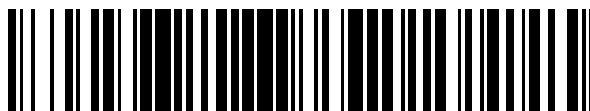


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 349**

51 Int. Cl.:

B05D 7/24 (2006.01)

B05D 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08839931 .6**

96 Fecha de presentación: **10.10.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2252410**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.11.2010**

54 Título: **Modificación de la superficie**

30 Prioridad:
10.10.2007 AT 16192007

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.03.2012

73 Titular/es:
**Greiner Bio-One GmbH
Maybachstrasse 2
72636 Frickenhausen, DE**

72 Inventor/es:
JEHLE, Heinrich

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 377 349 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

Modificación de la superficie

La presente invención describe el uso de un soporte de al menos un sustrato que presenta al menos por zonas un recubrimiento fabricado por polimerización por plasma de módulos individuales, así como un procedimiento para su fabricación.

En sistemas para la microfluídica o en productos de micromatrices para el análisis de muestras biológicas, el soporte o la superficie o la calidad de la superficie del soporte tiene una gran importancia. Los análisis de este tipo son frecuentemente muy laboriosos y requieren mucho tiempo y, por tanto, es especialmente importante que los ensayos usados para esto sean sensibles y fidedignos. Un cambio ventajoso para el uso puede conseguirse especialmente mediante modificaciones de la superficie como, por ejemplo, por cambio de la funcionalidad química.

Las superficies químicamente modificadas son indispensables, por ejemplo, en la industria farmacéutica para el desarrollo de sistemas de prueba biológicos, ya que mediante la provisión específica de la plataforma con capas definidas de unidades funcionales químicas puede controlarse la interacción superficie/biomolécula. La tecnología de micromatrices también se basa en el uso de superficies químicamente modificadas para la inmovilización de ADN (superficie de amina) o proteínas (superficie de aldehído, epoxídica) [M. Pirrung, *Angew. Chem.* 2002, 41, 1276. - N. Zammattéo y col., *Analytical Biochemistry* 2000, 280, 143. - M. Shena: *Microarrays, A practical approach*, Oxford University Press 1999.]

Los análisis del genoma incluyen el uso de material biológico que comprende ácidos nucleicos y proteínas, pudiendo realizarse en paralelo muchos análisis. Normalmente se inmovilizan biomoléculas por acoplamiento químico o adsorción. Actualmente se fabrican matrices con biomoléculas depositando alícuotas de muestra bajo condiciones que permiten que las moléculas se unan o sean unidas a la superficie de la matriz. Alternativamente o adicionalmente, las biomoléculas pueden sintetizarse sobre la superficie de la matriz o inmovilizarse directamente o indirectamente. El número de muestras diferentes que se aplican sobre una matriz individual puede ser muy alto. La aplicación puede facilitarse por impresoras de matriz. Las matrices son normalmente productos de un solo uso, por lo que en su producción se desea conseguir un alto grado de reproducibilidad y un mínimo de errores.

Para conseguir los efectos deseados se sabe manipular químicamente soportes con muchas cavidades o dispositivos de microfluídica para mejorar la afinidad o retención de moléculas seleccionadas en su superficie. A este respecto se desea unir la superficie tratada con la molécula diana con alta afinidad y retención sin influir negativamente al mismo tiempo en su actividad biológica, de manera que pueda realizarse un ensayo reproducible.

Por el documento WO 01/031339 A1 se conoce la aplicación de la polimerización por plasma. En ella, una película de polímero reticulado ultrafina de aproximadamente 200 nm se deposita sobre un sustrato con funcionalidad química controlable. A este respecto, las propiedades del sustrato permanecen en gran medida sin afectar. Los plasmas o los gases iónicos se excitan normalmente por un campo eléctrico. Se trata de un medio químico extraordinariamente reactivo que comprende iones, electrones, partículas neutras y radiación electromagnética. A presión reducida pueden alcanzarse condiciones a las que la temperatura de los electrones se diferencia claramente de la de los iones y las partículas neutras. H. K. Yasuda, *Plasma Polymerisation*, Academic Press, Londres, 1985, describieron que compuestos orgánicos (monómeros) se polimerizan puros o junto con otros gases, por ejemplo, argón, recubriéndose tanto superficies en contacto con el plasma como también aguas abajo de la descarga. La polimerización por plasma es una ruta eficaz para la generación libre de disolventes de finas capas (>5 nm). La generación de un plasma frío se produce a vacío por una descarga eléctrica, por la que se genera un entorno muy reactivo constituido por iones, radicales, electrones y partículas metaestables. Mediante la elección de condiciones de reacción adecuadas como activación, presión, entrada de potencia, gases portadores y compuestos de partida orgánicos (monómeros) puede conseguirse una polimerización del correactante y la deposición del polímero de plasma formado sobre sustratos. Los polímeros de plasma se diferencian principalmente drásticamente de los polímeros convencionales debido a la falta de una unidad de repetición continua, así como de un alto grado de reticulación. Un motivo de esto es la presencia de múltiples especies reactivas en el plasma y de una menor selectividad resultante en comparación con las rutas de síntesis convencionales. La condición básica para el uso de posibles monómeros es la introducción de precursores principalmente líquidos en la fase gaseosa bajo las condiciones de reacción seleccionadas.

Así, en el documento DE 603 04 163 T2 se describe una modificación de la superficie por polimerización por plasma por la que se fabrica una superficie que es irregular y define zonas de la superficie locales. Esta superficie presenta una elevada afinidad por moléculas biológicas que están expuestas a la superficie. Esto se consigue extrayendo una parte del plasma por una abertura. Alternativamente, un plasma puede excitarse en la punta o en un microcapilar.

Es objetivo de la presente invención un soporte para inmovilizar ácidos nucleicos con al mismo tiempo minimización de uniones no específicas de proteínas, así como facilitar un procedimiento para su fabricación.

5 El objetivo de la invención se alcanza respectivamente independientemente por un soporte con un recubrimiento, presentando el recubrimiento al menos por zonas espacios libres para acomodar una solución, y un procedimiento, generándose el recubrimiento al menos por zonas con espacios libres para acomodar la solución.

10 Como espacios libres en relación con la invención se entiende tanto estructuras bi como también tridimensionales que presentan una alta capacidad de unión para ácidos nucleicos con al mismo tiempo unión de proteínas minimizada. Para este modo de acción es decisiva tanto la estructura por las condiciones de síntesis que produce una matriz hinchable porosa como también las unidades funcionales químicas apróticas polares para ayudar en la repelencia de proteínas unidas a módulos químicos polares contiguos para la inmovilización selectiva de ácidos nucleicos. La ventaja de la matriz hinchable porosa funcional en la inmovilización de los ácidos nucleicos es la combinación de a) componentes de unión químicos adecuados en la capa funcional con b) la elevación de la capacidad de unión debido a la penetración del componente de unión en la capa y, por tanto, también la inmovilización en la capa y no sólo sobre la capa y c) la optimización de la tasa de inmovilización debido a la evaporación retardada y, por tanto, tiempo de reacción prolongado de las soluciones de la matriz. La ventaja de la matriz hinchable porosa funcional en la repelencia de proteínas es la combinación de la formación de la capa de hidrato del nanogel en contacto con soluciones tampón con módulos de síntesis apróticos incluidos que no participan en la unión de proteínas. Por tanto, con la invención se consigue un efecto sinérgico con unión de ADN mejorada y al mismo tiempo repelencia de proteínas.

