

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
15. Dezember 2011 (15.12.2011)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2011/154105 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation:  
*B81C 1/00* (2006.01)

Stuttgart (DE). **WOLFRAM, Tobias** [DE/DE]; Oberwiesenweg 57, 63303 Dreieich (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2011/002670

(74) **Anwalt: KATZAMEYER, Michael**; v. Bezold & Partner, Akademiestrasse 7, 80799 München (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
30. Mai 2011 (30.05.2011)

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

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
10 2010 023 490.7 11. Juni 2010 (11.06.2010) DE

(71) **Anmelder** (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E. V.** [DE/DE]; Hofgartenstraße 8, 80539 München (DE).

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder** (nur für US): **SPATZ, Joachim, P.** [DE/DE]; Knappenberg 21E, 70569 Stuttgart (DE). **PA-CHOLSKI, Claudia** [DE/DE]; Schmeilbachstraße 6, 70565 Stuttgart (DE). **SCHÖN, Tobias** [DE/DE]; Schwabstr. 71, 70197 Stuttgart (DE). **PURWANINGSIH, Lindarti** [ID/DE]; Alexanderstr. 84, 70182

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

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** THREE-DIMENSIONAL METAL-COATED NANOSTRUCTURES ON SUBSTRATE SURFACES, METHOD FOR PRODUCING SAME AND USE THEREOF

(54) **Bezeichnung:** DREIDIMENSIONALE METALLBEDECKTE NANOSTRUKTUREN AUF SUBSTRATOBERFLÄCHEN, VERFAHREN ZU DEREN ERZEUGUNG SOWIE DEREN VERWENDUNG

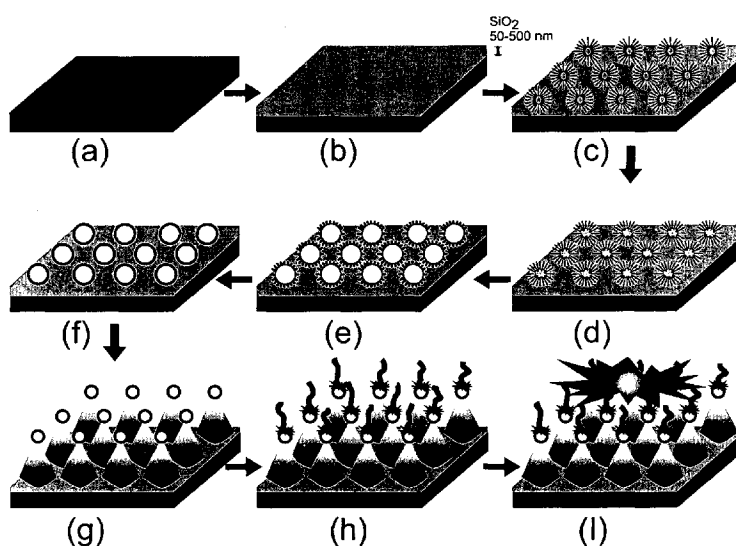


Fig. 1

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for producing column-shaped or conical nanostructures, wherein the substrate surface is covered with an arrangement of metal nanoparticles and etched, the nanoparticles acting as an etching mask and the etching parameters being set such that column structures or cone structures are created below the nanoparticles and the nanoparticles are preserved as a structural coating.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erzeugung von säulen- oder kegelförmigen Nanostrukturen auf Substratoberflächen, wobei die Substratoberfläche mit einer Anordnung von Metall-Nanopartikeln bedeckt und geätzt wird, wobei die Nanopartikel als Ätzmaske wirken und die Ätzparameter so eingestellt werden, dass unterhalb der Nanopartikel Säulenstrukturen oder Kegelstrukturen entstehen und die Nanopartikel als Strukturabdeckung erhalten bleiben.

WO 2011/154105 A1



**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)

**Dreidimensionale metallbedeckte Nanostrukturen auf  
Substratoberflächen, Verfahren zu deren Erzeugung  
sowie deren Verwendung**

Dreidimensional nanostrukturierte Substratoberflächen, welche mit Bindungsmolekülen funktionalisiert werden können, um die selektive Anbindung von biologischen Strukturen und Molekülen, insbesondere Zellen, zu ermöglichen, sind im Stand der Technik grundsätzlich bekannt. Nagrath et al. beschreiben in Nature, 450, 1235-1239 (2007), die Herstellung von Oberflächen mit Säulenstrukturen einer Länge im Mikrometerbereich zur Anreicherung von zirkulierenden Tumorzellen und Wang et al. beschreiben in Angew. Chem. Int. Ed., 48, 8970-8973 (2009), die Erzeugung von Si-Nanosäulen auf einem Si-Wafer mit Hilfe eines nasschemischen Ätzverfahrens und die Funktionalisierung mit einem spezifischen Antikörper, Anti-EpCAM, welcher die selektive Anbindung von bestimmten Tumorzellen ermöglicht. Die Herstellung dieser Nanostrukturen ist jedoch relativ zeit- und kostenaufwendig und deren Funktionalisierung ebenfalls. Strukturell bewegen sich die publizierten Strukturen im  $\mu\text{m}$ -Längenbereich (100-200 nm Durchmesser, Länge 10  $\mu\text{m}$ ). Somit stellen diese Strukturen nicht ideale Größen für die Immobilisierung von geordneten Moleküloberflächen dar. Zusätzlich ist die Anzahl der Moleküle pro Flächeneinheit bei diesen Strukturen im  $\mu\text{m}$ -Bereich im Vergleich zu Nanostrukturen reduziert. Die kontrollierte Langzeitkultivierung und Differenzierung von Zellen ist mit der publizierten Struktur funktionalisierung nicht durchführbar.

