

(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
02. April 2020 (02.04.2020)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2020/064723 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

A61K 9/00 (2006.01) C08L 1/12 (2006.01)
C08L 1/02 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2019/075698

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. September 2019 (24.09.2019)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2018 007 556.8
24. September 2018 (24.09.2018) DE

(71) Anmelder: FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG
E.V. [DE/DE]; Hansastrasse 27c, 80686 München (DE).

(72) Erfinder: EHRENTREICH-FOERSTER, Eva; Mörike-
straße 17, 14558 Nuthetal (DE). HETTRICH, Cornelia;
Am Panoramaweg 2b, 14548 Schwielowsee (DE). HETT-
RICH, Kay; Am Panoramaweg 2b, 14548 Schwielowsee
(DE).

(74) Anwalt: ALTMANN STÖBEL DICK PATENTAN-
WÄLTE PARTG MBB; Alexander Dick, Dudenstraße 46,
68167 Mannheim (DE).

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

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ,

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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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)

(54) Title: TAILORED LAYERS OF CELLULOSE DISPERSIONS FOR DETECTING ANALYTES

(54) Bezeichnung: MAßGESCHNEIDERTE SCHICHTEN AUS CELLULOSE-DISPERSIONEN ZUM NACHWEIS VON ANALYTEN

(57) Abstract: The present invention relates to a method for producing a cellulose layer for detecting at least one analyte, comprising (i) producing a cellulose layer by applying a stable dispersion of cellulose and/or a cellulose derivative to a suitable carrier, and (ii) immobilizing at least one ligand on the cellulose layer. The invention also relates to a cellulose layer produced according to said method. The present invention additionally relates to associated detection methods, devices, kits and uses.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung einer Celluloseschicht zum Nachweis mindestens eines Analyten, umfassend (i) Herstellung einer Celluloseschicht durch Aufträgen einer stabilen Dispersion von Cellulose und/oder einem Cellulose-Derivat auf einen geeigneten Träger, und (ii) Immobilisieren mindestens eines Liganden auf der Celluloseschicht, sowie auf eine nach diesem Verfahren hergestellte Celluloseschicht. Die vorliegende Erfindung bezieht sich zusätzlich auf zugehörige Nachweisverfahren, Vorrichtungen, Kits und Verwendungen.



WO 2020/064723 A1

 Maßgeschneiderte Schichten aus Cellulose-Dispersionen zum Nachweis von Analyten

5 Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung einer Celluloseschicht zum Nachweis mindestens eines Analyten, umfassend (i) Herstellung einer Celluloseschicht durch Auftragen einer stabilen Dispersion von Cellulose und/oder einem Cellulose-Derivat auf einen geeigneten Träger, und (ii) Immobilisieren mindestens eines Liganden auf der Celluloseschicht, sowie auf eine nach diesem Verfahren hergestellte

10 Celluloseschicht. Die vorliegende Erfindung bezieht sich zusätzlich auf zugehörige Nachweisverfahren, Vorrichtungen, Kits und Verwendungen.

Cellulose ist ein wirtschaftlich bedeutsames Naturmaterial und wird u. a. als Baumaterial, für

15 die Papierherstellung, für Bekleidung, und in der Energiewirtschaft verwendet. In neuerer Zeit wurden Modifikationen der Cellulose entwickelt, die neue Anwendungen ermöglichen. So wurden Cellulosematerialien mit Dimensionen im Nanometerbereich entwickelt, die generell als Nanocellulosen bezeichnet werden. Nanocellulosen können mit unterschiedlichen Verfahren und aus unterschiedlichen Ausgangsmaterialien hergestellt werden. Generell werden

20 dabei die In Tabelle 1 dargestellten Typen unterschieden.

Tabelle 1: Typen von Nanocellulose (nach Klemm et al. (2011), Angew. Chemie Int. Ed., 50: 5438-66)

Typ	Synonyme	Dimensionen
Mikrofibrillierte Cellulose (MFC)	Nanofibrillierte Cellulose (NFC)	Durchmesser: 5 -60 nm Länge: einige μm
Nanokristalline Cellulose (NCC)	Cellulose Nanokristalle, Mikrokristalle, Whisker, rodshaped cellulose	Durchmesser: 5 -70 nm Länge: 100 -250 nm
Bakterien Nanocellulose (BNC)	Bakterien-Cellulose, Mikrobielle Cellulose, Biocellulose	Durchmesser: 20 -100 nm Nanofiber Netzwerk

25 Gemischte Schichten mit Nanocellulose und z.B. Acrylpolymeren wurden ebenfalls vorgeschlagen (Grüneberger et al. (2014), J Mater Sci 49:6437). Wegen Ihrer günstigen

biologischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften wurden Nanocellulose-Materialien auch zur Verwendung in der Biomedizin vorgeschlagen, z.B. als Gerüstmaterial oder als Trägerstoff für Arzneimittel.

- 5 In der Medizin, Biotechnik, Landwirtschaft, Lebensmittel- und Umweltwissenschaften gibt es eine Vielzahl von Problemstellungen, deren Lösung enorm vom schnellen Nachweis bestimmter analytischer Parameter profitieren. Solche Tests sind mittlerweile in vielen Bereichen des Lebens etabliert. Die bekanntesten Beispiele sind pH-Papier, Schwangerschaftstest oder die Bestimmung der Wasserhärte. Alle genannten Beispiele zeigen
10 einen einfachen Farbumschlag bei entsprechender Indikation. Die Teststreifen sind dabei aus einem Träger (Kunststoff, Papier, Glas), einem Indikator (organischer Farbstoff) und einer oder mehrere polymere Schichten zur Fixierung des Indikators aufgebaut.

- Eine Signalgenerierung kann prinzipiell auf verschiedenen Arten erfolgen: Spektroskopisch (z.
15 B. Fluoreszenz, Lumineszenz, IR, UV); elektrochemisch (z. B.: Amperometrie, Potentiometrie, Konduktivität, Coulometrie); oder markierungsfreie optische Oberflächenanalytik (z.B. Ellipsometrie, reflektometrische Interferenzspektroskopie, Oberflächenplasmonenresonanz).

- Zunehmend nehmen Technologien für die Umsetzung von Multiparameter- oder auch
20 Multiplexanwendungen einen immer größeren Raum ein. Die Multiparameteranalytik ermöglicht die simultane Bestimmung mehrerer Analyte in einem Messdurchgang und damit komplexere analytische Aussagen nach nur einer Laboruntersuchung.

- Biochips dominieren zunehmend solche Detektionstechniken aufgrund der Fähigkeit, eine
25 hochparallele Messung vieler Analyten mit begrenzten Probenvolumina durchzuführen. Die Technologie liefert durch starke Miniaturisierung die Grundlage für die Durchführung von Reaktionen auf Basis von Biomolekülen, wie DNA, Peptiden oder Proteinen. Diese werden hierzu auf einem Träger (Chip) in einem festen Raster immobilisiert. Im Allgemeinen sind die Biomoleküle in wässrigen Flüssigkeiten gelöst, welche in Form kleinster Tropfen auf das feste
30 Substrat gebracht werden. Für die Herstellung von Biochips für die Multiparameteranalytik ist eine Oberfläche mit optimalen chemischen Funktionen eine grundlegende Voraussetzung. Entsprechende Oberflächeneigenschaften ermöglichen die spezifische Immobilisierung verschiedener Biomoleküle sowie die Erzeugung selektiver Eigenschaften hydrophiler oder

hydrophober Oberflächen. Ein weiteres Problem bei den bisherigen marktrelevanten Lösungen ist, dass für jede analytische Aufgabenstellung nur ein spezieller Biochip benutzt werden kann.

5 Es gibt also einen Bedarf für zuverlässige Mittel zur Herstellung von beschichteten Oberflächen, insbesondere Oberflächen mit optisch günstigen Eigenschaften und Oberflächen, die eine weitere Derivatisierung zulassen, ohne nachfolgende Verwendungen zu stören.

10 Dieses Problem wird durch die Verfahren, Celluloseschichten und Verwendungen mit den Merkmalen der unabhängigen Ansprüche gelöst. Bevorzugte Ausführungsformen, die isoliert oder in jeder beliebigen Kombination in die Praxis umgesetzt werden können, werden in den abhängigen Ansprüchen genannt.

15 Entsprechend bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein Verfahren zur Herstellung einer Celluloseschicht zum Nachweis mindestens eines Analyten, umfassend (i) Herstellung einer Celluloseschicht durch Auftragen einer stabilen Dispersion von Cellulose und/oder einem Cellulose-Derivat auf einen geeigneten Träger, und (ii) Immobilisieren mindestens eines Liganden auf der Celluloseschicht.

20 Im Folgenden werden die Begriffe "aufweisen", "enthalten", oder "umfassen" und jede beliebige grammatikalische Variation davon bevorzugt in nicht-ausschließlicher Bedeutung verwendet. Diese Begriffe können sich also sowohl auf eine Situation beziehen, in der neben den Merkmalen, die durch die Begriffe eingeführt werden, keine weiteren Merkmale im beschriebenen Gegenstand vorliegen, als auch auf eine Situation, in der ein oder mehrere weitere Merkmale vorhanden sind. Zum Beispiel beziehen sich bevorzugt die Formulierungen
25 "A umfasst B", "A enthält B" und "A weist B auf" auf eine Situation, in der außer B kein weiteres Element in A vorhanden ist, also auf eine Situation, in der A ausschließlich aus B besteht, aber auch auf eine Situation, in der neben B ein oder mehrere weitere Elemente in A vorhanden, so zum Beispiel Element C, Elemente C und D, oder sogar weitere Elemente.

30 Des Weiteren werden im Folgenden die Begriffe "bevorzugt", "mehr bevorzugt", "am meisten bevorzugt", "insbesondere", "spezifisch" oder ähnliche Formulierungen bevorzugt im Zusammenhang mit optionalen Merkmalen verwendet, ohne weitere Möglichkeiten zu beschränken. Merkmale, die durch diese Formulierungen eingeführt werden, sind also bevorzugt optionale Merkmale und schränken den in den Ansprüchen beanspruchten

Gegenstand nicht ein. Wie der Fachmann versteht, kann die Erfindung mit alternativen Merkmalen ausgeführt werden. Ähnliches gilt für die Formulierung "in einer Ausführungsform" oder ähnliche Formulierungen, die sich ebenfalls auf optionale Merkmale beziehen ohne Einschränkung bezüglich weiterer Ausführungsformen, ohne Einschränkung des Gegenstands der Erfindung und ohne Einschränkung der Möglichkeit, die so eingeführten Merkmale mit anderen optionalen oder nicht optionalen Merkmalen zu kombinieren.

Der Begriff "Standardbedingungen", soweit nicht anders definiert, bezieht sich auf die IUPAC Standard-Umgebungstemperatur- und -Druckbedingungen (SATP), also bevorzugt eine Temperatur von 25 °C und einen absoluten Druck von 100 Kilo-Pascal; bevorzugt beziehen sich Standardbedingungen zusätzlich auf einen pH von 7. Der Begriff "ungefähr", sofern nicht anders angegeben, bezieht sich auf den angegebenen Wert mit der allgemein akzeptierten technischen Präzision im relevanten Arbeitsgebiet und bevorzugt auf den angegebenen Wert $\pm 20\%$, bevorzugt $\pm 10\%$, noch mehr bevorzugt $\pm 5\%$. Der Begriff "im Wesentlichen" bezieht sich bevorzugt auf die Tatsache, dass mögliche Abweichungen, die einen Einfluss auf das angegebene Ergebnis oder die Verwendung haben, nicht vorliegen, d.h. mögliche Abweichungen verursachen eine Abweichung vom angegebenen Ergebnis von höchstens $\pm 20\%$, bevorzugt $\pm 10\%$, mehr bevorzugt $\pm 5\%$. "Bestehend im Wesentlichen aus" bedeutet also bevorzugt das Vorhandensein der angegebenen Bestandteile unter Ausschluss von anderen Komponenten mit Ausnahme von Verunreinigungen, Bestandteilen, die als Ergebnis des Herstellungsprozesses unvermeidlich sind und/oder Bestandteilen, die für einen Zweck hinzugefügt wurden, der sich nicht auf den technischen Effekt der vorliegenden Erfindung bezieht. Eine Zusammensetzung, die mit der Formulierung "bestehend im Wesentlichen aus" definiert wird, kann also Additive, Hilfsstoffe, Lösungsmittel, Verdünnungsmittel, Trägerstoffe und ähnliches enthalten. Bevorzugt enthält eine Zusammensetzung, die im Wesentlichen aus den angegebenen Komponenten bestehen soll, höchstens einen Massenanteil von 5 %, bevorzugt höchstens 2 %, mehr bevorzugt höchstens 1 % an nicht angegebenen Komponenten.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann zusätzlich weitere Schritte enthalten; solche weiteren Schritte können sich z.B. auf die Herstellung einer stabilen Dispersion vor dem Auftragen beziehen oder auf weitere, dem Auftragen folgende Schritte, wie z.B. Trocknung der Celluloseschicht. Einzelne oder alle Schritte können wiederholt werden; so können z.B. mehrere Liganden in verschiedenen Auftragsvorgängen aufgetragen werden. Die erfindungsgemäße Celluloseschicht kann auf dem Träger verbleiben oder, z.B. als Folie oder

Streifen, nach einem Trocknungsvorgang von diesem wieder entfernt werden. Bevorzugt werden, um unterschiedliche Funktionalitäten auf der Schicht zu realisieren, zunächst wässrige Dispersionen verschieden modifizierter Cellulosen hergestellt. Anschließend werden bevorzugt zunächst zwei oder mehr stabile Cellulosedispersionen mit den gewünschten Konzentrationen intensiv miteinander vermischt. Diese Mischung wird dann bevorzugt als Schicht auf einen gewünschten Träger aufgetragen. Somit können Schichten aus unterschiedlichen Dispersionen hergestellt werden.

Der Begriff "Träger" wird im Kontext der vorliegenden Beschreibung in der dem Fachmann geläufigen Bedeutung verwendet; bevorzugt handelt es sich bei dem Träger um einen Gegenstand oder eine Vorrichtung, der/die bevorzugt starr oder biegsam ist und der/die grundsätzlich aus jedem beliebigen Material bestehen kann. Bevorzugt hat der Träger planare, zylindrische oder elyptische Form, mehr bevorzugt handelt es sich bei dem Träger um einen Festkörper in Form einer Platte, Folie, Röhre, Membran oder eines oder mehrerer Beads. Insbesondere für die Herstellung einer Folie oder eines Streifens kann die stabile Dispersion auch auf z.B. auf eine Rolle aufgetragen und dort getrocknet werden. Ebenfalls bevorzugt kann es sich bei dem Träger um ein Verpackungsmaterial, ein Labormaterial und/oder einen Einwegartikel handeln. Bevorzugte Verpackungsmaterialien sind Folien, zum Beispiel aus Polyethylen, Polypropylen, Polyvinylchlorid, oder ähnlichen Kunststoffen. Bevorzugte Labormaterialien sind Träger für einen Biochip, zum Beispiel Objektträger oder ähnliche Materialien, Mehrlochplatten, wie z.B. Mikrotiterplatten, Halbleiterplatten oder ähnliche Artikel. Bevorzugte Einwegartikel sind zum Beispiel Urinbecher, Spritzen, Kanülen, Schläuche, Tissue-Artikel, Entnahmestäbchen (Swabs), Atemmasken oder Teile davon, oder Luftfilter. Bevorzugt enthält der Träger Glas, Papier, Kunststoff, Keramik und/oder Metall, noch mehr bevorzugt besteht der Träger aus Glas, Papier, Kunststoff, Keramik und/oder Metall.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Träger transparent. In einer ebenfalls bevorzugten Ausführungsform ist die Celluloseschicht transparent. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind Träger und Celluloseschicht transparent. Der Begriff "transparent" wird im Kontext der vorliegenden Beschreibung in der dem Fachmann geläufigen Bedeutung verwendet; bevorzugt bezieht sich der Begriff transparent auf die Eigenschaft eines Materials, Strahlung, bevorzugt sichtbares Licht, im Wesentlichen nicht zu absorbieren. Bevorzugt werden Wellenlängen in einem Bereich zwischen 300 nm und 700 nm im Wesentlichen nicht absorbiert, mehr bevorzugt in einem Bereich zwischen 350 nm und 650 nm.

