



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 343**

51 Int. Cl.:
B05D 7/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06726473 .9**

96 Fecha de presentación : **24.03.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1868738**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.12.2007**

54 Título: **Recubrimientos funcionalizados con tiol y métodos para su producción.**

30 Prioridad: **15.04.2005 GB 0507612**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.05.2011

73 Titular/es: **SURFACE INNOVATIONS LIMITED**
Redgate House Wolsingham
County Durham DL13 3HH, GB

72 Inventor/es: **Badyal, Jas Pal Singh y**
Schofield, Wayne Christopher Edward

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 358 343 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Recubrimientos funcionalizados con tiol y método para producir los mismos.

[0001] La presente invención está relacionada con la producción de recubrimientos que contienen grupos funcionales de tiol.

5 **[0002]** La funcionalización de superficie de objetos sólidos es un tema de importancia considerablemente tecnológica, puesto que ofrece un medio eficaz en coste de mejorar el rendimiento del sustrato sin afectar a las propiedades globales de masa. Por ejemplo, la unión de biomoléculas tales como ADN o proteínas es de gran interés técnico, lo que permite la construcción de conjuntos biológicos que están encontrando aplicación en campos de estudio tan diversos como la informática (Aldeman, M. *Science* 1994, 266, 1021; Frutos, A. G. *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 1997, 25, 4748), descubrimiento
10 de fármacos (Debouck, C. *et al.*, *Nature Genet.* 1999, 1 (sup/.) 48), investigación del cáncer (Van't Veer, L. J. *et al.* *Nature* 2002, 415, 530) y la elucidación del genoma humano (McGlennen, R. C. *Clinical Chemistry* 2001, 47, 393).

15 **[0003]** Además, una superficie de tiol ofrece un sustrato químicamente versátil que permite modificación de superficie por la aplicación de química basada en solución ampliamente usada incluyendo, sin limitación, la reacción de Mannich, la formación de puentes disulfuro, adición nucleófila, reacción con aldehídos, reacción con alquil haluros, reacción con cetonas, reacción con metales nobles y preciosos (tales como oro y plata), la formación de sulfuros y la oxidación o reducción de la funcionalidad de tiol.

20 **[0004]** Los métodos existentes para unir tioles de superficies sólidas incluyen el auto ensamblaje de mercapto-sitano (Levicky, R. *et al.* documento WO 2004113872), auto ensamblaje de tiol en oro usando grupos tiol en ambos extremos de la molécula enlazadora (Tivansky, A. V. *et al.* *J. Phys. Chem. B.* 2005, 109, 5398), y la inmovilización de enlazadores que contienen tiol con otras superficies funcionalizadas (Steichen, M. *et al.*, *Electrochemistry Communications* 2005, 7, 416; Lucarelli *et al.*, *Biosensors and Bioelectronics* 2005, 20, 2001). Todos estos enfoques padecen inconvenientes que incluyen la implicación de procedimientos multietapa, especificidad de sustrato y el requisito de química de fase en solución.

25 **[0005]** Otro método para formar funcionalidad de tiol en una superficie comprende el tratamiento de la superficie de un polímero, tal como polietileno, con un plasma de gas que contiene azufre, tal como sulfuro de hidrógeno. Sin embargo, tales enfoques conducen a la generación de una amplia serie de grupos funcionales de superficie tales como sulfuros y episulfuros (Muguruma, H. *et al.*, *Chemistry Letters* 1996, 4, 283).

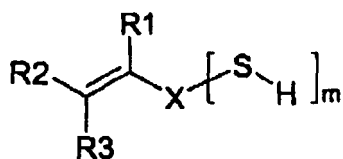
30 **[0006]** La funcionalización de superficie por polimerización de plasma de onda continua es una vía adicional con la que los tioles se han unido a superficies sólidas. Este enfoque padece el inconveniente de una retención estructural baja, con superficies que muestran una sulfonación aumentada y/o pérdida de funcionalidad del tiol en comparación con sus precursores monoméricos (Roh, J. H. *et al.* *Journal of Adhesion Science and Technology*, 2002, 16, 1529; Thyen, R. *et al.* Solicitud internacional de PCT WO 2001076773).

35 **[0007]** Los polímeros de plasma se consideran por lo tanto con frecuencia estructuralmente diferentes en comparación con polímeros convencionales, puesto que poseen niveles altos de reticulación y carecen de una unidad de repetición regular (Yasuda, H. *Plasma Polymerisation Academic Press: Nueva York, 1985*). Esto puede atribuirse a que el ambiente de plasma genera una serie completa de intermedios de reacción que contribuyen a una falta global de selectividad química. Sin embargo, se ha descubierto que emitiendo impulsos de descarga eléctrica en la escala de tiempo ms- μ s se puede mejorar significativamente la retención estructural de la especie monomérica parental (Panchalingam, V. *et al.*, *Appl. Polym. Sci.* 1994, 54, 123; Han, L. M. *et al.*, *Chem. Mater.*, 1998, 10, 1422; Timmons *et al.*, patente de Estados Unidos nº. 5.876.753) y en algunos casos se han sintetizado polímeros lineales convencionales (Han, L. M. *et al.*, *J. Polym.Sci., Part A: Polym. Chem.* 1998, 36, 3121). En tales condiciones, se entiende que impulsos cortos repetitivos del plasma controlan el número y tiempo de vida de especies activas creadas durante el período de activación, que se sigue después por vías de reacción convencionales (por ejemplo polimerización) que se producen durante el período de desactivación (Ryan, M.E. *et al.*, *Chem. Mater.*, 1996, 8, 37).

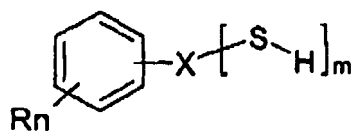
45 **[0008]** La preparación de superficies funcionalizadas con tiol mediante polimerización de plasma de onda continua se ha indicado previamente usando etanotiol (Maguruma, H. *et al.* *Chemistry Letters* 1996, 4, 283). Sin embargo, la retención de la estructura monomérica fue pobre y las superficies recubiertas mostraron niveles bajos de funcionalidad de tiol. El nivel inadecuado observado de rendimiento de la muestra se debió principalmente a la estructura del monómero utilizado. El etanotiol carece de grupo funcional, tal como funcionalidad de acrilato o alqueno, que pueda polimerizarse fácilmente mediante rutas de reacción convencionales durante el tiempo de inactivación del plasma pulsado. Por lo tanto, para que suceda la deposición de dichos monómeros, deben aplicarse condiciones de plasma relativamente duras, suficientes para iniciar la polimerización mediante grupos funcionales normalmente no polimerizables (por ejemplo, restos de alquilo). Claramente las condiciones capaces de romper y reunir tales estructuras insaturadas entre si son igualmente capaces de destruir la funcionalidad de tiol deseada. Esto conduce inevitablemente al bajo grado de retención de monómeros observado en experimentos previos. Para conseguir la deposición exitosa de una superficie que contiene tiol, debe utilizarse una metodología que combina técnicas de plasma pulsado y la selección de una estructura monomérica polimerizable adecuada.

5 **[0009]** Los solicitantes han descubierto que la polimerización por plasma pulsado de monómeros que contienen funcionalidades de tiol de fórmula general (I) o fórmula (Ia) puede potencialmente superar las limitaciones de las técnicas existentes para formar superficies funcionalizadas con tiol. Los compuestos de fórmula (I) o fórmula (Ia) poseen grupos funcionales insaturados (tales como alqueno, acilato, metacrilato y fenilo) que pueden experimentar rutas de polimerización convencionales durante el período de inactivación del plasma pulsado con impacto insignificante sobre el resto de tiol deseado. Las películas resultantes, en comparación con la técnica anterior, muestran una retención casi total de la funcionalidad de monómeros y se ha descubierto que son capaces de los niveles rigurosos de rendimiento demandados por aplicaciones tales como una producción de microseries de ADN.

10 **[0010]** De acuerdo con la presente invención se proporciona un método para aplicar un recubrimiento que contiene tiol reactivo a un sustrato, incluyendo dicho método someter a dicho sustrato a una descarga de plasma en presencia de un compuesto de fórmula (I) o fórmula (Ia);



(I)



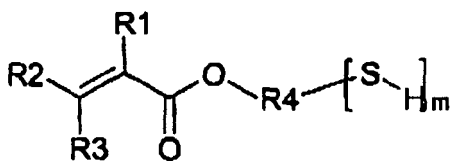
(Ia)

15 **[0011]** En las que X es una cadena o cadenas de alqueno lineales o ramificadas opcionalmente sustituidas o un grupo o grupos arilo; R¹, R² o R³ son opcionalmente hidrógeno, grupos heterocíclicos o hidrocarbilo sustituidos y m es un entero mayor que 0; Rⁿ es una variedad de grupos heterocíclicos o hidrocarbilo opcionalmente sustituidos, siendo n 0-5 y caracterizada por que una vez que se aplica el recubrimiento que contiene tiol al sustrato, dicho método incluye la etapa de derivatización de los grupos tiol con un reactivo, seguido de eliminación del reactivo ("stripping") del recubrimiento en tales condiciones que la derivatización de la superficie que contiene tiol sea reversible para crear una superficie re-escribible.

