

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 408 655**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2005 E 05798429 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 1800129**

54 Título: **Recubrimientos poliméricos policatiónicos para inmovilizar muestras biológicas**

30 Prioridad:

23.09.2004 US 612391 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

21.06.2013

73 Titular/es:

**TRIPATH IMAGING, INC. (100.0%)
780 PLANTATION DRIVE
BURLINGTON, NC 27215, US**

72 Inventor/es:

**FOX, WILLIAM, ALAN y
RAY, WILLIAM, CARL, III**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 408 655 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 poliméricos policatiónicos para inmovilizar muestras biológicas

5 **Campo de la invención**

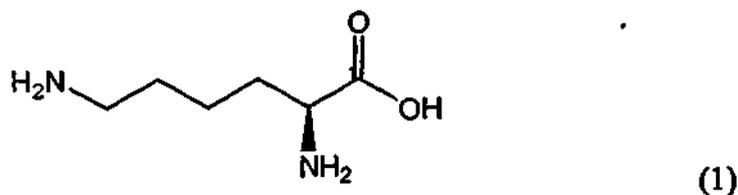
La invención presente invención está dirigida a un procedimiento para preparar un sustrato recubierto para inmovilizar una muestra biológica en el mismo, preferentemente para el análisis de la misma. La presente invención está dirigida adicionalmente a un sustrato prerrecubierto preparado según el procedimiento anterior. El sustrato se recubre con un polímero policatiónico que proporciona una capa de polímero estable capaz de una interacción iónica con componentes biológicos aniónicos.

Antecedentes

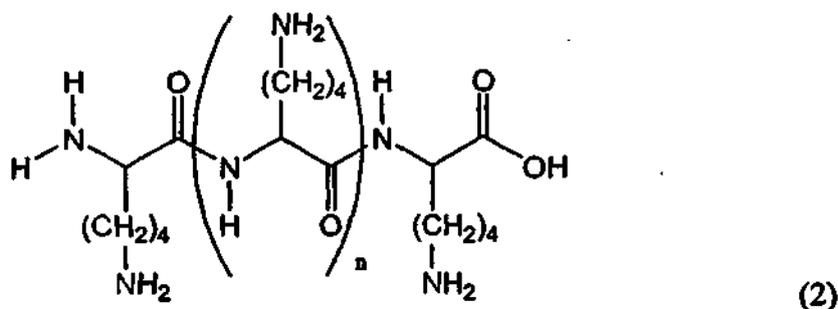
15 Diversas técnicas preparatorias biológicas requieren la inmovilización de materiales de muestra, tales como células, tejidos, proteínas o ácidos nucleicos, a un sustrato antes del subsiguiente procesado. Muchos de estos materiales biológicos de interés son de naturaleza aniónica, mostrando sitios con carga neta negativa. Un procedimiento de inmovilización de estos materiales es recubrir el sustrato objetivo con una disolución química que contiene principios activos que son de naturaleza catiónica, mostrando una carga neta positiva. Dado que los materiales biológicos de interés que se van a inmovilizar muestran sitios de carga neta negativa, los materiales biológicos se unen a la superficie del sustrato mediante la interacción con los sitios de carga neta positiva de la disolución de recubrimiento. Esta propiedad de adhesión de la disolución de recubrimiento permite la inmovilización del material de muestra para su subsiguiente procesado.

25 El efecto de inmovilización descrito anteriormente puede crearse mediante el uso de recubrimientos que contienen varios principios activos conocidos actualmente en la técnica. Por ejemplo, actualmente se conoce el uso de agentes de recubrimiento, tales como poli-1-lisina, 3-aminopropil trietoxisilano, gelatina de cromo y aluminio, y albúmina blanca de huevo. Uno de estos conocidos agentes de inmovilización más ampliamente usado es la poli-1-lisina (PLL).

30 La PLL es un gran homopolímero policatiónico que muestran una fuerte carga positiva producida por los grupos amino terminales de las cadenas laterales residuales de lisina a lo largo de todo el polímero. La L-lisina [ácido (S)-2,6-diaminohexanoico] es un aminoácido con la estructura química mostrada continuación en la fórmula (1). PEI y col. (Biomac Romolecules 2001, 2, páginas 463 - 468) describen capas de ADN-PDDA en una superficie.