Ein einfaches und kostengünstiges Verfahren, mit dem dreidimensionale Nanostrukturen für optische Elemente durch Ätzen

direkt auf Quarzglas erzeugt werden können, ist in der deutschen Offenlegungsschrift DE 10 2007 014 538 A1 und in der entsprechenden internationalen Veröffentlichung WO 2008/116616 A1 sowie in Lohmüller et al., NANO LETTERS 2008, Bd. 8, Nr. 5, 1429-1433, beschrieben. Die dort offenbarten Nanosäulen sind jedoch nicht metallbedeckt und eine Funktionalisierung mit biologischen Bindungsmolekülen wird nicht vorgeschlagen. Diese Nanosäulen des Standes der Technik haben nach dem Ätzprozess keine Metallpartikel oder Metallablagerungen auf ihrer Oberfläche, da das zuvor als Maske eingesetzte Metall vollständig beim Ätzprozess verdampft wird. Dies ist für die Funktionalität der dort beschriebenen Strukturen als optisches Element zwingend erforderlich. Eine Biofunktionalisierung dieser konventionellen Nanostrukturen wäre allenfalls über aufwendige Silanisierungsreaktionen unter Schutzgasatmosphäre im Verlauf von mehreren Stunden (mindestens 8 h) möglich. Die publizierte Struktur erlaubt keine chemisch geordnete Funktionalisierung mit bioaktiven Molekülen, da bei der Silanisierung die strukturelle Integrität der Moleküle verloren geht.

Vor diesem Hintergrund bestand eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung in der Bereitstellung von, insbesondere für biomedizinische, bioanalytische und biosensorische Anwendungen, verbesserten dreidimensionalen Nanostrukturen auf einer Substratoberfläche, welche auf einfache Weise mit einer Vielzahl von Bindungsmolekülen funktionalisiert werden können und die selektive Anbindung von biologischen Strukturen und Molekülen, sowie Zellen oder Zellverbänden, mit hoher Effizienz und Ausbeute ermöglichen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß mit der Bereitstellung des Verfahrens nach Anspruch 1 sowie der Substratoberfläche nach Anspruch 13 und der Vorrichtung nach Anspruch 18 gelöst.

Spezielle oder bevorzugte Ausführungsformen und Aspekte der Erfindung sind Gegenstand der weiteren Ansprüche.

#### Beschreibung der Erfindung

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Erzeugung von säulen- oder kegelförmigen Nanostrukturen, die auf ihrer Oberseite eine Metallabdeckung aufweisen, auf einer Substratoberfläche nach Anspruch 1 umfasst mindestens die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen einer mit  $\text{SiO}_2$  beschichteten oder aus  $\text{SiO}_2$  bestehenden Substratoberfläche;
- b) Bedecken der Substratoberfläche mit einer Anordnung von Metall-Nanopartikeln;
- c) Kontaktieren des Substrats mit einer Metallsalzlösung unter reduzierenden Bedingungen, wodurch eine Reduktion des Metallsalzes und eine stromlose Abscheidung von elementarem Metall auf den Metall-Nanopartikeln und entsprechendes Wachstum der Metall-Nanopartikel veranlasst wird;
- d) Ätzen der mit den in Schritt c) erhaltenen Nanopartikeln bedeckten Substratoberfläche in einer Tiefe von 10-500 nm, wobei die Nanopartikel als Ätzmaske wirken und die Ätzparameter so eingestellt werden, dass unterhalb der Nanopartikel Säulenstrukturen oder Kegelstrukturen entstehen und die Nanopartikel als Strukturabdeckung erhalten bleiben.

Die primäre Substratoberfläche ist grundsätzlich nicht besonders beschränkt und kann jegliches Material umfassen, das mit Si bzw.  $\text{SiO}_2$  beschichtet werden kann. Das Substrat kann beispielsweise aus Glas, Silicium,  $\text{SiO}_2$ , Halbleitern, Metallen, Polymeren etc. ausgewählt sein. Insbesondere für optische Anwendungen sind transparente Substrate bevorzugt, bei biomedizinischen Applikationen aber nicht relevant.

Die primäre Substratoberfläche kann beispielsweise durch chemische Dampfabscheidung oder Plasma-Abscheidung oder ein anderes im Stand der Technik bekanntes Verfahren mit einer, vorzugsweise 50-500 nm, dicken Siliciumschicht versehen werden. Anschließend erfolgt die Oxidation, z.B. mittels Sauerstoffplasma oder einem anderen geeigneten Oxidationsmittel, um eine SiO<sub>2</sub>-Schicht auf der primären Substratoberfläche zu erzeugen.

Erfindungsgemäß ist es bevorzugt, jedoch nicht unbedingt erforderlich, dass die Bedeckung der Substratoberfläche im Schritt b) mit Nanopartikeln mit Hilfe einer Mizellen-Diblock-Copolymer-Nanolithographietechnik, wie z.B. in EP 1 027 157 B1 und DE 197 47 815 A1 beschrieben, geschieht. Bei der mizellaren Nanolithographie wird eine mizellare Lösung eines Blockcopolymeres auf ein Substrat abgeschieden, z.B. durch Tauchbeschichtung, und bildet unter geeigneten Bedingungen auf der Oberfläche eine geordnete Filmstruktur von chemisch unterschiedlichen Polymerdomänen, die unter anderem von Typ, Molekulargewicht und Konzentration des Blockcopolymeres abhängt. Die Mizellen in der Lösung lassen sich mit anorganischen Salzen beladen, die nach der Abscheidung mit dem Polymerfilm zu anorganischen Nanopartikeln oxidiert oder reduziert werden können. Eine Weiterentwicklung dieser Technik, in der Patentanmeldung DE 10 2007 017 032 A1 beschrieben, ermöglicht es, sowohl die laterale Separationslänge der genannten Polymerdomänen und damit auch der resultierenden Nanopartikel als auch die Größe dieser Nanopartikel durch verschiedene Maßnahmen so präzise flächig einzustellen, dass nanostrukturierte Oberflächen mit gewünschten Abstands- und/oder Größengradienten herstellbar sind. Typischerweise weisen mit einer solchen mizellaren Nanolithographietechnik hergestellte Nanopartikelanordnungen ein quasi-hexagonales Muster auf.

