



INSPECT

Proving and quantifying presence of PSA for point-of-care prostate cancer diagnosis with immunoassay on CMOS biochip

Senova and IMMS are the first to succeed in precisely quantifying PSA (prostate-specific antigen) directly with an opto-electronic CMOS biochip by measurement of light absorption. The method fully complies with "Rili-BÄK", the guidelines published by the German Medical Association (Bundesärztekammer) for quality assurance in medical laboratory tests. Photograph: IMMS.

Objectives and overview

The goal: rapid, precise testing for prostate cancer diagnosis

During diagnosis and care of prostate cancer, PSA concentration (prostate-specific antigen) is determined at all stages: early recognition,¹ exploratory investigation, treatment monitoring and follow-up care. Even a few nanograms PSA per millilitre blood (ng/ml) are an indication of whether and which further tests and treatment are needed. Higher PSA concentrations may be a sign of cancer or its return.² The physician takes blood and sends it away for analysis. The PSA test results usually

¹ In the future, PSA measurements could be included in the risk-adapted PSA early detection, which is currently being researched and which provides individual regular measurements based on a basic PSA value, cf. <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/prostatakrebs/psa-test-frueherkennung.php> (last access: 27.04.2020). A general PSA early detection is currently not recommended, cf. https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Prostata_5_0/LL_Prostatakarzinom_Kurzversion_5.1.pdf (last access: 27.04.2020).

² Cf. on current recommendations and reference values for PSA concentrations https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Patientenleitlinien/Patientenleitlinie_Prostatakrebs_1_v01-2020.pdf (last access: 27.04.2020).

take a few days to come back.³ Not only for PSA concentrations, science has been working on one new point-of-care (PoC) testing system after another which may obviate costly, time-consuming lab tests carried out on huge, complex apparatus and reduce to a minimum the usually very worrying wait for the patient.

In many cases, such solutions involve test strips which change colour enabling the doctor to assess concentrations in the consultation room. The colour changes vary in intensity and are caused by biochemical reaction. There has been a move in recent years towards using PoC devices with photodetectors or a camera for concentration testing.

Apparatus of this kind still labours under the disadvantage of inaccuracy in comparison with laboratory testing. In the case of PSA detection, the "Rili-BÄK" (the guidelines published by the German Medical Association (Bundesärztekammer) for quality assurance in medical laboratory tests) prescribe a lower detection limit of 0.2 ng/ml and a range up to 50 ng/ml. Confidence in the results depends on a coefficient of variation (CV) which is at most 15.5%.⁴ Measurements taken with a PoC reader and PSA test strip combination developed for reference purposes in the current research project, however, failed to reach these standards.

Chip-based prototype detects and measures PSA at less than one nanogram per millilitre

In the INSPECT project, IMMS designed and developed a photometer as a portable reader in combination with a replaceable opto-electronic CMOS biochip and produced a demonstration model. Instead of the test strip employed to date in certain PoC systems with camera, the new version measures the biochemical reaction without a gap between photometer and sample, which is placed directly onto a microelectronic chip. IMMS' partner in the project, the company Senova Gesellschaft für Biowissenschaft und Technik mbH, undertook the tasks firstly of providing the chip surface with its biochemical functions using immobilised prostate-specific antibodies and secondly of using the prototype to measure samples with various PSA concentration levels. If the sample contains PSA, this is shown by biochemical reactions which darken the sample to an extent that varies with the concentration and with photometry and electronics the differences in brightness are measured. It is a world first for the Senova and IMMS partnership that the presence of PSA on a

- > INPOS
- > INSPECT
- > ADMONT
- > Ko²SiBus
- > AgAVE
- > Dig. Engineering
- > IRIS
- > Contents
- * Funding

*More detail on
INSPECT at
www.imms.de*

*More on chip
developments:
www.imms.de.*

³ <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/prostatakrebs/psa-test-frueherkennung.php> (last access: 27.04.2020)

⁴ www.bundesaeztekammer.de/rilibaek2019 (last access: 27.04.2020)

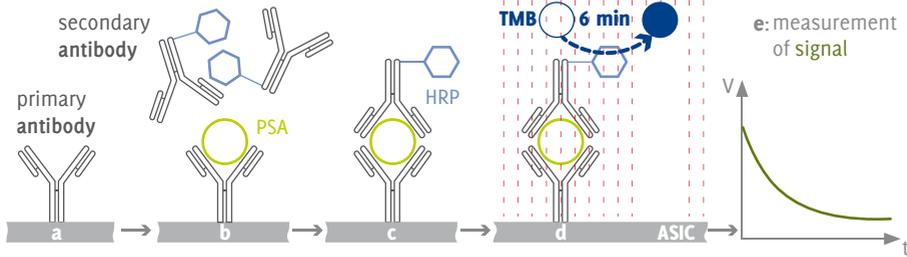


Figure 1: Diagram showing concept of detection and quantification of PSA analyte by means of immobilised primary antibodies, secondary antibodies marked with HRP (the horseradish peroxidase enzyme) and TMB (tetramethylbenzidine) substrate solution. The colour change caused by the HRP-TMB reaction alters the luminous intensity, which is what is measured by the chip. Diagram: IMMS/Senova.

CMOS biochip can be proven with a lower detection limit of 0.1 ng/ml. This degree of accuracy fulfils the requirements for clinical PSA tests set by "Rili-BÄK". The total time required for the test with the CMOS biochip is 14 minutes, there is digital output of the results and these can be processed on a computer connected to the diagnostic device.