Bevorzugt ist der Absorptionskoeffizient eines transparenten Materials höchstens 10 cm^{-1} , mehr bevorzugt höchstens 2 cm^{-1} , noch mehr bevorzugt höchstens 1 cm^{-1} .

Der Begriff "Cellulose" ist dem Fachmann bekannt und bezieht sich auf ein organisches Polymer aus beta-1,4-glycosidisch verknüpften Glucose-Einheiten. Die Herstellung von Cellulose ist dem Fachmann ebenfalls bekannt. Bevorzugt wird Cellulose aus Holz, einjährigen Pflanzen, Baumwolle und/oder Altpapier gewonnen. Bevorzugt kann auch ein Derivat der Cellulose verwendet werden; bevorzugt werden als Derivatisierung Ester- und/oder Ethergruppen eingeführt, insbesondere eine oder mehrere funktionale Gruppe(n) ausgewählt aus Carboxyl, Carbonyl, Sulfat, Carboxymethyl, Methyl, Ethyl, Silyl, Acetyl, Carbamat, und Amino. Der Substitutionsgrad (degree of substitution, DS), also die durchschnittliche Zahl ersetzter Hydroxy-Gruppen pro Glucose-Einheit, liegt bevorzugt bei höchstens 1, noch mehr bevorzugt höchstens 0,5. Bevorzugt ist die Cellulose eine Nanocellulose oder ein Derivat davon.

15

Der Begriff "Analyt" wird im Kontext der vorliegenden Beschreibung in der dem Fachmann geläufigen Bedeutung verwendet; bevorzugt handelt es sich bei dem Analyten um eine chemische Substanz, bevorzugt eine in einem Lösungsmittel, bevorzugt Wasser, lösliche Substanz. Bevorzugt ist der Analyt ein nieder- oder hochmolekularer Metaboliten einer Zelle, eines Gewebes, eines Organs, oder eines Körpers oder eine Substanz, die eingesetzt wird, um die chemische Zusammensetzung einer Zelle, eines Gewebes, eines Organs, oder eines Körpers zu verändern. Bevorzugte niedermolekulare Analyten sind solche, die in der medizinischen Diagnostik verwendet werden, also insbesondere Analyten, bei denen eine veränderte Konzentration in einem Körpergewebe oder in einer Körperflüssigkeit eine Krankheit anzeigt. Bevorzugte niedermolekulare Analyten sind deshalb Glucose, Hormone, insbesondere Östrogene, Lipide, insbesondere Cholesterin, Harnsäure, Ammoniak und dergleichen. Bevorzugte makromolekulare Analyten sind insbesondere Polypeptide und Polynukleotide. Unter den Polypeptiden sind besonders bevorzugt Antikörper, Glycoproteine und Phosphoproteine. Auch bevorzugt sind Autoantigene, Allergene, sowie Zellen oder Bestandteile davon, zum Beispiel von bakteriellen Zellhüllen oder von viralen Partikeln. Besonders bevorzugt sind Analyten Antikörper oder Antigene, bevorzugt Antigene, die an Antikörper binden.

30

Der Begriff "Ligand" wird im Kontext der vorliegenden Beschreibung in der dem Fachmann geläufigen Bedeutung verwendet; bevorzugt ist der Ligand eine chemische Substanz, die, bevorzugt spezifisch, an einen Analyten bindet. Eine spezifische Bindung liegt bevorzugt vor, wenn die Bindung des Liganden an den Analyten mindestens 5fach, bevorzugt mindestens 10fach, noch mehr bevorzugt mindestens 100fach, am meisten bevorzugt mindestens 1000fach so stark ist wie an eine Substanz, die nicht der Analyt ist; die Affinität wird dabei bevorzugt als Dissoziationskonstante der entsprechenden Komplexe angegeben. Alternativ kann Spezifität auch durch Bestimmung des Signal/Hintergrundverhältnisses bestimmt werden, wobei das Signal/Hintergrundverhältnis bei spezifischer Bindung bevorzugt bei mindestens 3, mehr bevorzugt mindestens 10, noch mehr bevorzugt mindestens 100, am meisten bevorzugt mindestens 1000, liegt. Entsprechende Methoden sind dem Fachmann bekannt. Die Spezifität ist bevorzugt eine Gruppenspezifität, also eine Spezifität für eine Gruppe nicht-identischer Moleküle mit mindestens einem gemeinsamen Strukturmerkmal; eine entsprechende Gruppe ist z.B. die der IgG-Moleküle. Mehr bevorzugt ist die Spezifität eine Spezifität für eine spezifische chemische Substanz, z.B. für ein Polypeptid. Die Affinität des Liganden zum Analyten ist bevorzugt hoch genug, um einen Nachweis des Analyten in der geplanten Nachweisprozedur zu ermöglichen. Bevorzugt ist die Dissoziationskonstante K_d des Ligand/Analyt-Komplexes höchstens 10^{-3} M, mehr bevorzugt höchstens 10^{-4} M, noch mehr bevorzugt höchstens 10^{-6} M, am meisten bevorzugt höchstens 10^{-8} M. Bevorzugt ist der Ligand ein Polypeptid, ein Polynukleotid, ein Kohlenhydrat, oder ein Fett. Noch mehr bevorzugt ist der Ligand ein Antikörper, ein Hormon, ein Glycolipid, ein Phospholipid, ein Glycoprotein oder ein Phosphoprotein. Auch bevorzugt ist der Ligand ein rekombinantes Protein, ein natives Protein, ein Autoantigen, ein Allergen und/oder eine Zelle oder ein Bestandteil davon, zum Beispiel von bakteriellen Zellhüllen oder von viralen Partikeln.

25

Der Begriff "immobilisieren" wird im Kontext der vorliegenden Beschreibung in der dem Fachmann geläufigen Bedeutung verwendet; bevorzugt führt die Immobilisierung dazu, dass der Ligand während der Verwendung im Wesentlichen an die Celluloseschicht gebunden bleibt. Bevorzugt werden von einem immobilisierten Liganden unter Standardbedingungen über einen Zeitraum von einer Stunde maximal 10%, bevorzugt maximal 2%, noch mehr bevorzugt maximal 1% in eine umgebende Lösung ausgewaschen. Bevorzugt kann der Ligand während des Immobilisierungsvorgangs zumindest teilweise in die Celluloseschicht eindringen; der Begriff "Immobilisierung auf" einer Celluloseschicht schließt also bevorzugt eine zumindest teilweise Immobilisierung in der Celluloseschicht mit ein. Der Ligand wird bevorzugt nicht-

30

- kovalent auf bzw. in der Celluloseschicht immobilisiert; bevorzugt beruht die Bindung des Liganden an die Celluloseschicht also auf Wasserstoffbrückenbindungen, van der Waalskräften und/oder ionischen Wechselwirkungen. Die Stärke der Immobilisierung lässt sich dabei insbesondere durch Verwendung geeigneter Cellulosederivate steuern; so kann der Fachmann für die Immobilisierung anionischer Liganden kationische Cellulosederivate bevorzugen, für die Bindung hydrophober Liganden dagegen hydrophobere Cellulosederivate. In einer Ausführungsform ist die Bindung des Liganden an die Celluloseschicht kovalent; geeignete Reagenzien und Seitengruppen sind dem Fachmann bekannt.
- 10 Bevorzugt wird eine Vielzahl von nicht-identischen Liganden auf der Celluloseschicht immobilisiert, wobei sich der Begriff Vielzahl bevorzugt auf eine Anzahl von mindestens zwei, noch mehr bevorzugt mindestens fünf, noch mehr bevorzugt mindestens zehn, am meisten bevorzugt mindestens 20 nicht-identischen Liganden bezieht. Ebenfalls bevorzugt bezieht sich der Begriff Vielzahl auf eine Anzahl von 2 bis 15, bevorzugt 2 bis 10, besonders bevorzugt 1 bis 6, nicht-identischer Liganden. Die nicht-identischen Liganden können prinzipiell als Gemisch immobilisiert werden; bevorzugt werden sie getrennt, noch mehr bevorzugt in räumlich strukturierter Anordnung auf bzw. in der Celluloseschicht aufgebracht und immobilisiert. Der Celluloseschicht zum Nachweis mindestens eines Analyten umfasst also bevorzugt eine räumlich strukturierte Anordnung ("Array") an Liganden, die bevorzugt eine Identifizierung des Auftragsortes der einzelnen Liganden erlaubt.
- 20

Der Begriff "Dispersion" ist dem Fachmann als Begriff für ein heterogenes Gemisch aus mindestens zwei Stoffen bekannt. Bevorzugt handelt es sich bei der Dispersion um eine flüssig/fest-Dispersion, also eine Suspension. Bevorzugt ist der Massenanteil in der Dispersion in einem Bereich zwischen 0,01 % und 10 %, mehr bevorzugt zwischen 0,05 % und 5 %. Noch mehr bevorzugt liegt der Massenanteil an Cellulose und/oder Cellulose-Derivat in der Dispersion zwischen 0,01 % und 10 %, noch mehr bevorzugt zwischen 0,05 % und 5 %. Bevorzugt ist das Dispersionsmedium eine wässrige Lösung, mehr bevorzugt Wasser.

30 Der Begriff "stabile Dispersion" wird im Kontext der vorliegenden Beschreibung in der dem Fachmann bekannten Bedeutung verwendet und bezieht sich bevorzugt auf eine Dispersion, bei der der Dispersionsgrad über einen Zeitraum von mindestens einem Monat, bevorzugt mindestens ein Jahr, noch mehr bevorzugt mindestens drei Jahren im Wesentlichen unverändert bleibt. Bevorzugt kommt es bei der stabilen Dispersion im vorgenannten Zeitraum nur in

vernachlässigbaren Umfang zur Flokkulation, Aggregation oder Sedimentation. Bevorzugt weist die Cellulose und/oder das Cellulosederivat in der stabilen Dispersion eine Partikelgröße von höchstens 1000 nm, mehr bevorzugt 750 nm, am meisten bevorzugt 600 nm auf, noch mehr bevorzugt weisen alle Inhaltsstoffe der stabilen Dispersion eine Partikelgröße von höchstens 1000 nm, mehr bevorzugt 750 nm, am meisten bevorzugt von höchstens 600 nm auf. Methoden zur Bestimmung von Partikelgrößen sind dem Fachmann geläufig; bevorzugt wird die Partikelgröße bestimmt wie in der vorliegenden Beschreibung in den Beispielen beschrieben. Bevorzugt ist die stabile Dispersion eine Dispersion von Nanocellulose. Der Ausdruck "Auftragen einer stabilen Dispersion von Cellulose und/oder einem Cellulose-Derivat" ist also bevorzugt dem Ausdruck "Auftragen einer stabilen Dispersion von Nanocellulose und/oder einem Nanocellulose-Derivat" äquivalent. Methoden zur Herstellung von stabilen Cellulose-Dispersionen sind dem Fachmann bekannt. Die stabile Cellulose-Dispersion wird bevorzugt mittels Hochdruck-Homogenisation erzeugt, wie zum Beispiel in die DE 2009021688 bzw. WO 2009/021687 angegeben. Ebenfalls bevorzugt werden stabile Cellulose-Dispersionen durch Behandlung in einem Ultra-Turrax bei ca. 20.000 Umdrehungen/min für 15 Minuten und bevorzugt nachfolgender zweistufiger Behandlung in einem Hochdruck-Homogenisator erhalten. Die Behandlung im Hochdruck-Homogenisator umfasst bevorzugt sechs Umläufe in einer 200 µm Zelle bei 500 bar und umfasst bevorzugt zwölf Umläufe in einer 50 µm Zelle bei 1000 bar.

Das Auftragen der Celluloseschicht kann durch alle Verfahren erfolgen, die dem Fachmann angemessen erscheinen; bevorzugt erfolgt das Auftragen durch Rakeln, Sprühen, Spincoaten, Sprühtrocknen und/oder Tauchen. Das Auftragen der Cellulosedispersion erfolgt bevorzugt homogen. Die Schichtdicke der Celluloseschicht beträgt nach Trocknung bevorzugt von 0,01 µm bis 10 µm, mehr bevorzugt von 0,02 µm bis 5 µm, noch mehr bevorzugt höchstens 2,5 µm. Dem Fachmann ist bekannt, dass sich die Schichtdicke neben der Wahl des Auftragsverfahrens insbesondere durch Auswahl des Auftragsvolumens und des Cellulosegehalts der Dispersion steuern lässt. Beispiele für die Verwirklichung beispielhafter Schichtdicken werden insbesondere in den Beispielen gezeigt.

Bevorzugt wird die Celluloseschicht nach dem Auftragen getrocknet. Die Trocknung erfolgt dabei bevorzugt bei einer Temperatur zwischen 15° von 100°, mehr bevorzugt zwischen 30° und 80°, noch mehr bevorzugt zwischen 35° und 65°. Die Trocknung erfolgt bevorzugt bis zur Schichtdickenkonstanz und/oder zur Gewichtskonstanz. Dem Fachmann sind geeignete

Trocknungsverfahren bekannt. Bevorzugt Trocknungsdauern werden im Wesentlichen vom Auftragsvolumen und der Trocknungstemperatur bestimmt. Die Immobilisierung des Liganden kann bevorzugt bereits während des Trocknens der Celluloseschicht erfolgen, z.B. indem der Ligand der stabilen Dispersion beigemischt wird. Mehr bevorzugt wird der Ligand auf der getrockneten oder vorgetrockneten Celluloseschicht immobilisiert, z.B. durch lokal begrenztes Auftragen kleiner Volumina einer oder mehrerer Ligandenlösung(en) ("Spotten"). Bevorzugt wird die Celluloseschicht nach dem Immobilisieren erneut getrocknet oder direkt verwendet. Die erfindungsgemäße Celluloseschicht wird bevorzugt vor der weiteren Verwendung nicht aktiviert. Die erfindungsgemäße Celluloseschicht wird also vor der weiteren Verwendung bevorzugt nicht mit chemischen Seitenketten modifiziert, die zu Liganden, bevorzugt den hierin beschriebenen Liganden, kovalente Bindungen ausbilden.