Grundsätzlich ist das Material der Nanopartikel nicht besonders beschränkt und kann jedes im Stand der Technik für solche Nanopartikel bekannte Material umfassen. Typischerweise handelt es sich dabei um ein Metall oder Metalloxid. Ein breites Spektrum geeigneter Materialien ist in DE 10 2007 014 538 A1 genannt. Vorzugsweise ist das Material des Metalls oder die Metallkomponente der Nanopartikel aus der Gruppe aus Au, Pt, Pd, Ag, In, Fe, Zr, Al, Co, Ni, Ga, Sn, Zn, Ti, Si und Ge, deren Mischungen und Kompositen ausgewählt. Spezielle Beispiele für ein bevorzugtes Metalloxid sind Titanoxid, Eisenoxid und Kobaltoxid. Bevorzugte Beispiele für ein Metall sind Chrom, Titan, Edelmetalle, z.B. Gold, Palladium und Platin, und besonders bevorzugt ist Gold.

Der Begriff „Partikel“ wie hier verwendet, umfasst auch einen „Cluster“, insbesondere wie in DE 10 2007 014 538 A1 und DE 197 47 815 A1 beschrieben und definiert, und beide Begriffe können hier austauschbar verwendet werden.

Die Vergrößerung der Metall-Nanopartikel durch stromlose Abscheidung von elementarem Metall auf den Nanopartikeln in Schritt c) beinhaltet eine Reduktion des entsprechenden Metallsalzes. Als Reduktionsmittel kann ein chemisches Agens, z.B. Hydrazin oder ein anderes geeignetes chemisches Reduktionsmittel, oder energiereiche Strahlung wie Elektronenstrahlung oder Licht (wie in DE 10 2009 053 406.7 beschrieben) verwendet werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren im Ätzschritt d) kann eine oder mehrere Behandlungen mit demselben Ätzmittel und/oder mit verschiedenen Ätzmitteln umfassen. Das Ätzmittel kann grundsätzlich jedes im Stand der Technik bekannte und für die jeweilige Substratoberfläche geeignete Ätzmittel sein. Vorzugsweise ist

das Ätzmittel aus der Gruppe aus Chlorgasen, z.B.  $\text{Cl}_2$ ,  $\text{BCl}_3$  und anderen gasförmigen Chlorverbindungen, Fluorkohlenwasserstoffen, z.B.  $\text{CHF}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{F}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{F}$ , Fluorocarbonen, z.B.  $\text{CF}_4$ ,  $\text{C}_2\text{F}_8$ , Sauerstoff, Argon,  $\text{SF}_6$  und Mischungen davon ausgewählt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird  $\text{CHF}_3$  in Kombination mit  $\text{SF}_4$  in mindestens einem Behandlungsschritt als Ätzmittel verwendet.

Die Dauer der gesamten Ätzbehandlung liegt typischerweise im Bereich von 10 s bis 60 Minuten, vorzugsweise 1 bis 15 Minuten.

Typischerweise wird beim Schritt d) ein Plasmaätzverfahren („reactive ion etching“) wie in DE 10 2007 014 538 A1 und Lohmüller et al. (NANO LETTERS 2008, Bd. 8, Nr. 5, 1429-1433, beschrieben eingesetzt und vorzugsweise wird eine Mischung von  $\text{CHF}_3$  mit  $\text{CF}_4$  verwendet.

Ebenfalls gute Ergebnisse werden bei Verwendung von  $\text{SF}_6$  als Ätzmittel bzw. Ätzmittelkomponente in mindestens einem Behandlungsschritt erzielt. Damit können sehr hohe Ätzraten erzielt werden, allerdings muss die Dauer der Ätzbehandlung sorgfältig überwacht werden, damit der Ätzvorgang nicht zu weit geht und die gewünschten metallbedeckten Nanostrukturen erhalten bleiben.

Die erhaltenen Nanostrukturen weisen typischerweise einen Durchmesser im Bereich von 10-100 nm, vorzugsweise 10-30 nm, und eine Höhe von 10-500 nm, vorzugsweise 10-150 nm, auf. Bei Kegelstrukturen gelten die Durchmesserangaben für die Dicke in halber Höhe. Die mittleren Abstände der Nanostrukturen liegen vorzugsweise in einem Bereich von 15 bis 200 nm.

Für einige Anwendungen ist es bevorzugt, dass die als Ätzmaske verwendeten Nanopartikel eine vorgegebene zweidimensionale geometrische Anordnung auf der Substratoberfläche aufweisen. Eine solche Anordnung weist als ein Charakteristikum vorgegebene minimale oder mittlere Partikelabstände auf, wobei diese vorgegebenen Partikelabstände in allen Bereichen der Substratoberfläche gleich sein können oder verschiedene Bereiche unterschiedliche vorgegebene Partikelabstände aufweisen können. Eine derartige geometrische Anordnung kann grundsätzlich mit jedem geeigneten Verfahren des Standes der Technik, insbesondere mizellarer Nanolithographie wie oben näher erläutert, realisiert werden.

Die nach dem Ätzschritt erhaltenen Nanostrukturen werden vorzugsweise mit mindestens einem Bindungsmolekül funktionalisiert, das die Anbindung von biologischen Strukturen, Molekülen, Mikroorganismen oder Zellen ermöglicht oder erleichtert.

Vorzugsweise ist das Bindungsmolekül ein spezifisch an Oberflächenstrukturen von Zellen oder Bestandteile der extrazellulären Matrix bindendes Molekül oder ein Molekül, welches später von den auf dem Substrat kultivierten Zellen aufgenommen werden kann.

In spezielleren Ausführungsformen ist das Bindungsmolekül aus der Gruppe aus Proteinen oder niedermolekularen Peptiden, insbesondere Antikörpern und Fragmenten davon, sowie enzymatisch aktiven Proteinen oder Domänen davon, Lektinen, Kohlenhydraten, Proteoglykanen, Glykoproteinen, Nukleinsäuren wie ssDNA, dsDNA, RNA, siRNA, Lipiden oder Glykolipiden ausgewählt.