The IMMS solution in detail

Measuring principle – PSA immunoassay on microelectronic chip

The biological and technological principle behind the new system is comparable with that of lateral flow tests, the type represented by the usual test strips. Analytes in a sample are targeted with an interaction between antibody and antigen. In the case of prostate cancer the PSA is the analyte. The primary antibodies (anti-human PSA antibodies) which would on the test strip be the "catcher" molecules are fixed on the chip surface as shown in Figure 1 (a). They catch PSA if it is present in a sample placed on the chip. To prove and quantify the presence of the PSA, secondary antibodies for PSA which are marked with HRP (the horseradish peroxidase enzyme) are also applied to the chip. These likewise attach to the PSA molecules. This sandwich made up of primary antibodies, PSA, secondary antibodies and HRP is as yet invisible. Any marked secondary antibodies which are not fixed to the chip surface are rinsed away (c). The next step is to add colourless TMB (tetramethylbenzidine) substrate solution, which reacts with the HRP and after 6 minutes renders the invisible antibody-antigen combinations visible because of a colour change to blue (d), which in turn changes the optical density sensed and evaluated by the chip (e).

The procedure is to measure luminous intensity before the reaction and after it to measure the attenuation due to the coloration.

Initial design and construction of a portable photometer

To trigger and measure the optical signals from the chip, IMMS developed a compact, portable, enclosed and light-proof readout unit which is attached to a PC via USB cable. From the computer, the software created by IMMS enables the test to be run and the results to be shown and further processed. The sample is applied direct to the chip which is on a small PCB in plug-in cartridge form in the black box. The cartridge is plugged into the device below the light source. This is an LED at a fixed distance from the chip which supplies homogenous light so that the sample is illuminated at constant intensity during the reaction.

At first, the readout unit was operated with a pre-existing chip to establish requirements and contingent conditions applicable to the whole system and to provide the basis for a new dedicated ASIC. The pre-existing chip was originally developed for detecting infectious diseases, not the PSA application. It contains a matrix of 6 x 7 photodiodes, see Figure 2 (left) and is therefore relatively large for research purposes. When it was originated it was for detecting a variety of pathogens in parallel by measurement of differences in light.

Photometer optimisation trials for quantifying PSA

To develop the photometer, IMMS created various experimental setups and testing systems which included the chip so that a number of features could be established: the light absorbed by samples, the linearity, sensitivity and resolution limit of the

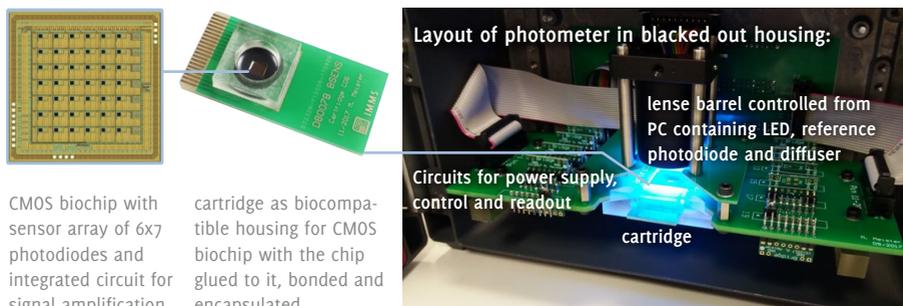


Figure 2: The optoelectronic CMOS biochip (left) which is exchangeable because of the cartridge solution (centre) can be used in the photometer for the analysis (right). Photographs: IMMS.

More on sensor systems at www.imms.de

Article on this research chip: www.imms.de.

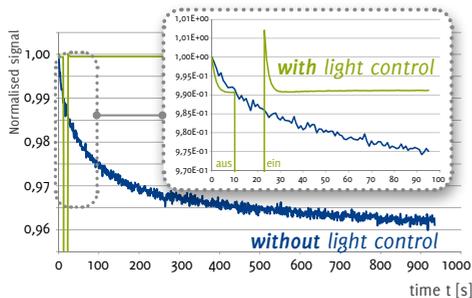


Figure 3:

Comparison of system behaviour based on the normalised photocurrent over a period of 15 minutes without (blue) and with light control using a reference photodiode in the lens barrel (green): the light source stabilises within a few seconds of being switched on or off.

Diagram: IMMS.

photometers; also to analyse influences like the rise in temperature of the electronics and light source, constancy of illumination, evaporation effects and light scattering.

As one result of the experiments, IMMS integrated illumination control into the analyser. This enabled the startup time for the whole system to be reduced from more than 15 minutes to less than one minute, see Figure 3, so that systematic measurement errors are reduced and the actual biochemical reactions are more clearly evidenced. Systematic measurement errors can arise from a temperature rise in the electronics and LED or the evaporation of liquids below an intense light.

The LED can be regulated from the GUI on the connected PC. The ASIC amplification, the choice of sensors, the calculation of the mean, the measured value per unit of time and the storing of the analysis data likewise take place on or from the PC. Various graphs are provided via the GUI for the evaluation of the control and the measurement results, see Figure 4.

More on system integration at www.imms.de

Figure 4:

Graphic user interface created by IMMS for the control of and measurement with the photometer, which is connected to a PC or laptop by USB cable. This screenshot is of the matrix for the measured values from the sensors.

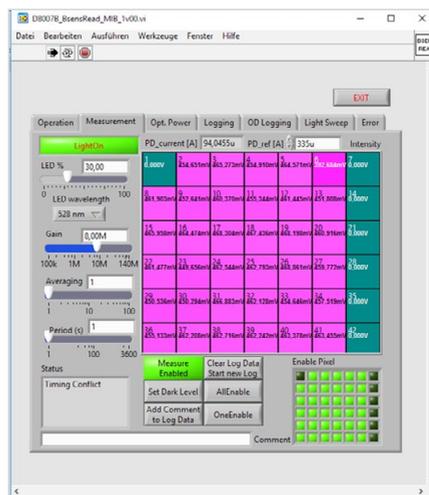


Diagram: IMMS.