20 Como solución, en relación con la invención se entiende un líquido que puede interaccionar con los grupos funcionales de las finas capas generadas por plasma. Por ésta se entiende, por ejemplo, un líquido que contiene ADN, ARN, PNA, LNA, etc.

25 La capa así generada puede ser ventajosa para todas las aplicaciones que quieran unir ácidos nucleicos, como ADN, ARN, PNA, LNA o una forma mixta de los mismos, y a este respecto se minimiza al mismo tiempo la unión de proteínas como, por ejemplo, enzimas, anticuerpos, antígenos. Éste es el caso en muchas reacciones de detección en las que se usan ácidos nucleicos como sondas de captura. Las enzimas más frecuentemente usadas son peroxidasa de rábano picante (HRP), glucosa-oxidasa o fosfatasa alcalina, usándose éstas tanto para reacciones de detección colorimétricas como también de quimioluminiscencia y fluorescencia. En el transcurso del análisis primero se usan analitos que están marcados con un hapteno como, por ejemplo, biotina, antígeno, se hibridan, por ejemplo, con sondas de ADN. A continuación se lava y una enzima que está acoplada a una molécula de captura complementaria al hapteno, por ejemplo, estreptavidina, anticuerpo, se une al complejo analito-sonda. Después de otra etapa de lavado, la enzima se añade al sustrato y se detecta el producto de reacción. Por tanto, puede conseguirse ventajosamente que sólo aquellas moléculas que encuentran un componente de unión con un sitio de unión específico se adhieran al soporte y no se formen señales por depósitos no específicos de reactantes necesarios para la reacción de detección.

35 Los espacios libres o cavidades pueden extenderse tanto en dirección bi como también tridimensional. De esta manera puede formarse una estructura de red. El recubrimiento presenta preferiblemente una estructura tridimensional y forma una matriz tridimensional o mediante el recubrimiento se forma una estructura tridimensional, por lo que se evita en gran medida la unión de proteínas.

40 Además, se muestra ventajosamente que con el soporte según la invención que presenta un recubrimiento hinchable o con el procedimiento, generándose como recubrimiento un polímero de plasma al menos por zonas hinchable, se pone a disposición un funcionalización de la superficie económica para la generación de capas funcionales ya que los materiales de base convencionales pueden proveerse de novedosas propiedades mediante la rentable mejora del sustrato y, por tanto, abrirse nuevas aplicaciones.

45 La capa hinchable puede presentar una capa de hidrato o puede formar una capa de hidrato después de la aplicación de un medio predominantemente acuoso, por lo que se consigue la alta capacidad de unión para ácidos nucleicos con al mismo tiempo unión de proteínas minimizada y, por tanto, representa una optimización de la reacción en lo referente a la sensibilidad, ruido y también consumo de muestras.

50 El recubrimiento formado presenta ángulos de contacto de un intervalo con un límite inferior de 35° y un límite superior de 65° con agua como líquido de medida, por lo que muestra un comportamiento característico de materiales hinchables en contacto con soluciones de reacción. En la aplicación de la muestra sobre el soporte se forma brevemente una fase estacionaria de una gota que se asienta sobre la superficie hidrófila que a continuación difunde rápidamente en la superficie.

Se prevé que el recubrimiento presente un espesor seleccionado de un intervalo con un límite inferior de 4 nm,

preferiblemente 10 nm, y un límite superior de 300 nm, preferiblemente 40 nm. Además, el recubrimiento formado está libre de defectos, reticulado y es estable a largo plazo y no perjudica las principales características requeridas de los sustratos procesados como, por ejemplo, la transparencia o resistencia a disolventes.

5 El material del sustrato del soporte está formado por plástico, por un grupo que comprende un polímero a base de carbono o silicio, por un grupo que comprende poliestireno (PS), polietileno (PE), poli(tereftalato de etileno) (PET, PETP, PBTP), polipropileno (PP), poli(cloruro de vinilo) (PVC), poliamidas, nitrocelulosa, poli(metacrilato de metilo) (PMMA), estireno-acrilonitrilo (SAN), policarbonato (PC), copolímeros de cicloolefina (COC) como copolímero de ciclopenteno-polietileno, copolímero de ciclohexano-polietileno, copolímero de ciclohepteno-polietileno, así como
10 polímeros de cicloolefina (COP) o similares, pentóxido de ditantalio, vidrio, metal o combinaciones de los mismos, por lo que los materiales conocidos por el estado de la técnica como también los nuevos materiales pueden proveerse de propiedades que permiten una unión de ácidos nucleicos con al mismo tiempo ninguna unión de proteínas o unión de proteínas mínima. También se muestran especialmente ventajosos híbridos de materiales de plástico y vidrio.

15 El sustrato también puede configurarse como membrana, con lo que pueden modificarse múltiples soportes. Además, el sustrato que va a recubrirse no está limitado a cuerpos base planos, sino que también pueden recubrirse superficies estructuradas o porosas.

Además, se prevé que los módulos individuales estén formados por al menos una especie de monómero, pudiendo conseguirse un recubrimiento lo más uniforme posible mediante el uso de una especie del compuesto de partida en caso de necesidad. La adición de módulos individuales conduce a la formación de polímeros de plasma.

20 La especie de monómero se selecciona de un grupo que comprende aminas, amidas, dialquiloietano, pudiendo presentar la especie monomérica respectiva restos de un grupo que comprende H, alquilo o arilo, por lo que se obtiene un recubrimiento con propiedades óptimas para la unión de ácidos nucleicos con al mismo tiempo unión de proteínas minimizada. Como restos R pueden servir H, alquilo, arilo, usándose preferiblemente restos con 1 a 8 átomos de carbono, especialmente 1 a 3 átomos de carbono.

25 Antes de o durante la polimerización por plasma puede realizarse una activación de la superficie del sustrato en el plasma, produciendo el control de la síntesis de la polimerización por plasma sin un tratamiento previo una buena capacidad de unión de ácidos nucleicos con al mismo tiempo repelencia de proteínas. Ventajosamente, mediante una síntesis de dos etapas constituida por tratamiento con plasma para la activación seguido de una polimerización por plasma se deposita una capa que puede vencer las limitaciones de hasta la fecha referentes a la rentabilidad y, por tanto, la utilidad en el diagnóstico médico que combina la capacidad de unión de ADN con al mismo tiempo la
30 minimización de la unión no específica de proteínas. El rendimiento en un proceso de dos etapas es claramente mejor. Mediante una activación pre-conectada también pueden eliminarse impurezas del sustrato o en la superficie del sustrato.