In den der vorliegenden Erfindung zugrundeliegenden Untersuchungen wurde überraschend gefunden, dass auf Grund der speziellen Struktur der erfindungsgemäßen Celluloseschicht und der möglichen Funktionalisierung mit chemischen Gruppen, Liganden aus verschiedenen Stoffgruppen gebunden werden können. Mit einer Beschichtung können also verschiedene Fragestellungen, z. B. in der Peptid-, DNA- oder Proteinanalytik gelöst werden. Ausgehend von einem gegebenen Träger wird durch physikalische und chemische Prozesse eine maßgeschneiderte Beschichtung aus Cellulose, auf Wunsch auch orts aufgelöst multifunktional, geschaffen, die die parallele Analyse selbst verschieden gearteter Spezies ermöglicht. Die Einstellung der Oberflächeneigenschaften lässt die generellen Eigenschaften des Bulkmaterials bzw. des Trägers unberührt.

Für heterogene Nachweisverfahren, insbesondere für den Einsatz als Biosensoren kann eine Funktionalisierung der Oberflächen mit biomolekularen Sonden oder Rezeptoren erfolgen. In Abhängigkeit von der Art dieser Funktionalisierung können die entwickelten Multifunktionsschichten in verschiedensten Anwendungen genutzt werden. Mögliche Sondenmoleküle sind DNA zur Untersuchung von Krankheiten bzw. zur Bestimmung der Identität von Probenmaterial, Antikörper für den Nachweis von Antigenen, sowie Antigene bzw. Fragmente von Antigenen zum serologischen Nachweis von Antikörpern in biologischen Proben. Die aufzubringenden Substanzen können an die Multifunktionsschichten selektiv und kovalent immobilisiert werden.

Die Entwicklung solcher Funktionsmaterialien für die Multiparameteranalytik für „on site-Tests“ sowohl im Bereich Qualität und Sicherheit von Lebens- und Futtermitteln als auch für „point of need“ in der Diagnostik zeigt eine Vielzahl von Vorteilen, zumal die Herstellungsbedingungen des Funktionsmaterials so angepasst werden können, dass die

5 gewünschten Eigenschaften wie Netzwerkdicke, Funktionalität und Konzentration den immobilisierten Sonden gerecht werden. Die Vorteile der Erfindung gegenüber dem Stand der Technik bestehen dabei insbesondere in Folgendem:

- Modifizierbarkeit und damit verschiedene funktionelle Gruppen auf der Oberfläche darstellbar und sind die Oberflächenfunktionalitäten für Peptide, Proteinen, DNA, Antikörper
- 10 leicht zugänglich;
- dünne stabile Schichten mit verschiedenen Methoden darstellbar;
- sehr niedriges Hintergrundsignal;
- mit verschiedenen Wellenlängen auswertbar;
- Aufsicht und Durchsicht realisierbar;
- 15 - keine Aktivierungschemie nötig.

Aus den genannten Vorteilen ergeben sich verschiedene Möglichkeiten der Anwendung für Fragestellungen in der Praxis. Beispiele dafür sind Eingrenzung der Analyse (Diagnose) einer bestimmten Erkrankung durch die gleichzeitige Verwendung verschiedener Analyte/Marker,

20 und Durchführung einer größeren Anzahl von Tests aus einem großen, heterogenen Gebiet.

Die oben angegebenen Definitionen gelten mutatis mutandis auch für die im Folgenden dargestellten Ausführungsformen.

25 Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf eine Celluloseschicht mit einem immobilisierten Liganden, hergestellt oder herstellbar nach dem Verfahren zur Herstellung einer Celluloseschicht der vorliegenden Erfindung.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich außerdem auf ein Verfahren zum Nachweis eines

30 Analyten in einer Probe, umfassend Inkontaktbringen der Probe mit einer nach dem Verfahren zur Herstellung einer Celluloseschicht der vorliegenden Erfindung hergestellten Celluloseschicht und/oder einer Celluloseschicht der vorliegenden Erfindung, und detektieren von mit dem in der Celluloseschicht enthaltenen Liganden interagierendem Analyten.

Das Verfahren zum Nachweis eines Analyten ist vorzugsweise ein in vitro Verfahren und kann zusätzlich weitere Schritte enthalten. Weitere Schritte können sich z.B. auf die Gewinnung einer Probe und/oder das Hinzufügen (weiterer) Reaktanden einer Nachweisreaktion beziehen. Ein oder mehrere Schritte des Verfahrens können auch automatisiert durchgeführt werden.

5

Der Begriff "Inkontaktbringen" wird im Kontext der vorliegenden Beschreibung in der dem Fachmann bekannten Bedeutung verwendet; bevorzugt umfasst Inkontaktbringen das Aufbringen einer flüssigen Probe auf die erfindungsgemäße Celluloseschicht und das Ermöglichen einer Interaktion zwischen Ligand und in der Probe möglicherweise vorhandenem Analyten. Im Fall einer gasförmigen Probe gilt das oben gesagte mutatis mutandis; bevorzugt wird die Celluloseschicht in diesem Fall befeuchtet oder vorgequollen. Im Fall einer festen Probe kann das Inkontaktbringen z.B. dadurch erfolgen, dass die Oberfläche der Probe mit der Celluloseschicht in Kontakt gebracht wird, z.B. durch Auflegen.

15 Der Begriff "Probe" ist dem Fachmann geläufig und umfasst alle Probenmaterialien, die potentiell einen Analyten enthalten können. Die Probe kann das vollständige zu untersuchende Objekt sein, z.B. bei der Untersuchung von Lebensmitteln. Bevorzugt ist die Probe ein Teil des zu untersuchenden Objekts. Bevorzugte Probenmaterialien sind flüssige oder gasförmige Proben; feste Proben werden bevorzugt mit einer geeigneten Extraktionsflüssigkeit extrahiert und dann wie flüssige Proben verwendet. Die Proben werden bevorzugt vorbehandelt, z.B. um
20 den Analyten aus Bindungen oder Komplexen herauszulösen oder um möglicherweise störende Probenbestandteile zu entfernen, noch mehr bevorzugt wird die Probe vor dem Inkontaktbringen mit der Celluloseschicht nicht vorbehandelt. Bevorzugt ist die Probe eine biologische Probe, insbesondere ein Lebensmittel oder eine zu diagnostischen Zwecken entnommene Probe. Bevorzugt handelt es sich bei der Probe um eine Gewebeprobe eines lebenden Organismus, bevorzugt eines Säugetiers, mehr bevorzugt eines Menschen. Feste Proben sind bevorzugt Gewebeproben oder Stuhl. Mehr bevorzugt ist die Probe eine gasförmige Probe, z.B. eine Atemluft-Probe, insbesondere eine Ausatemluftprobe. Noch mehr bevorzugt ist die Probe eine Probe einer Körperflüssigkeit, bevorzugt Blut, Plasma, Serum, Speichel, Urin,
25 Liquor, Pleuraflüssigkeit, Aszitesflüssigkeit, Galle, Schweiß, Muttermilch, Menstruationsflüssigkeit, Ejakulat, Abstrichmaterial, insbesondere aus der Nase, dem Mund, oder anderen Schleimhäuten, oder Spülflüssigkeit einer Körperöffnung (Lavage); am meisten bevorzugt sind Proben von Blut, Serum, Plasma oder Urin. Ebenfalls bevorzugt ist die Probe
30

eine Probenmatrix aus den Umwelt- oder Lebenswissenschaften, insbesondere Frisch- und Trinkwasser, Prozess- und Abwasser, Boden, Luft oder Abluft.

Die Detektion der Interaktion des Liganden mit dem Analyten erfolgt bevorzugt über dem
5 Fachmann bekannte Methoden, die vom Fachmann je nach den Erfordernissen ausgewählt werden, die sich insbesondere aus Probenmaterial, Identität des Analyten und Identität des Liganden ergeben. Im Fall eines Polypeptids als Analyt und eines Antikörpers als Ligand kann die Detektion z.B. über einen Sekundärantikörper erfolgen, der an eine detektierbare chemische Gruppierung wie z.B. einen Farbstoff oder ein Enzym gekoppelt ist. Im Fall eines
10 niedermolekularen Analyten kann der Ligand z.B. ein Enzym sein, welches den Analyten als Substrat verwendet. Entsprechend kann für die Detektion eine Zugabe weiterer Reaktanden, Puffer, Ionen und Ähnlichem nötig sein, um eine nachweisbare Reaktion zu erhalten. Entsprechende Verfahren sind dem Fachmann bekannt. Bevorzugt erfolgt die Detektion visuell oder mittels Fluoreszenz-, Lumineszenz-, oder Absorptionsoptik, durch Scanning
15 Densitometrie oder elektrochemisch. Mehr bevorzugt erfolgt die Detektion bildgebend Fluoreszenz-, Lumineszenz-, oder Absorptionsoptik oder durch Scanning Densitometrie.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf eine Vorrichtung umfassend eine erfindungsgemäße Celluloseschicht.

20

Der Begriff "Vorrichtung" wird im Kontext der vorliegenden Beschreibung in der dem Fachmann bekannten Bedeutung verwendet; bevorzugt ist die Vorrichtung eine Vorrichtung zur Bestimmung eines Analyten in einer Probe oder ein Teil davon, z.B. eine Sonde oder ein Teststreifen. Bevorzugt umfasst die Vorrichtung die erfindungsgemäße Celluloseschicht als
25 Membran, Folie, oder in anderer geeigneter Form. Mehr bevorzugt umfasst die Vorrichtung die erfindungsgemäße Celluloseschicht auf einem Träger. Die Vorrichtung ist also bevorzugt ein Verpackungsmaterial, ein Labormaterial, bevorzugt ein Biochip oder eine Mehrlochplatte, oder ein Einwegartikel, bevorzugt ein Urinbecher, eine Spritze, eine Kanüle, ein Schlauch, ein Tissueartikel, ein Swab, eine Atemmaske oder ein Teil davon, oder ein Luftfilter.

30

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf einen Kit zum Nachweis mindestens eines Analyten, umfassend mindestens eine Celluloseschicht mit mindestens einem immobilisierten Liganden und eine Vorrichtung zur Probennahme, wobei die Celluloseschicht bevorzugt auf einem Träger vorliegt.

Der Begriff "Kit" wird im Kontext der vorliegenden Beschreibung in der dem Fachmann bekannten Bedeutung verwendet; bevorzugt bezieht sich der Begriff auf eine Kombination der angegebenen Komponenten, die bevorzugt angepasst ist, um den Nachweis mindestens eines Analyten in einer Probe zu ermöglichen. Die Komponenten können zusammen oder einzeln
5 verpackt sein. Bevorzugt ist der Kit eingerichtet, um das Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe gemäß der vorliegenden Erfindung durchzuführen. Die Komponenten werden bevorzugt benutzungsfertig zur Verfügung gestellt. Bevorzugt enthält der Kit weitere Komponenten, zum Beispiel Puffer, Waschlösungen, ein oder mehrere Nachweisreagenzien, und/oder optional eine Gebrauchsanweisung. Im erfindungsgemäßen Kit ist die
10 Celluloseschicht bevorzugt auf einem Träger fixiert, insbesondere auf einer Platte, Folie, Membran oder einem Bead. Ebenfalls bevorzugt liegt die Celluloseschicht auf einem Biochip, einer Mehrlochplatte, einem Verpackungsmaterial, oder einem Einwegartikel vor, insbesondere einem Urinbecher, einer Spritze, einer Kanüle, einem Schlauch, einem Tissueartikel, einem Swab, einer Atemmaske oder Teil davon, oder einem Luftfilter.

15

Der Begriff "Vorrichtung zur Probenentnahme" bezieht sich auf jede Vorrichtung, die zur Entnahme einer Probe wie oben spezifiziert geeignet bzw. eingerichtet ist. Dem Fachmann ist bekannt, welche Vorrichtungen für die jeweils beabsichtigte Probenentnahme geeignet sind. Zur Entnahme von biologischen Proben werden bevorzugt Swabs, Skalpelle, Stanzen,
20 Beatmungskanülen oder Schläuche verwendet. Noch mehr bevorzugt als Vorrichtungen zur Probenahme sind Spritzen und/oder Kanülen. Im Bereich der chemischen und Umweltanalytik handelt es sich bei der Vorrichtung zur Probenannahme bevorzugt um eine Pipette, einen Swab, einen Löffel, einen Spatel oder insbesondere eine Einmalpipette

25 Die vorliegende Erfindung bezieht sich weiter auf die Verwendung einer nach dem Verfahren der vorliegenden Erfindung hergestellten Celluloseschicht zum Nachweis eines Analyten, bevorzugt in der medizinischen Diagnostik, der (Bio)analytik, der Umweltanalytik, der Landwirtschafts-, Nahrungsmittel- oder Verpackungsindustrie, der Verfahrenstechnik oder der Gerichtsmedizin.

30

Im Licht des oben Gesagten werden die folgenden Ausführungsformen besonders in Betracht gezogen:

Ausführungsform 1: Verfahren zur Herstellung einer Celluloseschicht zum Nachweis mindestens eines Analyten, umfassend

- (i) Herstellung einer Celluloseschicht durch Auftragen einer stabilen Dispersion von Cellulose und/oder einem Cellulose-Derivat auf einen geeigneten Träger, und
- 5 (ii) Immobilisieren mindestens eines Liganden auf der Celluloseschicht.

Ausführungsform 2: Verfahren nach Ausführungsform 1, wobei mindestens zwei nicht-identische Cellulosen und/oder Cellulose-Derivate vor dem Auftragen gemeinsam dispergiert werden.

10

Ausführungsform 3: Verfahren nach Ausführungsform 1 oder 2, wobei die Celluloseschicht auf einem Träger vorliegt, bevorzugt auf einem im Wesentlichen transparenten Träger, mehr bevorzugt auf einem transparenten Träger.

- 15 Ausführungsform 4: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 1 bis 3, wobei der Ligand eine Verbindung mit Affinität für den mindestens einen Analyten ist.

Ausführungsform 5: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 1 bis 4, wobei der Ligand den mindestens einen Analyten selektiv bindet.

20

Ausführungsform 6: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 1 bis 5, wobei der Ligand ein Polypeptid, ein Polynukleotid, ein Kohlenhydrat, oder ein Fett ist.

- 25 Ausführungsform 7: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 1 bis 6, wobei der Ligand ein Antikörper ist, ein Hormon, ein Glycolipid, ein Phospholipid, ein Glykoprotein oder ein Phosphoprotein.

- Ausführungsform 8: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 1 bis 7, wobei der Ligand ein rekombinantes Protein, ein natives Protein, ein Autoantigen, ein Allergen und/oder eine
30 Zelle ist oder enthält.

Ausführungsform 9: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 1 bis 8, wobei eine Vielzahl von nicht-identischen Liganden auf der Celluloseschicht immobilisiert wird, die bevorzugt Affinität für nicht-identische Analyten aufweisen.

Ausführungsform 10: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 1 bis 9, wobei die Immobilisierung räumlich strukturiert erfolgt.