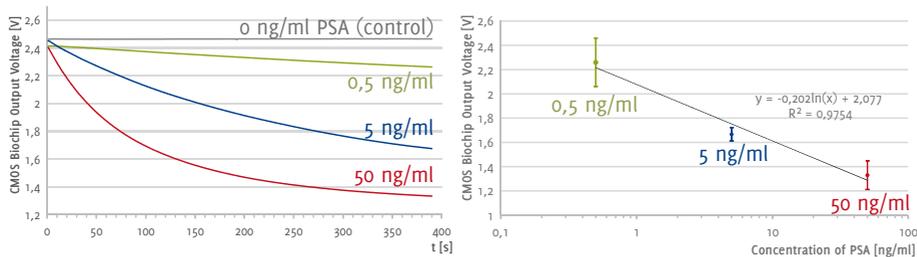


Figure 5: Left: Decreasing averaged output signals (V) from five CMOS biochips for each concentration of PSA during measurement process, which starts with addition of substrate to the immunoassay. Right: Calibration curve (logarithmic) for the PSA immunoassay with different PSA concentration levels measured after six minutes. Diagrams: IMMS.

Measuring PSA with photometer after optimisation

The optimised photometer was handed over to Senova with the cartridge units (see Figure 2) so that the measuring system could be validated for PSA. Senova provided the chip surfaces with the appropriate functions using immobilised anti-human PSA antibodies, optimised the PSA assay and carried out measurements on samples containing various PSA concentrations.

As can be seen from Figure 5, as PSA concentration in samples increases, there is a decrease in strength of the photometric signals. Five repetitions of the experiments using different CMOS biochip cartridges gave the same results. The presence of PSA was proven with a lower detection limit of 0.1 ng/ml. The figures for the coefficient of variation across the experiments were 8.8%, 3.2% and 8.9% for 0.5 ng/ml, 5 ng/ml and 50 ng/ml of PSA. This being the case, the requirements set in the "Rili-BÄK" for clinical testing are fulfilled.

Development of an opto-electronic CMOS biochip D4021A on the basis of the experiments

IMMS created the ASIC D4021A for the specific purpose following these experiments on the PSA testing system, sending it for wafer manufacturing in 2018. This chip is smaller and more affordable than that used in the initial experiments and its architecture produces even more accurate and noise-free measurements. The D4021A also includes a digital section for the initial processing of the values captured by analogue means. This simplifies the ensuing signal processing and standardised output to data processing systems. There is a further benefit in that the digitised signals are less vulnerable to external factors.

More on ASIC development at www.imms.de.

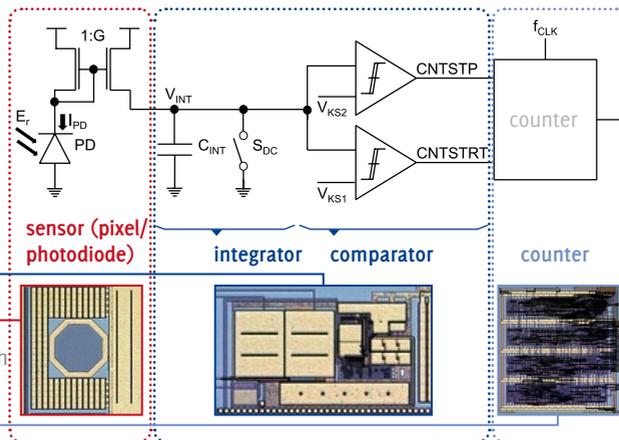
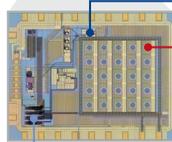
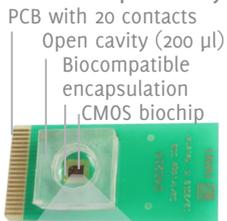
CMOS biochip assembly:

Figure 6: Photograph of the chip and circuit diagram, D4021A CMOS biochip. Photographs and diagram: IMMS.

Wide-range and low-noise signal processing with digitisation included

The D4021A CMOS biochip comprises a sensor matrix of 5 x 5 photodiodes, see Figure 6. Incident light is converted by the photodiode into a pre-defined photocurrent I_{PD} and amplified using a current mirror. The photocurrent is integrated at capacitance C_{INT} , causing the integration voltage V_{INT} to rise. Two comparators and a signal meter then work together in digitising the signal. Two set threshold reference voltages V_{KS1} and V_{KS2} serve to enable the comparators to start and stop the meter counting as soon as the integration voltage V_{INT} has reached the appropriate threshold value, see Figure 6. CNTSTRT and CNTSTP are the start and stop signals.

The value is in indirect proportion to the luminous intensity striking the sensor. If the timing cycles counted are few in number, i.e. the threshold value is rapidly reached, the intensity is high (see Figure 7). This method of signal processing enables fluctuating photocurrents generated by the incident light to be treated almost noiselessly across a wide signal range, so that the signal-to-noise ratio is excellent.

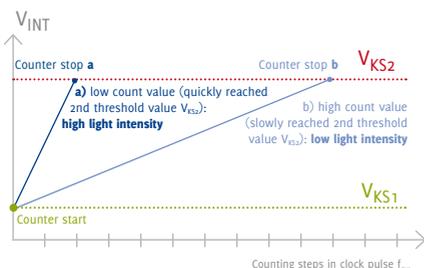


Figure 7:

Illustration of the counting principle exemplified at (a) higher and (b) lower light intensity: with timing at set frequency f_{CLK} , counting continues until the integration voltage V_{INT} reaches the second threshold value, stopping the clock. V_{KS} refers to the threshold and reference voltage 1 and 2 of the comparators. Diagram: IMMS.

- > INPOS
- > INSPECT
- > ADMONT
- > Ko²SiBus
- > AgAVE
- > Dig. Engineering
- > IRIS
- > Contents
- * Funding

More on ASIC development at www.imms.de.

Wafer testing took place on ten wafers each comprising approx. 600 of the D4021A circuits. This was to check the basic functions of contactability, operating current, test voltages and signal processing plus particular special functions. Also, various sample biocompatible cartridges containing the ASIC were designed and constructed, see Figure 8.

In early characterisation measurements using red light with the wavelength 617 nm, the ASIC produced was capable of a dynamic range of 114 dB. This means it permits signal coverage 2.5 orders of magnitude greater for optical density between 2.8 and 0.0004 than that of the chip used in the preliminary experiments. Consequently, the detection threshold is improved by a factor of 25. Further optimisation potential in this context is also available to the settings on the new ASIC as well as to the optics.