40 El polímero de PLL es una cadena de unidades monoméricas de 1-lisina unidas mediante enlaces peptídicos. La estructura química de la PLL se proporciona a continuación en la fórmula (2), donde n es un número entero que representa el número de unidades monoméricas de la cadena polimérica.



45 Aunque la PLL se usa ampliamente como un recubrimiento polimérico policatiónico, los sustratos recubiertos con PLL tienden a perder su eficacia de inmovilización en un periodo de tiempo relativamente corto. Se cree que esta disminución de la eficacia con el tiempo es debida a la oxidación de los grupos amino de las cadenas laterales de la PLL. Los grupos oxidados no muestran la carga neta positiva requerida para la adecuada adhesión de los materiales biológicos que se quieren inmovilizar.

50

La eficacia de la PLL como agente de inmovilización también está limitada por su inherente estructura química, mostrada anteriormente en la fórmula (2). Según se mencionó anteriormente, los residuos de aminoácidos del polímero están conectados mediante enlaces peptídicos (enlaces de -CO-NH-). Estos enlaces peptídicos son altamente vulnerables a la escisión por enzimas proteolíticas, tales como tripsina, y a escisiones hidrolíticas en general, tales como a través del ataque procedente de una sustancia nucleófila. La escisión de los enlaces peptídicos da como resultado moléculas de PLL con una longitud de cadena sustancialmente más corta, medida mediante el peso molecular medio del polímero. Dado que el peso molecular de la molécula de PLL se reduce debido a la escisión proteolítica, la capacidad de inmovilización de la molécula (es decir, su propiedad adhesiva) queda reducida en gran medida.

Algunos agentes de inmovilización conocidos, tales como la PLL, muestran una utilidad limitada como resultado de las inestabilidades químicas descritas anteriormente. Consecuentemente, los sustratos recubiertos con los agentes conocidos también muestran una utilidad limitada, particularmente durante su uso a largo plazo o su uso después de un tiempo de almacenamiento significativo. Dada la estabilidad limitada de los sustratos recubiertos con los agentes de inmovilización conocidos, sería muy útil tener un sustrato prerrecubierto que esté recubierto con un agente de inmovilización que muestre una estabilidad aumentada, siendo particularmente útil para inmovilizar una muestra biológica para su observación.

Resumen de la invención

La invención son está limitada por las reivindicaciones.

La presente invención proporciona un sustrato recubierto adaptado preferentemente para inmovilizar una muestra biológica. El sustrato se recubre con un polímero policatiónico que muestra una estabilidad aumentada en comparación con los agentes de inmovilización conocidos previamente en la técnica. Consecuentemente, el sustrato recubierto con el polímero policatiónico estable es útil para inmovilizar muestras biológicas con una carga neta negativa, y el sustrato recubierto mantiene dicha utilidad durante un periodo prolongado de tiempo.

En una forma de realización de la presente invención, se proporciona un procedimiento para preparar un sustrato recubierto. Preferentemente, el sustrato recubierto está adaptado para inmovilizar una muestra biológica. Según una forma de realización, el procedimiento comprende proporcionar un sustrato con una superficie que comprende una pluralidad de grupos aniónicos, y poner en contacto el sustrato con una composición que comprende una disolución de un material polimérico no peptídico para formar un recubrimiento del material polimérico no peptídico en al menos una porción de la superficie del sustrato. La disolución que comprende el material polimérico no peptídico puede ser una disolución acuosa o una disolución orgánica, preferiblemente con un pH de al menos aproximadamente 6.

En una forma de realización preferida de la invención, el procedimiento comprende adicionalmente las etapas de secar el sustrato recubierto con el material polimérico no peptídico. Preferentemente, el sustrato recubierto con el material polimérico no peptídico seco en el mismo se enjuaga.