5 Ausführungsform 11: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 1 bis 10, wobei der beschichtete Träger für eine visuelle Auswertung, eine bildgebende Auswertung mittels Fluoreszenz-, Lumineszenz-, oder Absorptionsoptik, eine Auswertung durch Scanning Densitometrie und/oder elektrochemische Auswertung eingerichtet ist.

10 Ausführungsform 12: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 1 bis 11, wobei der Ligand kovalent an die Celluloseschicht gebunden ist.

15 Ausführungsform 13: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 1 bis 12, wobei die erhaltene Celluloseschicht im Wesentlichen transparent ist, bevorzugt wobei die erhaltene Celluloseschicht transparent ist.

20 Ausführungsform 14: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 1 bis 13, wobei die stabile Dispersion einen Feststoffgehalt (Masseanteil) zwischen 0.05 % (w/w) und 5 % (w/w) aufweist, bevorzugt einen Gehalt an Cellulose und/oder Cellulose-Derivat zwischen 0.05 % (w/w) und 5 % (w/w) aufweist.

25 Ausführungsform 15: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 1 bis 14, wobei die Cellulose und/oder das Cellulose-Derivat eine Partikelgröße von höchstens 600 nm aufweisen, bevorzugt wobei die Inhaltsstoffe der stabilen Dispersion eine Partikelgröße von höchstens 600 nm aufweisen.

30 Ausführungsform 16: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 1 bis 15, wobei das Auftragen der Celluloseschicht durch Rakeln, Sprühen, Spincoaten, Sprühtrocknen und/oder Tauchen erfolgt, optional gefolgt von Trocknung.

Ausführungsform 17: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 1 bis 16, wobei die stabile Dispersion eine stabile wässrige Dispersion oder eine stabile Dispersion in einer Mischung aus Wasser und einem mit Wasser mischbaren Lösungsmittel ist.

Ausführungsform 18: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 1 bis 17, wobei das Cellulose-Derivat eine Derivatisierung mit Ester- und/oder Ethergruppen aufweist.

5 Ausführungsform 19: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 1 bis 18, wobei das Cellulose-Derivat eine Derivatisierung mit mindestens einer funktionalen Gruppe ausgewählt aus Carboxyl, Carbonyl, Sulfat, Carboxymethyl, Methyl, Ethyl, Silyl, Acetyl, Carbamat, und Amino aufweist.

10 Ausführungsform 20: Verfahren nach der Ausführungsform 18 oder 19, wobei das Cellulose-Derivat einen DS-Wert von weniger als 0,5 aufweist.

15 Ausführungsform 21: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 1 bis 20, wobei die Celluloseschicht mindestens zwei nicht-identische Cellulosen und/oder Cellulose-Derivate enthält.

Ausführungsform 22: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 1 bis 21, wobei die Cellulose aus Holz, Einjahrespflanzen, Baumwolle, und/oder Altpapier gewonnen wurde.

20 Ausführungsform 23: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 1 bis 22, wobei der Träger Glas, Papier, Kunststoff, Keramik und/oder Metall enthält, bevorzugt aus Glas, Papier, Kunststoff, Keramik und/oder Metall besteht.

Ausführungsform 24: Celluloseschicht mit einem immobilisierten Liganden, hergestellt oder herstellbar nach dem Verfahren gemäß einer der Ausführungsformen 1 bis 23.

25 Ausführungsform 25: Celluloseschicht nach Ausführungsform 24, wobei die Celluloseschicht transparent ist.

30 Ausführungsform 26: Celluloseschicht nach Ausführungsform 24 oder 25, wobei der beschichtete Träger als Festkörper, bevorzugt als Platte, Folie, Membran oder als Bead vorliegt.

Ausführungsform 27: Celluloseschicht nach einer der Ausführungsformen 24 bis 26, wobei der beschichtete Träger ein Verpackungsmaterial ist, ein Labormaterial, bevorzugt ein Biochip oder eine Mehrlochplatte, oder ein Einwegartikel, bevorzugt ein Urinbecher, eine Spritze, eine

Kanüle, ein Schlauch, ein Tissueartikel, ein Swab, eine Atemmasken oder Teil davon, oder ein Luftfilter.

Ausführungsform 28: Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, umfassend

5 (I) Inkontaktbringen der Probe mit einer gemäß dem Verfahren gemäß einer der Ausführungsformen 1 bis 23 hergestellten Celluloseschicht und/oder einer Celluloseschicht gemäß einer der Ausführungsformen 24 bis 27, und

(II) detektieren von mit dem in der Celluloseschicht enthaltenen Liganden interagierendem Analyten.

10

Ausführungsform 29: Verfahren nach Ausführungsform 28, wobei die Auswertung visuell oder mittels Fluoreszenz-, Lumineszenz-, oder Absorptionsoptik bildgebend, durch Scanning Densitometrie oder elektrochemisch erfolgt.

15 Ausführungsform 30: Verfahren nach Ausführungsform 28 oder 29, wobei der Analyt in einer Probe eines Körpermaterials vorliegt.

Ausführungsform 31: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 28 bis 30, wobei das Körpermaterial eine Körperflüssigkeit, bevorzugt, Blut, Plasma, Serum oder Urin, oder ein Gas,

20 bevorzugt Ausatemluft, ist.

Ausführungsform 32: Vorrichtung umfassend eine Celluloseschicht gemäß einer der Ausführungsformen 24 bis 29.

25 Ausführungsform 33: Vorrichtung gemäß Ausführungsform 32, wobei die Vorrichtung ein Verpackungsmaterial ist, ein Labormaterial, bevorzugt ein Biochip oder eine Mehrlochplatte, oder ein Einwegartikel, bevorzugt ein Urinbecher, eine Spritze, eine Kanüle, ein Schlauch, ein Tissueartikel, ein Swab, eine Atemmasken oder Teil davon, oder ein Luftfilter.

30 Ausführungsform 34: Kit zum Nachweis mindestens eines Analyten, umfassend mindestens eine Celluloseschicht mit einem immobilisierten Liganden und eine Vorrichtung zur Probennahme.

Ausführungsform 35: Kit gemäß Ausführungsform 34, wobei die Celluloseschicht auf einem Träger vorliegt.

5 Ausführungsform 36: Verwendung einer nach dem Verfahren gemäß einer der Ausführungsformen 1 bis 23 hergestellten Celluloseschicht und/oder einer Celluloseschicht gemäß einer der Ausführungsformen 24 bis 29 zum Nachweis eines Analyten, bevorzugt in der medizinischen Diagnostik, der (Bio)analytik, der Umweltanalytik, der Landwirtschafts-, Nahrungsmittel- oder Verpackungsindustrie, der Verfahrenstechnik oder der Gerichtsmedizin.

10 Ausführungsform 37: Verfahren zur Herstellung von transparenten Celluloseschichten und deren Verwendung als multifunktionelle Träger von Liganden, dadurch gekennzeichnet, dass

- a) die Celluloseschicht auf einen Träger, wie Glas, Papier, Kunststoff, Keramik oder Metall aufgetragen wird,
- b) die erzeugte Schicht mit Liganden immobilisiert wird
- 15 c) die mit Liganden immobilisierte Schicht zum Nachweis für eine analytische Problemstellung eingesetzt wird.

Ausführungsform 38: Verfahren nach Ausführungsform 37, wobei Cellulose in Form von stabiler wässriger Dispersion auf den Träger aufgetragen wird oder Cellulose auch in einer

20 Mischung aus Wasser und ein mit Wasser mischbaren Lösungsmittel dispergiert ist und auf den Träger aufgetragen werden kann.

Ausführungsform 39: Verfahren nach Ausführungsform 37 bis 38, wobei für die Herstellung der Cellulosedispersionen, Cellulose aller möglichen Quellen verwendet wird (Holz,

25 Einjahrespflanzen, Baumwolle, Altpapier) und für die Herstellung der Cellulosedispersionen, Cellulosen aus Cellulosederivaten verwendet werden können, die einen DS-Wert $< 0,5$ haben, wobei die Cellulosederivate funktionelle Ether und/oder Estergruppen wie Carboxyl-, Carbonyl-, Sulfat-, Carboxymethyl-, Methyl-, Ethyl-, Silyl-, Acetat-, Carbamat-, Amino enthalten können.

30

Ausführungsform 40: Verfahren nach Ausführungsform 37 bis 39, wobei die Dispersionen, die Cellulose bzw. Cellulosederivate enthalten, einen Feststoffgehalt (Masseanteil) zwischen 0.05 und 5 % (w/w) haben und die Inhaltsstoffe Partikelgrößen ≤ 600 nm haben.

Ausführungsform 41: Auftrag einer homogenen Celluloseschicht, welche auch eine Mischung aus mehreren verschiedenen Dispersionen, die Cellulose bzw. Cellulosederivate gemäß der Ausführungsformen 1 bis 4 enthalten, bestehen kann, durch Rakeln, Sprühen, Spincoaten, Tauchen oder Sprühtrocknung bzw. einer Kombination der genannten Methoden erzeugt wird.

5

Ausführungsform 42: Mittels des Verfahrens nach Ausführungsform 37 bis 41 hergestellte, beschichtete Träger, welche fest, flexibel, planar, Beads, Folien und Membranen, Verpackungsmaterialien aller Art sein können.

10 Ausführungsform 43: Verfahren nach Ausführungsform 37 bis 42, wobei die hergestellten Celluloseschichten in der medizinischen Diagnostik, der (Bio)analytik, der Umweltanalytik, Landwirtschafts-, Nahrungsmittel- und Verpackungsindustrie, der Verfahrenstechnik oder der Gerichtsmedizin und dem Life Style Bereich angewendet werden.

15 Ausführungsform 44: Verfahren nach Ausführungsform 37 bis 43, wobei als Liganden alle Moleküle verwendet werden, mit denen sich eine selektive Bindung von Analyten aus einer Probe realisieren lassen, deren Bindung anschließend nach Waschen (heterogener Assay) oder anschließend bzw. simultan ohne Waschen (homogener Assay) detektiert werden kann.

20 Ausführungsform 45: Verfahren nach Ausführungsform 37 bis 43, wobei die Auswahl der Liganden stark vom Anwendungszweck abhängt. Als Liganden können Proteine, Peptide, Nukleinsäuren, Oligonukleotide, Kohlenhydrate, Lipide oder Fette, insbesondere Antikörper, Antigene, Hormone, Glycolipide, Phospholipide, Glykoproteine, Phosphoproteine, rekombinante Proteine, native Proteine, Autoantigene, Allergene und Zellen verstanden
25 werden. Des Weiteren zählen auch Moleküle, die sich in lebenden Systemen oder abgetöteten Systemen befinden und diese Systeme komplett oder in Teilen immobilisiert werden, dazu.

Ausführungsform 46: Verfahren nach Ausführungsform 37-45, dadurch gekennzeichnet, dass die Auswertung visuell oder mittels Fluoreszenz-, Lumineszenz-, sowie Absorbtiionsoptik
30 bildgebend oder durch Scanning Densitometrie oder elektrochemisch erfolgt.

Ausführungsform 47: Verfahren zur Herstellung von transparenten Celluloseschichten und deren Verwendung als multifunktionelle Träger von Liganden, dadurch gekennzeichnet, dass

- a) die Celluloseschicht auf einen (auch flexiblen) Träger, wie Glas, Papier, Kunststoff, Keramik oder Metall aufgetragen wird,
- b) die Schicht nach Trocknung mit Liganden immobilisiert wird
- c) die mit Liganden immobilisierte Schicht zur Nachweis für eine analytische
- 5 Problemstellung eingesetzt wird.

Ausführungsform 48: Verfahren nach Ausführungsform 47, wobei Cellulose als stabile wässrige Dispersion auf den Träger aufgetragen wird.

- 10 Ausführungsform 49: Verfahren nach Ausführungsform 47 oder 48, wobei eine homogene Celluloseschicht, durch Rakeln, Sprühen, Spincoaten, Tauchen oder Sprühtrocknung bzw. einer Kombination der genannten Methoden erzeugt wird.

- Ausführungsform 50: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 47 bis 49, wobei für die
- 15 Herstellung der Cellulosedispersionen, Cellulose aller möglichen Quellen verwendet wird (Holz, Einjahrespflanzen, Baumwolle, Altpapier).

- Ausführungsform 51: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 47 bis 50, wobei die
- 20 Cellulosederivate funktionelle Ether und/oder Estergruppen enthalten, wie Carboxyl-, Alkyl- und Aryl-, Sulfat-, Phosphat-, Carbonyl-, Carboxymethyl-, Acetat-, Carbamat-, Amino-, Ammonium-, Silyl-Gruppen, wobei der Substitutionsgrad $DS \leq 0.5$ ist.

- Ausführungsform 52: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 47 bis 51, wobei die
- 25 Celluloseschicht auch eine Mischung aus mehreren verschiedenen Dispersionen, die Cellulose bzw. Cellulosederivaten enthalten kann.

- Ausführungsform 53: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 47 bis 52, wobei die
- Dispersionen, die Cellulose bzw. Cellulosederivate enthalten, einen Feststoffgehalt (Masseanteil) zwischen 0.05 und 5 % (w/w) haben.

- 30 Ausführungsform 54: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 47 bis 53, wobei die Dispersionen, die die Cellulose bzw. Cellulosederivate enthalten, dadurch gekennzeichnet sind, dass die genannten Inhaltsstoffe Partikelgrößen ≤ 600 nm, bevorzugt im Bereich zwischen 300 - 100 nm haben.

Ausführungsform 55: Verwendung einer nach einer der Ausführungsformen 47 bis 54 hergestellten Celluloseschicht in der medizinischen Diagnostik, der (Bio)analytik, der Umweltanalytik, Landwirtschaft und Nahrungsmittelindustrie, Verpackungsindustrie, der Gerichtsmedizin.

5

Ausführungsform 56: Verfahren nach einer der Ausführungsformen 47 bis 54 wobei die Celluloseschicht auf feste, flexible, planare, zylindrische oder elyptische Träger, wie Beads, Tubes, Röhren, Folien oder Membranen aufgetragen wird.

10 Ausführungsform 57: Verwendung einer nach einer der Ausführungsformen 47 bis 54 hergestellten Celluloseschicht zur Beschichtung von Verpackungsmaterialien aller Art, Labormaterialien wie Biochips, Mikrotiterplatten oder medizinischen Einwegartikeln wie Urinbecher, Spritzen und Kanülen, Schläuche, Tissueartikel, Swabs, Atemmasken bzw. Teile davon, oder Luftfilter.

15

Ausführungsform 58: Gegenstand einer der Ausführungsformen 47 bis 57, wobei Liganden alle Moleküle sind, mit denen sich eine selektive Bindung von Analyten aus einer Probe realisieren lassen, deren Bindung anschließend nach Waschen oder anschließend bzw. simultan ohne Waschen detektiert werden kann, wobei die Auswahl der Liganden stark vom
20 Anwendungszweck abhängt, wie z. B. der Einsatz in der medizinischen Diagnostik, der Bioanalytik, der Umweltanalytik, der Gerichtsmedizin.