35 La activación puede realizarse con una mezcla de reacción que comprende un gas portador y un gas de reacción en un reactor, siendo el gas portador un gas inerte y seleccionándose el gas de reacción de un grupo que comprende oxígeno, amoníaco, H₂, N₂, CO₂, C₂H₂, por lo que pueden usarse gases rentables para la producción económica de superficies polimerizadas por plasma.

40 En un perfeccionamiento se prevé que entre la activación y la polimerización por plasma se introduzca al reactor un gas de lavado, preferiblemente un gas inerte, especialmente a la cámara de reacción, por lo que, por ejemplo, los productos interferentes con la polimerización por plasma se evacúan de la cámara de reacción. Mediante la activación de los sustratos mediante gases de soporte y de reacción como, por ejemplo, plasmas de O₂/Ar o NH₃/Ar también se generan sitios de unión con mayor acoplamiento de potencia.

45 La activación y/o la polimerización por plasma puede realizarse a un acoplamiento de potencia de un intervalo con un límite inferior de 0,1 W, preferiblemente 2 W, especialmente 5 W, y un límite superior de 2500 W, preferiblemente 300 W, especialmente 20 W. En una síntesis de dos etapas, la activación de los sustratos se realiza preferiblemente a un acoplamiento de potencia de 5 a 20 veces, preferiblemente de 9 a 18 veces, mayor acoplamiento de potencia que en la polimerización por plasma. En la síntesis de dos etapas, la activación se realiza preferiblemente a una potencia de plasma de un intervalo con un límite inferior de 2 W y un límite superior de 2500 W y la polimerización por plasma se realiza a una potencia de plasma de un intervalo con un límite inferior de 0,1 W
50 y un límite superior de 400 W. La entrada de potencia elegida hace posible garantizar el mayor mantenimiento posible de las propiedades estructurales y funcionales de los monómeros.

Mediante la formación del recubrimiento por plasmas pulsados también se hace posible mantener las propiedades estructurales y funcionales de los monómeros.

5 La al menos una especie de monómero puede introducirse líquida o en forma gaseosa, pudiendo pulverizarse los monómeros líquidos directamente en el reactor y convertirse en la fase gaseosa bajo las condiciones de presión allí prevalecientes o evaporándose fuera y dosificándose como gas. No es necesaria una purificación previa de los monómeros mediante ciclos de desgasificación/gasificación o congelación/desgasificación pre-conectados repetidos.

La presión durante la activación y/o polimerización por plasma se selecciona de un intervalo con un límite superior de 1,5 mbar (150 Pa), preferiblemente 0,5 mbar (50 Pa), y un límite inferior de 0,05 mbar (5 Pa), preferiblemente 0,2 mbar (20 Pa), por lo que se facilitan relaciones de presión óptimas para la polimerización por plasma.

10 La activación se realiza durante un periodo de tiempo con un límite inferior de 1 min, preferiblemente, 5 min, y un límite superior de 15 min, preferiblemente 10 min, y/o la polimerización por plasma durante un periodo de tiempo con un límite inferior de 1,5 min, preferiblemente 10 min, y un límite superior de 60 min, preferiblemente 20 min, por lo que se consiguen resultados óptimos en lo referente a la unión de ácidos nucleicos minimizando al mismo tiempo la unión de proteínas.

15 Para facilitar la extracción del soporte de la cámara de reacción y para mantener la carga por malos olores tan baja como sea posible, el reactor, especialmente la cámara de reacción, se lava con aire después de la polimerización y la cámara se ventila.

A continuación se representan los resultados de los análisis del objeto o procedimiento según la invención:

Muestran:

20 Fig. 1 Espectro de FITR de un soporte de polímero de cicloolefina recubierto según el Ejemplo de realización 1 en comparación con un soporte sin recubrir

Fig. 2 Análisis de ToF SIMS de un perfilado de profundidad y determinación del espesor de capa del Ejemplo de realización 1

Fig. 3 Ejemplo de aplicación de un diagnóstico de POC sobre un soporte según la invención

25 Fig. 4 Comparación de la inmovilización de ADN de superficies funcionalizadas conocidas por el estado de la técnica con la superficie funcionalizada según la invención

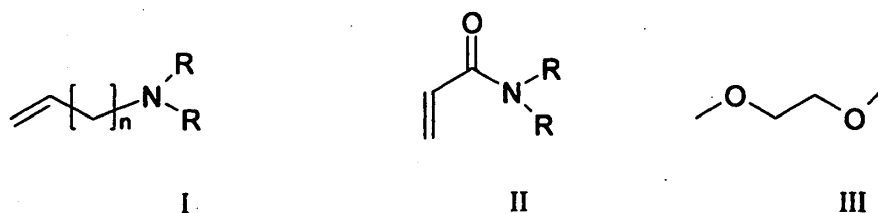
Fig. 5 Comparación de las propiedades de unión de la superficie funcionalizada según la invención con una superficie sin funcionalizar

30 Cabe observar a modo de introducción que en los ejemplos de realización se proveen partes diferentemente descritas con las mismas designaciones, pudiendo transferirse las revelaciones contenidas en toda la descripción en términos de significado a las mismas partes con las mismas designaciones. Los datos de posición elegidos en la descripción como, por ejemplo, arriba, abajo, lateral, etc., también se refieren a la figura inmediatamente descrita, así como representada, y éstos pueden transferirse a un cambio de posición en términos de significado a la nueva posición. Además, también pueden representarse características individuales o combinaciones de características de los diferentes ejemplos de realización mostrados y descritos para soluciones independientes, inventivas o según la invención.

40 Debe entenderse que todas las indicaciones a intervalos de valores en esta descripción comprenden todos y cada uno de los intervalos parciales de los mismos, por ejemplo, la indicación 1 a 10 debe entenderse que comprende todos los intervalos parciales, a partir del límite inferior 1 y del límite superior 10, es decir, todos los intervalos parciales empiezan con un límite inferior de 1 o superior y terminan en un límite superior de 10 o inferior, por ejemplo, 2 a 9 ó 4 a 7 ó 5 a 6.

La capacidad de la cámara de reacción para el procedimiento descrito a continuación y según la invención comprende entre 0,01 m³ y 0,8 m³.

45 El tratamiento con plasma de los sustratos mediante plasmas de O₂/Ar o NH₃/Ar a mayor acoplamiento de potencia sirve para la activación mediante la generación de sitios de unión. La adición de reactantes inmediatamente posterior de las clases de sustancias I a III citadas a continuación conduce a la formación de polímeros de plasma. Como restos R pueden servir H, alquilo, arilo, pudiendo ser los restos de una clase de sustancias o bien igual o bien diferente. En la clase de sustancias I, n se selecciona preferiblemente entre 1 y 5, consiguiéndose muy buenos resultados con n=1.



Entre la etapa de activación y la etapa de polimerización puede usarse un gas de lavado (por ejemplo, argón) para la eliminación de los reactantes. En la realización preferida no es necesario un lavado del reactor.