25 **[0012]** Como se usa en la presente memoria, el término "hidrocarbilo" incluye grupos alquilo, alqueno, alquino, arilo y aralquilo. El término "arilo" se refiere a grupos cíclicos aromáticos tales como fenilo o naftilo, en particular fenilo. El término "alquilo" se refiere a cadenas lineales o ramificadas de átomos de carbono que tienen, de forma adecuada, de 1 a 20 átomos de carbono de longitud. Los términos "alqueno" y "alquino" se refieren a cadenas insaturadas lineales o ramificadas que tienen de forma adecuada de 2 a 20 átomos de carbono. Estos grupos pueden tener uno o más enlaces múltiples. De este modo los ejemplos de grupos alqueno incluyen aleno y dienilo.

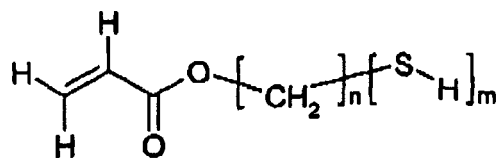
[0013] Los sustituyentes opcionales adecuados para los grupos hidrocarbilo R¹, R², R³ y grupos alqueno/arilo X son grupos que son sustancialmente inertes durante el procedimiento de la invención. Pueden incluir grupos halógenos tales como fluoro, cloro, bromo y/o yodo. Los sustituyentes halógenos particularmente preferidos son fluoro.

30 **[0014]** En una realización preferida de la invención, X es un resto que comprende un grupo éster adyacente a un grupo heterocíclico o hidrocarbilo opcionalmente sustituido, R⁴. De este modo, en una realización particular, el compuesto de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (II):



(II)

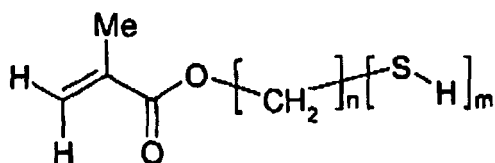
5 **[0015]** En particular, R^1 , R^2 , R^3 y R^4 se seleccionan de forma independiente de hidrógeno o alquilo y, en particular, de hidrógeno o alquilo C_{1-6} , tal como metilo. De este modo, en una realización particularmente preferida, el compuesto de fórmula (II) es un compuesto de fórmula (III): La funcionalidad de tiol deseada está conectada con un grupo acrilato fácilmente polimerizado ($CH_2=CH-CO_2-$) mediante un enlazador de cadena de hidrocarburo de alquilo saturada, R^4 , en el que n es un entero de 1 a 20:



(III)

[0016] Un ejemplo particular de un compuesto de fórmula (III), en el que $m=1$ y $n=1$, es 2-mercaptoetil acrilato.

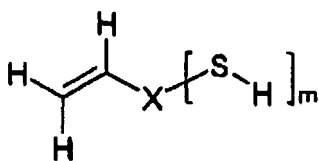
10 **[0017]** En otra realización particularmente preferida, el compuesto de fórmula (II) es un compuesto de fórmula (IIIa): la funcionalidad de tiol deseada está conectada con un grupo metacrilato polimerizado fácilmente ($CH_2=C(CH_3)-CO_2-$) mediante un enlazador de cadena de hidrocarburo de alquilo saturada, R^4 , en el que n es un entero de 1 a 20:



(IIIa)

[0018] Un ejemplo particular de un compuesto de fórmula (IIIa), en el que $m=1$ y en el que $n=1$, es 2-mercaptoetil metacrilato.

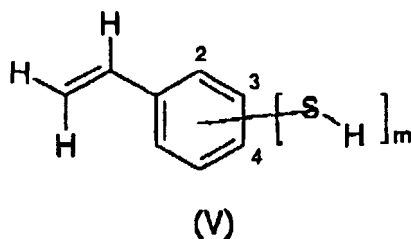
15 **[0019]** En otras realizaciones particularmente preferidas de la invención, con referencia al compuesto de fórmula (I), R^1 , R^2 y R^3 se seleccionan de nuevo de forma independiente de hidrógeno o alquilo y, en particular, de hidrógeno o alquilo C_{1-6} , tal como metilo. De este modo, en otra realización particular, el compuesto de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (IV):



(IV)

20 en la que X es como se ha definido anteriormente y m es un entero mayor que 0.

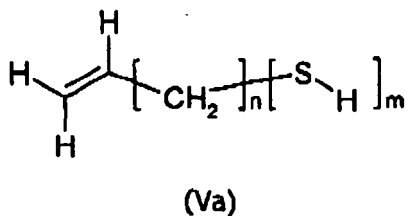
[0020] Los compuestos particularmente preferidos de fórmula (IV) son vinilbencenos de fórmula (V), en los que X es un anillo aromático disustituido:



en el que el anillo puede ser orto, meta o para sustituido.

[0021] Un ejemplo particular de un compuesto de fórmula (V) es 4-mercaptoestireno.

5 **[0022]** En otro ejemplo particularmente preferido del compuesto de fórmula (IV), X es una cadena de hidrocarburo de alquilo saturada. De este modo, el compuesto de fórmula (IV) es un compuesto de fórmula (V) en el que n es un número entero de 1 a 20, por ejemplo de 1 a 10 y preferiblemente 8.



[0023] Un ejemplo particular de un compuesto de fórmula (Va), en el que m=1 y n=1, es alil mercaptano.

15 **[0024]** Las condiciones precisas en las que la deposición de plasma pulsado del compuesto de fórmula (I) tiene lugar de una manera eficaz variará dependiendo de factores tales como la naturaleza del monómero, el sustrato, el tamaño y la arquitectura de la cámara de deposición de plasma etc. y se determinará usando métodos rutinarios y/o las técnicas ilustradas en lo sucesivo en la presente memoria. En general, sin embargo, la polimerización se efectúa de forma adecuada usando vapores o gotas atomizadas de compuesto de fórmula (I) a presiones de 0,01 a 999 mbar, de forma adecuada a aproximadamente 0,2 mbar. Aunque los plasmas a presión atmosférica y presión subatmosférica se conocen y utilizan para deposición de polímero por plasma en la técnica.

20

[0025] Una descarga luminiscente se enciende después mediante la aplicación de una tensión de alta frecuencia, por ejemplo a 13,56 Mhz. Los campos aplicados son de forma adecuada de una potencia media de hasta 50 W.

25 **[0026]** Los campos se aplican de forma adecuada durante un período suficiente para proporcionar el recubrimiento deseado. En general, éste será de 30 segundos a 60 minutos, preferiblemente de 1 a 15 minutos, dependiendo de la naturaleza del compuesto de fórmula (I) y el sustrato, etc.

[0027] De forma adecuada, la potencia media de la descarga de plasma pulsado es baja, por ejemplo de menos de 0,05 W/cm³, preferentemente menos de 0,025 W/cm³ y más preferentemente menos de 0,0025 W/cm³.

30 **[0028]** El régimen de pulsos que suministrará descargas de potencia media baja tales variará dependiendo de la naturaleza de sustrato, el tamaño y naturaleza de la cámara de descarga etc. Sin embargo, pueden determinarse disposiciones de pulsación adecuada por métodos rutinarios en cualquier caso particular. Una secuencia típica es una en la que la energía se enciende de 1 μs a 100 μs, y se apaga de 100 μs a 20000 μs.

35 **[0029]** En una realización de la invención el régimen de pulsación varía durante el transcurso de la deposición de recubrimiento para permitir la producción de recubrimientos gradados. Por ejemplo, un régimen de pulsación de potencia media alta puede usarse al comienzo del tratamiento de la muestra para producir un recubrimiento de subsuperficie insoluble altamente reticulado que se adhiere bien al sustrato. Un régimen de pulsación de potencia media baja puede adoptarse después para la conclusión del ciclo de tratamiento, produciendo una capa de superficie que presenta altos niveles de funcionalidad de tiol monomérica conservada sobre dicha subsuperficie bien adherida. Se esperaría que un régimen tal mejore la durabilidad y adhesión de recubrimiento global, sin sacrificar ninguna de las propiedades de superficies deseadas (es decir funcionalidad de tiol de superficie reactiva).