Ausführungsform 59: Gegenstand von Ausführungsform 58, wobei Liganden werden beispielgebend Proteine, Peptide, Nukleinsäuren, Oligonukleotide, Kohlenhydrate, Fette,
25 bevorzugt Antikörper, Antigene, Hormone, Glycolipide, Phospholipide, Glykoproteine, Phosphoproteine, rekombinante Proteine, native Proteine, Autoantigene, Allergene oder Allergenkomplexe, oder Zellen sind, bevorzugt Moleküle, die sich in lebenden Systemen oder abgetöteten Systemen befinden und diese Systeme komplett oder in Teilen immobilisiert werden.

30

Ausführungsform 60: Gegenstand einer der Ausführungsformen 47 bis 59, dadurch gekennzeichnet, dass die Auswertung visuell oder mittels Fluoreszenz-, Lumineszenz-, sowie Absorptionsoptik bildgebend oder durch Scanning Densitometrie oder elektrochemisch erfolgt.

Ausführungsform 61: Gegenstand einer der Ausführungsformen 47 bis 60, wobei der beschichtete und mit Liganden bestückte Träger Wasch- und/oder Detektionsreagenzien umfasst.

5 Ausführungsform 62: Verwendung einer nach einer der Ausführungsformen 47 bis 54 hergestellten Celluloseschicht zur Analyse einer Probenmatrix aus der Human- und Veterinärmedizin; insbesondere zur Analyse von Urin, Blut, Serum, Atemgas, Schweiß, oder Abstrichen aus Faeces, Rachen, Nase sowie relevanten Oberflächen aus dem Human- und Veterinärbereich.

10

Ausführungsform 63: Verwendung einer nach einer der Ausführungsformen 47 bis 54 hergestellten Celluloseschicht zur Analyse einer Probenmatrix aus den Umwelt- und Lebenswissenschaften, insbesondere in der Analytik von Frisch- und Trinkwasser, Prozess- und Abwasser, Boden, Luft und Abluft.

15

Ausführungsform 64: Vorrichtung umfassend eine nach einer der Ausführungsformen 47 bis 54 hergestellte Celluloseschicht eingerichtet für die Analyse einer Probe aus der Human- oder Veterinärmedizin; insbesondere zur Analyse von Urin, Blut, Serum, Atemgas, Schweiß, oder Abstrichen aus Faeces, Rachen, Nase sowie relevanten Oberflächen aus dem Human- und

20

Ausführungsform 65: Vorrichtung umfassend eine nach einer der Ausführungsformen 47 bis 54 hergestellte Celluloseschicht eingerichtet für die Analyse einer Probe aus den Umwelt- und Lebenswissenschaften, insbesondere in der Analytik von Frisch- und Trinkwasser, Prozess- und

25

Alle in dieser Beschreibung zitierten Druckschriften werden hiermit bezüglich ihres gesamten Offenbarungsgehaltes durch Verweis in die Offenbarung einbezogen.

30

Figur-Legenden

Fig. 1: Vergleich der Signal-Hintergrund (BG)-Intensitäten von Peptiden (C1 - C2) und Proteinen (wtC) auf Cellulosebeschichtung (Anregung bei 635 nm); kleine Balken für Hintergrundsignale (Verwendung von Objektträger O D3)

Fig. 2: Vergleich der Signal-Hintergrund-Intensitäten von Peptiden (C1 - C2) und Proteinen (wtC) auf (inhouse) Epoxy-Slide (Anregung bei 635 nm)

Fig. 3: Schematische Darstellung eines Trägers mit Beschichtung; A) eine Funktionalität, B) mehrere Funktionalitäten.

Fig. 4: A) Beispielhafte Darstellung eines beschichteten Trägers; B) schematische Darstellung der Struktur von Cellulose und von Substitutionsoptionen.

Fig. 5: A) Schematische exemplarische Darstellung der Herstellung von erfindungsgemäßen Schichten; B) Beispiele für die Transparenzeigenschaften der erfindungsgemäßen Celluloseschichten.

Fig. 6: Immobilisieren von Liganden (exemplarisch und schematisch)

Fig. 7: Beispiel für einen mit einer erfindungsgemäßen Celluloseschicht beschichteten Träger

Fig. 8: Spotmorphologie, Vergleich Cellulose und (inhouse) Epoxy-Slide-Beschichtung

Fig. 9: Stress-Test: Oberfläche; Vergleich verschiedene Schichtdicken von Cellulose, inhouse Epoxy-Beschichtung

Fig. 10: Immobilisierung und Detektion von Proteinen und Peptiden auf einem Träger; Detektion bei 635 nm.

Die folgenden Beispiele dienen lediglich der Veranschaulichung der Erfindung. Sie sind nicht als Beschränkung der Erfindung oder der anhängenden Ansprüche zu verstehen.

Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung von transparenten Cellulosefilmen aus wässrigen Cellulose-Dispersionen sowie deren Verwendung als multifunktionelle Träger für Tests in der medizinischen Diagnostik, der Lebensmittel- und der Umweltanalytik und anderen Bereichen, in denen analytische Fragestellungen auftauchen. Die transparenten Filme können auf verschiedene, auch flexible Träger aus Kunststoff, Glas, Keramik, Metall und Papier aufgetragen werden und zeigen sich lagerstabil.

Beispiel 1: Dispersionen

Für die folgenden Beispiele wurden verschiedene wässrige Cellulosedispersionen verwendet. Zunächst wurde 0,8 g der Cellulose bzw. des jeweiligen Cellulosederivats eingewogen und auf 100 g mit entionisiertem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben mit einem Ultraturax bei ca. 20.000 U/min 15 min behandelt. Nach einer 15-minütigen Ruhephase wird die Prozedur wiederholt. Anschließend erfolgt eine zweistufige Behandlung in einem Hochdruckhomogenisator. Hier werden 6 Umläufe in einer 200 µm Zelle bei 500 bar und 12 Umläufe in einer 50 µm Zelle bei 1000 bar durchgeführt. Es werden homogene wässrige Dispersionen erhalten, die eine Lagerstabilität von mehr als 3 Jahren aufweisen. Alle aufgeführten Dispersionen wurden jeweils auf einen kommerziellen Objektträger gegeben und mit einer Rakel homogen auf der Oberfläche verteilt.

20 **Tabelle 1: Dispersionen**

Probe	Cellulose bzw. Cellulosederivat	Objektträger
Dispersion 1	Cellulose (DP = 380)	O D1
Dispersion 2	Oxidierter Cellulose (Carboxyl-Gehalt = 22 moleq/100 g)	O D2
Dispersion 3	Oxidierter Cellulose (Carboxyl-Gehalt = 48 moleq/100 g)	O D3
Dispersion 4	Oxidierter Cellulose (Carboxyl-Gehalt = 66 moleq/100 g)	O D4
Dispersion 5	Carboxymethylierte Cellulose (DS = 0,1)	O D5
Dispersion 6	Cellulosesulfat (DS = 0,05)	O D6
Dispersion 7	Silylcellulose (DS = 0,3)	O D7
Dispersion 8	Methylcellulose (DS = 0,5)	O D8

Beispiel 2: Beschichtung von Glasobjektträger und Array-Herstellung

Kommerzielle Objektträger aus Glas wurden mit den in Tabelle 1 aufgeführten Dispersionen und, wie in Beispiel 1 beschrieben, mittels Rakel beschichtet.

5

Für die Herstellung von Arrays werden verschiedene Ligandmoleküle, wie DNA, Peptide und Proteine, gelöst in Flüssigkeiten und in Form kleinster Tropfen (Spots) auf den beschriebenen Oberflächen aufgebracht (Mikroarraytechnologie). Über die reaktive Oberflächenbeschichtung können die Ligandmoleküle spezifisch an die Oberfläche binden. Keine der Oberflächen wurde
10 vorher aktiviert.

Alle Mikroarrays konnten gut prozessiert werden. Sie überstanden mehrfaches Waschen, Blocken und das Inkubieren der Analyte, ohne dass sich die Filmschicht ablöste.

15 In der Microarraytechnik werden viele Proteine mit Cy5-Farbstoffen gelabelt, die dann bei 635 nm ausgelesen werden. Das ist mit den kommerziellen Nitrocellulose-Slides aufgrund der hohen Eigenfluoreszenz nicht möglich. Das ist ein deutlicher Vorteil der neuen Beschichtung, dass der Anwender handelsübliche Mikroarray-Reader mit rotem (Standard Cy5) und grünem Laser (Standard Cy3) verwenden kann. Ein Vergleich der Signal-Hintergrund-Intensitäten ist
20 in den Fig. 1 und 2 gezeigt, Fig. 1: Celluloseschicht, Fig. 2: Epoxy-Slide.

Beispiel 3: Diagnostischer Proteinchip

Nach dem Grundprinzip des Western-Blot werden Peptide und Proteine als Ligandmoleküle
25 auf den beschriebenen Oberflächen in verschiedenen Konzentrationen gebunden und detektiert. Die große Diversität der chemischen Eigenschaften von Proteinen (sauer/basisch, hydrophil/hydrophob, Strukturmodifikationen) macht diese Moleküle empfindlich gegenüber den Eigenschaften der beschichteten Träger. Im Gegensatz zu DNA-Chips werden die zu analysierenden Proteine bzw. Peptide mit markierten Liganden (Antikörpern) sekundär
30 detektiert.

Beispiel 4: Herstellung der Schichten mit unterschiedlichen Methoden und Bestimmung der Schichtdicke mittels AFM (Bruker Dimension Icon)

Die Herstellung von transparenten Schichten auf kommerziellen Glaträgern (Objektträgern) erfolgte mit unterschiedlichen Methoden. Dazu wurden eine wässrige Cellulose-Dispersionen (0,71 %, w/w) auf den Träger mit der jeweiligen Methode aufgetragen und anschließend die Schichtdicke mit AFM (Atomic force microscope) der Firma Bruker (Typ Dimension Icon) bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 dargestellt. Nach dem Beschichten der Objektträger sind diese für 5 Minuten in einem Umlufttrockenschrank bei 45°C getrocknet worden. Die Schichtdicken sind auf den Objektträgern an drei Stellen gemessen worden. Der Wert der Tabelle entspricht dem arithmetischen Mittel.

10 Tabelle 2:

Methode	Schichtdicke [μm]
Tropfen mit einer Pasteur-Pipette	3,2
Rakeln	2,2
Spin-Coating	0,05
Tauchen	0,03

Beispiel 5: Herstellung der Schichten in Abhängigkeit vom Gehalt an Cellulose

Für die Untersuchung der Abhängigkeit der Schichtdicke von Gehalt an Cellulose in den Dispersionen werden verschiedenen Objektträger mittels Rakel auf den Träger verteilt. Die Ergebnisse sind der Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3:

Cellulose-Gehalt (% w/w)	Schichtdicke [μm]
0,71	2,2
0,88	2,5
1,20	3,6

20

Beispiel 6:

Motivation

-Trend: Multiparameteranalytik -> simultane Bestimmung mehrerer Analyte in einem

25 Messdurchgang

- komplexere analytische Aussagen nach nur einer Laboruntersuchung
- schnellere, bessere und kostengünstiger Analytik durch Miniaturisierung und parallele Bestimmung mehrerer Analyten in nur einem Test
- optimierte Materialien und deren Oberflächen entscheidend, unabhängig der verwendeten Technologien.

5

- Anforderung an Trägermaterialien für den Einsatz in oberflächengebundenen Analysen liegen darin, hohe Beladungsdichten und optimale Funktionen in Kontext der jeweiligen Fragestellung zu schaffen.

10

Aufbau eines Festphasentests zum Nachweis eines Analyten (Fig. 3A, B)

- Träger: Glas, Kunststoff, Papier, Metall
- Beschichtung: (chemische) Funktionalitäten zur spezifischen Bindung von Liganden (DNA, Peptide, Proteine...)

15

- Liganden
- Detektionssysteme: Farbstoffe (UV, Fluoreszenz, Lumineszenz), Metall-Nanopartikel, Latexpartikel ...

20

Eine Beschichtung mit einer Funktionalität (Fig. 3A), Generierung einer Beschichtung mit verschiedenen funktionellen Gruppen, die zur Immobilisierung der Liganden dienen (Fig. 3B).

Technische Durchführung multiparametrischer Tests am Bsp. von Peptid- und Proteinchips

- parallel unterschiedliche Liganden für je einen Analyten
- oder jeweils einen Ligand für viele Analyten z.B. für Screeningexperimente

25

- Ziel:
- hohe Bindungskapazität bei geringer unspezifischer Bindung
 - keine Beeinflussung der Peptid- bzw. Proteinstruktur durch die Oberfläche
 - Methodenhemmnis aufgrund ungeeigneter Oberfläche, die mit der Umgebung direktem Kontakt steht
 - hohe Empfindlichkeit, höhere Signalintensität – poröse Materialien und Fasern

30

Proteomanalyse auf Nitrocellulose-Slides

pro

- stabile Proteinstruktur auf der Oberfläche bleibt erhalten
- hohe Bindungsaffinität bzw. Bindekapazität der gespotteten Proteine

- poröse Oberfläche
- Raumtemperaturstabilität
- Langzeitstabilität

contra

- 5 - hohe Eigenfluoreszenz
- schlechte Benetzung (hydrophobe OF)
- nachfolgende Funktionalisierung nicht möglich

Proteomanalyse auf Cellulose-Slides (Fig. 4)

10 pro

- stabile Proteinstruktur auf der Oberfläche bleibt erhalten
- hohe Bindungsaffinität bzw. Bindekapazität der gespotteten Proteine
- poröse Oberfläche
- Raumtemperaturstabilität

15 - Langzeitstabilität

- transparent, guter Filmbildner
- gute Benetzung (hydrophile OF)
- nachfolgende Funktionalisierung möglich

20 Eine schematische exemplarische Darstellung der Herstellung von erfindungsgemäßen Schichten und Beispiele für die Transparenzeigenschaften der erfindungsgemäßen Celluloseschichten sind in Fig. 5 gezeigt.

Ergebnis der Beschichtung (Fig. 6, 7)

- 25 - modifizierte Cellulose als Film auf einem festen Träger (ohne Nachfunktionalisierung)
- transparenter Film
- optisch auslesbar
- Mikroporenstruktur
- Schichtdickenmodifizierung
- 30 - Stabilität gegen äußere Einflüsse (Puffersalze, pH, Feuchte Temperatur)
- keine Oberflächenaktivierung nötig
- kein Blocken

Spotmorphologie im Vergleich von Cellulose- und Epoxy-Slide-Beschichtung ist in Fig. 8 gezeigt, ein Stress-Test der Oberfläche; Vergleich verschiedener Schichtdicken von Cellulose-Slides mit Epoxy-Slide in Fig. 9. Ein Beispiel einer Immobilisierung und Detektion von Proteinen und Peptiden auf einem Träger ist in Fig. 10 gezeigt.