En otra forma de realización preferida de la invención, el procedimiento está caracterizado por la ausencia de limpieza del sustrato. En particular, el procedimiento excluye someter al sustrato a un proceso de limpieza antes de poner en contacto el sustrato con el material polimérico no peptídico.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un sustrato prerrecubierto, tal como un portaobjetos para microscopio, que está adaptado preferentemente para la inmovilización de una muestra biológica para su análisis. Según una forma de realización, el sustrato comprende una superficie con una pluralidad de grupos aniónicos para proporcionar una carga neta negativa, y el sustrato está recubierto con un material polimérico no peptídico que comprende una pluralidad de grupos catiónicos.

El sustrato prerrecubierto, según este aspecto de la invención, está caracterizado por su capacidad de movilizar un número medio de células por área superficial del sustrato. En una forma de realización en particular, el sustrato prerrecubierto es capaz de inmovilizar un número medio de células por área superficial de al menos aproximadamente 20.000 células/cm² cuando el sustrato prerrecubierto se pone en contacto con 1 ml de una suspensión de células procedentes de la línea celular SiHa.

Según otra forma de realización de la invención, el material polimérico no peptídico usado para el recubrimiento del sustrato prerrecubierto comprende un polímero alílico, un polímero vinílico o una combinación de los mismos, comprendiendo preferentemente grupos catiónicos elegidos del grupo que consiste en aminas primarias, aminas secundarias, aminas terciarias y aminas cuaternarias. En una forma de realización preferida, el material polimérico no peptídico comprende polidialildimetilamonio (PDDA). En otra forma de realización preferida de la invención, el material polimérico no peptídico comprende polialilamina (PAH).

El sustrato según la presente invención puede ser cualquier artículo o aparato útil o necesario para observar o analizar un material biológico. En una forma de realización preferida, el sustrato se elige del grupo que consiste en portaobjetos, placas, microesferas, tubos de ensayo, cubetas, tiras reactivas, hisopos y gasa. En una forma de

realización adicional, el sustrato podría ser un dispositivo útil como dispositivo de recolección de contaminantes. Por ejemplo, el sustrato podría ser un guante, un paño o un apósito médico.

Los sustratos recubiertos según la presente invención están adaptados para inmovilizar materiales que son al menos de naturaleza parcialmente aniónica. Preferiblemente, los materiales de inmovilización tienen una carga neta negativa. Consecuentemente, los sustratos recubiertos son útiles para inmovilizar diversos materiales, estando particularmente adaptados para la inmovilización de material biológico, tal como células, tejido, fluidos, ADN, ARN, proteínas y material biológico similar, con grupos aniónicos disponibles para su interacción con los grupos catiónicos del material polimérico no peptídico usado en la preparación de sustrato recubierto de la presente invención.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para analizar una muestra biológica. En una forma de realización según este aspecto de la invención, el procedimiento comprende las siguientes etapas: proporcionar un sustrato prerrecubierto adaptado para la inmovilización de una muestra biológica, comprendiendo el sustrato una superficie con una pluralidad de grupos aniónicos, donde el sustrato está recubierto con un material polimérico no peptídico que comprende una pluralidad de grupos catiónicos; aplicar una muestra biológica al sustrato prerrecubierto para inmovilizar la muestra biológica en el sustrato; y analizar la muestra biológica inmovilizada sobre el sustrato prerrecubierto. En una forma de realización en particular, el sustrato prerrecubierto es capaz de inmovilizar un número medio células por área superficial de al menos aproximadamente 20.000 células/cm² cuando el sustrato prerrecubierto se pone en contacto con 1 ml de una suspensión de células procedentes de la línea celular SiHa.

Descripción detallada de la invención

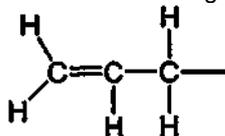
La presente invención se describirá ahora más completamente a continuación. Sin embargo, la invención puede llevarse a cabo de muchas formas diferentes y no debería interpretarse como limitada a las formas de realización establecidas en este documento; más bien, estas formas de realización se proporcionan de forma que esta descripción satisfaga los requisitos legales aplicables. Según se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las formas singulares "un," "uno/a" y "el/la" incluyen referentes plurales salvo que el contexto lo indique claramente de otro modo.

