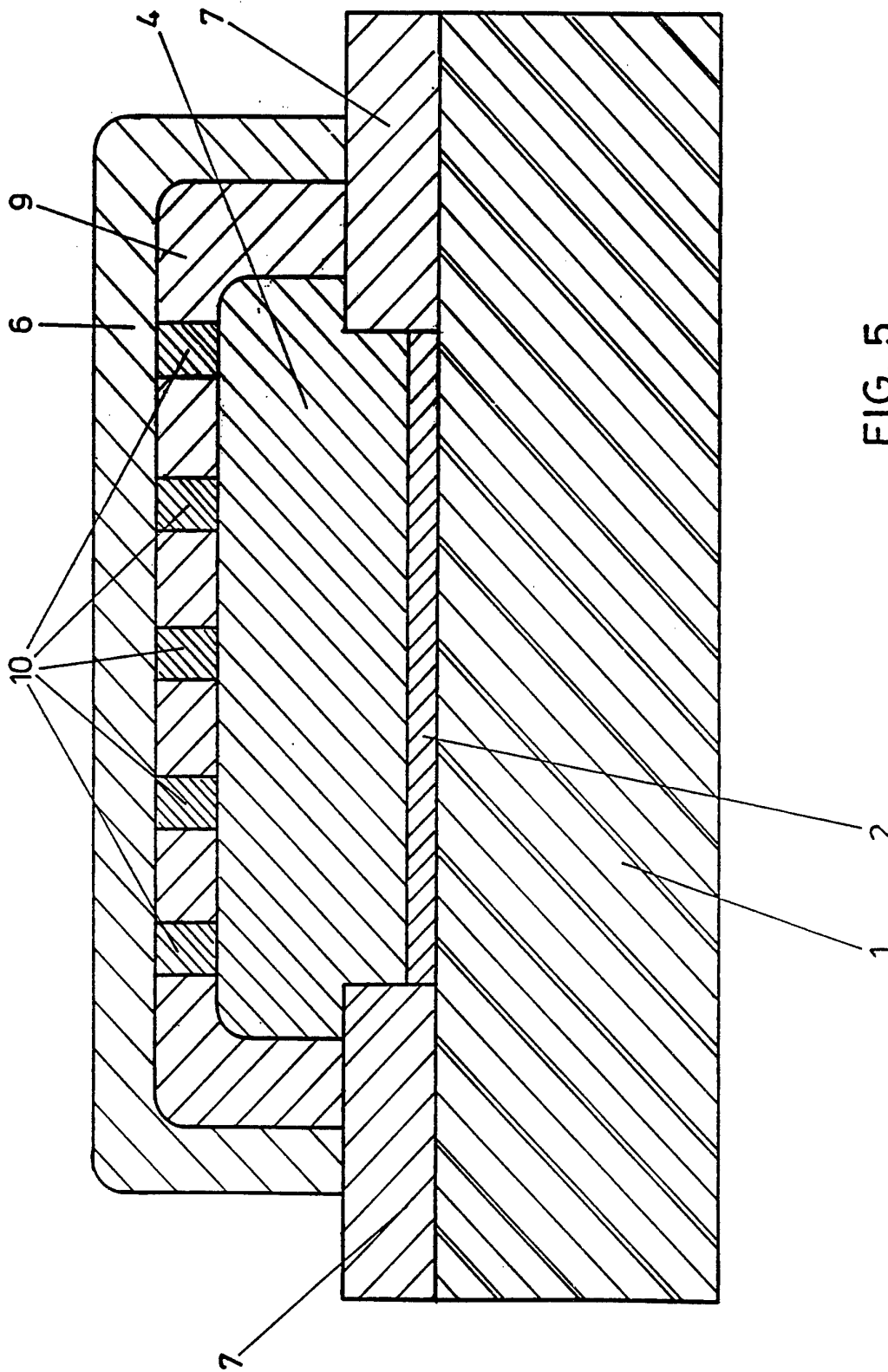


FIG. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int: onal Application No
PCT/AT 93/00168

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 G01N27/327 G01N27/40 C12M1/40 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 5 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	FR,A,2 614 422 (SMITHKLINE DIAGNOSTICS) 28 October 1988 see page 29, line 8 - page 35, line 9; claims; figure 14 ---	1-10
X	US,A,4 795 707 (Y.NIIYAMA ET AL.) 3 January 1989 Y see the whole document ---	1,2,8-10
Y	BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS vol. 7, no. 10, 1992 pages 733 - 739 G.URBAN ET AL. 'Miniaturized multi-enzyme biosensors antegrated with pH sensors on flexible polymer carriers for in vivo applications.' cited in the application A see the whole document ---	6,7
		6,7
		1,2,8-10

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

10 February 1994

Date of mailing of the international search report

18. 02. 94

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

Hitchen, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/AT 93/00168

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 216 577 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC.) 1 April 1987 see the whole document -----	1,2,4-10

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/AT 93/00168

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2614422	28-10-88	US-A- 4891104	02-01-90
		DE-A- 3813709	24-11-88
		GB-A- 2222681	14-03-90
		JP-A- 63290955	28-11-88
US-A-4795707	03-01-89	JP-A- 61128152	16-06-86
EP-A-0216577	01-04-87	AU-B- 605111	10-01-91
		AU-A- 6272986	19-03-87
		CA-A- 1244085	01-11-88
		DE-A- 3684394	23-04-92
		JP-A- 62067442	27-03-87

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. Aktenzeichen

PCT/AT 93/00168

<p>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 5 G01N27/327 G01N27/40 C12M1/40 C12Q1/00</p>		
<p>Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK</p>		
<p>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</p>		
<p>Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 5 C12Q</p>		
<p>Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen</p>		
<p>Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)</p>		
<p>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</p>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FR,A,2 614 422 (SMITHKLINE DIAGNOSTICS) 28. Oktober 1988 siehe Seite 29, Zeile 8 - Seite 35, Zeile 9; Ansprüche; Abbildung 14 ---	1-10
X	US,A,4 795 707 (Y.NIIYAMA ET AL.) 3. Januar 1989	1,2,8-10
Y	siehe das ganze Dokument ---	6,7
Y	BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS Bd. 7, Nr. 10, 1992 Seiten 733 - 739 G.URBAN ET AL. 'Miniaturized multi-enzyme biosensors antegrated with pH sensors on flexible polymer carriers for in vivo applications.' in der Anmeldung erwähnt	6,7
A	siehe das ganze Dokument ---	1,2,8-10
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/>	Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p>		<p>'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>'&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>
<p>Datum des Abschlusses der internationalen Recherche</p> <p>10. Februar 1994</p>		<p>Absenddatum des internationalen Recherchenberichts</p> <p>18. 02 94</p>
<p>Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde</p> <p>Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016</p>		<p>Bevollmächtigter Bediensteter</p> <p>Hitchen, C</p>

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP,A,0 216 577 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC.) 1. April 1987 siehe das ganze Dokument -----	1,2,4-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 93/00168

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
FR-A-2614422	28-10-88	US-A- 4891104	02-01-90
		DE-A- 3813709	24-11-88
		GB-A- 2222681	14-03-90
		JP-A- 63290955	28-11-88
US-A-4795707	03-01-89	JP-A- 61128152	16-06-86
EP-A-0216577	01-04-87	AU-B- 605111	10-01-91
		AU-A- 6272986	19-03-87
		CA-A- 1244085	01-11-88
		DE-A- 3684394	23-04-92
		JP-A- 62067442	27-03-87