More on test and characterisation at www.imms.de.

Summary and Outlook

As partners, Senova and IMMS are the first to succeed in precisely quantifying prostate-specific antigen by PSA immunoassay on an opto-electronic CMOS biochip exactly measuring light absorption changes in a portable unit that gives results of a quality required of medical laboratories. In addition, IMMS has concluded the development of a much more exact and tiny CMOS biochip which thus suffers much less from noise, testing it at wafer level; the Institute has also designed and constructed plug-in modules containing the new ASIC for this reader. In the INSPECT project, IMMS has reengineered the device so that it is now considerably more compact and contains upgraded LED controls so that the noise and responsiveness of the illumination unit has been improved. The IMMS internal research group on integrated system solutions for life science applications is responsible for the construction and for testing the system with the improved hardware.

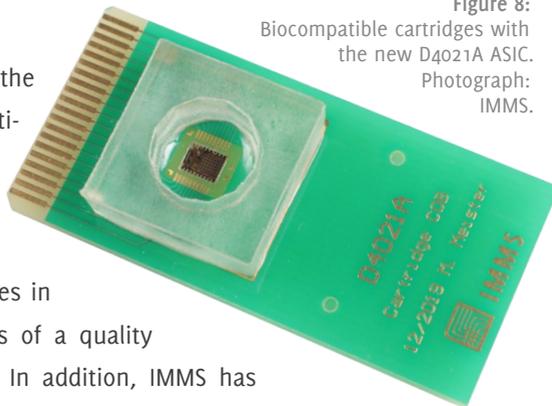


Figure 8:
Biocompatible cartridges with
the new D4021A ASIC.
Photograph:
IMMS.

Thanks to the fact that the biochemical reactions took place on the chip itself, PSA presence could be measured with no gap between the sample and the light sensor. This being the case, the CMOS biochips gave more accurate, more reliable results than do test strips. It is to be expected that the newly developed principle now successfully tried and tested on PSA will be able to improve the sensitivity of other tests. Starting here, IMMS now aims to use the results of this project to develop further PoC electronic solutions with which to serve other bioanalytical purposes or open up new ones.

Contact person: Alexander Hofmann, M.Sc., alexander.hofmann@imms.de



The INSPECT project on which these results are based was funded by the “Land” of Thüringen and co-financed by European Union funds under the European Regional Development Fund (ERDF) under the reference 2015 FE 9159. IMMS’ project partners are Senova Gesellschaft für Biowissenschaft und Technik mbH, CDA GmbH, Institut für Bioprocess- und Analysenmesstechnik e.V. and X-FAB Semiconductor Foundries GmbH.

- > *INPOS*
- > *INSPECT*
- > *ADMONT*
- > *Ko²SiBus*
- > *AgAVE*
- > *Dig. Engineering*
- > *IRIS*
- > *Contents*
- * *Funding*

*More on
Life Sciences:
www.imms.de.*

*More detail
on INSPECT at
www.imms.de.*



INSPECT

Quantitativer PSA-Nachweis mit Immunassay auf CMOS-Biochip zur Vor-Ort-Diagnostik von Prostatakrebs

Senova und IMMS ist es erstmals gelungen, mit einem PSA-Immunassay direkt auf einem opto-elektronischen CMOS-Biochip das prostataspezifische Antigen (PSA) durch Lichtabsorptionsmessungen quantitativ nachzuweisen und dabei die Vorgaben der Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen Rili-BÄK einzuhalten. Foto: IMMS.

Motivation und Überblick

Ziel: Quantitative Schnelltests für die Diagnostik von Prostatakrebs

Zur Diagnostik von Prostatakrebs wird für die Früherkennung¹, für Abklärungsuntersuchungen, das Monitoring von Therapien und in der Nachsorge unter anderem die Konzentration des prostataspezifischen Antigens (PSA) bestimmt. Wenige Nanogramm pro Milliliter (ng/ml) PSA geben Hinweise darauf, ob und wie weitere Untersuchungen und Behandlungen erfolgen sollten. Erhöhte PSA-Werte können auf Krebs bzw. auf dessen erneutes Auftreten hindeuten.² Für einen PSA-Test wird beim Arzt Blut abgenommen und ins Labor geschickt. Meist liegt erst einige Tage später

¹ Perspektivisch könnten PSA-Messungen in die risikoadaptierte PSA-Früherkennung einfließen, die derzeit erforscht wird und individuelle, von einem Basis-PSA-Wert ausgehende regelmäßige Messungen vorsieht, vgl. <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/prostatakrebs/psa-test-frueherkennung.php> (letzter Aufruf: 27.04.2020). Eine generelle PSA-Früherkennung wird derzeit nicht empfohlen, vgl. https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Prostata_5_0/LL_Prostatakarzinom_Kurzversion_5_1.pdf (letzter Aufruf: 27.04.2020).

² Vgl. zu aktuellen Empfehlungen und Richtwerten für PSA-Konzentrationen https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Patientenleitlinien/Patientenleitlinie_Prostatakrebs_1_v01-2020.pdf (letzter Aufruf: 27.04.2020).

die PSA-Konzentration als Ergebnis vor.³ Um zeit- sowie kostenaufwändige Laboruntersuchungen mit großen und komplexen Geräten zu vermeiden und die häufig auch psychisch belastenden Wartezeiten für Patienten zu minimieren, wird nicht nur für PSA-Messungen an immer neuen kompakten sowie preiswerten Point-of-Care-Lösungen (PoC) gearbeitet.

Diese basieren in vielen Fällen auf Streifen-tests, mit denen Ärzte direkt in ihrer Praxis aus mehr oder weniger intensiven und durch biochemische Reaktionen hervorgerufenen Farbumschlägen Konzentrationen ableiten können. In den letzten Jahren haben sich für die Messung dieser Konzentrationen PoC-Geräte etabliert, die dafür z.B. Helligkeitssensoren oder eine Kamera nutzen.