El sustrato prerrecubierto de la presente invención está caracterizado por el uso de un material de recubrimiento polimérico que muestra preferiblemente una capacidad de inmovilización equivalente al menos a los agentes de recubrimiento conocidos actualmente, pero que también muestra una capacidad ampliada de este efecto de inmovilización después del recubrimiento del sustrato. Además, en una forma de realización preferida, el material de recubrimiento polimérico tiene una estructura química que es menos vulnerable, o invulnerable, a la degradación proteolítica o hidrolítica en comparación con los agentes de recubrimiento convencionales, tales como la PLL.

El material de recubrimiento polimérico según la presente invención comprende una pluralidad de grupos catiónicos que están disponibles para su interacción con grupos aniónicos, tales como en un sustrato que va a ser recubierto y en una muestra biológica que va a ser inmovilizada. Los grupos catiónicos pueden ser un componente integral del esqueleto polimérico del material de recubrimiento polimérico o estar presentes como grupos de cadenas laterales. Los grupos catiónicos pueden ser cualquier grupo con una carga neta positiva y que sean capaces de una interacción iónica con partículas o grupos con cargas opuestas. Algunos grupos catiónicos particularmente preferidos incluyen grupos amina y grupos amonio, que pueden ser grupos amina o grupos amonio primario, secundario, terciario o cuaternario. Los grupos catiónicos, particularmente un grupo amonio, tienen a menudo un contraión cargado negativamente asociado al grupo, tal como cloruro.

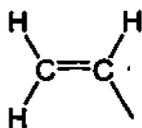
Son particularmente preferidos los grupos catiónicos que muestran mayores grados de sustitución. Según se mencionó anteriormente, los grupos amina simples, tales como aminas primarias, son muy susceptibles a la oxidación. Las aminas sustituidas son menos susceptibles a dicho ataque oxidativo, y por lo tanto muestran una estabilidad aumentada. Se cree que la sustitución de los grupos hidrógeno de la amina por grupos más complejos, tales como grupos metilo, proporciona protección frente a la oxidación, siendo los grupos más complejos menos susceptibles a la sustitución. Consecuentemente, se cree que mayores grados de sustitución proporcionan aminas con una estabilidad aumentada. Los grupos de amonio cuaternario son particularmente preferidos por su estabilidad aumentada.

El material de recubrimiento polimérico de la presente invención está formado preferiblemente por la polimerización de uno o más monómeros alílicos o vinílicos. Se entiende que los polímeros alílicos son polímeros derivados de monómeros que comprenden al menos un grupo alílico, que se ilustra a continuación en la fórmula (3).



(3)

Se entiende que los polímeros vinílicos son polímeros derivados de monómeros que comprenden al menos un grupo vinílico que se ilustra a continuación en la fórmula (4).



(4)

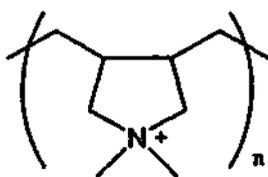
5

El ácido acrílico, el ácido metacrílico y diversos ésteres de los mismos son ejemplos de monómeros vinílicos útiles en la presente invención. Tanto los monómeros alílicos como los vinílicos dan como resultado la formación de esqueletos poliméricos no peptídicos y, como resultado, muestran una mayor resistencia a la degradación proteolítica que la PLL.

10

En una forma de realización de la presente invención, un polímero particularmente preferido derivado de un monómero alílico para su uso como el material de recubrimiento polimérico es polidialildimetilamonio (PDDA), que generalmente está disponible como la sal de cloruro del polímero. Al igual que la PLL, el PDDA es un gran homopolímero policationico que muestra una fuerte carga neta positiva. La fuerte carga neta positiva de la molécula de PDDA está producida por los grupos amonio dimetilados de las cadenas laterales de los residuos a lo largo del polímero. La estructura química del polímero de PDDA se proporciona a continuación en la fórmula (5), donde n es un número entero que representa el número de unidades monoméricas de la cadena polimérica.