In einer speziellen Ausführungsform sind die Nanostrukturen mit mindestens einem Bindungsmolekül, ausgewählt aus Molekü-

len, die an Zelladhäsionsrezeptoren (CAM) von Zellen, spezifische Rezeptoren oder Bindungsstellen auf Viren, Proteinen oder Nukleinsäuren binden, chemisch funktionalisiert.

Spezieller handelt es sich um Moleküle, die an Zelladhäsionsrezeptoren der Gruppen der Cadherine, Immunglobulin-Superfamilie (Ig-CAMS), Selectine und Integrine, insbesondere an Integrine, binden. In einer noch spezielleren Ausführungsform ist das Bindungsmolekül aus Fibronectin, Laminin, Fibrinogen, Tenascin, VCAM-1, MadCAM-1, Collagen oder einem an Zelladhäsionsrezeptoren, insbesondere Integrine, spezifisch bindenden Fragment davon oder einem an Zelladhäsionsrezeptoren spezifisch bindenden Derivat davon ausgewählt. Auch signalgebende Moleküle, wie zum Beispiel die gesamten Rezeptorfamilien von EGFR, FGFR und Notch/Jagged-1, können mit diesen Molekülen adressiert werden.

Der Fachmann wird jedoch unschwer erkennen, dass Variationen dieser Moleküle sowie beliebige andere Moleküle mit spezifischen Bindungseigenschaften für bestimmte Zielobjekte, insbesondere Antikörper und andere Vertreter der oben angegebenen Substanzklassen, ebenso eingesetzt werden können.

Die Funktionalisierung geschieht durch Immobilisierung des Bindungsmoleküls auf der Metallabdeckung der Nanostrukturen. Verfahren zur Immobilisierung von Bindungsmolekülen auf Metallsubstraten, insbesondere Gold-Nanopartikeln, sind grundsätzlich bekannt und beispielsweise beschrieben in Arnold et al., *ChemPhysChem* (2004) 5, 383-388, *Wolfram et al.*, *Biointerphases* 2007, Mar;2(1):44-8, *Ibii et al.*, *Anal Chem.* 2010 May 15;82(10):4229-35, *Sakata et al.*, *Langmuir.* 2007, Feb 27;23(5):2269-72 und *Mateo-Martí et al.*, *Langmuir.* 2005, Oct 11;21(21):9510-7.

Die erfindungsgemäß verwendeten dreidimensionalen Nanostrukturen lassen sich bei Raumtemperatur typischerweise innerhalb einer halben Stunde biofunktionalisieren und sind damit hinsichtlich Zeit- und Kostenaufwand den in der Einleitung des vorliegenden Texts beschriebenen dreidimensionalen Mikrostrukturen des Standes der Technik deutlich überlegen.

Einige prinzipielle Verfahren zur Immobilisierung von bevorzugten Bindungsmolekülen, z.B. Antikörper, Peptide, rekombinante Proteine, Glykoproteine, Nukleinsäuren oder native Proteine, auf Metallsubstraten werden im Folgenden kurz erläutert.

Die orientierungsspezifische Immobilisierung von rekombinanten Proteinen ist beispielsweise mit Ni-NTA-Komplexreaktionen möglich (Wolfram et al., oben). Weiterhin lassen sich sämtliche Proteine und Antikörper mit Hilfe von DTSSP und verwandten thiolbasierten Linkern an Gold- und Silbernanopartikel kovalent anbinden (siehe Beispiel 2). Auch eine Immobilisierung von Antikörpern oder Fragmenten davon sind über eine Immobilisierung von Protein A/G oder L möglich. Die bioaktiven Molekülen können direkt oder indirekt über Linker-Systeme gebunden werden. Es können Chemisorption, Affinitäts-basierte sowie Protein-vermittelte Immobilisierungen eingesetzt werden.

In den Ausführungsbeispielen werden geeignete Bedingungen zur Herstellung von säulenförmigen Nanostrukturen auf einer mit SiO<sub>2</sub>-beschichteten Substratoberfläche und zu deren Funktionalisierung eingehender beschrieben. Für den Fachmann wird jedoch ersichtlich sein, dass Variationen dieser Bedingungen in Abhängigkeit von den verwendeten speziellen Materialien erforderlich sein können und unschwer durch Routineversuche zu ermitteln sind.

Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten dreidimensional nanostrukturierten Substratoberflächen bieten vielfältige Anwendungsmöglichkeiten auf den Gebieten der Halbleitertechnik, Biologie, Medizin, Pharmazie, Sensortechnik und Medizintechnik, insbesondere für bioaktive und biointelligente Oberflächen oder Implantatflächen sowie Gewebetechniken.

Die funktionalisierten nanostrukturierten Substratoberflächen eignen sich insbesondere für die Identifizierung von biologischen Zielstrukturen, -molekülen, -mikroorganismen oder -zellen in einer Probe und/oder deren Isolierung daraus. Die Probe kann beispielsweise eine Körperflüssigkeit, insbesondere Blut, interstitielle oder muköse Flüssigkeiten, oder eine feste Gewebeprobe sein. Die Zielstrukturen können Moleküle sein, die als Diagnostik-Marker bekannt sind, oder Zielzellen können beispielsweise bestimmte Tumorzellen, Trophoblasten oder andere gewünschte Zelltypen oder Komponenten davon sein.

Ein wesentlicher Aspekt der Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur spezifischen Anbindung von biologischen Zielstrukturen, -molekülen, -mikroorganismen oder -zellen, die in einer Probe, insbesondere einer Probe wie oben definiert, vorliegen, welche eine solche nanostrukturierte Substratoberfläche umfasst.