40

- [0030]** Los plasmas adecuados para su uso en el método de la invención incluyen plasmas no en equilibrio tales como los generados por audiofrecuencias, radiofrecuencias (RF) o frecuencias de microondas. En otra realización el plasma se genera por un dispositivo de cátodo hueco. En otra realización más, el plasma pulsado se produce por corriente directa (DC).
- 5 **[0031]** El plasma puede operar a presiones atmosféricas o subatmosféricas baja como se conoce la técnica. El monómero puede introducirse en el plasma como un vapor o una pulverización atomizada de gotas líquidas (documentos WO03101621 y WO03097245, Surface Innovations Limited). El monómero puede introducirse en el aparato de deposición de plasma pulsado de forma continua o de una manera por pulsos mediante, por ejemplo, una válvula de pulsos de gas.
- 10 **[0032]** El sustrato al que el recubrimiento que porta tiol se aplica preferentemente estará localizado sustancialmente dentro del plasma pulsado durante la deposición de recubrimiento. Sin embargo, el sustrato puede como alternativa estar localizado fuera del plasma pulsado, impidiendo de este modo un daño excesivo al sustrato o al recubrimiento en crecimiento.
- 15 **[0033]** El monómero típicamente se excitará directamente dentro de la descarga de plasma. Sin embargo, los métodos de deposición de plasma "remotos" pueden usarse como se conoce en la técnica. En dicho métodos el monómero entra en el aparato de deposición sustancialmente "aguas abajo" del plasma pulsado, reduciendo este modo los potenciales efectos perjudiciales del bombardeo por especies de alta energía de corta vida tales como iones.
- 20 **[0034]** El plasma puede comprender el compuesto monomérico sólo, en ausencia de otros compuestos o en mezcla con por ejemplo un gas inerte. Los plasmas que consisten en compuesto monomérico solo, pueden conseguirse como se ilustra en lo sucesivo en la presente memoria, evacuando primero el recipiente reactor tanto como sea posible y purgando después el recipiente reactor con el compuesto orgánico durante un período suficiente para asegurar que el recipiente está sustancialmente sin otros gases. La temperatura en la cámara de plasma es suficientemente alta de forma adecuada para permitir que entre monómero suficiente en fase gaseosa en la cámara de plasma. Esto dependerá del monómero y convenientemente se empleará a temperatura ambiente. Sin embargo, en algunos casos pueden requerirse temperaturas elevadas por ejemplo de 25 a 250°C.
- 25 **[0035]** En realizaciones alternativas de la invención, están presentes materiales adicionales al precursor de recubrimiento de polímeros de plasma dentro del aparato de deposición de plasma. Los materiales adicionales pueden introducirse en el aparato de deposición de recubrimiento de forma continua o de una manera por pulsos por medio de, por ejemplo, una válvula de pulso de gases.
- 30 **[0036]** Dichos materiales aditivos pueden ser inertes y actuar como tampones sin que ninguna de sus estructuras atómicas se incorporen en el polímero de plasma creciente (los ejemplos adecuados incluyen los gases nobles). Un tampón de este tipo puede ser necesario para mantener una presión de procedimiento requerida. Como alternativa el tampón inerte puede requerirse para mantener la descarga de plasma. Por ejemplo, el funcionamiento de plasmas de descarga luminiscente a presión atmosférica (APGD) con frecuencia requiere grandes cantidades de helio. Este diluyente de helio mantiene el plasma por medio de un mecanismo de ionización de Penning sin incorporarse dentro del recubrimiento depositado.
- 35 **[0037]** En otras realizaciones de la invención, los materiales aditivos poseen la capacidad de modificar y/o incorporarse en el material que forma el recubrimiento y/o el recubrimiento depositado por plasma resultante. Los ejemplos adecuados incluyen otros gases reactivos tales como halógenos, oxígeno y amonio.
- 40 **[0038]** En las realizaciones alternativas de la invención, los materiales aditivos pueden ser otros monómeros. Los recubrimientos resultantes comprenden copolímeros como se conocen y describen en la técnica. Los monómeros adecuados para su uso dentro del método de la invención incluyen monómeros orgánicos (por ejemplo estireno), inorgánicos, de órgano-silicio y órgano-metálicos.
- 45 **[0039]** La invención proporciona adicionalmente un sustrato que tiene un recubrimiento que contiene tiol en el mismo, obtenido por un procedimiento como se ha descrito anteriormente. Dicho sustrato puede incluir cualquier sustrato sólido, particulado o poroso o artículo terminado, que consiste en cualquier material (o combinación de materiales) como se conocen en la técnica. Los ejemplos de materiales incluyen cualquiera o cualquier combinación de, sin limitación, fibras tejidas o no tejidas, fibras naturales, fibras sintéticas, metal, vidrio, cerámica, semiconductores, materiales celulósicos, papel, madera o polímeros tales como politetrafluoroetileno, politeno o poliestireno. En una realización particular, la superficie comprende un material de soporte, tal como un material polimérico, usado en análisis bioquímico.
- 50 **[0040]** En una realización de la invención el sustrato está recubierto por medio de un aparato de bobina abierta. Este proceso puede ser continuo. En una realización el sustrato se mueve a través y pasando un aparato de recubrimiento que actúa de acuerdo con la presente invención.
- 55 **[0041]** La polimerización de plasma pulsado de la invención es por tanto un método sin disolvente para funcionalizar superficies sólidas con grupos tiol.

[0042] El método de la invención puede dar como resultado un producto completamente recubierto con un recubrimiento de polímero funcionalizado con tiol.

[0043] En un aspecto alternativo de la invención el recubrimiento de polímero funcionalizado con tiol sólo se aplica a dominios de superficie seleccionados.

5 **[0044]** La restricción del recubrimiento de polímero funcionalizado con tiol para dominios de superficie específicos puede conseguirse limitando el medio de producción de recubrimiento del método a dichos dominios de superficie específicos. En una realización de este aspecto de la invención, la restricción espacial antes mencionada se consigue depositando por plasma el recubrimiento funcionalizado con tiol a través de una máscara o molde. Esto produce una muestra que presenta regiones cubiertas con polímeros funcionalizados con tiol yuxtapuestas con regiones que no muestran funcionalidad de tiol.

10 **[0045]** Un medio alternativo de restringir la funcionalización de tiol a dominios de superficie específicos incluye: depositar el polímero funcionalizado con tiol sobre la superficie completa de la muestra o artículo, antes de hacer a varias áreas seleccionadas de ella no funcionalizadas con tiol. Este daño/retirada espacialmente selectivo del polímero funcionalizado con tiol puede conseguirse usando numerosos medios como se describen en la técnica. Los métodos adecuados incluyen, sin limitación, grabado con haz de electrones y exposición a irradiación ultravioleta a través de una máscara. El patrón de material no transmisor que posee la máscara se transfiere de este modo a áreas de funcionalización de tiol.

15 **[0046]** Una vez que el recubrimiento funcional de tiol se ha aplicado al sustrato, el grupo tiol puede derivatizarse adicionalmente según se requiera. En particular, puede hacerse reaccionar con otro tiol, tal como una cadena oligonucleotídica terminada en tiol para formar un enlace de puente de disulfuro. La reacción de derivatización puede efectuarse en la fase gaseosa cuando los reactivos lo permiten o en un disolvente tal como agua o un disolvente orgánico. Los ejemplos de tales disolventes incluyen alcoholes (tal como metanol), y tetrahidrofurano.

20 **[0047]** La derivatización puede dar como resultado la inmovilización de reactivo que contiene tiol en dicha superficie. Si la derivatización se efectúa espacialmente, como se conoce la técnica, esto da como resultado un patrón químico de la superficie. Un caso preferido de una superficie de tiol con patrón de biomoléculas que contienen tiol es una microserie biológica. Un caso particularmente preferido es uno en que la biomolécula que contiene tiol es una cadena de ADN, dando como resultado una microserie de ADN. Otra realización preferida es una en la que la biomolécula que contiene tiol es una proteína o fragmento de la misma, dando como resultado una microserie proteica.

25 **[0048]** Las superficies funcionalizadas con tiol producidas de acuerdo con la invención se derivatizaron con una diversidad de reactivos que contienen tiol (por ejemplo cadenas oligonucleotídicas, proteínas y azúcares derivatizados). Además, estas superficies funcionalizadas con tiol producidas de acuerdo con la invención permitieron la construcción de microseries de ADN por un procedimiento mostrado en forma de diagrama en el esquema 1.

30 **[0049]** De este modo en una realización adicional, la invención proporciona un método para la inmovilización de un reactivo que contiene tiol en una superficie, incluyendo dicho método la aplicación de un recubrimiento que contiene tiol reactivo a dicha superficie por un método de deposición de plasma descrito anteriormente, y poniendo en contacto después la superficie de acoplamiento con una solución de dicho reactivo que contiene tiol en condiciones tales que el agente que contiene tiol reaccione con los grupos tiol de superficie.

35 **[0050]** Una realización adicional incluye dicho método de derivatizar un recubrimiento que contiene tiol con un reactivo que contiene tiol usando el método descrito anteriormente y después separando dicho reactivo que contiene tiol unido en condiciones tales que el reactivo que contiene tiol se retira de forma reversible del recubrimiento que contiene tiol. Además el recubrimiento que contiene tiol producido en esta invención puede volver a derivatizarse con agentes que contienen tiol varias veces, creando una superficie re-escribible.

40 **[0051]** En una realización adicional del método, los recubrimientos que contienen tiol producido de acuerdo con la invención pueden derivatizarse con reactivos que contienen metales nobles o preciosos. Dichos reactivos pueden ser de naturaleza particulada, incluyendo los ejemplos, pero sin restricción, soluciones coloidales de oro o nanopartículas de plata.

45 **[0052]** Se ha descubierto que la polimerización por plasma pulsado de acuerdo con la invención es un medio eficaz para funcionalizar sustratos sólidos con grupos tiol. Las superficies funcionalizadas resultantes son susceptibles a químicas de derivatización de tiol convencionales.

50 **[0053]** La invención se describirá ahora particularmente por medio de ejemplos con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

La figura 1 muestra los espectros de XPS de (a) una oblea de silicio, (b) una capa de polímero de plasma pulsado de mercaptano de alilo ($P_p = 40$ W; $t_{on} = 100$ μ s; $t_{off} = 4$ ms; tiempo de deposición = 10 minutos) y (c) un oligonucleótido

de ADN (Sonda I) depositado de una solución 200 nM en la superficie polimérica de plasma pulsado de mercaptano de alilo.