15



(5)

20

El PDDA es un agente de inmovilización particularmente estable para su uso como el material de recubrimiento polimérico de la presente invención. Los grupos catiónicos del PDDA son amonios cuaternarios, lo que significa que son mucho menos susceptibles a la oxidación, según se ha descrito anteriormente. El esqueleto polimérico del PDDA deriva de grupos alílicos y no contiene enlaces peptídicos, tales como los encontrados en la molécula de PLL. Esta ausencia de enlaces peptídicos hace que el PDDA sea resistente al ataque de agentes proteolíticos, tales como la tripsina, que se ha demostrado que rompen la cadena polimérica de la PLL y reducen la capacidad de inmovilización.

25

La estabilidad aumentada de los sustratos recubiertos con un material de recubrimiento polimérico que comprende PDDA ha sido corroborada mediante pruebas de laboratorio. En una prueba se recubrió un sustrato con un material de recubrimiento polimérico que comprendía PDDA, se dejó secar y se aclaró con agua desionizada. Estudios de estabilidad acelerada que comparaban los sustratos recubiertos con PLL con los sustratos recubiertos con PDDA a 45°C predijeron un comportamiento de estabilidad excepcional en un exceso de 15 meses. Esta comparación se ilustra adicionalmente en el Ejemplo 2.

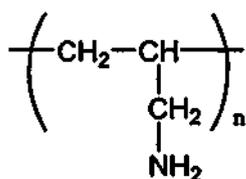
35

Además, el PDDA es ventajoso para su uso en el material de recubrimiento polimérico material de la presente invención debido a su inherente hidrofilia. Sorprendentemente, los sustratos recubiertos con PDDA mostraron una hidrofilia aumentada en comparación con los sustratos recubiertos con los agentes de recubrimiento conocidos, tales como la PLL. Esto es un efecto ventajoso ya que pequeñas muestras analíticas acuosas se diseminan de forma más uniforme por todo el sustrato recubierto con PDDA. Esto permite una distribución más uniforme de la muestra inmovilizada, lo que facilita una mejor observación de la muestra inmovilizada.

40

En otra forma de realización de la presente invención, el polímero usado en el material de recubrimiento polimérico es polialilamina (PAH), que generalmente está disponible como la sal de clorhidrato (clorhidrato de polialilamina). Al igual que con el PDDA, la PAH es un polímero alílico sin enlaces peptídicos. El grupo amina de la PAH no está muy sustituido, tal como en el PDDA; sin embargo, la PAH sigue siendo útil como material de recubrimiento polimérico según la presente invención. La estructura química del polímero de PAH se proporciona a continuación en la fórmula (6), donde n es un número entero que representa el número de unidades monoméricas de la cadena polimérica.

50



(6)

Además del PDDA y de la PAH, el material de recubrimiento polimérico puede ser un polímero derivado de la polimerización de uno o más monómeros diversos, particularmente de monómeros alílicos o vinílicos. Consecuentemente, el material de recubrimiento polimérico puede ser un homopolímero, un copolímero o un terpolímero. Adicionalmente, el material de recubrimiento polimérico puede ser una mezcla física de uno o más homopolímeros, copolímeros o terpolímeros. Cuando el material de recubrimiento polimérico comprende un homopolímero, los monómeros son preferiblemente todos monómeros catiónicos; sin embargo, cuando el polímero es un copolímero, un terpolímero o una mezcla física de polímeros, no es necesario que todos los monómeros sean catiónicos. En una forma de realización preferida, el material de recubrimiento polimérico comprende un porcentaje molar desde aproximadamente el 5% hasta aproximadamente el 100% de polímeros o monómeros catiónicos. Más preferiblemente, el material de recubrimiento polimérico comprende un porcentaje molar desde aproximadamente el 30% hasta aproximadamente el 100% de polímeros o monómeros catiónicos, muy preferiblemente desde aproximadamente el 50% hasta aproximadamente el 100% de polímeros o monómeros catiónicos.

El monómero catiónico usado en el material de recubrimiento polimérico puede ser catiónico en su estado normal o puede estar derivatizado a partir de un estado no catiónico hacia un estado catiónico. Dicha derivatización puede ser mediante cualquier procedimiento conocido generalmente en la técnica, tal como mediante la adición de una funcionalidad iónica, tal como una amina o un grupo amonio. Es decir, los monómeros usados para formar el material de recubrimiento polimérico pueden contener grupos catiónicos naturales, como en el caso de los monómeros usados para formar el PDDA y la PAH, o pueden contener grupos laterales que pueden estar derivatizados para formar grupos laterales catiónicos.