5 El sustrato que va a recubrirse puede estar constituido por un polímero a base de carbono o silicio, vidrio, pentóxido de ditantalio, metal, o por membranas y no está limitado a cuerpos base planos. También pueden procesarse combinaciones de materiales.

El gas portador puede ser argón u otro gas inerte; los gases de reacción pueden ser oxígeno, amoníaco, H₂, N₂, CO₂ o representantes similares.

10 La potencia de plasma se extiende preferiblemente en el intervalo de 0,1 W a 2500 W, preferiblemente 2 W a 300 W, en la realización especialmente preferida de 5 W a 20 W.

Pueden usarse fuentes de plasma como se conocen por el estado de la técnica.

15 Los monómeros líquidos pueden pulverizarse directamente en el reactor o introducirse como aerosoles y convertirse en la fase gaseosa bajo las condiciones de presión allí prevalecientes o evaporarse fuera y dosificarse como gas. No es necesaria una purificación previa de los monómeros mediante ciclos de desgasificación/gasificación o congelación/desgasificación pre-conectados repetidos.

Los intervalos de presión durante la polimerización se encuentran preferiblemente entre 0,05 mbar (5 Pa) y 1,5 mbar (150 Pa), en una realización preferida entre 0,2 mbar (20 Pa) y 0,5 mbar (50 Pa).

La deposición de capas produce en función del cuerpo base una superficie hidrófila con intervalos de ángulos de contacto preferidos de 35° a 65° con agua como líquido de medida.

20 El tiempo de reacción de la activación puede encontrarse en el intervalo de 1 min a 15 min; en la realización preferida en el intervalo de 5 min a 10 min.

Los tiempos de reacción de la polimerización por plasma se encuentran en el intervalo de 1,5 min a 60 min y en una realización preferida en el intervalo de 10 min a 20 min.

25 El espesor de capa de los polímeros de plasma asciende a 4 nm a 300 nm, en la realización preferida a 10 nm a 40 nm.

Después de la polimerización, la cámara de reacción se lava con aire durante un periodo de tiempo de 1 min a 5 min, la cámara se ventila y se extraen los cuerpos base recubiertos.

30 En función del dimensionado del reactor o de la cámara de reacción puede ser necesario adaptar los valores anteriormente citados correspondientemente al dimensionado elegido, lo que se encuentra en el juicio rutinario del experto.

35 Las capas resultantes destacan por un comportamiento característico de materiales hinchables en contacto con soluciones de reacción formándose brevemente (1-2 s) en la aplicación de una gota una fase estacionaria de una gota que se asienta sobre la superficie que a continuación difunde rápidamente en la superficie. Este hinchamiento genera una capa de hidrato que evita una adhesión de proteínas y está bien documentado, por ejemplo, para superficies mezcladas por química húmeda con polietilenglicol (PEG) o polisacárido (K. Emoto, Anal. Chem. 1996, 68, 3751 - C. Brink, Colloid Surf 1992, 66, 149 - Y.S. Lin, Colloids and Surf. B: Biointerfaces 1994, 3, 49 - E. Uchida, Langmuir 1994, 10, 481). Una mezcla de derivados de PEG con clasificaciones de balance hidrófilo-lipófilo entre 5 y 8 con polímeros de base como poliestireno está documentada en el documento WO 1998/017407 A1 para alcanzar un rechazo de proteínas.

40 Ejemplo de realización 1:

Se usan argón 5.6, NH₃ y N,N-dimetilacrilamida como se obtienen del fabricante, por ejemplo, Aldrich, Fluca.

5 Cuerpos base de poliestireno, polímero de cicloolefina y vidrio se colocan en la cámara de reacción y la presión se reduce a 0,1 mbar (10 Pa). Se realiza la dosificación de argón y NH₃ bajo un ajuste de presión a 0,5 mbar (50 Pa) y el acoplamiento de potencia de 180 W durante 10 min. Después de detener el proceso de activación, la presión se regula a 0,1 mbar (10 Pa), se eleva a 0,35 mbar (35 Pa) mediante la adición de argón y N,N-dimetilacrilamida y la polimerización por plasma se realiza en una etapa de potencia de 15 W durante 15 min.

Ejemplo de realización 2:

10 Se usan argón 5.6, NH₃ y N,N-dimetilalilamina como se obtienen del fabricante. Cuerpos base de poliestireno, polímero de cicloolefina y vidrio se colocan en la cámara de reacción y la presión se reduce a 0,1 mbar (10 Pa). Se realiza la dosificación de argón y NH₃ bajo un ajuste de presión a 0,5 mbar (50 Pa) y el acoplamiento de potencia de 100 W durante 10 min. Después de detener el proceso de activación, la presión se regula a 0,1 mbar (10 Pa), se eleva a 0,5 mbar (50 Pa) mediante la adición de argón y N,N-dimetilalilamina y la polimerización por plasma se realiza en una etapa de potencia de 15 W durante 20 min.

Ejemplo de realización 3:

15 Se usan argón 5.6, NH₃ y N,N-dimetilalilamina como se obtienen del fabricante. Cuerpos base de poliestireno, polímero de cicloolefina y vidrio se colocan en la cámara de reacción y la presión se reduce a 0,1 mbar (10 Pa). Se realiza la dosificación de argón y NH₃ bajo un ajuste de presión a 0,5 mbar (50 Pa) y el acoplamiento de potencia de 1700 W durante 10 min. Después de detener el proceso de activación, la presión se regula a 0,1 mbar (10 Pa), se eleva a 0,5 mbar (50 Pa) mediante la adición de argón y N,N-dimetilalilamina y la polimerización por plasma se realiza en una etapa de potencia de 200 W durante 20 min.

20 Ejemplo de realización 4:

Se usan argón y dimetoxietano como se obtienen del fabricante. Cuerpos base de poliestireno, polímero de cicloolefina y vidrio se colocan en la cámara de reacción y la presión se reduce a 0,1 mbar (10 Pa). Se realiza la dosificación de argón y dimetoxietano bajo un ajuste de presión a 0,6 mbar (60 Pa) y el acoplamiento de potencia de 6 W durante 40 min.

25 Debido a los espacios libres preparados, el rechazo de proteínas de las superficies fabricadas según la invención es mucho mayor que en superficies convencionalmente fabricadas descritas como, por ejemplo, en el estado de la técnica. Las propiedades de unión de la superficie funcionalizada se comprueban con ayuda de una prueba de ELISA competitiva, pudiendo detectarse una propiedad de unión un factor de 10 veces más baja para las superficies según la invención en comparación con superficies convencionales.

30 Además, pudo mostrarse una inmovilización de ADN mejorada de las capas resultantes del procedimiento según la invención, por lo que se redujeron, por una parte, el consumo de ácido nucleico de las sondas que iban a inmovilizarse y, por otra parte, el consumo de muestra. La capacidad de unión para ADN es al menos el 40% superior a la de las superficies sin funcionalizar o funcionalizadas conocidas por el estado de la técnica.