La figura 2 muestra los espectros infrarrojos de (a) el monómero de mercaptano de alilo, (b) la capa polimérica de plasma pulsado de mercaptano de alilo ($P_p = 40$ W; $t_{on} = 100$ μ s; $t_{off} = 4$ ms; tiempo de deposición = 10 minutos) y (c) un oligonucleótido de ADN (Sonda I) depositado de una solución 200 nM en (b).

La figura 3 es un gráfico que muestra la variación de la concentración de nitrógeno atómico (% de N) en la superficie de la capa de poli(mercaptano de alilo) de plasma pulsado seguido de inmovilización de Sonda I de ADN como una función de la concentración de la solución.

La figura 4 muestra imágenes de microscopia de fluorescencia de series con micro puntos de ADN producidas en capas poliméricas de plasma pulsado de mercaptano de alilo: (a) Sonda oligonucleotídica II; (b) Sonda oligonucleotídica II hibridada posteriormente con Sonda oligonucleotídica III; y (c) Sonda oligonucleotídica I y IV en patrón alterno y posteriormente hibridadas con Sonda oligonucleotídica III.

La figura 5 demuestra la intensidad de fluorescencia en la superficie de las capas poliméricas de plasma pulsado de mercaptano de alilo: (a) después de separar y re-inmovilizar la Sonda oligonucleotídica de ADN II; y (b) después de la retirada de la sonda oligonucleotídica de ADN hibridada III de la sonda oligonucleotídica de ADN unida superficie I y la re-exposición posterior a una solución de sonda III. Cuando el recubrimiento de plasma es poli(mercaptano de alilo) y el portaobjetos comercial recubierto de tiol se proporcionó por CEL Associates, Inc. (Pearland, Texas).

La figura 6 muestra una sonda de ADNmc II marcada con Cy5 inmovilizada en perlas de poliestireno tratado funcionalizadas con mercaptano de alilo. Examinado por (a) microscopio visible y (b) microscopia de fluorescencia.

[0054] El esquema 1 muestra un método de la invención para permitir hibridación de ADN en superficies: (a) funcionalización de superficie con tiol por polimerización por plasma pulsado de mercaptano de alilo, (b) inmovilización de ADNmc terminado en tiol en la superficie polimérica de plasma pulsado por química de formación de puentes disulfuro y (c) hibridación de ADNmc marcado con Cy5 complementario con ADNmc inmovilizado en superficie.

[0055] Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren la presente invención pero no se pretende que limiten a la misma:

Ejemplo 1

[0056] La polimerización por plasma de mercaptano de alilo (Aldrich, $H_2C = CH(CH_2)SH$ al 80 %, purificado por varios ciclos de congelación-bombeo-descongelación) se llevó a cabo en un reactor de vidrio cilíndrico sin electrodos (5 cm de diámetro, 520 cm³ de volumen, presión base de 3×10^{-2} mbar, velocidad de filtrado = 1×10^{-9} mol s⁻¹) incluido en una jaula de Faraday. La cámara se ajustó con una entrada de gas, un manómetro de presión de termopar y una bomba rotatoria de dos etapas de 30 l min⁻¹ conectada con una trampa fría de nitrógeno líquido. Todos los engranajes estaban sin grasa. Una bobina de cobre de 4 mm de diámetro enrollada externamente abarcó 8-15 cm de la entrada de gas con 9 vueltas.

[0057] La impedancia de salida de una alimentación eléctrica de 13,56 MHz RF se adaptó a la carga de gas ionizado parcialmente con una red de adaptación L-C. En el caso de deposición por plasma pulsado, la fuente de RF se desencadenó a partir de un generador de señal externo y la forma de pulso se controló con un osciloscopio de rayos catódicos. El reactor se limpió frotando con detergente, aclarando en agua, propan-2-ol y secando en un horno. El reactor se limpió adicionalmente con plasma de aire a 0,2 mbar funcionando a 40 W durante un período de 30 minutos. Cada sustrato se limpió sónicamente en una mezcla 50:50 de ciclohexano y propan-2-ol durante 10 minutos y después se colocó en el centro del reactor en una placa de vidrio plana.

[0058] El análisis de XPS de las capas de poli(mercaptano de alilo) de plasma confirmó la presencia solamente de carbono y azufre en la superficie, sin que se mostrara señal de Si(2p) de la capa de silicio subyacente, figura 1 y tabla 1. El pico de S(2p) correspondiente para la película polimérica de plasma pulsado se produjo a una energía de unión de 163,7 eV, lo que indica un tiol como la principal especie de azufre presente (Moulder, J. F.; Stickle, W. F.; Sobol, P. E.; Bomben, K. D. Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy, Perkin Elmer Corporation: Eden Prairie, MN, 1992; Terasaki, N.; Akiyama, T.; Yamada, N. Langmuir 2002, 18, 8666).

Tabla 1.

Porcentaje atómico de XPS para capas de mercaptano de alilo depositadas por plasma pulsado					
Superficie	Abundancia elemental				
	%C	% N	% O	% P	% S
Mercaptano de alilo, polímero de plasma pulsado	76 ± 1	0	0	0	24 ± 1
Mercaptano de alilo, teórico	75	0	0	0	25
Sonda oligonucleotídica I, en polímero de plasma de mercaptano de alilo	46 ± 1	10 ± 1	24 ± 1	4 ± 1	16 ± 1
Sonda oligonucleotídica I, teórica	49	13	32	5	<1

Se usó espectroscopía de infrarrojos para evaluar la estructura molecular de las películas de poli (mercaptano de alilo) de plasma pulsado y los oligonucleótidos inmovilizados posteriormente, Figura 2. Para el monómero de mercaptano de alilo, se realizaron las siguientes asignaciones de banda: tramo de C-H de alilo (3080 cm^{-1}); tramo de CH_2 de alilo (3031 cm^{-1}); tramo de CH_2 de alquilo (2891 cm^{-1}); tramo de S-H de tiol (2555 cm^{-1}); tramo de C=C de alilo (1634 cm^{-1}) (Lin-Vien, D. et al. The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules, Academic Press: Nueva York, 1991). Todas las bandas asociadas con el monómero de mercaptano de alilo eran claramente distinguibles después de la polimerización por plasma pulsado, excepto para los elementos con doble enlace de carbono-carbono de alilo que habían desaparecido durante la polimerización. La presencia continuada de la banda de infrarrojos que pertenece al elemento de tiol confirmó que se había producido retención estructural del grupo de tiol durante las condiciones de pulsos eléctricos.

Ejemplo 2

[0059] La inmovilización de ADN en superficies de mercaptano de alilo polimerizadas con plasma pulsado suponía sumergir la sonda oligonucleotídica I (Tabla 2) en un tampón de cloruro sódico/citrato sódico (NaCl 3 M, citrato de Na 0,3 M – $2\text{H}_2\text{O}$, pH 4,5, Aldrich) hasta una concentración final de entre 50 nM y 400 nM que se inmovilizó en la película polimérica de plasma pulsado. La solución tamponada de oligonucleótidos se colocó en superficies de poli(mercaptano de alilo) de plasma pulsado recién preparadas usando una punta de pipeta. Las superficies se incubaron posteriormente durante 16 horas a temperatura ambiente en una cámara humidificada (humedad relativa del 64%) para evitar que los puntos se secan (cuando se transportan solutos secos en gotas a sus bordes, lo que conduce a una distribución de la concentración irregular) y después se lavaron tres veces usando agua y solución de tampón. Las superficies punteadas se secaron después con gas nitrógeno para asegurar que fueran sin polvo ni disolvente.

Tabla 2

Secuencias oligonucleotídicas usadas en el estudio (sintetizadas por Sigma-Genosys Ltd).

Marcador oligonucleotídico	Secuencia de bases (5' a 3')	Fluoróforo	Enlazador
Sonda I	GCTTATCGAGCTTTC	N/D	5'-HS-(CH_2) ₆ -
Sonda II	GCTTATCGAGCTTTC	3'-[CY5]-	5'-HS-(CH_2) ₆ -
Sonda III	GAAAGCTCGATAAGC	5'-[CY5]-	N/D
Sonda IV	CGAATAGCTCGAAAG	N/D	5'-HS-(CH_2) ₆ -

El análisis de XPS de capas de poli(mercaptano de alilo) de plasma pulsado expuestas a sonda oligonucleotídica I indicó la presencia de varios elementos incluyendo carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre (como sulfuro o centros de

disulfuro, energía de unión: 161,4 eV) y centros de fósforo, Figura 1 y Tabla 1. No se detectaron rastros de sodio o cloro de las soluciones de tampón. Un desplazamiento en la energía de unión del pico de S(2p) se atribuyó a inmunización de sonda oligonucleotídica I exitosa en la superficie, Esquema 1. Sin embargo, la formación de puentes disulfuro intra-poliméricos o inter-poliméricos dentro de la capa de poli(mercaptano de alilo) de plasma pulsado también puede haber contribuido a este pico de disulfuro.

[0060] El aumento correspondiente en la intensidad del pico de N(1s) a ~400 eV también indicó unión de ADNmc con la superficie de poli(mercaptano de alilo) de plasma pulsado. La densidad de empaquetamiento de ADNmc en la superficie podría variarse mediante la dilución de la solución con tampón, Figura 3. Para el oligonucleótido de sonda de ADNmc I que se investiga, se descubrió que la concentración en superficie de nitrógeno (%N) se relacionaba con el grado de dilución. Los niveles de saturación de superficie correspondían a diluciones por encima de 150 nM.