Diese Geräte haben allerdings noch den Nachteil, dass sie ungenau im Vergleich zu Laboruntersuchungen sind. Im Fall von PSA-Messungen sehen die Vorgaben der Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen Rili-BÄK neben einer Nachweisgrenze von 0,2 ng/ml auch einen Messbereich bis zu 50 ng/ml vor sowie für sichere Aussagen einen Variationskoeffizienten von maximal 15,5 %.⁴ Mit Messungen an im Projekt für Referenzzwecke entwickelten PSA-Streifen-tests mit einem PoC-Lesegerät konnten diese Vorgaben allerdings nicht erreicht werden.

Mikroelektronik-basierter Demonstrator misst weniger als ein Nanogramm pro Milliliter PSA

Das IMMS hat im Projekt INSPECT ein Photometer in Form eines mobilen Lesegeräts mit einem austauschbaren opto-elektronischen CMOS-Biochip erarbeitet und als Demonstrator aufgebaut. Statt der bislang in einigen PoC-Geräten genutzten Teststreifen mit Kamera-basierter Auswertung wird eine Probe direkt auf den Mikroelektronik-Chip gegeben und die biochemische Reaktion ohne Abstände zwischen Probe und Lichtdetektor gemessen. Der Projektpartner Senova Gesellschaft für Biowissenschaft und Technik mbH hat die biochemische Funktionalisierung der Chip-Oberflächen mit immobilisierten Antikörpern für PSA vorgenommen und Messungen mit Proben unterschiedlicher PSA-Konzentrationen mit dem Prototyp durchgeführt. Liegt PSA in der Probe vor, wird es mit biochemischen Reaktionen nachgewiesen, die je nach Konzentration die Probe unterschiedlich stark einfärben und als Helligkeitsunterschiede opto-elektronisch gemessen werden.

> INPOS
> INSPECT
> ADMONT
> Ko²SiBus
> AgAVE
> Dig. Engineering
> IRIS
> Inhalt
* Förderung

Mehr zu
INSPECT auf
www.imms.de

Mehr zu Chip-
entwicklungen:
www.imms.de

³ <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/prostatakrebs/psa-test-frueherkennung.php> (letzter Aufruf: 27.04.2020)

⁴ www.bundesaerztekammer.de/rilibaek2019 (letzter Aufruf: 27.04.2020)

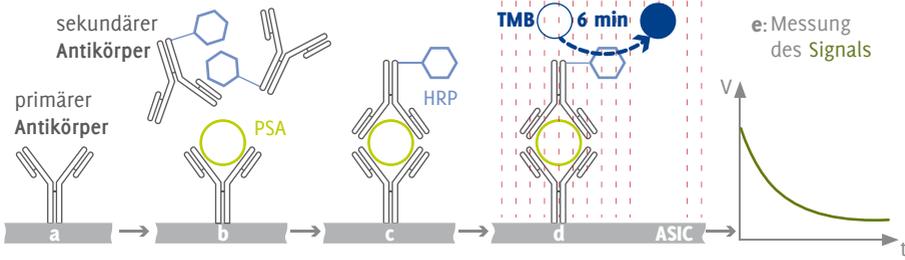


Abbildung 1: Grundprinzip für den quantitativen Nachweis des Analyten PSA mithilfe von immobilisierten primären Antikörpern, mit HRP (Meerrettich-Peroxidase-Enzym) markierten sekundären Antikörpern und Tetramethylbenzidin-Substrat-Lösung (TMB): die HRP-TMB-Reaktion verändert durch einen Farbumschlag die Lichtintensität, die mit dem Chip gemessen wird. Grafik: Senova/IMMS.

- > INPOS
- > INSPECT
- > ADMONT
- > Ko²SiBus
- > AgAVE
- > Dig. Engineering
- > IRIS
- > Inhalt
- * Förderung

Senova und IMMS ist es damit erstmals gelungen, PSA auf einem CMOS-Biochip mit einer Detektionsgrenze von 0,1 ng/ml quantitativ nachzuweisen. Die Messungen erfüllen die für klinische PSA-Tests gemäß Rili-BÄK erforderlichen Vorgaben. Der Test mit dem CMOS-Biochip-System benötigt insgesamt 14 Minuten, die Ergebnisse werden digital bereitgestellt und können direkt über ein an das Gerät angeschlossenes PC weiterverarbeitet werden.

Lösung im Detail

Messprinzip: PSA-Immunoassay auf Mikroelektronik-Chip

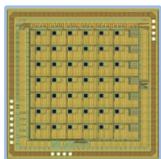
Das biotechnologische Prinzip des neuen Testsystems ist vergleichbar mit dem von Lateral-Flow-Tests, also von gängigen Teststreifen: Mit einer Antikörper-Antigen-Wechselwirkung werden gezielt Analyten in einer Probe nachgewiesen, d.h. bei Prostatakrebs das PSA. Für den Mikroelektronik-basierten Nachweis werden primäre Antikörper für PSA (anti-human PSA antibody), die sonst als Fängermoleküle auf Teststreifen aufgebracht werden, auf der Chip-Oberfläche aufrecht fixiert, vgl. Abbildung 1 (a). Sie fangen PSA ein, sofern es in einer Probe enthalten ist, die auf den Chip gegeben wird. Für den Nachweis werden auch sekundäre Antikörper für PSA auf den Chip gegeben, die mit dem Meerrettich-Peroxidase-Enzym (HRP) markiert sind (b), und ebenfalls am PSA andocken. Dieses Sandwich aus primären Antikörpern, PSA, sekundären Antikörpern und HRP ist noch unsichtbar. Die markierten sekundären Antikörper, die nicht an die Oberfläche gebunden sind, werden mit einer Waschlösung weggespült (c). Im nächsten Schritt wird farblose Tetramethylbenzidin-

Substrat-Lösung (TMB) hinzugefügt, die mit dem HRP reagiert und die unsichtbaren Antikörper-Antigen-Komplexe nach sechs Minuten durch einen blauen Farbumschlag sichtbar macht (d). Das verändert die optische Dichte, die mit dem Chip detektiert und ausgewertet wird (e). Hierfür wird zuerst die Lichtintensität vor der Reaktion gemessen und danach, wie stark das Licht durch die Farbmenge gedämpft wird.