Claims

1. Verfahren zur Herstellung einer Celluloseschicht zum Nachweis mindestens eines Analyten, umfassend
5 (i) Herstellung einer Celluloseschicht durch Auftragen einer stabilen Dispersion von Cellulose und/oder einem Cellulose-Derivat auf einen geeigneten Träger, und
(ii) Immobilisieren mindestens eines Liganden auf der Celluloseschicht.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Celluloseschicht auf einem Träger vorliegt,
10 bevorzugt auf einem im Wesentlichen transparenten Träger, mehr bevorzugt auf einem transparenten Träger.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Ligand den mindestens einen Analyten selektiv bindet.
15
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Ligand ein Polypeptid, ein Polynukleotid, ein Kohlenhydrat, oder ein Fett ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Ligand ein Antikörper ist, ein
20 Hormon, ein Glycolipid, ein Phospholipid, ein Glykoprotein oder ein Phosphoprotein.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Ligand ein rekombinantes Protein, ein natives Protein, ein Autoantigen, ein Allergen und/oder eine Zelle ist oder enthält.
25
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei eine Vielzahl von nicht-identischen Liganden auf der Celluloseschicht immobilisiert wird, die bevorzugt Affinität für nicht-identische Analyten aufweisen.
- 30 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Immobilisierung räumlich strukturiert erfolgt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei der Ligand kovalent an die Celluloseschicht gebunden ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die erhaltene Celluloseschicht im Wesentlichen transparent ist, bevorzugt wobei die erhaltene Celluloseschicht transparent ist.
- 5 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die stabile Dispersion einen Feststoffgehalt zwischen 0.05 % (w/w) und 5 % (w/w) aufweist, bevorzugt einen Gehalt an Cellulose und/oder Cellulose-Derivat zwischen 0.05 % (w/w) und 5 % (w/w) aufweist.
- 10 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die Cellulose und/oder das Cellulose-Derivat eine Partikelgröße von höchstens 600 nm aufweisen, bevorzugt wobei die Inhaltsstoffe der stabilen Dispersion eine Partikelgröße von höchstens 600 nm aufweisen.
- 15 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei das Cellulose-Derivat eine Derivatisierung mit Ester- und/oder Ethergruppen aufweist, bevorzugt mit mindestens einer funktionalen Gruppe ausgewählt aus Carboxyl, Carbonyl, Sulfat, Carboxymethyl, Methyl, Ethyl, Silyl, Acetyl, Carbamat, und Amino aufweist.
- 20 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei die Celluloseschicht mindestens zwei nicht-identische Cellulosen und/oder Cellulose-Derivate enthält.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei mindestens zwei nicht-identische Cellulosen und/oder Cellulose-Derivate vor dem Auftragen gemeinsam
25 dispergiert werden.
16. Celluloseschicht mit einem immobilisierten Liganden, hergestellt oder herstellbar nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16.
- 30 17. Celluloseschicht nach Anspruch 16, wobei der beschichtete Träger ein Verpackungsmaterial ist, ein Labormaterial, bevorzugt ein Biochip oder eine Mehrlochplatte, oder ein Einwegartikel, bevorzugt ein Urinbecher, eine Spritze, eine Kanüle, ein Schlauch, ein Tissueartikel, ein Swab, eine Atemmasken oder Teil davon, oder ein Luftfilter.

18. Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, umfassend
(I) Inkontaktbringen der Probe mit einer gemäß dem Verfahren gemäß einer der
Ansprüchen 1 bis 15 hergestellten Celluloseschicht und/oder einer Celluloseschicht
gemäß Anspruch 16 oder 17, und
(II) detektieren von mit dem in der Celluloseschicht enthaltenen Liganden
interagierendem Analyten.
19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei die Auswertung visuell oder mittels Fluoreszenz-,
Lumineszenz-, oder Absorptionsoptik bildgebend, durch Scanning Densitometrie oder
elektrochemisch erfolgt.
20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, wobei der Analyt in einer Probe eines
Körpermaterials vorliegt, bevorzugt Blut, Plasma, Serum oder Urin, oder ein Gas,
bevorzugt Ausatemluft, ist.
21. Vorrichtung umfassend eine Celluloseschicht gemäß Anspruch 16 oder 17.
22. Vorrichtung gemäß Anspruch 21, wobei die Vorrichtung ein Verpackungsmaterial ist,
ein Labormaterial, bevorzugt ein Biochip oder eine Mehrlochplatte, oder ein
Einwegartikel, bevorzugt ein Urinbecher, eine Spritze, eine Kanüle, ein Schlauch, ein
Tissueartikel, ein Swab, eine Atemmaske oder ein Teil davon, oder ein Luftfilter.
23. Kit zum Nachweis mindestens eines Analyten, umfassend mindestens eine gemäß dem
Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 hergestellte Celluloseschicht mit
einem immobilisierten Liganden und eine Vorrichtung zur Probennahme.
24. Kit gemäß Anspruch 23, wobei die Celluloseschicht auf einem Träger vorliegt.
25. Verwendung einer nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15
hergestellten Celluloseschicht und/oder einer Celluloseschicht gemäß Anspruch 16
oder 17 zum Nachweis eines Analyten, bevorzugt in der medizinischen Diagnostik,
der (Bio)analytik, der Umweltanalytik, der Landwirtschafts-, Nahrungsmittel- oder
Verpackungsindustrie, der Verfahrenstechnik oder der Gerichtsmedizin.

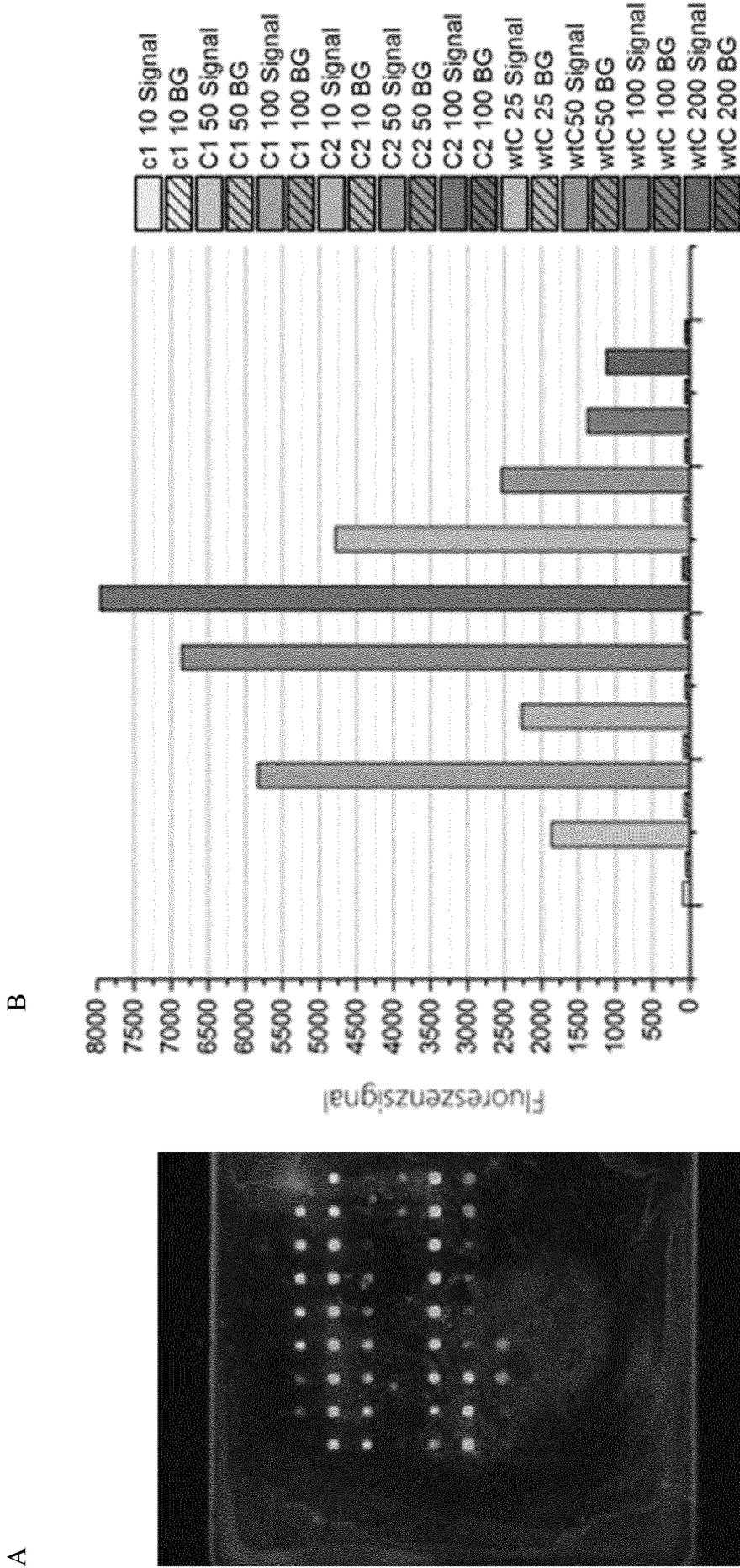


Fig. 1

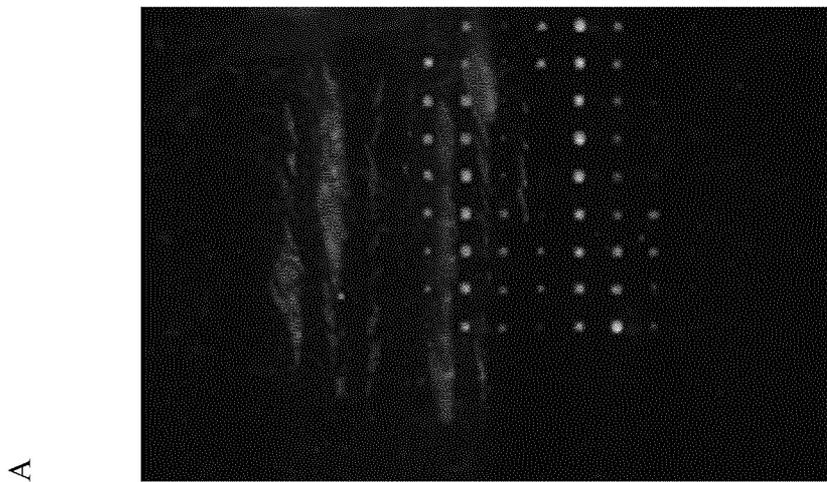
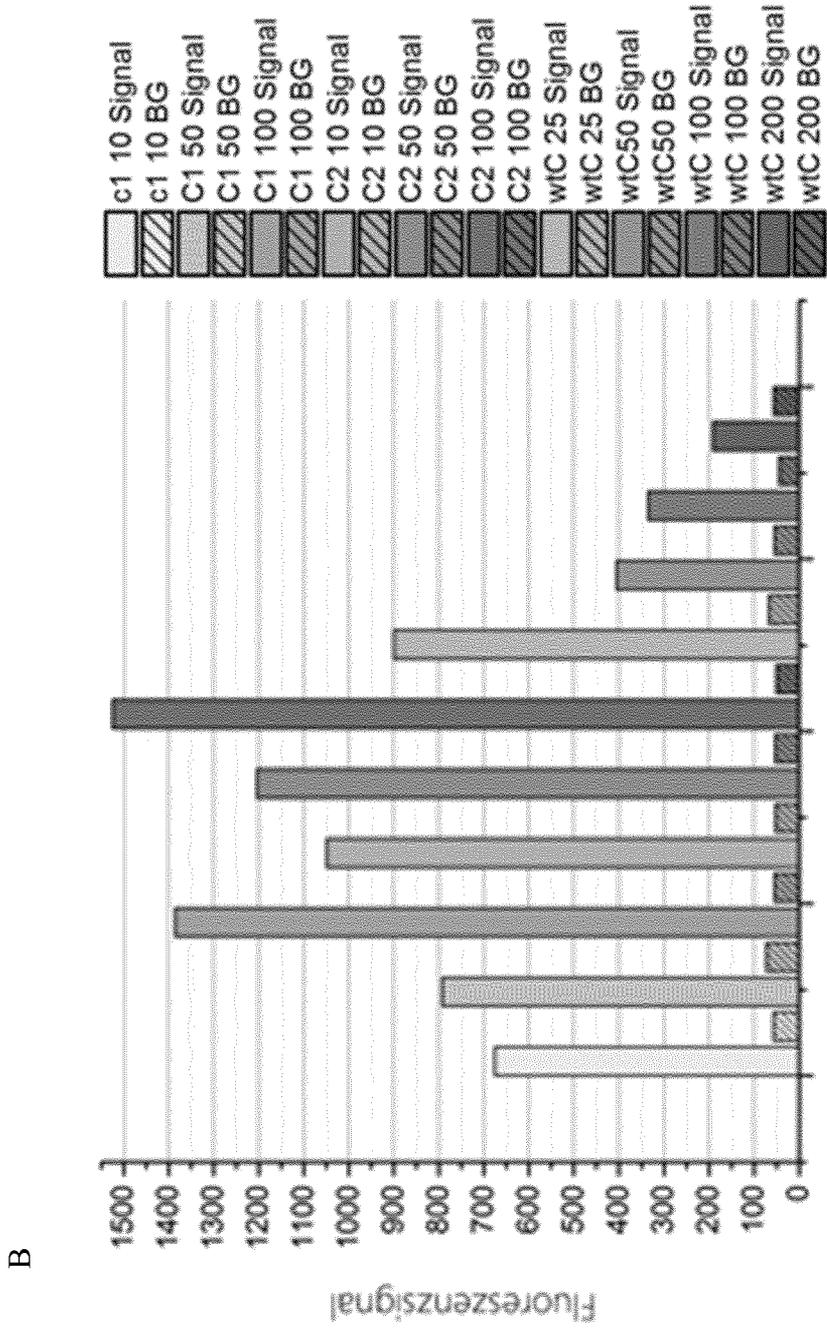