Ejemplo 3

[0061] Se generaron microseries de ADNmc en capas de plasma pulsado de poli(mercaptano de alilo) fresco usando un aparato de microseries robótico (Genetix Inc) equipado con puntas micromecanizadas que suministraban consistentemente muestras de ~1nl (solución de ADNmc tamponada 200 nM) en los portaobjetos de vidrio recubiertos de poli(mercaptano de alilo) de plasma pulsado (18 x 18 x 0,17 mm, BDH) en localizaciones designadas. Pudieron obtenerse de forma rutinaria puntos circulares con diámetros que variaban de 100 a 125 μm y con un cabeceo de impresión mínimo de 110 μm . Después de la distribución por puntos, los portaobjetos inmovilizados con oligonucleótido de ADN se mantuvieron en una cámara húmeda (humedad relativa del 64%) durante 24 horas a 60° C. Finalmente, los portaobjetos se retiraron y se lavaron con solución de tampón y cantidades copiosas de agua. Se usaron las sondas I, II y IV en el procedimiento de aplicación puntual.

[0062] Las microseries de ADNmc y superficies completamente inmovilizadas de sonda I y IV se expusieron posteriormente a una solución de hibridación de sonda III en tampón de hibridación (que consistía en SSC 6x pH 7, solución de Denhardt Sx (BSA (albúmina de suero bovino) 1%), Ficoll 400 al 2%, polivinilpirrolidona (PVP) al 2%), dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,5% y ADN de esperma de salmón cortado (55 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hasta una concentración final de 400 nM. Dos pequeñas tiras de cinta adhesiva se fijaron a lo largo del borde de los portaobjetos de sonda I y IV funcionalizados con oligonucleótidos de ADNmc y se cubrieron después con un cubreobjetos de vidrio para portaobjetos de microscopio limpio. La cavidad formada entre la microplaca y el cubreobjetos de vidrio se llenó después lentamente con 10 μl de la solución de hibridación por fuerza capilar. Este portaobjetos se incubó después en una cámara de hibridación humidificada (se colocaron 100 μl de agua junto a la microplaca) se sumergió en un baño de agua de 55° C durante 2 horas. Después se retiró el cubreobjetos de vidrio, se lavó tres veces la microplaca con solución de tampón y después con cantidades copiosas de agua y se secó por soplado con gas nitrógeno. La eliminación ("stripping") de los oligonucleótidos unidos de la microplaca se investigó colocándolo en una solución en ebullición de (a) TrisCl 200 nM pH 7,0, SSC 0,1 X y SDS al 0,1% (p/v) durante 10 minutos o (b) SDS al 0,1% (p/v) durante 10 minutos para eliminar los oligonucleótidos marcados.

[0063] Se usó microscopía de fluorescencia para evaluar la viabilidad de producción de microseries usando capas de polímero de plasma pulsado de mercaptano de alilo como un sustrato. El mapeo de fluorescencia de las series resultantes se consiguió usando un microscopio Dilor Labram utilizando un láser de He:Ne de 20 mW con una longitud de onda de 632,817 nm (corresponde a la frecuencia de excitación del fluoróforo Cy5) y una polarización de 500:1, que se pasó a través de una rejilla de difracción de 1800 líneas mm^{-1} . En el caso de la inmovilización de sonda oligonucleotídica II, se obtuvo una imagen de fluorescencia de una serie de puntos con un diámetro medio de 125 micrómetros un cabeceo de impresión de 150 micrómetros de acuerdo con los parámetros de aplicación puntual usados, Figura 4a. En el caso de las series hibridadas, se obtuvo un patrón similar en la superficie, sin embargo, el tamaño de punto había aumentado a 150 micrómetros de diámetro y los puntos tenían una señal de densidad del borde exterior no homogénea, Figura 5b.

[0064] No se detectó señal de hibridación no específica del oligonucleótido control no complementario (Sonda IV), Figura 4c. También se observó que menos del 5% de los oligonucleótidos unidos por disulfuro se separaron del soporte sólido cuando se trataron con sales de hibridación usadas en este ejemplo durante 48 horas a temperatura ambiente.

Ejemplo 4

[0065] La comparativa capacidad de reutilización de las microplacas de mercaptano de alilo preparadas en el ejemplo 2 y las microplacas de vidrio recubierta de tiol del mercado (CEL Associates, Pearland, Texas) se investigó separando los oligonucleótidos unidos de las microplacas mediante su colocación en una solución en ebullición de (a) TrisCl 200 nM pH 7,0, SSC 0,1 x y SDS al 0,1% (p/v) durante 10 minutos o (b) SDS al 0,1% (p/v) durante 10 minutos.

[0066] Ambos tipos de micro placas se investigaron mediante desorción ("stripping"); usando lavados de alta rigurosidad y lavados de baja rigurosidad para eliminar oligonucleótidos inmovilizados e hibridados de la superficie respectivamente. Después del primer caso, de la retirada de los oligonucleótidos inmovilizados seguida de otro conjunto de procedimientos de inmovilización, la intensidad de fluorescencia disminuyó solamente el 5 % a partir del primer experimento cuando se usaron capas de poliméricas de plasma pulsado de mercaptano de alilo como sustrato, figura

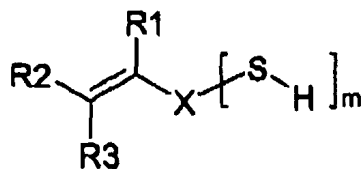
5A. De hecho la microplaca pudo usarse 5 veces sin pérdida significativa de sondas inmovilizadas. Éste no fue el caso para los portaobjetos comerciales que mostraron una disminución comparativamente rápida en su rendimiento. Se descubrió un resultado similar para la reutilización de las microplacas con respecto a experimentos de desnaturalización/re-hibridación, figura 5b.

5 Ejemplo 5

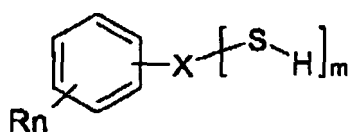
[0067] Se depositó mercaptano de alilo en perlas de poliestireno (Biosearch Technologies, Inc.) como se ha descrito anteriormente. Estas perlas funcionalizadas con tiol se derivatizaron después con cadenas de ADN marcadas con fluorescencia como se ha descrito anteriormente. La derivatización se confirmó por microscopia de fluorescencia, figura 6.

REIVINDICACIONES

1. Un método para aplicar un recubrimiento que contiene tiol reactivo a un sustrato, incluyendo dicho método someter dicho sustrato a una descarga de plasma en presencia de un compuesto de fórmula (I) o fórmula (Ia):



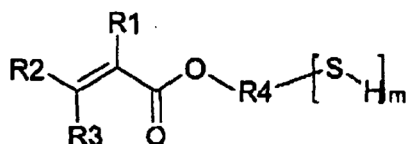
(I)



(Ia)

10 en el que X es una cadena o cadenas de alquileo lineales o ramificadas opcionalmente sustituidas o un grupo o grupos arilo; R¹, R² o R³ son opcionalmente hidrógeno, grupos heterocíclicos o hidrocarbilos sustituidos y m es un número entero mayor que 0; Rⁿ es un número de grupos heterocíclicos o hidrocarbilos opcionalmente sustituidos, donde n es 0-5 y **caracterizado porque** una vez que el recubrimiento que contiene tiol se aplica al sustrato, dicho método incluye la etapa de derivatización de los grupos tiol con un reactivo, seguido de la eliminación del reactivo del recubrimiento en tales condiciones que la derivatización de la superficie que contiene tiol sea reversible para crear una superficie re-
15 escribible.

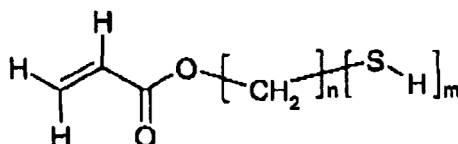
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el compuesto de fórmula (I) que contiene tiol reactivo es un compuesto de fórmula (II)



(II)

en el que R⁴ es un grupo heterocíclico o hidrocarbilo opcionalmente sustituido.

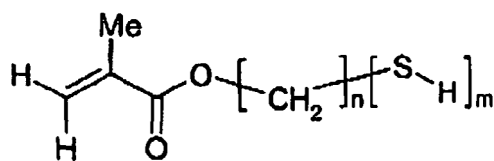
20 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2 en el que el compuesto de fórmula (II) es un compuesto de fórmula (III)



(III)

en el que n = 1-20.

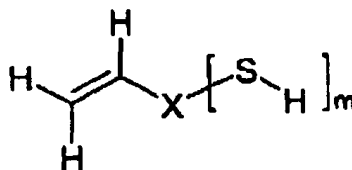
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 2 en el que el compuesto de fórmula (II) es un compuesto de fórmula (IIIa)



(IIIa)

en el que $n = 1-20$.