35 El motivo estructural en gran medida intacto C(=O)N puede detectarse a 1680 cm⁻¹ mediante las bandas de carbonilo características para amidas como se muestra en el espectro de FITR en la Fig. 1, resultando el pico a 1680 cm⁻¹ de la superficie del soporte funcionalizada según la invención, mientras que las superficies sin funcionalizar no presentan picos a 1680 cm⁻¹.

40 Un perfilado de profundidad y la determinación del espesor de capa mediante la composición química de las capas mediante ToF SIMS proporciona en la realización preferida del Ejemplo 1 un espesor de capa de aproximadamente 11 nm, como se representa en la Fig. 2. Para determinar la distribución de elementos en función de la profundidad se crean perfiles de profundidad. En el perfilado de profundidad por ToF-SIMS en el llamado "Modo de haz doble" ("Dual-Beam-Mode"), la superficie de la muestra se atomiza continuamente con un haz de iones (aquí: Cs⁺), mientras que un segundo haz de iones (aquí: Bi³⁺) se usa para la caracterización de la composición química de la base de cráter así formada. La atomización masiva necesaria para el perfilado daña el material sólido, de manera que en este tipo de análisis la mayoría de las veces sólo puede registrarse la distribución de elementos en función de la profundidad.

45 Los resultados de investigaciones de XPS en muestras de los ejemplos de realización también muestran una composición claramente modificada en comparación con referencias sin recubrir. Para las mediciones se usó un aparato PHI Quantera SXP: radiación de excitación: AlK α ; lugar de análisis: 200 x 200 μm^2 .

50 En la siguiente Tabla 1 se reproduce la comparación de las concentraciones de elementos en porcentaje de átomos de poliestireno (PS) transparente y blanco y adicionalmente se especifican las relaciones de concentración. Los resultados para ambas muestras son muy similares entre sí. En total, en los aproximadamente 10 nm superiores de

las muestras se encuentran 11,6 por ciento de átomos (% de átomos) de N y 13,7% de átomos de O (poliestireno transparente) o 15,8% de átomos de N y 16,6% de átomos de O (poliestireno blanco).

Tabla 1: Concentraciones de elementos en porcentaje de átomos y relaciones de concentración

	C	O	N	C/O	C/N
PS, transparente	74,7	13,7	11,6	5,4	6,4
PS, blanco	67,7	16,6	15,8	4,1	4,3

5 La siguiente Tabla 2 muestra las proporciones en porcentaje de los desplazamientos químicos del pico C 1s; (C1s alifático/aromático: 284,8 eV; C-O/C-N: 286,2 eV; C=O/C-C-O: 287,5 eV)

El pico de oxígeno O 1s se encuentra a 531 eV (correspondientemente a enlaces O-C) y el pico N 1s a 399,5 eV (correspondientemente a enlaces N-C).

10 Si se comparan ambas tablas, entonces puede concluirse que aproximadamente el 33% del carbono (correspondientemente el 24% de átomos) no está unido como C-C. Por tanto, en el 13% de átomos de O y en el 11% de átomos de N prácticamente no pueden estar presentes enlaces de C con 2 oxígenos. Por tanto, el motivo estructural C(=O)N sigue siendo decisivo incluso después de la polimerización por plasma y se excluye en gran medida una fragmentación del monómero.

Tabla 2: Proporciones en porcentaje de los desplazamientos químicos del pico C 1s

	C-C/C-H alifático/aromático	C-O/C-N	C=O/O-C-O
PS, transparente	67	20	13
PS, blanco	68	16	16

15 Por tanto, la presencia de una capa de la superficie modificada puede confirmarse mediante diferentes análisis.

20 Los soportes según la invención pueden usarse, por ejemplo, para sistemas de matrices para la detección de analitos o para estructuras microfluídicas. Posibilidades de aplicación típicas son matrices de hibridación de ácidos nucleicos con generación de señales, debiendo realizarse aquí con procedimientos conocidos por el estado de la técnica una etapa de bloqueo que cubra los sitios de unión a proteínas de la superficie del soporte con una capa que no se une a las proteínas, ya que si no resultaría una señal por el ruido. Esta etapa de bloqueo se suprime con el soporte según la invención.

25 Mediante la elevación de la capacidad de unión de ácidos nucleicos a la superficie del soporte según la invención también puede conseguirse una mejora de la sensibilidad de los ensayos de hibridación de ácidos nucleicos y, por tanto, mejorarse el límite de detección.

El soporte según la invención también es adecuado para inmunoensayos ya que no produce unión no específica de proteínas a la superficie y de esta manera puede evitarse un ruido interferente para la señal.

30 Mediante el procedimiento según la invención también pueden hidrofiliarse superficies, especialmente superficies de plástico, de manera que se haga posible un transporte de muestras en microcanales. El procedimiento permite la modificación de superficies con cavidades, por lo que también es adecuado para superficies estructuradas.

Posibles sectores de aplicación en el diagnóstico de punto de cuidado ("Point of Care") (POC)

35 Como técnica dominante hasta la fecha en las aplicaciones de POC es de mencionar el llamado ensayo de flujo lateral ("Lateral Flow Assay") (LFA). Los LFA se basan en el mismo principio que otros ensayos inmunológicos (ELISA, ensayo de perlas magnéticas ("Magnetic Bead Assays"), etc.) aprovechando el efecto de la reacción anticuerpo-antígeno. Adicionalmente, tienen propiedades cromatográficas, ya que los anticuerpos están unidos sobre una membrana. La muestra que va a analizarse (solución) se extiende sobre toda la tira debido a las fuerzas capilares y conduce a un resultado rápidamente visible. Por los motivos mencionados, el LFA también se designa inmunocromatografía. La muestra la soporta un soporte de muestra que separa las impurezas (partículas de suciedad) de la muestra. Bajo el soporte de muestra se encuentra el soporte del conjugado en el que se encuentra

el conjugado (anticuerpo primario). A este respecto se trata de anticuerpos dirigidos contra los analitos que van a medirse (por ejemplo, ricina) que están unidos a oro coloidal. Cuando está contenido en la muestra, el analito reacciona sobre el soporte del conjugado con el anticuerpo unido al oro coloidal. Después, la muestra circula sobre la membrana de nitrocelulosa. Allí están aplicadas dos zonas consecutivas. En el caso de la primera zona se trata de un anticuerpo secundario que está dirigido contra los analitos y reconoce un epítotope diferente al conjugado (sitio de reconocimiento del anticuerpo). La otra línea contiene un anticuerpo anti-especie que reacciona con el conjugado no unido. El líquido en exceso con las partículas de oro no unidas a la línea de prueba o de control sigue circulando por el sistema de membrana hasta que es absorbido por un papel de filtro y, por tanto, se evita un reflujo. Las membranas de nitrocelulosa son las membranas más adecuadas para un LFA. Las propiedades del polímero de nitrocelulosa junto con la estructura microporosa hacen que la membrana sea un material de soporte ideal para la mayoría de los ensayos de flujo lateral ("Lateral Flow Assays"). Una buena membrana posee las siguientes propiedades: (i) alta capacidad de unión, (ii) velocidad capilar definida y precisa, (iii) superficie de la membrana homogénea que está libre de polvo y defectos, (iv) espesor homogéneo de la membrana, (v) calidad homogénea entre los distintos lotes. Se ha demostrado ventajosamente en la aplicación del soporte según la invención en comparación con el ensayo LIF del estado de la técnica que (i) no es necesario el uso de una membrana "externa", (ii) no es necesaria ninguna carga, entre otras cosas, con conjugados de oro, (iii) hace posible la fluídica del transporte de líquidos y materia y (iv) la química de la superficie garantiza una buena inmovilización con baja unión no específica (dado el caso no se necesita ninguna otra etapa de trabajo de saturación).