Fig. 2

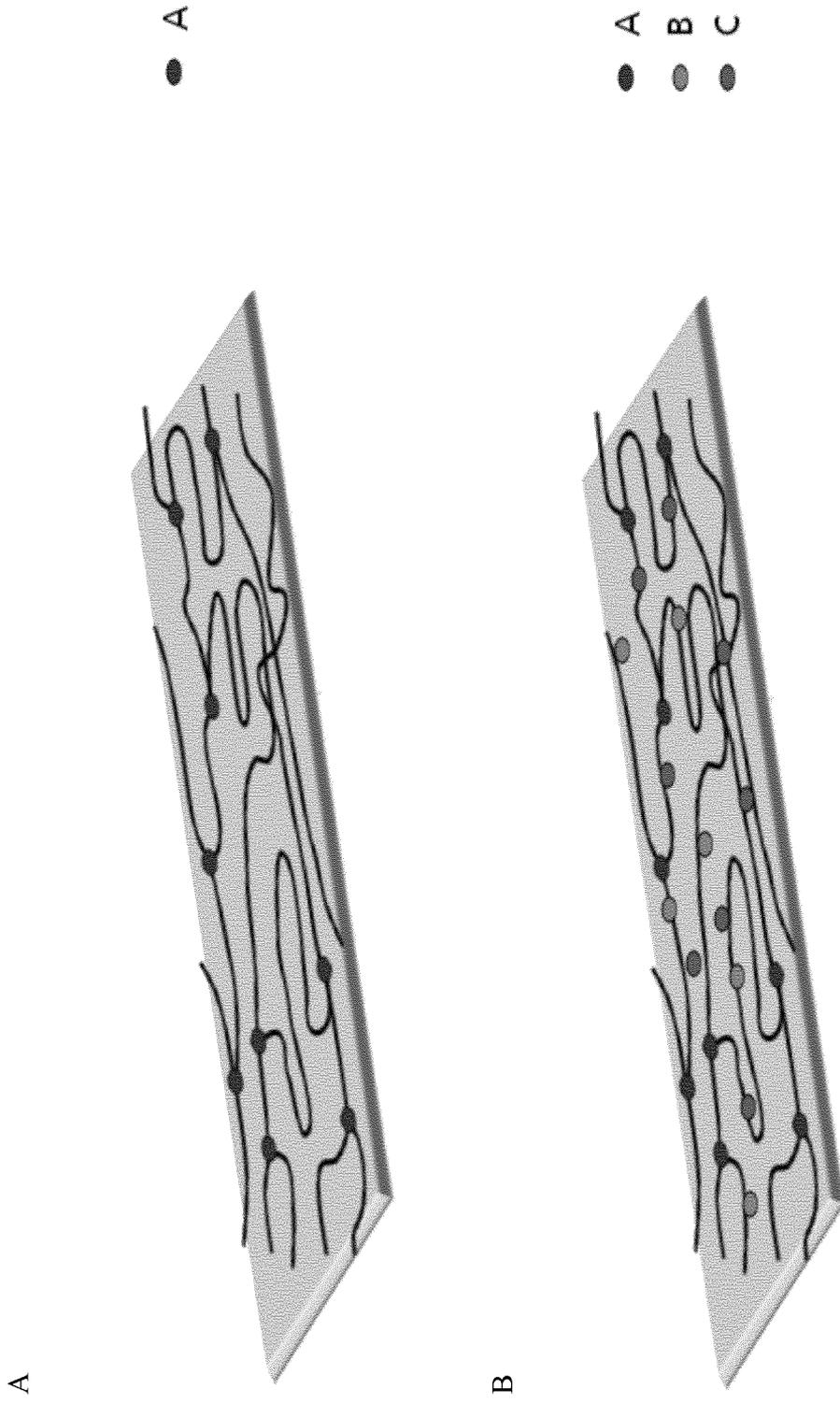
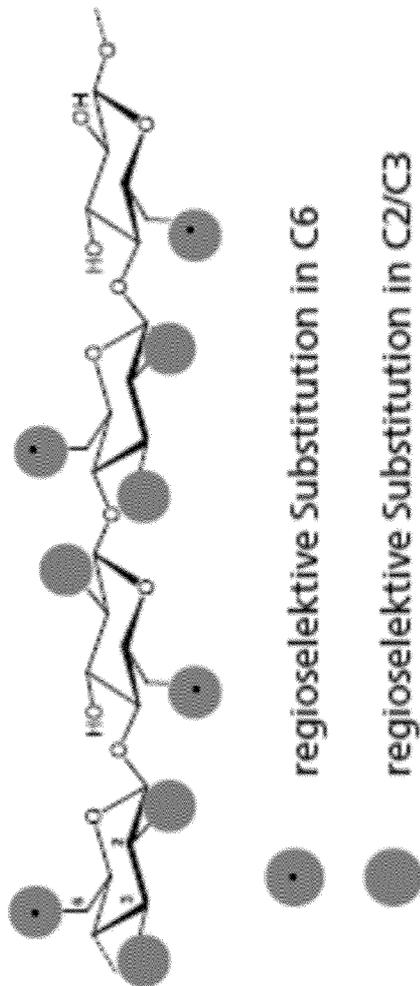


Fig. 3

B



A

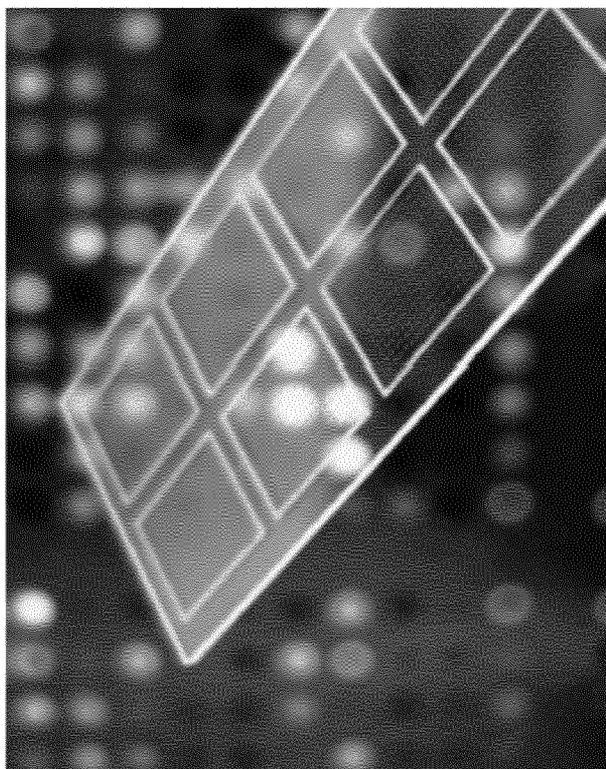
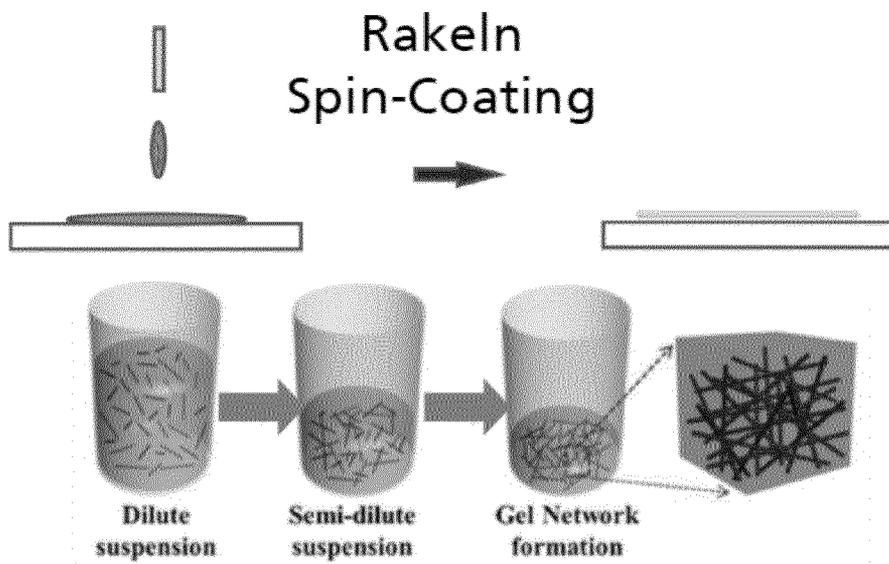
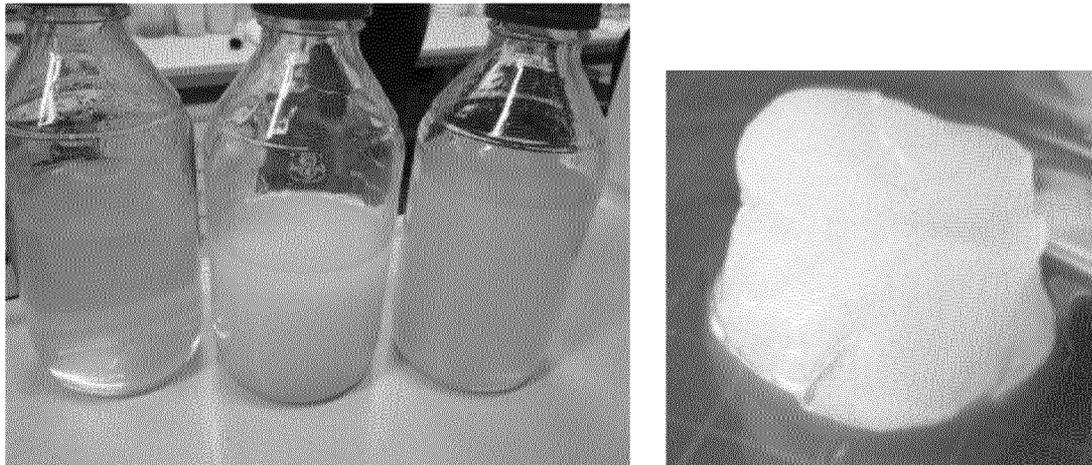


Fig. 4

A



B

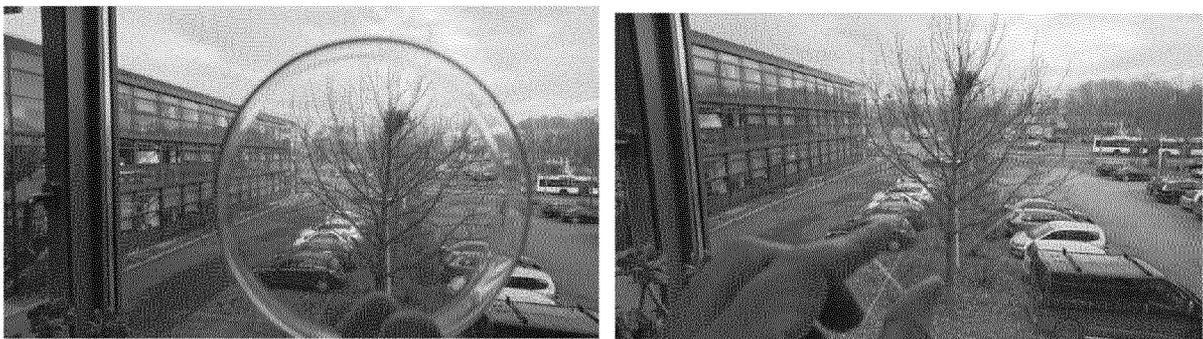


Fig. 5

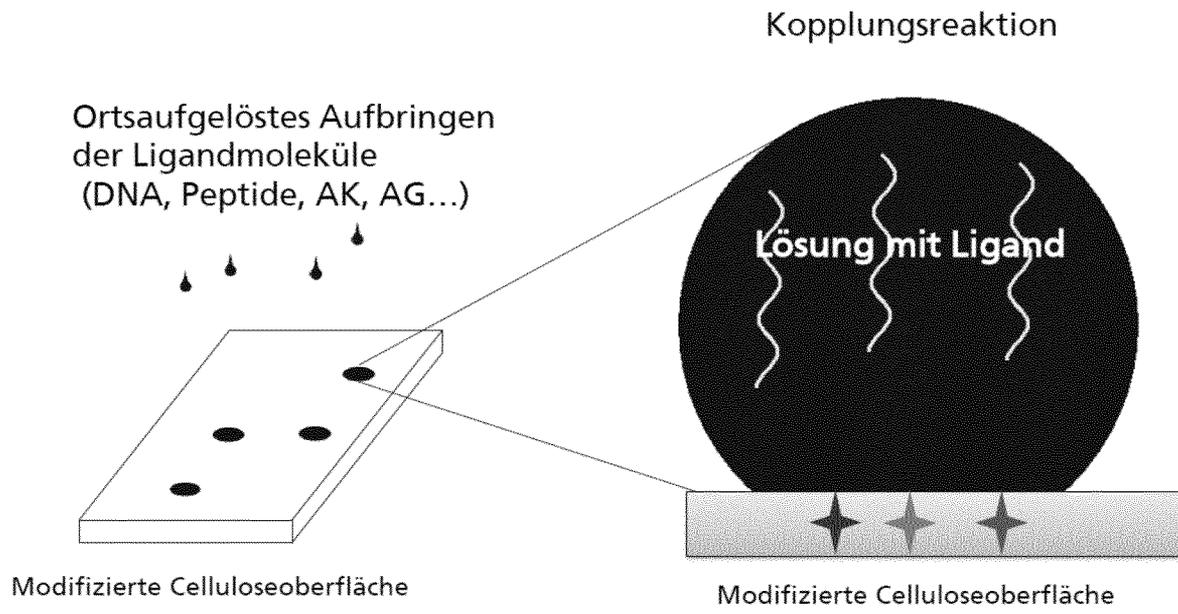


Fig. 6

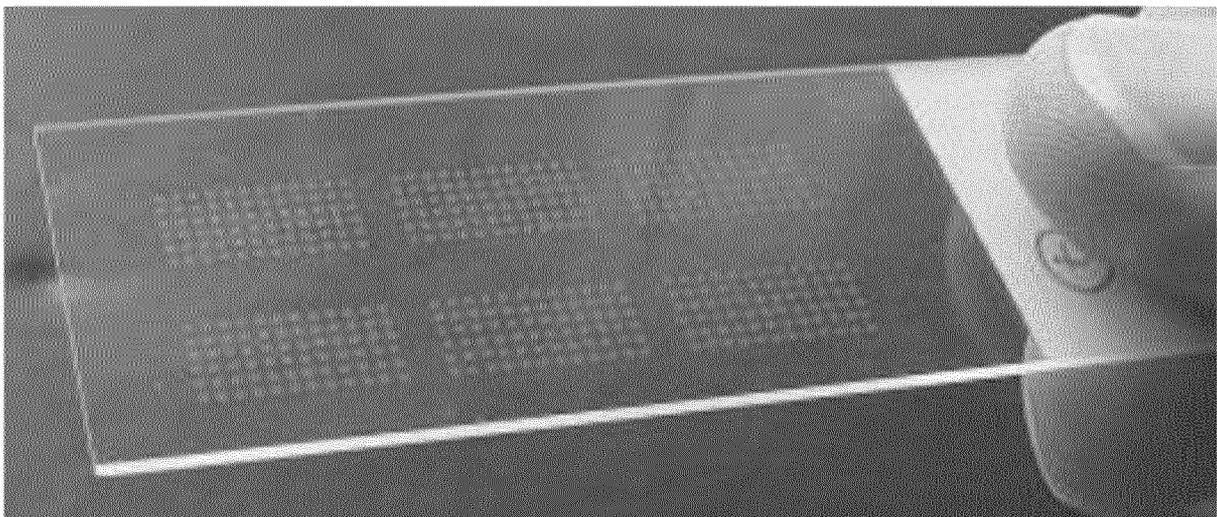


Fig. 7

TopSpot: DNA - Spots
Axon Scanner: Laser: 635 nm,
Laserpower: 40 %, Gain: 400

5 µM	1 µM	5 µM	1 µM	1 µM	5 µM
1 µM	5 µM	5 µM	1 µM	1 µM	1 µM
1 µM	5 µM	5 µM	1 µM	1 µM	1 µM
1 µM	5 µM	5 µM	1 µM	1 µM	5 µM