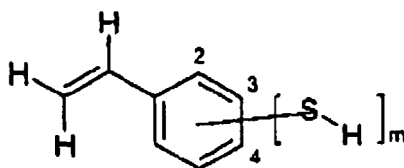
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el compuesto de fórmula (I) que contiene tior es un compuesto de fórmula (IV)



(IV)

5

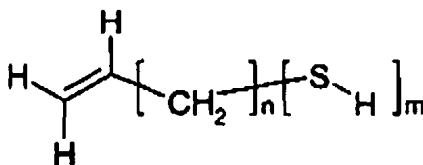
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5 en el que el compuesto de fórmula (IV) es un compuesto de fórmula (V)



(V)

10

7. Un método de acuerdo con la reivindicación 5 en el que el compuesto de fórmula (IV) es un compuesto de fórmula (Va)



(Va)

en el que $n = 1-20$.

8. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la descarga de plasma es por pulsos.

15

9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8 en el que la energía media de la descarga de plasma pulsado es menor de $0,05 \text{ W/cm}^3$.

10. Un método de acuerdo con la reivindicación 8 en el que la descarga de plasma pulsado se aplica de modo que la energía está activada durante de $1 \mu\text{s}$ a $100 \mu\text{s}$ y desactivada de $100 \mu\text{s}$ a $20000 \mu\text{s}$.

20

11. Un método de acuerdo con la reivindicación 8 en el que la descarga de plasma pulsado se aplica de modo que el régimen de pulsos cambia de una manera controlada a lo largo del transcurso de una única deposición de recubrimiento.

12. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la descarga de plasma contiene el compuesto de fórmula (I) en ausencia de cualquier otro material.
13. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que se añaden materiales adicionales al compuesto de fórmula (I) a la descarga de plasma.
- 5 14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13 en el que dichos materiales adicionales son inertes y no se incorporan dentro del recubrimiento de producto que contiene tiol reactivo.
15. Un método de acuerdo con la reivindicación 13 en el que dichos materiales adicionales son no inertes y poseen la capacidad de modificar y/o incorporarse en el recubrimiento del producto que contiene tiol reactivo.
- 10 16. Un método de acuerdo con la reivindicación 15 en el que el uso de dichos materiales adicionales no inertes dan como resultado un recubrimiento de copolímero que contiene funcionalidad de tiol reactivo.
17. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la introducción del compuesto de fórmula (I) y/o cualquier material adicional en la descarga de plasma es por pulsos.
18. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el compuesto de fórmula (I) y/o cualquier material adicional se introducen en la descarga de plasma en forma de gotas de líquido atomizadas.
- 15 19. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el medio para aplicar el recubrimiento es un aparato de deposición de plasma equipado con bobina abierta.
20. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la cámara de deposición de plasma se calienta.
21. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la etapa de la derivatización o reacción de los grupos tiol de recubrimiento se realiza con un reactivo que contiene tiol.
- 20 22. Un método de acuerdo con la reivindicación 21 en el que una solución de dicho reactivo que contiene tiol se pone en contacto con la superficie en condiciones en las que la funcionalidad de tiol del reactivo que contiene tiol reacciona con grupos tiol en la superficie.
23. Un método de acuerdo con la reivindicación 22 en el que la inmovilización de la solución de tiol se dirige espacialmente sobre la superficie que contiene tiol reactivo, de modo que la inmovilización de tiol se produce solamente en localizaciones espaciales dadas.
- 25 24. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 21 o 22 en el que en tiol es biomolécula terminada en tiol.
25. Un método de acuerdo con la reivindicación 24 en el que la superficie modificada se utiliza para hibridación de ADN.
26. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el recubrimiento que contiene tiol producido por el método se hace reaccionar con un reactivo que contiene metales nobles o preciosos tales como oro y plata.
- 30 27. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el recubrimiento de polímero funcionalizado con tiol se aplica a dominios específicos en la superficie de sustrato, por ejemplo en un patrón.
28. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el sustrato es cualquiera o cualquier combinación de metal, vidrio, semiconductor, cerámica, polímero, fibras tejidas o no tejidas, fibras naturales, material celulósico o polvo.
- 35 29. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que R^1 , R^2 y/o R^3 incluyen sustituyentes de flúor, cloro, bromo y/o yodo.
30. Un método de acuerdo con la reivindicación 3 en el que el compuesto de fórmula III, cuando $m=1$ y $n=1$, es acrilato de 2-mercaptoetilo.
31. Un método de acuerdo con la reivindicación 4 en el que el compuesto de fórmula IIIa, cuando $m=1$ y $n=1$, es metacrilato de 2-mercaptoetilo.
- 40 32. Un método de acuerdo con la reivindicación 6 en el que el compuesto de fórmula V es 4-mercaptoestireno.
33. Un método de acuerdo con la reivindicación 7 en el que el compuesto de fórmula Va, cuando $m=1$ y $n=1$, es mercaptano de alilo.
34. Un método de acuerdo con la reivindicación 9 en el que la energía media de la descarga de plasma pulsado es menor de $0,0025 \text{ W/cm}^3$.
- 45 35. Un sustrato que tiene un recubrimiento que contiene tiol sobre el mismo, obtenido por un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1.