Prototypischer Aufbau eines mobilen Photometers

Für die optische Anregung und die Auswertung der Signale des Mikroelektronik-Chips hat das IMMS ein kompaktes, mobiles, lichtdicht verschlossenes Lesegerät entwickelt, das per USB-Kabel an einen PC angeschlossen wird. Dort lässt sich mit der am IMMS realisierten Software der Test steuern, die Daten anzeigen und weiterverarbeiten. Die Probe wird in die Reaktionskammer direkt auf den Chip gegeben, der auf einer kleinen Platine als Steckmodul (Cartridge) aufgebaut ist. Die Cartridge wird in das Gerät unter die Beleuchtungseinheit eingesteckt. Eine LED erzeugt in einem festen Abstand zum Chip homogenes Licht, das mit konstanter Intensität während Reaktion die Probe ausleuchtet.

Das Lesegerät wurde zunächst mit einem bereits vorliegenden Chip betrieben, um Anforderungen und Randbedingungen für das Gesamtsystem und eine neu zu entwickelnde applikationsspezifische integrierte Schaltung (ASIC) abzuleiten. Der vorliegende Chip war ursprünglich für den Nachweis von Infektionskrankheiten und damit für andere Anwendungen entwickelt worden. Er beinhaltet eine Matrix aus 6 x 7 Photodioden, vgl. Abbildung 2 (links) und ist damit für Forschungszwecke relativ groß gehalten. Er war einst realisiert worden, um parallel verschiedene Krankheits-erreger durch die Messung von Lichtunterschieden zu detektieren.



CMOS-Biochip mit Sensorarray aus 6x7 Photodioden und signalverstärkender integrierter Schaltung



Cartridge als biokompatibles CMOS-Biochip-Gehäuse mit geklebtem, gebondetem und verkapseltem CMOS-Biochip



Photometeraufbau in lichtabschirmendem Gehäuse:

PC-gesteuerter Linsentubus mit LED, Referenzphotodiode und Diffusor

Versorgungs-, Steuer- & Ausleseschaltungen

Cartridge

Abbildung 2: Der opto-elektronische CMOS-Biochip (links) lässt sich dank der Cartridge-Lösung (Mitte) auswechseln und im Photometeraufbau (rechts) für Messungen nutzen. Fotos: IMMS.

> INPOS

> INSPECT

> ADMONT

> Ko²SiBus

> AgAVE

> Dig. Engineering

> IRIS

> Inhalt

* Förderung

Mehr zu Sensor-systemen auf

www.imms.de

Mehr zu diesem Forschungschip:

www.imms.de

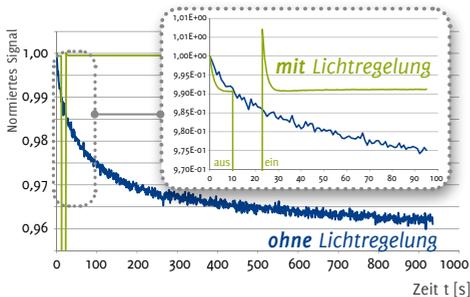


Abbildung 3:

Vergleich des Systemverhaltens anhand des normierten Photostroms über 15 Minuten ohne (blau) und mit Lichtregelung über eine Referenz-Photodiode im Linsentubus (grün): Wenige Sekunden nach dem Ab-/Anschalten ist die Lichtquelle stabilisiert.

Grafik: IMMS.

Untersuchungen zur Optimierung des Photometers für die PSA-Messungen

Das IMMS hat für die Entwicklung des Photometers mehrere Messaufbauten und Testsysteme mit dem Chip realisiert, um die Lichtabsorption von Proben sowie Linearität, Empfindlichkeit und Auflösungsgrenze des Photometers zu bestimmen und Einflussfaktoren wie die Erwärmung von Elektronik und Lichtquelle, konstante Beleuchtungsbedingungen, Verdunstungseffekte und Streulicht zu untersuchen.

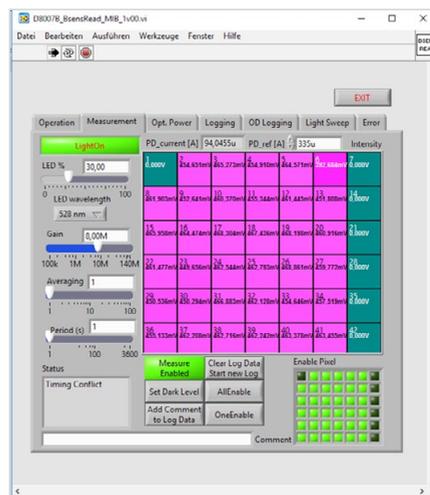
Auf dieser Basis hat das IMMS beispielsweise eine Lichtregelung in das Lesegerät integriert. Durch diese konnte die Einschwingzeit des Gesamtsystems von mehr als 15 min auf unter eine Minute erheblich verkürzt werden, vgl. Abbildung 3. Damit lassen sich systematische Messfehler verringern und die eigentlichen biochemischen Reaktionen sicherer nachweisen. Ursachen für die systematischen Messfehler liegen z.B. in der Erwärmung der Elektronik und der LED sowie in der Verdunstung von Flüssigkeiten bei sehr hohen Lichtintensitäten.

Die LED lässt sich vom angeschlossenen Rechner mit der grafischen Benutzeroberfläche (GUI) einstellen genauso wie die ASIC-Verstärkung, die Auswahl von Sensoren, Mittelwertbildung, Messwert-pro-Zeiteinheit und Messdatenspeicherung. Über die GUI werden verschiedene Graphen bereitgestellt zur Auswertung der Regelung und der Messergebnisse, vgl. Abbildung 4.

Abbildung 4:

Am IMMS erstellte grafische Benutzeroberfläche für die Regelung und Messung am Photometer, das per USB-Kabel an einen Rechner oder Laptop angeschlossen wird. Der Screenshot zeigt die Messwerte von Sensoren in Matrixformat.