In einer speziellen Ausführungsform ist diese Vorrichtung Bestandteil einer Sonde, welche so gestaltet ist, dass sie in einen lebenden Organismus eingeführt und in Kontakt mit dessen Körperflüssigkeiten gebracht werden kann.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Vorrichtung dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Teil der Sonde die Gestalt einer Nadel hat und in den Blutstrom eines

lebenden Organismus eingebracht werden kann. Damit können beispielsweise gezielt bestimmte zirkulierende Zelltypen aus dem Blut isoliert und identifiziert werden. Die Nadeldimensionen liegen dabei vorzugsweise in den für medizinische Anwendungen von Nadeln und Kanülen (z.B. für Injektionen und Blutentnahmen) bekannten Bereichen und können unschwer durch Routineversuche optimiert werden.

Nachdem sowohl die physikalischen Parameter einer erfindungsgemäß nanostrukturierten Substratoberfläche durch Variation der Höhe, Dicke, Form und Abstände der Nanostrukturen als auch die chemischen Parameter durch Auswahl der speziellen Metallabdeckungen und immobilisierten Bindungsmoleküle flexibel und präzise einstellbar sind, können gezielt Oberflächen geschaffen werden, welche nicht nur eine optimale Adhäsion von Zielmolekülen wie Zellen gewährleisten (was die Nachweisempfindlichkeit entsprechend erhöht), sondern darüber hinaus auch Einfluss auf das Verhalten von lebenden Zellen selbst gestatten, da Zellen bekanntermaßen nicht nur chemische Signale sondern auch strukturelle Signale, wie die Topographie einer Substratoberfläche, wahrnehmen.

#### Kurzbeschreibung der Figuren

**Fig. 1** zeigt schematisch die Hauptschritte des erfindungsgemäßen Verfahrens

**Fig. 2** zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer Substratoberfläche in verschiedenen Stadien des erfindungsgemäßen Verfahrens:

(a) nach Aufbringung von Gold-Nanopartikeln durch mizellare Block-Nanolithographie;

- (b) nach Vergrößerung der Gold-Nanopartikel durch stromlose Abscheidung;
- (c) mit metallbedeckten Säulenstrukturen nach dem Ätzen;
- (d) zeigt die grossflächige Ordnung im  $\mu\text{m}$ -Bereich;
- (e) zeigt die kegelförmigen Säulen in der Seitenansicht.

Die folgenden Beispiele dienen zur näheren Erläuterung der vorliegenden Erfindung, ohne diese jedoch darauf zu beschränken.

### BEISPIEL 1

*Erzeugung von säulenförmigen Nanostrukturen auf einem Substrat mit einer Anordnung von Gold-Nanopartikeln*

#### **1. Bereitstellung der Substratoberfläche**

Zunächst wurde eine primäre Substratoberfläche durch chemische Dampfabcheidung oder Plasma-Abscheidung mit einer 50-500 nm dicken Siliciumschicht versehen. Dann erfolgte eine Aktivierung in Sauerstoffplasma (150 W, 0,1 mbar, 30 Minuten), um eine  $\text{SiO}_2$ -Schicht auf der primären Substratoberfläche zu erzeugen (Fig. 1b).

#### **2. Bedeckung mit Gold-Nanopartikeln**

Die im ersten Schritt gebildete  $\text{SiO}_2$ -Substratoberfläche wurde mittels mizellarer Nanolithographie mit Gold-Nanopartikeln in einer definierten Anordnung bedeckt (Fig. 1c). Bei diesem Schritt kann einem der in EP 1 027 157 B1, DE 197 47 815 A1 oder DE 10 2007 017 032 A1 beschriebenen Protokolle gefolgt werden. Das Verfahren beinhaltet die Abscheidung einer mizellaren Lösung eines Blockcopolymers (z.B. Polystyrol(n)-b-Poly(2-vinyl-pyridin(m)) in Toluol) auf das Substrat, z.B. durch Tauchbeschichtung, wodurch auf der Oberfläche eine ge-

ordnete Filmstruktur von Polymerdomänen gebildet wird. Der oben beschriebene Aktivierungsschritt in Sauerstoffplasma fördert die Adhäsion der Mizellen an der Oberfläche.

Die Mizellen in der Lösung sind mit einem Goldsalz, vorzugsweise  $\text{HAuCl}_4$ , beladen, welches nach der Abscheidung mit dem Polymerfilm zu den Gold-Nanopartikeln reduziert wird. Zu diesem Zweck wird eine kurze Wasserstoffplasma-Aktivierung (200 W, 0,5 mbar, 1 Minute) durchgeführt, um Goldpartikel-Keime in den Mizellenkernen zu erzeugen (Fig. 1d).

### **3. Vergrößerung der Gold-Nanopartikel durch stromlose Abscheidung**

Die stromlose Abscheidung erfolgte durch Eintauchen der Oberfläche in eine Lösung von 0.1%  $\text{HAuCl}_4$  und 0.2 mM  $\text{NH}_3\text{OHCl}$  (1:1) für 3,5 Minuten. Unter diesen reduzierenden Bedingungen wird das Goldsalz in der Lösung zu elementarem Gold reduziert, das sich selektiv auf den Goldpartikel-Keimen abscheidet und diese vergrößert (Fig. 1e). Nun können die Polymer-Mizellen von der Oberfläche entfernt werden und dies wird durch Exposition der Oberfläche gegenüber einem Wasserstoffplasma (150 W, 0,4 mbar, 45 Minuten) erreicht. Zu diesem Zeitpunkt ist die Substratoberfläche mit einer quasi-hexagonalen zweidimensionalen Anordnung von Gold-Nanopartikeln gewünschter Größe dekoriert (Fig. 1f).

### **4. Ätzschritt**

Anschließend erfolgte die Ätzung der mit Gold-Nanopartikeln bedeckten  $\text{SiO}_2$ -Schicht in einer gewünschten Tiefe. Dazu wurde ein „Reactive Ion Etcher“ von Oxford Plasma, Gerät: PlasmaLab 80 plus verwendet. Andere im Stand der Technik bekannte Vorrichtungen sind jedoch grundsätzlich ebenso geeignet.