En la Fig. 3 se ilustra un ejemplo de una aplicación de POC con una superficie funcional según la invención cuya síntesis se esquematiza a continuación:

Después de la inmovilización de sondas de ADN específicas se realiza una hibridación con una muestra compleja. Las secuencias de ADN inmovilizadas se ponen en contacto con un tampón de hibridación que dado el caso contiene las secuencias complementarias de las sondas. A éstas se une la enzima peroxidasa de rábano picante (Horseradish peroxidase, HRP) mediante una proteína conjugada. Esta enzima pertenece al grupo de las peroxidases y, por tanto, cataliza la oxidación en presencia de un peróxido. Así, la tetrametilbencidina se convierte en presencia de peróxido de hidrógeno de la forma reducida incolora (TMBH₂) en la forma oxidada azul (TMB).

Los nuevos procedimientos de detección aquí usados se basan en esta reacción de color enzimática. Después de la adición de TMB y peróxido de hidrógeno, después de la hibridación se realiza la reacción de color con un precipitado de color azul. De esta manera, el sistema puede usarse como detección de la hibridación. El resultado cualitativo del ensayo puede evaluarse a simple vista (Fig. 3). La intensidad del precipitado puede evaluarse mediante escaneo de los ensayos y posterior lectura en escala de grises. De esta manera pueden sacarse conclusiones sobre la densidad de inmovilización, la capacidad de unión y la accesibilidad de las sondas (Fig. 4). Éstas dependen de las propiedades de inmovilización de la superficie. La unión de proteínas no específica minimizada se ilustra en un experimento adicional (Fig. 5).

La Fig. 3 muestra un ejemplo de aplicación del diagnóstico de punto de cuidado ("Point of Care") con identificación de secuencias específicas de una muestra compleja con minimización de unión de proteínas no específica. Las bandas coloreadas demuestran la inmovilización específica de ADN en la muestra con una sensibilidad diagnósticamente relevante. La región sin colorear entre las bandas demuestra una unión no específica minimizada.

La Fig. 4 muestra la intensidad de señal de la inmovilización de ADN de la Fig. 3 en comparación con rutas convencionales de la funcionalización de la superficie (MF = superficie funcionalizada fotoquímica mediante sistemas de quinoide; COR = plasma a baja presión; 3 D = motivos estructurales dendríticos para aumentar la superficie y capacidad de unión máxima - actualmente el estándar de oro). La superficie de POC3.3 es una superficie según la invención y se deposita satisfactoriamente en comparación con otros procedimientos de funcionalización.

La Fig. 5 muestra el resultado de una investigación de las propiedades de unión de la superficie funcionalizada según la invención con ayuda de una prueba de ELISA competitiva. Un ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción, de "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay") o EIA (prueba de inmunoadsorción acoplada a enzima) se basa en una reacción de color enzimáticamente desencadenada. Con ayuda de esta prueba pueden detectarse biomoléculas como, por ejemplo, péptidos, proteínas, virus, hormonas o toxinas. El antígeno (IgG humana) se inmoviliza por adsorción durante la noche sobre la superficie. La solución con antígeno en exceso se elimina en una primera etapa de lavado.

La posterior reacción inmunoquímica se realiza según el principio de competencia. Los anticuerpos marcados y sin marcar compiten por los sitios de unión libres en los antígenos inmovilizados. La peroxidasa de rábano picante (HRP, Horseradish peroxidase) sirve aquí de enzima marcadora. Los anticuerpos sin unir en exceso se eliminan mediante una segunda etapa de lavado. El sustrato añadido en la siguiente etapa tetrametilbencidina (TMB) lo escinde la enzima HRP y se libera un colorante azul turquesa. La reacción de color se detiene y se fija con ácido

sulfúrico (viraje de color a amarillo). La intensidad de la reacción de color se mide con un fotómetro mediante la absorción y así da información sobre el comportamiento de unión de la superficie investigada. A este respecto, alta absorción significa alto número de antígenos unidos y viceversa. A este respecto puede detectarse que en comparación con cuerpos base sin funcionalizar tiene lugar una reducción significativa de la adhesión de proteínas.

- 5 Los ejemplos de realización muestran posibles variantes de realización para la fabricación del soporte según la invención, siendo aquí de mencionar que la invención no se limita a las variantes de realización especialmente representadas de la misma, sino que más bien también son posibles diversas combinaciones de las variantes de realización individuales entre sí y esta posibilidad de variación se encuentra dentro de la capacidad del experto que trabaja en este campo técnico debido a las enseñanzas de la presente invención para la actividad técnica. Por
- 10 tanto, el alcance de la invención también comprende todas las variantes de realización concebibles que son posibles por combinaciones de detalles individuales de las variantes de realización representadas y descritas.