Grafik: IMMS.



Mehr zu System-
integration auf
www.imms.de

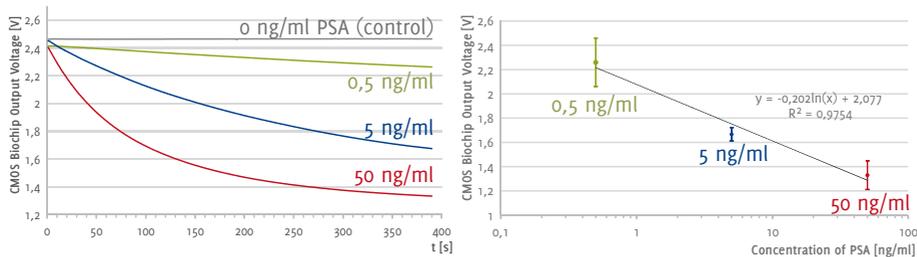


Abbildung 5: Links: Abnehmende und gemittelte Ausgangssignale (V) von fünf CMOS-Biochips pro PSA-Konzentration während der Messungen, die nach der Zugabe von Substrat zum Immunassay beginnen. Rechts: Logarithmisch angepasste Kalibrierungskurve des PSA-Immunoassays mit verschiedenen PSA-Konzentrationen, die nach 6 Minuten gemessen wurden. Grafiken: IMMS.

PSA-Messung mit optimiertem Photometer

Das optimierte Photometer wurde mit Cartridge-Aufbauten, vgl. Abbildung 2, an Senova übergeben, um das Messsystem mit dem prostataspezifischen Antigen (PSA) zu validieren. Senova hat die biochemische Funktionalisierung der Chip-Oberflächen mit immobilisierten Antikörpern für PSA vorgenommen, den PSA-Assay optimiert und Messungen mit Proben unterschiedlicher PSA-Konzentrationen durchgeführt.

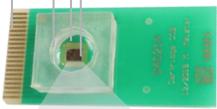
Wie in Abbildung 5 dargestellt, führt die steigende PSA-Konzentration in der Probe zu abnehmenden Signalen bei optischen Messungen mit dem CMOS-Biochip. Die Experimente wurden fünfmal mit verschiedenen CMOS-Biochip-Cartridges mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. PSA wurde dabei mit einer Detektionsgrenze von 0,1 ng/ml nachgewiesen. Es wurden Variationskoeffizienten über die Experimente von 8,8%, 3,2% und 8,9% für 0,5 ng/ml, 5 ng/ml und 50 ng/ml PSA erreicht. Das Nachweissystem erfüllt damit die Vorgaben für die klinische Prüfung gemäß Rili-BÄK.

Entwicklung eines opto-elektronischen CMOS-Biochips D4021A auf Basis der Untersuchungen

Das IMMS hat auf der Basis von Untersuchungen mit dem Testsystem den speziell auf die Anwendung ausgerichteten ASIC D4021A entwickelt, der 2018 in die Fertigung übergeben wurde. Dieser Chip ist kleiner und kostengünstiger als jener für die Voruntersuchungen und hat eine Architektur, mit der genauere und rauschärmere Messungen möglich sind. Der D4021A enthält zudem einen Digitalteil zur Vorverarbeitung der analog erfassten Werte. Damit wird die nachfolgende Signalverarbeitung und standardisierte Anbindung zu Informationsverarbeitungssystemen vereinfacht. Die digitalisierten Messsignale sind darüber hinaus robuster gegen äußere Störeinflüsse.

Mehr zu Chip-
Entwicklungen:
www.imms.de.

CMOS-Biochip-Aufbau:
PCB mit 20 Kontakten
Offene Kavität (200 μ l)
Biokompatibler Verguss
CMOS-Biochip



CMOS-Biochip mit 5x5-Sensormatrix

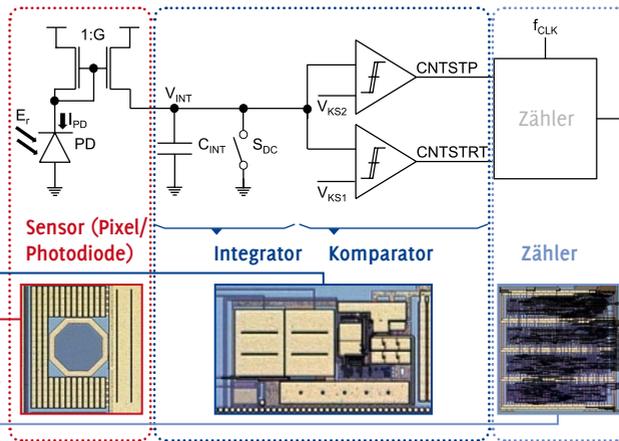


Abbildung 6: CMOS-Biochip-Aufbau, Chipfoto und Blockschaltbild des CMOS-Biochips D4021A. Fotos/ Grafik: IMMS.

- > INPOS
- > INSPECT
- > ADMONT
- > Ko²SiBus
- > AgAVE
- > Dig. Engineering
- > IRIS
- > Inhalt
- * Förderung

Großer Dynamikbereich und rauscharme Signalverarbeitung inklusive Digitalisierung

Der CMOS-Biochip D4021A besteht aus einer Sensormatrix aus 5x5 Photodioden, vgl. Abbildung 6. Einfallendes Licht wird durch die Photodiode in einen definierten Photostrom I_{PD} umgewandelt und in einem Stromspiegel verstärkt. Dieser wird auf der Kapazität C_{INT} integriert, wodurch die Integrationsspannung V_{INT} ansteigt. Das Signal wird dann mithilfe von zwei Komparatoren und einem Zähler digitalisiert. Zwei festgelegte Schwellreferenzspannungen V_{KS1} und V_{KS2} sorgen dafür, dass die Komparatoren den Zähler starten bzw. stoppen, sobald die Integrationsspannung V_{INT} den jeweiligen Schwellwert erreicht hat, vgl. Abbildung 6 mit den Start- bzw. Stoppsignalen CNTSTRT und CNTSTP.