Das Ätzen wurde mit einer Mischung der Prozessgase  $\text{CHF}_3$  und  $\text{CF}_4$  (10:1) bei einem Gesamtdruck von 10 mTorr, einer Temperatur von  $20^\circ\text{C}$  und einer Energie von 30 W durchgeführt. Die Zeitdauer der Ätzbehandlung variierte in Abhängigkeit von der gewünschten Ätztiefe in einem Bereich von etwa 1-15 Minuten. Als Ergebnis wurden säulenförmige bzw. stumpfkegelige Nanostrukturen erhalten, die immer noch Gold-Nanopartikel auf ihrer Oberseite aufwiesen (Fig. 1g).

## BEISPIEL 2

### *Funktionalisierung der Nanostrukturen*

Zur Funktionalisierung der in Beispiel 1 erhaltenen dreidimensionalen Nanostrukturen wurden verschiedene Protokolle angewandt.

**(Protokoll A)** Die dargestellten Nanostrukturen wurden 30 min bei Raumtemperatur oder 2h bei  $4^\circ\text{C}$  mit 20-60  $\mu\text{l}$  0,25-5 mM DTSSP (3,3'-Dithiobis[sulfosuccinimidylpropionat], Thermo Fisher Scientific, Rockford USA) in PBS inkubiert und danach mehrmals mit PBS gewaschen. Dann wurde jedes Substrat für 2 h bei  $4^\circ\text{C}$  oder 30 min bei Raumtemperatur mit dem gewünschten Antikörper ( $c = 10 \mu\text{g/ml}$ ) inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Falls die Antikörperlösung Tris-Puffer oder Glycin enthält, sollte der Antikörper vor der Inkubation gegen PBS dialysiert werden. Neben der Thiol-Chemie basierten Chemisorption wurden auch Affinitätsimmobilisierungen eingesetzt.

**(Protokoll B)** Gold dotierte Substratoberflächen wurde für zwei Stunden mit thiolisierter Nitrilotriessigsäure(NTA) in Ethanol bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde Nickel als  $\text{NiCl}_2$  (10 mM in HBS) an das NTA durch ein 15 minütige Inkubation gebunden. Nach Umpufferung erfolgte eine Inkubation mit ei-

ner Proteinlösung (His-Tag Protein 10µg/ml in PBS) zwischen 4 bis 12 Stunden bei 4°C. Abschliessend wurden die Substrate gewaschen.

**(Protokoll C)** Eine weiteres Protokoll ist die direkte Immobilisierung von Proteinen durch Chemisorption. Dabei wurde Protein A, G oder L für 5 Minuten bei 65° erhitzt und anschliessend unter leicht basischen Pufferbedingungen (Tris-HCl pH 8-9,5) für eine Stunde auf den Substraten inkubiert.

**(Protokoll D)** Die so hergestellten Substrate wurden für eine Antikörperbindung verwendet. Dabei wurde eine Antikörperlösung (1-2 mg/mL in PBS) 1:50 in PBS verdünnt und anschliessend für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Abschliessend wurden die Substrate kurz gewaschen.

**(Protokoll E)** Neben der Immobilisierung von Peptiden und Proteinen wurden auch Nukleinsäuren immobilisiert. Dabei wurden thiolisierte ssDNA-Fragmente (100 pMol in Wasser) auf den Substraten für vier Stunden bei 4° inkubiert und anschliessend gewaschen. Der komplementäre ssDNA-Strang (100 pMol in Wasser) wurde für eine Stunde bei 37°C auf den Substraten inkubiert. Die erfolgreiche Bindung wurde durch eine fluoreszente Gruppe im zweiten ssDNA-Strang nachgewiesen.

Die funktionalisierten Substratoberflächen (Fig. 1h) können nun zur Anbindung von Zielstrukturen, insbesondere Zielzellen, verwendet werden (Fig. 1i).

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Erzeugung von säulen- oder kegelförmigen Nanostrukturen, die auf ihrer Oberseite eine Metallabdeckung aufweisen, auf Substratoberflächen, umfassend
  - a) Bereitstellen einer mit SiO<sub>2</sub> beschichteten oder aus SiO<sub>2</sub> bestehenden Substratoberfläche;
  - b) Bedecken der Substratoberfläche mit einer Anordnung von Metall-Nanopartikeln;
  - c) Kontaktieren des Substrats mit einer Metallsalzlösung unter reduzierenden Bedingungen, wodurch eine Reduktion des Metallsalzes und eine stromlose Abscheidung von elementarem Metall auf den Metall-Nanopartikeln und entsprechendes Wachstum der Metall-Nanopartikel veranlasst wird;
  - d) Ätzen der mit den in Schritt c) erhaltenen Nanopartikeln bedeckten Substratoberfläche in einer Tiefe von 10-500 nm, wobei die Nanopartikel als Ätzmaske wirken und die Ätzparameter so eingestellt werden, dass unterhalb der Nanopartikel Säulenstrukturen oder Kegelstrukturen entstehen und die Nanopartikel als Strukturabdeckung erhalten bleiben.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Ätzen eine Behandlung mit einem Ätzmittel, das aus der Gruppe aus Chlor, gasförmigen Chlorverbindungen, Fluorkohlenwasserstoffen, Fluorocarbonen, Sauerstoff, Argon, SF<sub>6</sub> und Mischungen davon ausgewählt ist, umfasst.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Ätzbehandlung für einen Zeitraum im Bereich von 10 s bis 60 min durchgeführt wird.



ren von Zellen oder Bestandteile der extrazellulären Matrix bindendes Molekül ist.