Preferiblemente, el material de recubrimiento polimérico deriva de al menos un monómero elegido del grupo que consiste en dialildimetilamonio, alilamina, metilacrilamidopropiltrimetilamonio, acrilamida, ácido acrílico, metacrililoiloxietiltrimetilamonio, 4-vinil-benciltrimetilamonio, ácido metacrílico, acrilato de hidroxietilo, metacrilato, metacrilato de metilo, metacrilato de hidroxietilo, 4-vinilpiridinio, 4-vinil-1-metilpiridinio, acrilato de metilo, acrilato de etilo, acrilato de butilo, acrilato de 2-etil hexilo, acrilato de dimetilaminoetilo, cloruro cuaternario de dimetilaminoetilacrilato de metilo, dimetilaminopropilacrilamida, dimetilaminopropilacrilamida cloruro de metilo cuaternario, acriloxietildimetilbencilamonio, acriloxietiltrimetilamonio, metacrilato de dimetilaminoetilo, metacriloxietildimetilamonio, metacriloxietiltrimetilbencilamonio, eteno, etilenoimina, propeno, estireno, cloruro de vinilo, isobutileno, trimetil-2-metacrililoetilamonio, trimetil-2-metacrilaminopropilamonio, y mezclas de los mismos.

En otra forma de realización preferida de la invención, el material de recubrimiento polimérico comprende un copolímero de un monómero catiónico y al menos un monómero adicional. Preferentemente, el material de recubrimiento polimérico comprende un copolímero de dialildimetilamonio y al menos un monómero adicional. Más preferiblemente, el al menos un monómero adicional comprende un monómero vinílico. En una forma de realización, el material de recubrimiento polimérico comprende un copolímero que comprende dialildimetilamonio y unidades monoméricas de ácido acrílico. En otra forma de realización, el material de recubrimiento polimérico comprende un copolímero que comprende unidades monoméricas de dialildimetilamonio y acrilamida. En otra forma de realización de la invención, el material de recubrimiento polimérico comprende un terpolímero que comprende unidades monoméricas de dialildimetilamonio, ácido acrílico y metacrilato de hidroxietilo.

Preferiblemente, el material de recubrimiento polimérico según la presente invención es "no peptídico", lo que significa que los enlaces entre las unidades monoméricas son predominantemente, y preferiblemente sustancialmente, de naturaleza no peptídica. Preferiblemente, el material de recubrimiento polimérico no comprende más de aproximadamente el 25% de enlaces monoméricos peptídicos, lo que significa que no más de aproximadamente el 25% de los enlaces entre unidades monoméricas comprenden enlaces peptídicos. Más preferiblemente, no más de aproximadamente el 10% de los enlaces monoméricos son enlaces peptídicos, y muy preferiblemente no más de aproximadamente el 5% de los enlaces monoméricos son enlaces peptídicos. En ciertas formas de realización preferidas, el material de recubrimiento polimérico está completamente exento de enlaces peptídicos.

El polímero usado en el material de recubrimiento polimérico de la presente invención es preferiblemente de un peso molecular relativamente alto. Se prefieren los polímeros con un peso molecular relativamente alto debido a la elevada densidad de carga asociada con dicho peso molecular alto. Consecuentemente, aunque son preferidos los pesos moleculares altos, los polímeros con pesos moleculares menores a los descritos en este documento podrían ser también útiles según la presente invención si los polímeros con un peso molecular menor mostraron una densidad de carga lo suficientemente elevada como para ser considerada equivalente a la densidad de carga de los polímeros de peso molecular mayor descritos en este documento.