Figura 1

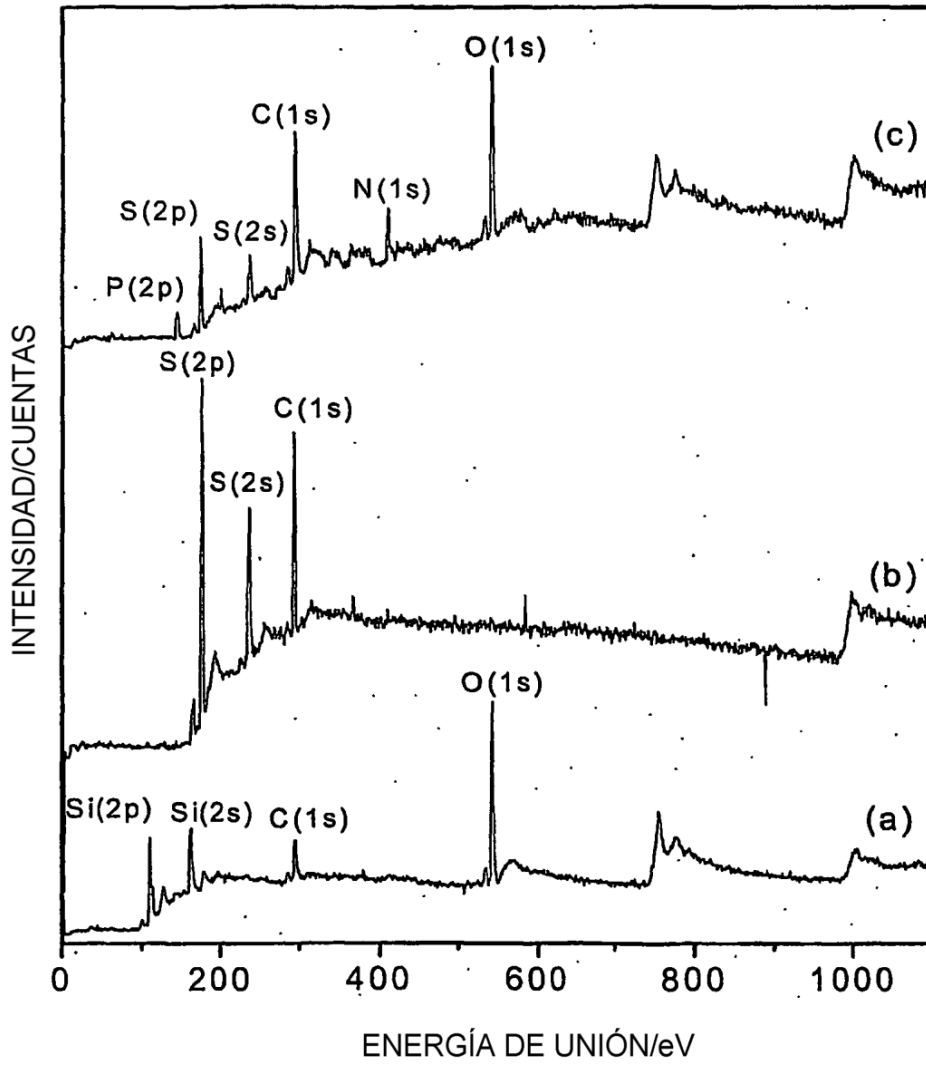


Figura 2

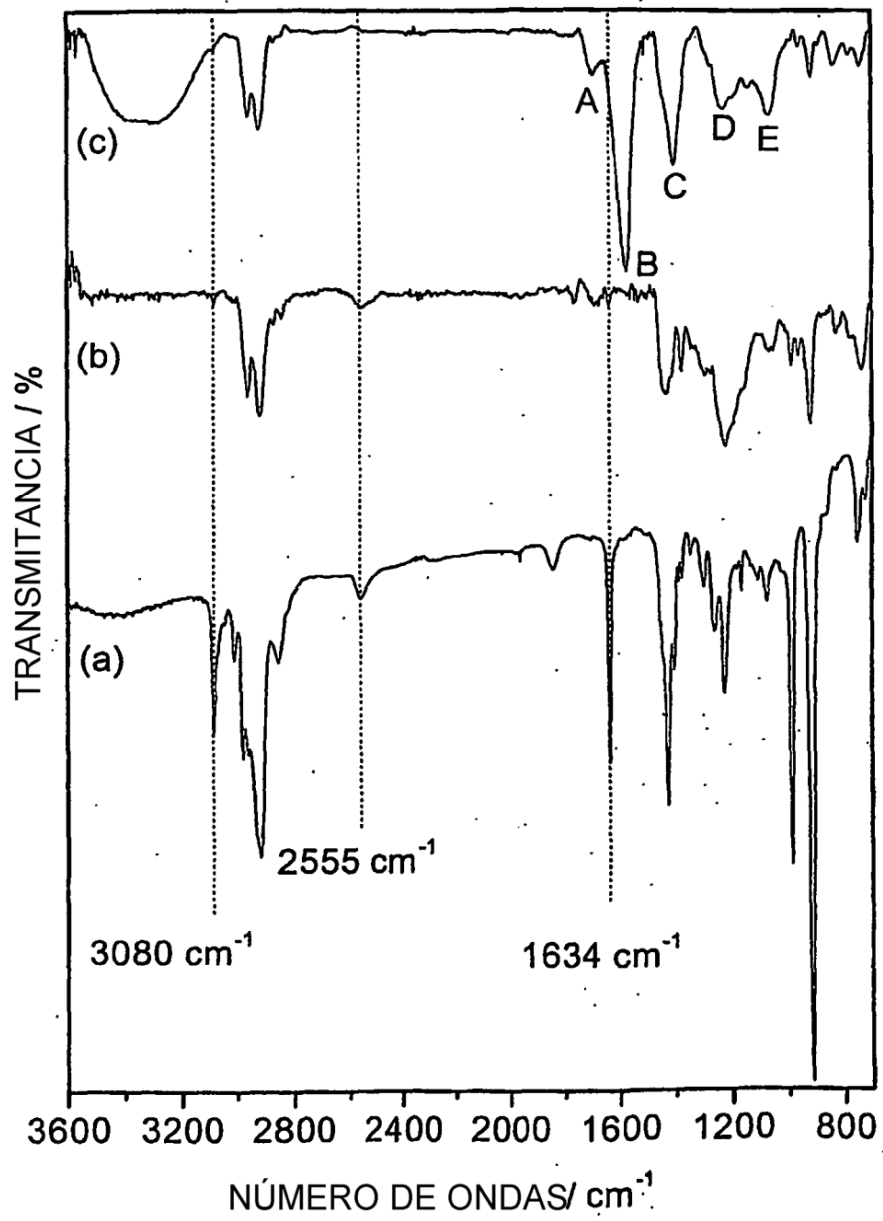


Figura 3

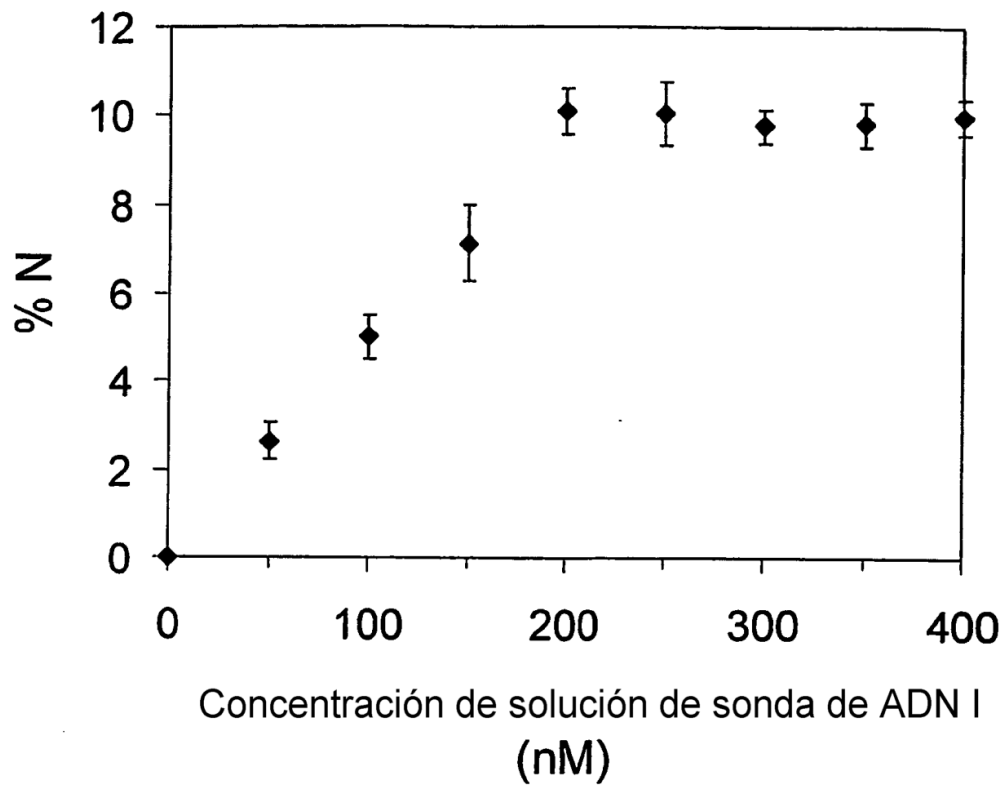


Figura 4

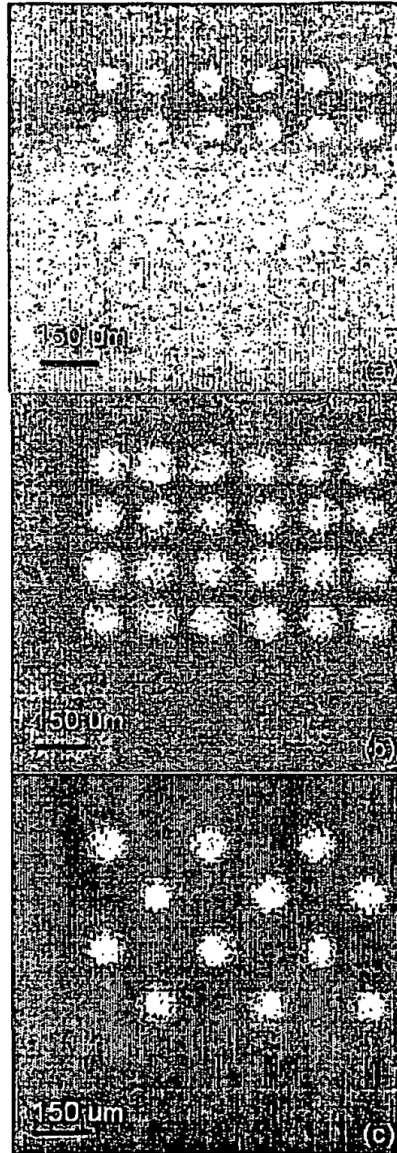


Figura 5

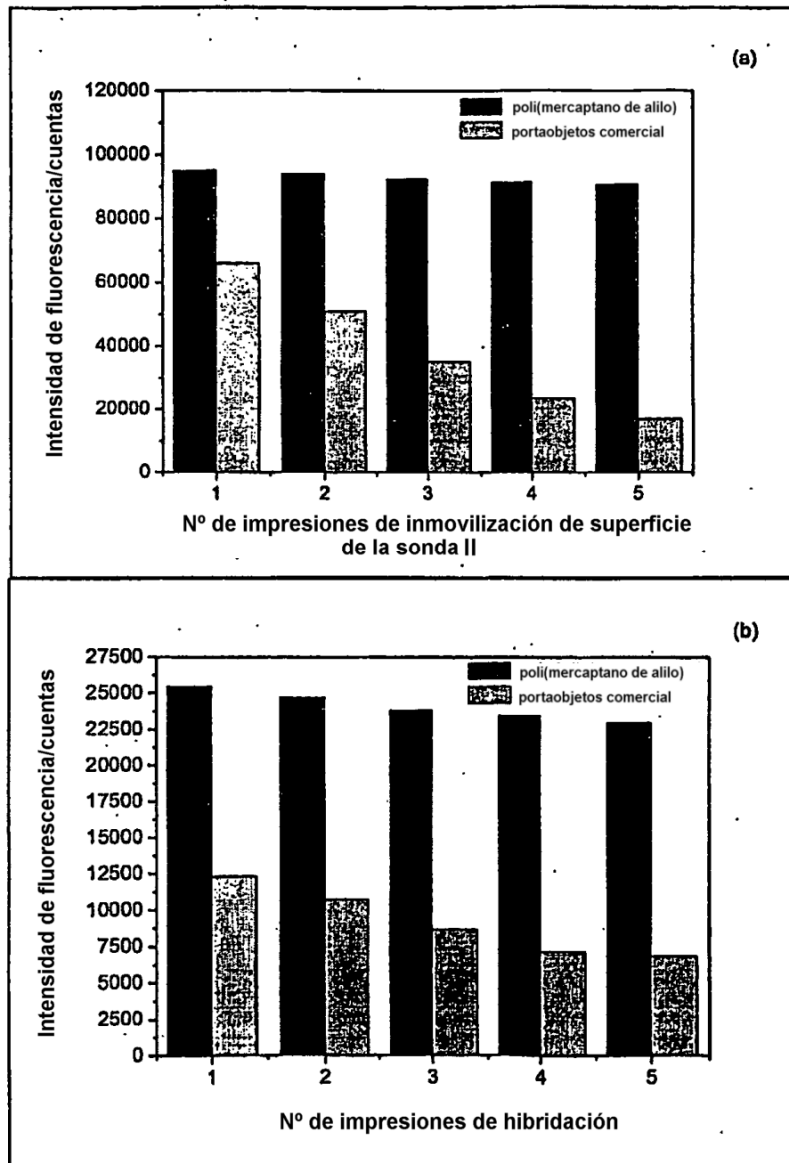
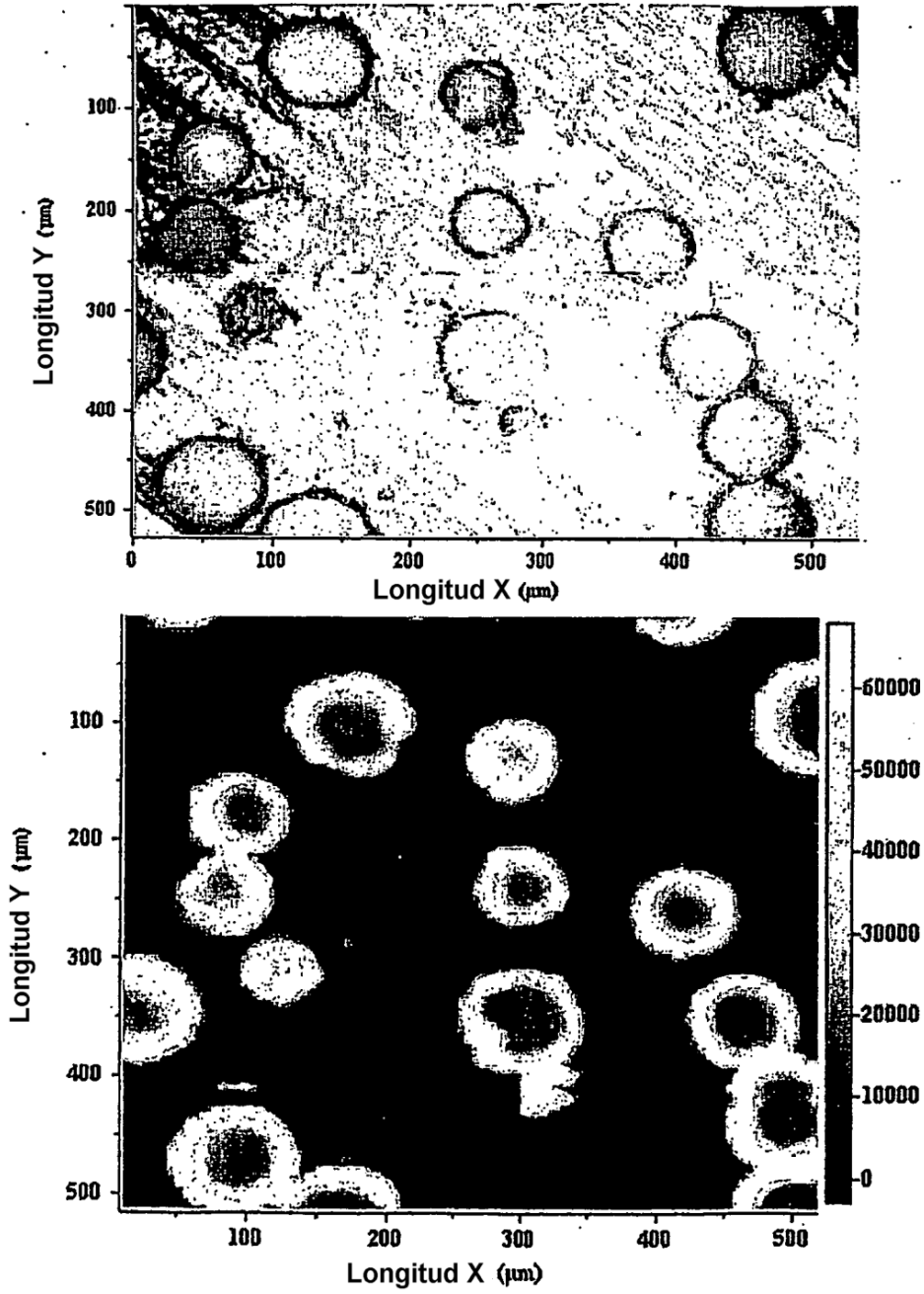
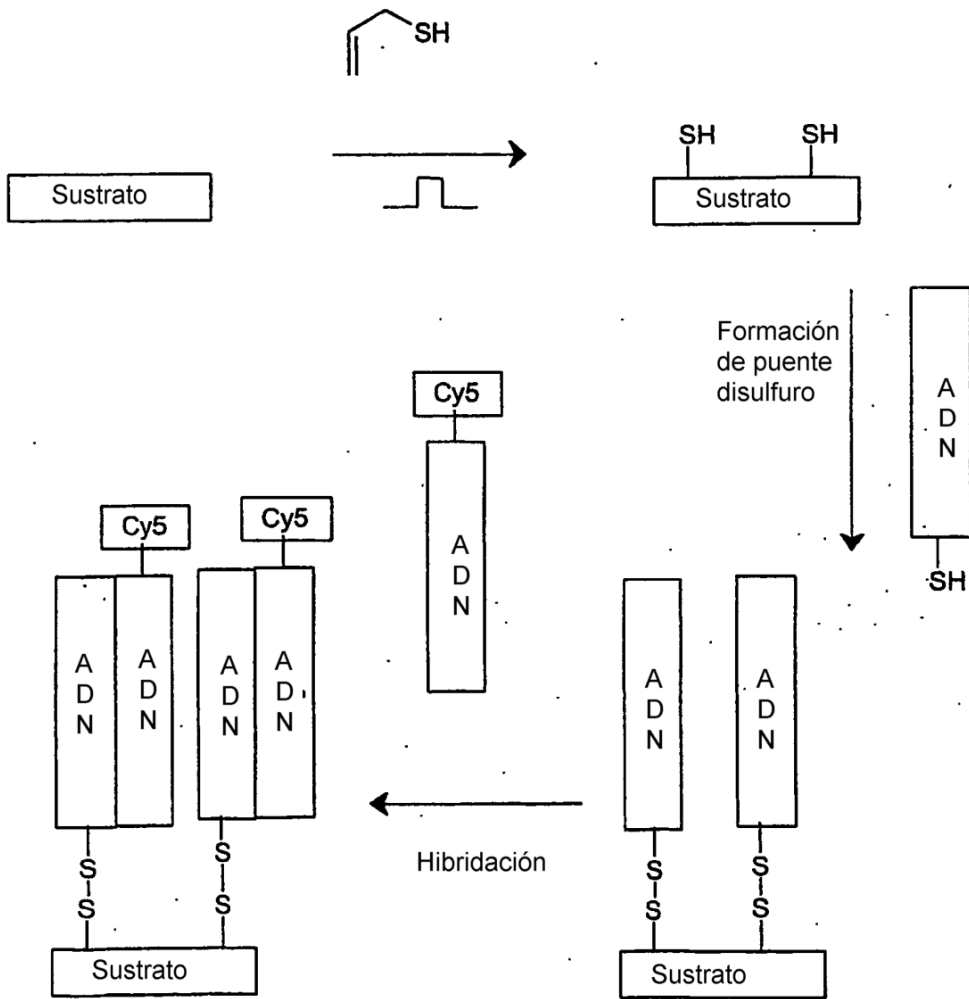


Figura 6



Esquema 1



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

5 Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 2004113872 A, Levicky, R. [0004]
- WO 2001076773 A, Thyen, R. [0006]
- US 5876753 A [0007]
- WO 03101621 A [0032]
- WO 03097245 A [0032]

Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

10

- Aldeman, M. *Science*, 1994, vol. 266, 1021 [0002]
- Frutos, A. G. et al. *Nuc. Acids Res.*, 1997, vol. 25, 4748 [0002]
- Debouck, C. et al. *Nature Genet.*, 1999, vol. 1, 48 [0002]
- Van't Veer, L. J. et al. *Nature*, 2002, vol. 415, 530 [0002]
- McGlennen, R. C. *Clinical Chemistry*, 2001, vol. 47, 393 [0002]
- Tivansky, A. V. et al. *J. Phys. Chem. B.*, 2005, vol. 109, 5398 [0004]