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Bindungsmolekül aus der Gruppe aus Proteinen oder niedermolekularen Peptiden, insbesondere Antikörpern und Fragmenten davon, sowie enzymatisch aktiven Proteinen oder Domänen davon, Lektinen, Kohlenhydraten, Proteoglykanen, Glykoproteinen, Nukleinsäuren wie ssDNA, dsDNA, RNA, siRNA, Lipiden oder Glykolipiden ausgewählt ist.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-11, dadurch gekennzeichnet, dass Schritt a) die Schritte i) Beschichten einer Substratoberfläche mit einer 50-500 nm dicken Si-Schicht und ii) Oxidieren der Si-Schicht, wodurch die mit SiO<sub>2</sub> beschichtete Substratoberfläche von Schritt a) bereitgestellt wird, umfasst.
13. Substratoberfläche, umfassend die mit dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1-12 erhältlichen säulenförmigen oder kegelförmigen Nanostrukturen.
14. Substratoberfläche nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Säulenstrukturen oder Kegelstrukturen eine Höhe von 10-500 nm, eine Dicke von 10-100 nm sowie einen mittleren Abstand zwischen 15 und 200 nm aufweisen und dadurch dass die Metallabdeckung der Nanosäulen/kegel von Edelmetall-Nanopartikeln, insbesondere Gold-Nanopartikeln, gebildet wird.
15. Verwendung der Substratoberfläche nach Anspruch 13 oder 14 auf den Gebieten der Halbleitertechnik, Optik, Biologie, Medizin, Pharmazie, Sensortechnik und Medizintechnik, ins-

besondere für bioaktive Oberflächen oder Implantatflächen sowie Gewebetechniken.

16. Verwendung nach Anspruch 15 für die Identifizierung von biologischen Zielstrukturen, -molekülen, -mikroorganismen oder -zellen in einer Probe und/oder deren Isolierung daraus.
17. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe eine Körperflüssigkeit, insbesondere Blut, interstitielle oder mukose Flüssigkeit, oder eine feste Gewebeprobe ist.
18. Vorrichtung zur spezifischen Anbindung von biologischen Zielstrukturen, -molekülen, -mikroorganismen oder -zellen, die in einer Probe vorliegen, umfassend eine Substratoberfläche nach Anspruch 13 oder 14.
19. Vorrichtung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass sie Bestandteil einer Sonde ist, welche so gestaltet ist, dass sie in einen lebenden Organismus eingeführt und in Kontakt mit dessen Körperflüssigkeiten gebracht werden kann.
20. Vorrichtung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Teil der Sonde die Gestalt einer Nadel hat und in den Blutstrom eines lebenden Organismus eingebracht werden kann.