El objetivo en el que se basan las soluciones inventivas independientes puede extraerse de la descripción.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Procedimiento para la modificación al menos por zonas de una superficie de un soporte de al menos un sustrato mediante deposición de un recubrimiento mediante polimerización por plasma, generándose el recubrimiento al menos por zonas con espacios libres para acomodar al menos una solución realizándose antes de o durante la polimerización por plasma una activación de la superficie del sustrato en el plasma y generándose al menos por zonas un polímero de plasma hinchable, así como formándose mediante el recubrimiento una estructura tridimensional, caracterizado porque en la activación se realiza un acoplamiento de potencia de 5 a 20 veces mayor que en la polimerización por plasma.
- 10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la activación se realiza con una mezcla de reacción que comprende un gas portador y un gas de reacción en un reactor, siendo el gas portador un gas inerte y seleccionándose el gas de reacción de un grupo que comprende oxígeno, amoníaco, H₂, N₂, CO₂, C₂H₂.
- 3.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque entre la activación y la polimerización por plasma se introduce en el reactor un gas de lavado, especialmente en la cámara de reacción.
- 4.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque el gas de lavado es un gas inerte.
- 15 5.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la activación y/o la polimerización por plasma se realiza a un acoplamiento de potencia de un intervalo con un límite inferior de 0,1 W y un límite superior de 2500 W
- 20 6.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la activación y/o la polimerización por plasma se realiza a un acoplamiento de potencia de un intervalo con un límite inferior de 2 W, especialmente 5 W, y un límite superior de 1700 W, especialmente 300 W.
- 7.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la activación se realiza preferiblemente a una potencia de plasma de un intervalo con un límite inferior de 2 W y un límite superior de 2500 W y la polimerización por plasma a una potencia de plasma de un intervalo con un límite inferior de 0,1 W y un límite superior de 400 W.
- 25 8.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el recubrimiento se deposita por medio de plasmas pulsados.
- 9.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la polimerización por plasma se realiza mediante la adición de al menos una especie de monómero.
- 30 10.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque la adición de la al menos una especie de monómero se realiza en forma líquida y/o en forma gaseosa.
- 11.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque la presión durante la activación y/o la polimerización por plasma se selecciona de un intervalo con un límite superior de 1,5 mbar (150 Pa), preferiblemente 0,5 mbar (50 Pa), y un límite inferior de 0,05 mbar (5 Pa), preferiblemente 0,2 mbar (20 Pa).
- 35 12.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque la activación se realiza durante un periodo de tiempo con un límite inferior de 1 min, preferiblemente, 5 min, y un límite superior de 15 min, preferiblemente 10 min.
- 13.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque la polimerización por plasma se realiza durante un periodo de tiempo con un límite inferior de 1,5 min, preferiblemente, 10 min, y un límite superior de 60 min, preferiblemente 20 min.
- 40 14.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque el reactor, especialmente la cámara de reacción, se lava con aire después de la polimerización y se ventila la cámara.
- 45 15.- Uso de un soporte de al menos un sustrato que presenta al menos por zonas un recubrimiento fabricado por polimerización por plasma de módulos individuales que presenta al menos por zonas uno o varios espacios libres para acomodar al menos una solución, es hinchable al menos por zonas y presenta al menos por zonas una estructura tridimensional, formando la capa hinchable una capa de hidrato para inmovilizar ácidos nucleicos rechazando al mismo tiempo proteínas.
- 16.- Uso de un soporte según la reivindicación 15, caracterizado porque el recubrimiento formado presenta ángulos de contacto de un intervalo con un límite inferior de 35° y un límite superior de 65° con agua como líquido de

medida.

17.- Uso de un soporte según la reivindicación 15 ó 16, caracterizado porque el recubrimiento presenta un espesor seleccionado de un intervalo con un límite inferior de 4 nm, preferiblemente 10 nm, y un límite superior de 300 nm, preferiblemente 40 nm.

5 18.- Uso de un soporte según una de las reivindicaciones 15 a 17, caracterizado porque el material del sustrato está formado preferiblemente por plástico, por un grupo que comprende un polímero a base de carbono o silicio, por un grupo que comprende poliestireno (PS), polietileno (PE), poli(tereftalato de etileno) (PET, PETP, PBTP), polipropileno (PP), poli(cloruro de vinilo) (PVC), poliamidas, nitrocelulosa, poli(metacrilato de metilo) (PMMA), estireno-acrilonitrilo (SAN), policarbonato (PC), copolímeros de cicloolefina (COC) como copolímero de ciclopenteno-polietileno, copolímero de ciclohexano-polietileno, copolímero de ciclohepteno-polietileno, así como
10 polímeros de cicloolefina (COP) o similares, pentóxido de ditantalio, vidrio, metal o combinaciones de los mismos.

19.- Uso de un soporte según una de las reivindicaciones 15 a 18, caracterizado porque el sustrato está configurado como membrana.

15 20.- Uso de un soporte según una de las reivindicaciones 15 a 18, caracterizado porque los módulos individuales de al menos una especie de monómero se seleccionan de un grupo que comprende aminas, amidas, dialquiloxtano, presentando la especie de monómero restos de un grupo que comprende H, alquilo o arilo.

21.- Uso del soporte según una de las reivindicaciones 15 a 20 para sistemas de matrices.

22.- Uso del soporte según una de las reivindicaciones 15 a 21 para componentes microfluídicos.