El polímero usado en el material de recubrimiento polimérico tiene preferiblemente un peso molecular mayor de aproximadamente 75.000 Da, más preferiblemente mayor de aproximadamente 100.000 Da. En formas de realización particulares, el polímero tiene un peso molecular en el intervalo desde aproximadamente 250.000 hasta aproximadamente 750.000 Da, muy preferiblemente en el intervalo desde aproximadamente 400.000 Da hasta aproximadamente 500.000 Da. Salvo que se indique de otro modo, el peso molecular se expresa en este documento como peso molecular medio en peso (M_w), que está definido por la fórmula (7) a continuación

$$\frac{\sum NiMi^2}{\sum NiMi} \quad (7)$$

donde N_i es el número de moléculas de polímero (o el número de moles de esas moléculas) con un peso molecular M_i .

En una forma de realización preferida, el material de recubrimiento polimérico comprende PDDA, según se mostró anteriormente en la fórmula (5), donde n es un número entero entre aproximadamente 500 y 6.000, preferiblemente entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 5.000, más preferiblemente entre aproximadamente 3.000 y aproximadamente 4.000. En otra forma de realización preferida, el material de recubrimiento polimérico comprende PAH, según se mostró anteriormente en la fórmula (6), donde n es un número entero entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 15.000, preferiblemente entre aproximadamente 5.000 y aproximadamente 12.000, más preferiblemente entre aproximadamente 8.000 y aproximadamente 10.000.

En un aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para preparar un sustrato recubierto que está preferentemente adaptado para la inmovilización de una muestra biológica. Generalmente, el procedimiento comprende proporcionar un sustrato con una superficie que comprende una pluralidad de grupos aniónicos, poner en contacto el sustrato con una composición que comprende una disolución de un material de recubrimiento polimérico no peptídico, según se ha descrito anteriormente, para formar un recubrimiento del material de recubrimiento polimérico en al menos una porción de la superficie del sustrato, y secar el material de recubrimiento polimérico recubierto en la superficie del sustrato.

El sustrato usado según el procedimiento de la invención puede ser cualquier sustrato que comprenda una superficie con una pluralidad de grupos aniónicos y que muestre una carga neta negativa, y que podría ser útil para inmovilizar una muestra en el mismo. Preferiblemente, el sustrato es un artículo útil como herramienta diagnóstica, como herramienta de observación, como herramienta anticontaminación, y otras herramientas similares, cuyo uso sería apreciable por el experto en la técnica. Preferentemente, el sustrato usado en el procedimiento de la invención comprende vidrio, metales, cerámica, polímeros naturales o sintéticos, materiales fibrosos naturales o sintéticos, y mezclas de los mismos. Algunos ejemplos específicos no limitantes de sustratos útiles en el procedimiento incluyen portaobjetos, microesferas, tubos de ensayo, cubetas, tiras reactivas, hisopos y gasa, y similares.

En una forma de realización de la invención, el sustrato que se va recubrir con el material de recubrimiento polimérico es una placa o un portaobjetos, tal como un portaobjetos de microscopio. El portaobjetos puede comprender cualquier material aceptado generalmente en la técnica como útil como tal. Por ejemplo, el portaobjetos puede estar fabricado en vidrio, cerámica o un material polimérico. Cuando se usa vidrio, el vidrio puede ser cualquier tipo de vidrio estándar que comprenda principalmente dióxido de silicio, tal como vidrio estándar de cal sodada. Alternativamente, el vidrio puede ser un vidrio especial, tal como vidrio de silicato de boro.

Cuando el portaobjetos está formado por un polímero, se prefiere que el polímero, en su estado normal, comprenda grupos aniónicos capaces de una interacción con los grupos catiónicos del material de recubrimiento polimérico. En ausencia de dichos grupos, sin embargo, el polímero puede ser derivatizado para mejorar la adhesión celular. Algunos ejemplos de polímeros útiles como portaobjetos según esta forma de realización de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, poliestireno, metacrilato de polihidroxilo, tereftalato de polietileno, politetrafluoroetileno, etileno fluorado y polidimetilsiloxano. El polímero puede ser un homopolímero, un copolímero, un terpolímero o una física mezcla de polímeros.