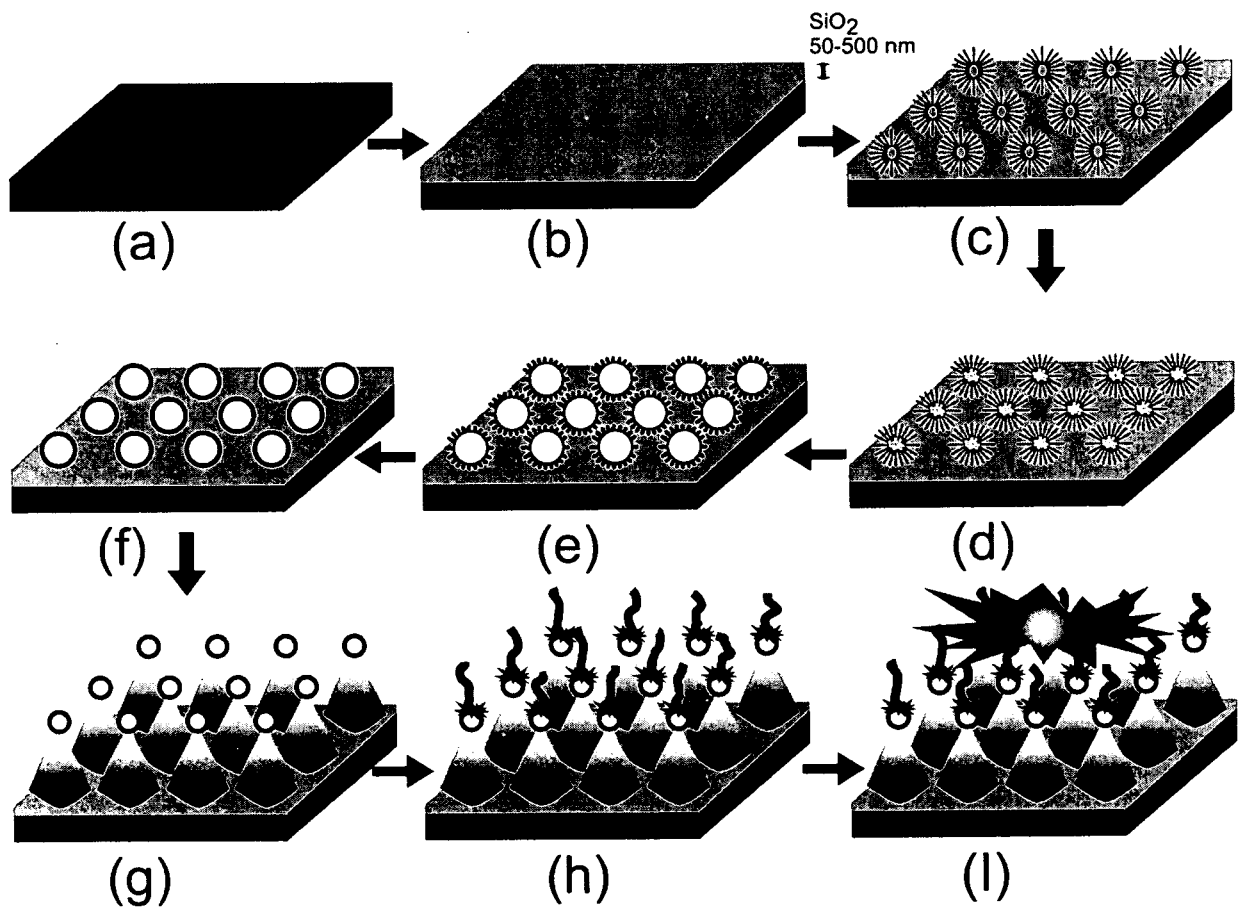


Fig. 1

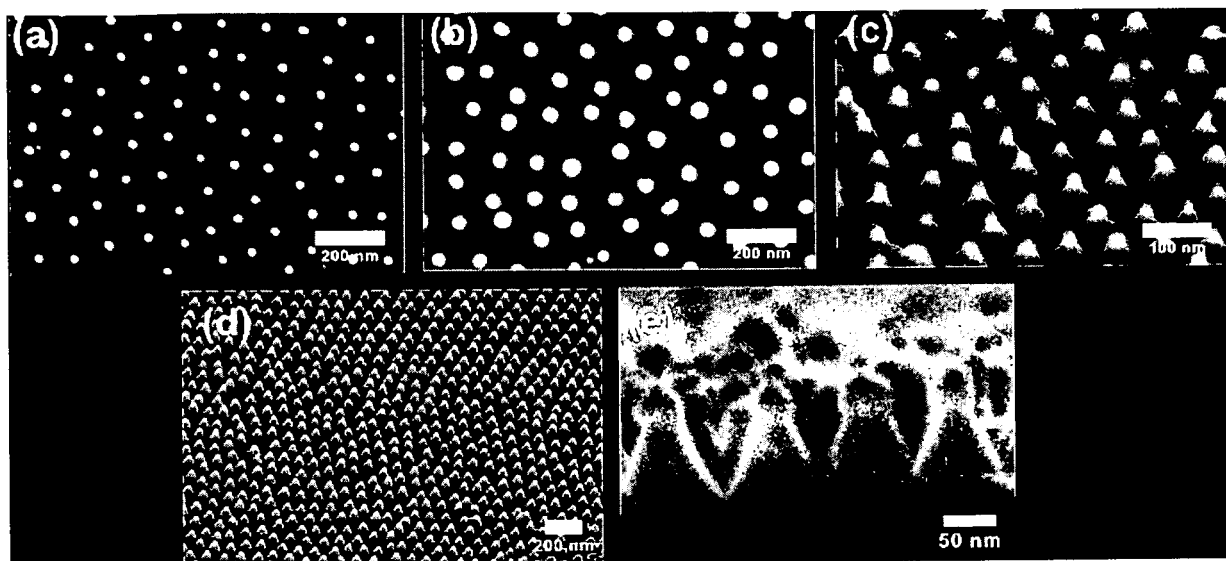


Fig. 2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/002670
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. B81C1/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) B81C		
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) EPO-Internal, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2009/136785 A1 (CHEN JIAN [US]) 28 May 2009 (2009-05-28)	13, 14
A	paragraphs [0037], [0039], [0051], [0055], [0056] figure 3c	1-12, 15-20
A	----- WO 2009/002644 A2 (3M INNOVATIVE PROPERTIES CO [US]) 31 December 2008 (2008-12-31) sentence 1 - sentence 3 page 7, line 9 - line 12 page 19, line 32 - page 20, line 10 -----	1-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <span style="margin-left: 100px;"><input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.</span>		
* 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	Date of mailing of the international search report	
9 November 2011	16/11/2011	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Foussier, Philippe	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/002670

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009136785	A1	28-05-2009	NONE
-----			
WO 2009002644	A2	31-12-2008	CN 101827783 A 08-09-2010
			EP 2170764 A2 07-04-2010
			WO 2009002644 A2 31-12-2008
-----			

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2011/002670

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**

INV. B81C1/00  
ADD.

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

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
B81C

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

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

EPO-Internal, WPI Data

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2009/136785 A1 (CHEN JIAN [US]) 28. Mai 2009 (2009-05-28)	13, 14
A	Absätze [0037], [0039], [0051], [0055], [0056] Abbildung 3c	1-12, 15-20
	-----	
A	WO 2009/002644 A2 (3M INNOVATIVE PROPERTIES CO [US]) 31. Dezember 2008 (2008-12-31) Satz 1 - Satz 3 Seite 7, Zeile 9 - Zeile 12 Seite 19, Zeile 32 - Seite 20, Zeile 10	1-20
	-----	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

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

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

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

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

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

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

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

"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

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. November 2011

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

16/11/2011

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Foussier, Philippe

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2011/002670

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2009136785	A1	28-05-2009	KEINE
-----			
WO 2009002644	A2	31-12-2008	CN 101827783 A 08-09-2010
			EP 2170764 A2 07-04-2010
			WO 2009002644 A2 31-12-2008
-----			

专利名称(译)	基板表面上的三维金属涂覆的纳米结构，其制备方法及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">EP2580155A1</a>	公开(公告)日	2013-04-17
申请号	EP2011724961	申请日	2011-05-30
[标]申请(专利权)人(译)	马普科技促进协会		
申请(专利权)人(译)	马普GESELLSCHAFT ZURFÖRDERUNGDER学问E.V.		
当前申请(专利权)人(译)	马普GESELLSCHAFT ZURFÖRDERUNGDER学问E.V.		
[标]发明人	SPATZ JOACHIM P PACHOLSKI CLAUDIA SCHON TOBIAS PURWANINGSIH LINDARTI WOLFRAM TOBIAS		
发明人	SPATZ, JOACHIM, P. PACHOLSKI, CLAUDIA SCHÖN, TOBIAS PURWANINGSIH, LINDARTI WOLFRAM, TOBIAS		
IPC分类号	B81C1/00 A61B5/145 A61B5/00 G01N33/553		
CPC分类号	G01N33/553 A61B5/14503 A61B5/6848 B81B2203/0361 B81C1/00031		
优先权	102010023490 2010-06-11 DE		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种用于制造柱形或锥形纳米结构的方法，其中基板表面覆盖有金属纳米颗粒的排列并被蚀刻，纳米颗粒用作蚀刻掩模并且蚀刻参数被设定为使得柱结构或锥形结构在纳米颗粒下方产生纳米颗粒，并将纳米颗粒保留为结构涂层。