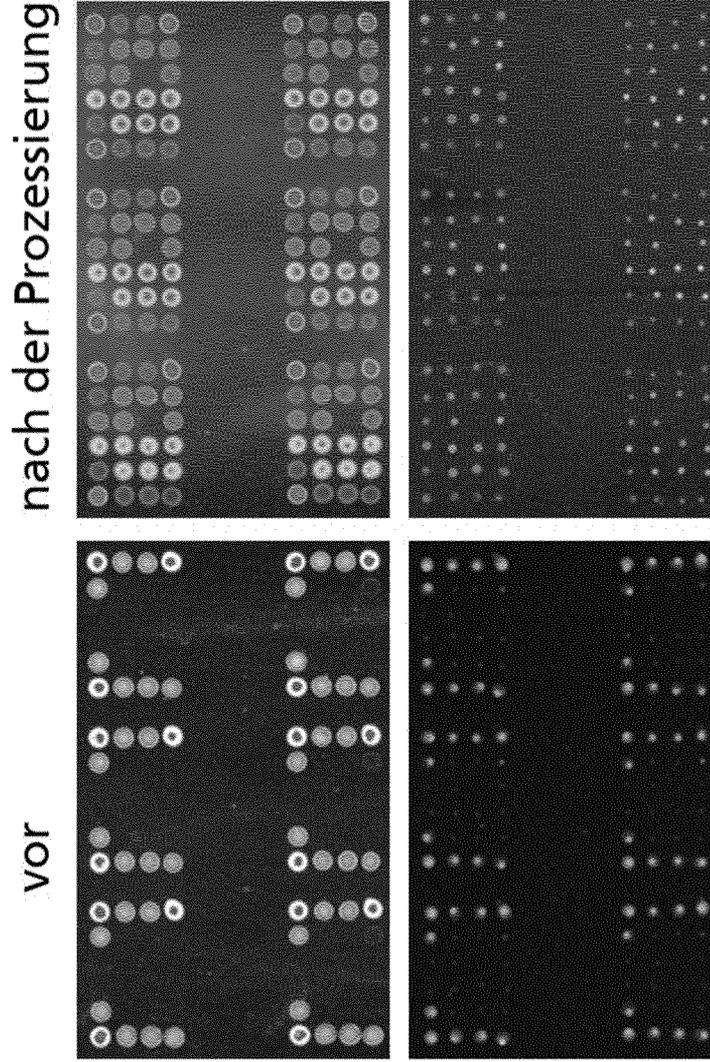
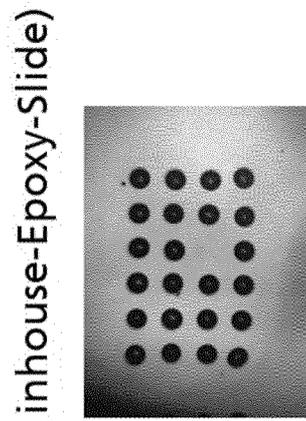
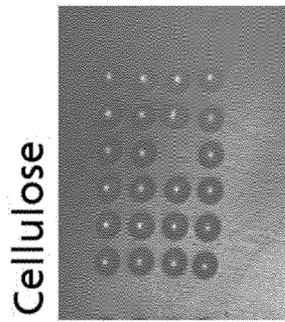
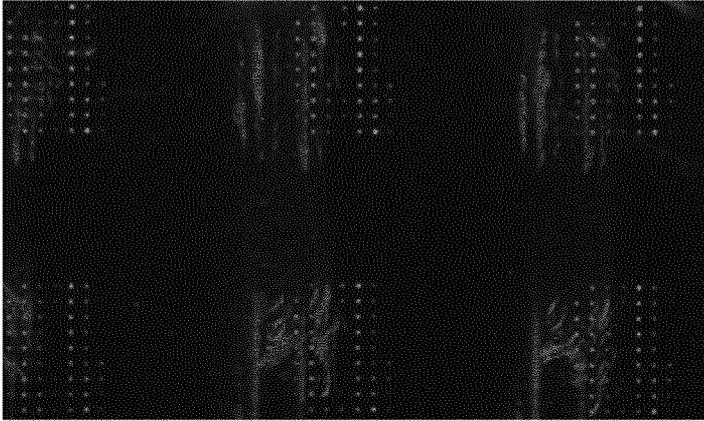
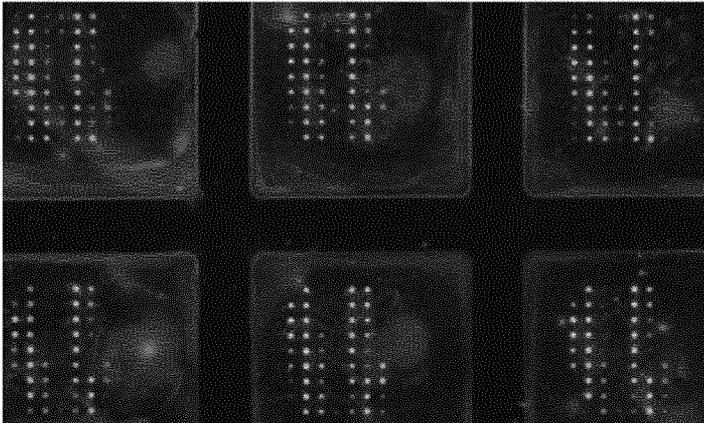


Fig. 8



inhouse-chip: Epoxy



unterschiedliche Schichtdicke

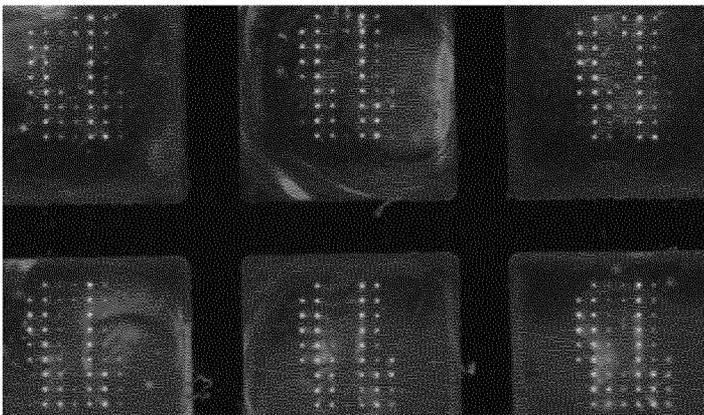


Fig. 9

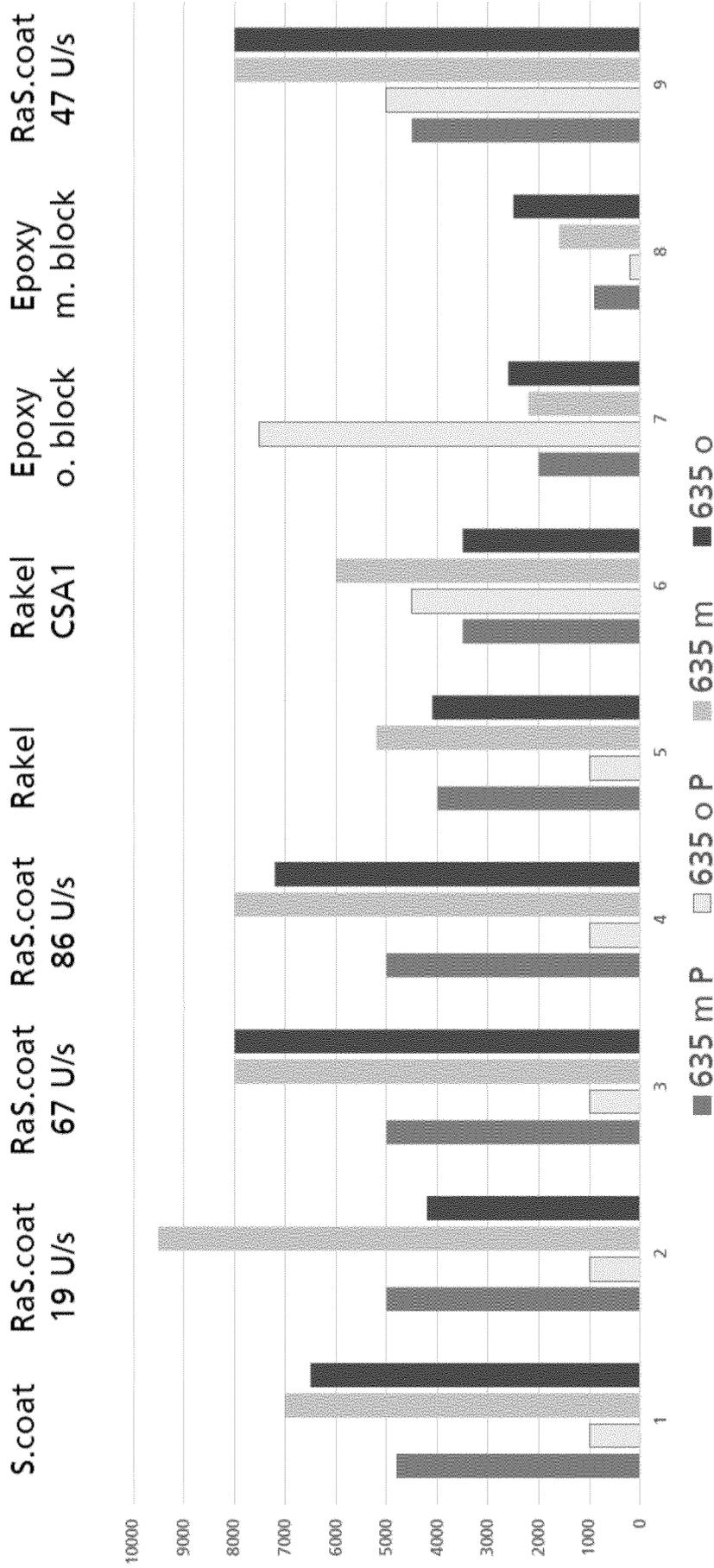


Fig. 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2019/075698

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 9/00(2006.01)i; C08L 1/02(2006.01)i; C08L 1/12(2006.01)i		
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) A61K; C09J; C08L		
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 practicable, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1657551 A1 (ENVITEC WISMAR GMBH [DE]) 17 May 2006 (2006-05-17) the whole document	1-25
A	WO 03097859 A2 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE] ET AL.) 27 November 2003 (2003-11-27) the whole document	1-25
A	MARTINE POITEVIN ET AL. "Evaluation of microchip material and surface treatment options for IEF of allergenic milk proteins on microchips" <i>ELECTROPHORESIS</i> , Vol. 30, No. 24, 01 December 2009 (2009-12-01), pages 4256-4263 DOI: 10.1002/elps.200900254 ISSN: 0173-0835, XP055653747 the whole document	1-25
A	PETER C ET AL. "OPTICAL DNA-SENSOR CHIP FOR REAL-TIME DETECTION OF HYBRIDIZATION EVENTS" <i>FRESENIUS' JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY, SPRINGER, DE</i> , Vol. 371, No. 2, 01 September 2001 (2001-09-01), pages 120-127 DOI: 10.1007/S002160101006 ISSN: 0937-0633, XP009016890 the whole document	1-25
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family 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 application or patent 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 17 February 2020		Date of mailing of the international search report 09 March 2020
Name and mailing address of the ISA/EP European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer Zellner, Armin Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/EP2019/075698

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
EP	1657551	A1	17 May 2006	NONE			
WO	03097859	A2	27 November 2003	AT	345396	T	15 December 2006
				AU	2003232790	A1	02 December 2003
				AU	2003240260	A1	02 December 2003
				AU	2003240666	A1	02 December 2003
				BR	0309947	A	01 March 2005
				BR	0311175	A	15 March 2005
				CA	2486950	A1	27 November 2003
				CA	2493918	A1	27 November 2003
				CN	1653189	A	10 August 2005
				CN	1653190	A	10 August 2005
				DK	1504113	T3	05 March 2007
				EP	1504113	A2	09 February 2005
				EP	1504115	A1	09 February 2005
				EP	1504116	A1	09 February 2005
				ES	2275095	T3	01 June 2007
				HK	1081599	A1	02 September 2011
				HK	1081600	A1	17 July 2009
				JP	4656938	B2	23 March 2011
				JP	5118288	B2	16 January 2013
				JP	2005528896	A	29 September 2005
				JP	2005528897	A	29 September 2005
				JP	2005532796	A	04 November 2005
				JP	2009275233	A	26 November 2009
				KR	20040106530	A	17 December 2004
				KR	20040106531	A	17 December 2004
				MX	PA04011103	A	14 February 2005
				MX	PA04011220	A	14 February 2005
				US	2005214891	A1	29 September 2005
				US	2006099327	A1	11 May 2006
				US	2008182324	A1	31 July 2008
				WO	03097859	A2	27 November 2003
				WO	03097863	A1	27 November 2003
				WO	03097864	A1	27 November 2003

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. A61K9/00 C08L1/02 C08L1/12
ADD.

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
A61K C09J C08L

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

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 1 657 551 A1 (ENVITEC WISMAR GMBH [DE]) 17. Mai 2006 (2006-05-17) das ganze Dokument	1-25
A	WO 03/097859 A2 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE] ET AL.) 27. November 2003 (2003-11-27) das ganze Dokument	1-25
	----- -/--	

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" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. 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 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	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
17. Februar 2020	09/03/2020

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 Zellner, Armin
--	---

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>MARTINE POITEVIN ET AL: "Evaluation of microchip material and surface treatment options for IEF of allergenic milk proteins on microchips", ELECTROPHORESIS, Bd. 30, Nr. 24, 1. Dezember 2009 (2009-12-01), Seiten 4256-4263, XP55653747, ISSN: 0173-0835, DOI: 10.1002/elps.200900254 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-25
A	<p>PETER C ET AL: "OPTICAL DNA-SENSOR CHIP FOR REAL-TIME DETECTION OF HYBRIDIZATION EVENTS", FRESENIUS' JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY, SPRINGER, DE, Bd. 371, Nr. 2, 1. September 2001 (2001-09-01), Seiten 120-127, XP009016890, ISSN: 0937-0633, DOI: 10.1007/S002160101006 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-25

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2019/075698

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 1657551	A1	17-05-2006	KEINE

WO 03097859	A2	27-11-2003	AT 345396 T 15-12-2006
		AU 2003232790 A1	02-12-2003
		AU 2003240260 A1	02-12-2003
		AU 2003240666 A1	02-12-2003
		BR 0309947 A	01-03-2005
		BR 0311175 A	15-03-2005
		CA 2486950 A1	27-11-2003
		CA 2493918 A1	27-11-2003
		CN 1653189 A	10-08-2005
		CN 1653190 A	10-08-2005
		DK 1504113 T3	05-03-2007
		EP 1504113 A2	09-02-2005
		EP 1504115 A1	09-02-2005
		EP 1504116 A1	09-02-2005
		ES 2275095 T3	01-06-2007
		HK 1081599 A1	02-09-2011
		HK 1081600 A1	17-07-2009
		JP 4656938 B2	23-03-2011
		JP 5118288 B2	16-01-2013
		JP 2005528896 A	29-09-2005
		JP 2005528897 A	29-09-2005
		JP 2005532796 A	04-11-2005
		JP 2009275233 A	26-11-2009
		KR 20040106530 A	17-12-2004
		KR 20040106531 A	17-12-2004
		MX PA04011103 A	14-02-2005
		MX PA04011220 A	14-02-2005
		US 2005214891 A1	29-09-2005
		US 2006099327 A1	11-05-2006
		US 2008182324 A1	31-07-2008
		WO 03097859 A2	27-11-2003
		WO 03097863 A1	27-11-2003
		WO 03097864 A1	27-11-2003