- Steichen, M. et al. *Electrochemistry Communications*, 2005, vol. 7, 416 [0004]
- Lucarelli et al. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, vol. 20, 2001 [0004]
- Muguruma, H. et al. *Chemistry Letters*, 1996, vol. 4, 283 [0005]
- Roh, J. H. et al. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 2002, vol. 16, 1529 [0006]
- Yasuda, H. *Plasma Polymerisation*. Academic Press, 1985 [0007]
- Panchalingam, V. et al. *Appl. Polym. Sci.*, 1994, vol. 54, 123 [0007]
- Han, L. M. et al. *Chem. Mater.*, 1998, vol. 10, 1422 [0007]
- Han, L. M. et al. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 1998, vol. 36, 3121 [0007]
- Ryan, M.E. et al. *Chem. Mater.*, 1996, vol. 8, 37 [0007]
- Maguruma, H. et al. *Chemistry Letters*, 1996, vol. 4, 283 [0008]
- Moulder, J. F. ; Stickle, W. F. ; Sobol, P. E. ; Bomben, K. D. *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy*. Perkin Elmer Corporation, 1992 [0059]
- Terasaki, N. ; Akiyama, T. ; Yamada, N. *Langmuir*, 2002, vol. 18, 8666 [0059]
- Lin-Vien, D. et al. *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*. Academic Press, 1991 [0059]