Der Zählwert ist umgekehrt proportional zu der vom Sensor empfangenen Lichtintensität. Werden wenige Taktzyklen gezählt, also der zweite Schwellwert schnell erreicht, liegt eine entsprechend hohe Lichtintensität vor, vgl. Abbildung 7. Mit diesem Signalverarbeitungskonzept ist es möglich, vom eintreffenden Licht generierte Photoströme über einen großen Signal- bzw. Dynamikbereich rauscharm zu verarbeiten und ein sehr gutes Signal-zu-Rauschverhältnis zu erhalten.

Mehr zu Chip-
Entwicklungen:
www.imms.de.

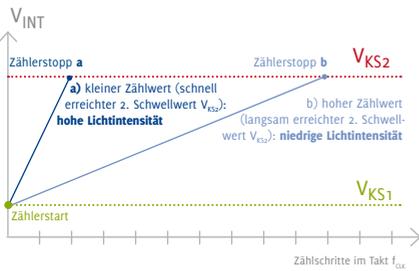


Abbildung 7:

Illustration des Zählerprinzips am Beispiel hoher (a) und niedriger (b) Lichtintensitäten: In einem Takt der festgelegten Frequenz f_{CLK} wird solange gezählt, bis die Integrationsspannung V_{INT} den zweiten Schwellwert erreicht hat und der Zähler somit gestoppt wird. V_{KS} steht für Komparatorschwellwert/-referenzspannung 1 und 2. Grafik: IMMS.

Erste Messungen und Charakterisierungen

Zehn Wafer mit jeweils ca. 600 D4021A-Schaltungen sind im Wafertest auf Grundfunktionalitäten wie Kontaktierbarkeit, Betriebsstrom, Testspannungen, Signalverarbeitung und spezielle Funktionen überprüft worden. Weiterhin wurden Muster für biokompatible Cartridges mit dem neuen ASIC entwickelt und aufgebaut, vgl. Abbildung 8.

Der aufgebaute ASIC erreichte bei ersten Charakterisierungsmessungen mit rotem Licht der Wellenlänge von 617 nm einen Dynamikbereich von 114 dB. Er erlaubt damit eine um 2,5 Größenordnungen höhere Signalbereichsabdeckung optischer Dichten von 2,8 – 0,0004 als der bislang für die Voruntersuchungen verwendete Chip. Die Detektionsgrenze ist damit um den Faktor 25 besser. Einstellungsmöglichkeiten am neuen ASIC sowie am optischen System bieten diesbezüglich zudem noch weiteres Optimierungspotential.

Zusammenfassung und Ausblick

Senova und IMMS ist es erstmals gelungen, mit einem PSA-Immunassaydirekt auf einem opto-elektronischen CMOS-Biochip das prostataspezifische Antigen (PSA) durch Lichtabsorptionsmessungen quantitativ mit einem mobilen Lesegerät in einer für klinische Tests erforderlichen Qualität nachzuweisen. Das IMMS hat zudem die Entwicklung eines wesentlich genaueren, kleineren und damit rauschärmeren CMOS-Biochips abgeschlossen und diesen auf Wafer-Ebene getestet sowie Steckmodule mit dem neuen ASIC für dieses Lesegerät entwickelt und aufgebaut. Darüber hinaus hat das IMMS in INSPECT das Gerät überarbeitet, das nun deutlich kompakter ist und eine überarbeitete LED-Regelung für ein signifikant verbessertes Rausch- und Regelverhalten der Beleuchtungseinheit beinhaltet. Der

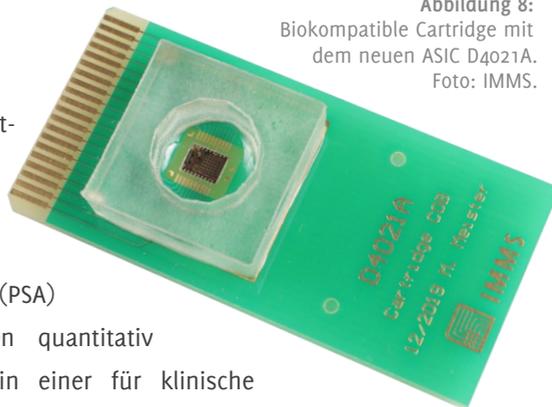


Abbildung 8:
Biokompatible Cartridge mit dem neuen ASIC D4021A.
Foto: IMMS.

Mehr zu Test
und Charakterisierung auf
www.imms.de

Aufbau und der Test mit der verbesserten Hardware werden in der IMMS-internen Forschungsgruppe zu integrierten Systemlösungen für Life-Sciences-Anwendungen vorgenommen.

PSA konnte dank der direkt auf der Mikroelektronik stattfindenden biochemischen Reaktionen ohne Abstände zwischen Probe und Lichtdetektor gemessen werden. Die CMOS-Biochips erlaubten in diesem Fall genauere und zuverlässigere Ergebnisse als Streifen-tests. Es ist davon auszugehen, dass sich mit dem anhand von PSA entwickelten und erfolgreich erprobten Prinzip auch die Sensitivität anderer Nachweise verbessern lässt. Das IMMS strebt an, die Projektergebnisse als Grundlage für die Entwicklung neuer PoC-Lösungen zu nutzen und damit weitere Anwendungen in der Bioanalytik zu bedienen und zu erschließen.



Kontakt: Alexander Hofmann, M.Sc., alexander.hofmann@imms.de

Das diesen Ergebnissen zugrundeliegende Vorhaben INSPECT wurde vom Freistaat Thüringen unter der Nummer 2015 FE 9159 gefördert und durch Mittel der Europäischen Union im Rahmen des Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE) kofinanziert. Projektpartner des IMMS sind die Senova Gesellschaft für Biowissenschaft und Technik mbH, die CDA GmbH, das Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V. und die X-FAB Semiconductor Foundries GmbH.