Fig.1

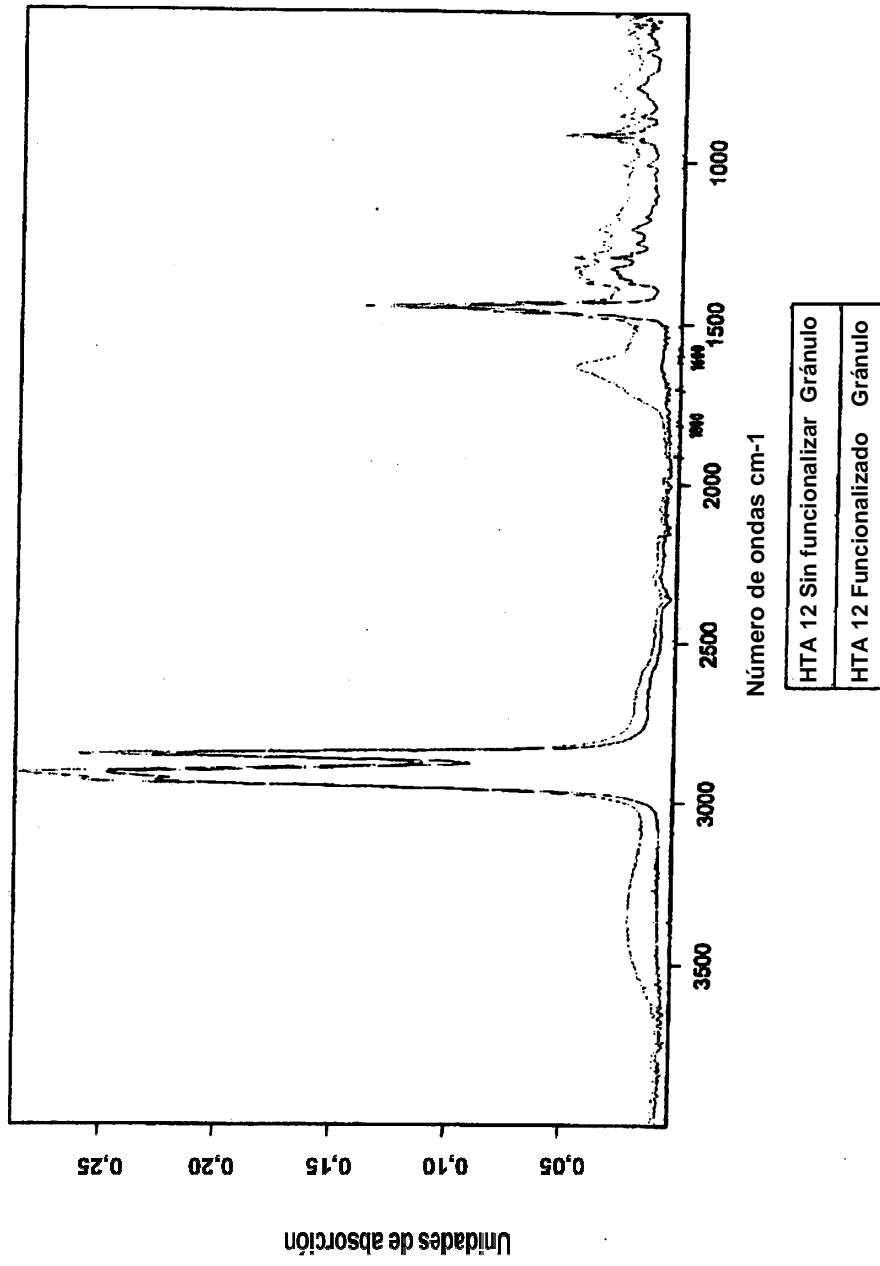


Fig.2

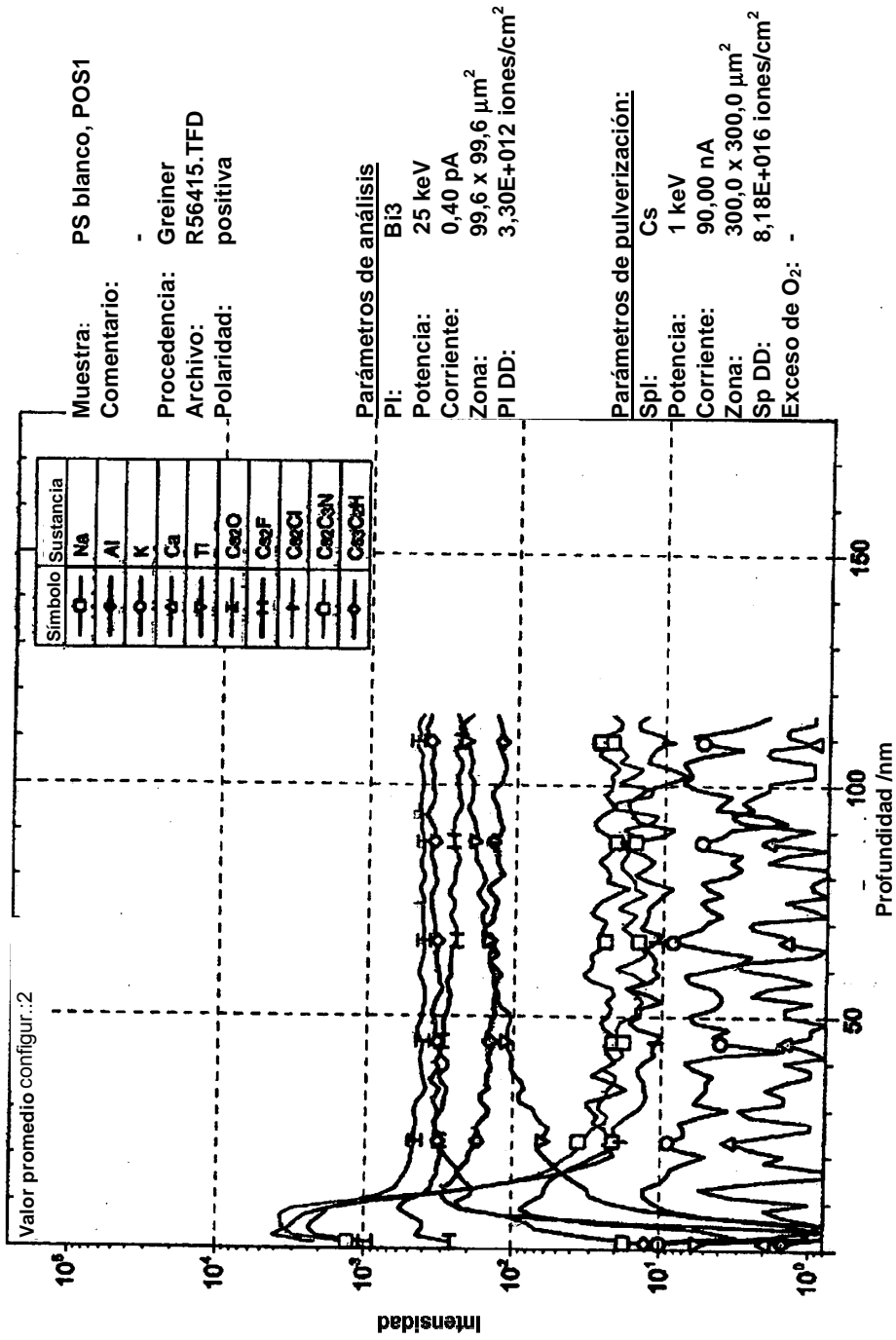


Fig.3

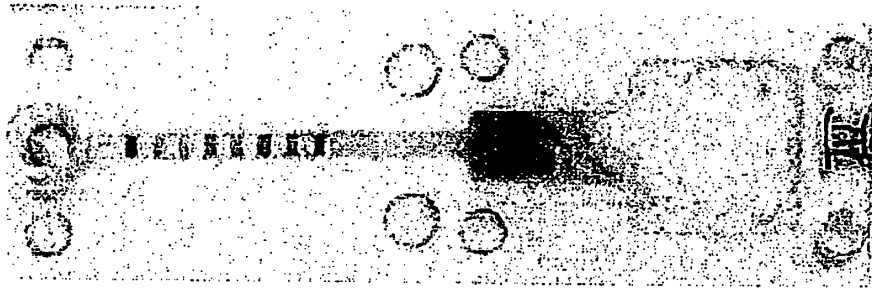


Fig.4

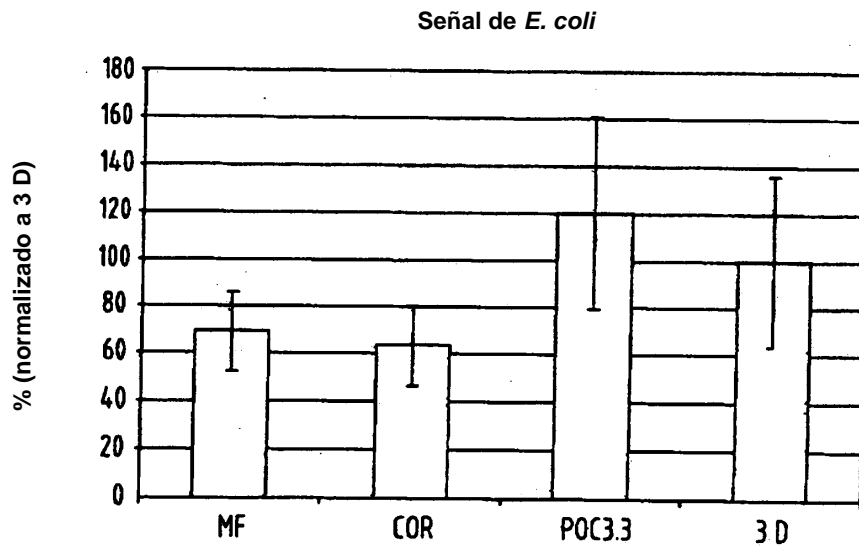


Fig.5