En una forma de realización preferida del procedimiento de la invención, el material de recubrimiento polimérico está en disolución, que puede ser una disolución acuosa o una disolución orgánica. Puede usarse cualquier disolvente adecuado conocido en la técnica para solubilizar el material de recubrimiento polimérico, tal como agua desionizada para elaborar una disolución acuosa, o un alcohol para elaborar una disolución orgánica. La disolución puede tener una concentración del material de recubrimiento polimérico que varía desde aproximadamente el 0,001% (p/v) hasta aproximadamente el 50% (p/v). Preferiblemente, la concentración del material de recubrimiento polimérico en la disolución es desde aproximadamente el 0,01% hasta aproximadamente el 10%, más preferiblemente desde aproximadamente el 0,05% hasta aproximadamente el 2%, aún más preferiblemente desde aproximadamente el 0,1% hasta aproximadamente el 1%, y muy preferiblemente desde aproximadamente el 0,15% hasta aproximadamente el 0,75%.

Particularmente sorprendentemente según la presente invención, en ciertas formas de realización, pueden usarse unas disoluciones de menor concentración para preparar un sustrato recubierto con una capacidad de inmovilización superior a la de un sustrato recubierto preparado usando una disolución con mayor concentración. Por ejemplo, en algunas formas de realización en particular, las disoluciones con una concentración del material de recubrimiento polimérico de aproximadamente el 0,25% han mostrado ser especialmente ventajosas para preparar un sustrato prerrecubierto según la invención.

Según se mencionó anteriormente, los polímeros policatiónicos útiles en la invención pueden existir en un estado neutro estando acoplados a un contraión (por ejemplo, cloruro en el caso de PDDA y clorhidrato en el caso de PAH). Cuando están en disolución, los iones tienen a disociarse. Consecuentemente, el polímero está en su estado catiónico, listo para su uso como un agente de inmovilización según la presente invención.

La presente invención también incluye facilitar la activación de los sitios de unión en el sustrato, aumentando así el número de sitios aniónicos disponibles para interactuar con los grupos catiónicos del material de recubrimiento polimérico. Cualquier procedimiento conocido en la técnica de activación de sitios de unión aniónicos en un sustrato sería útil según la presente invención.

Según una forma de realización de la presente invención, el pH del material de recubrimiento polimérico puede ser ajustado. Dicho ajuste del pH del material de recubrimiento polimérico puede ser para aumentar o disminuir el pH y puede tener lugar antes o después del recubrimiento del sustrato con el material de recubrimiento polimérico. Esta capacidad de ajustar el pH del material de recubrimiento polimérico es particularmente ventajosa para aumentar el número de sitios de unión aniónicos en el sustrato mediante la desprotonación del sustrato cuando entra en contacto con el material de recubrimiento polimérico. Generalmente, el aumento del pH en la superficie del sustrato promoverá la desprotonación y aumentará el número de sitios de unión aniónicos disponibles.

Preferentemente, el pH de la disolución que comprende el material de recubrimiento polimérico se ajusta a un pH preferido. En una forma de realización, el pH de la disolución es de al menos aproximadamente 6. En otras palabras, el pH de la disolución es de aproximadamente 8, de aproximadamente 9, de aproximadamente 10, de aproximadamente 11, de aproximadamente 12, de aproximadamente 13 o de aproximadamente 14. En una forma de realización preferida, el pH de la disolución que comprende el material de recubrimiento polimérico es desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 14, preferiblemente desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 10.

Después de poner en contacto el sustrato con el material de recubrimiento polimérico, el material de recubrimiento polimérico recubierto en el sustrato se seca preferiblemente antes de un procesado adicional o de su uso. El secado del material de recubrimiento polimérico puede ser evaluado mediante cualquier procedimiento conocido generalmente en la técnica. En una forma de realización de la invención, el recubrimiento polimérico se seca al menos hasta un punto de sequedad visual. La diferencia visual entre un material polimérico húmedo y un material polimérico seco sería fácilmente reconocible para el experto en la técnica.

El secado del material de recubrimiento polimérico puede conseguirse mediante cualquier procedimiento aceptado generalmente en la técnica y puede comprender el secado pasivo o el secado activo (por ejemplo, aire forzado, tal como un ventilador). El material de recubrimiento polimérico recubierto en el sustrato puede secarse a temperatura ambiente o a una temperatura elevada. Se entiende que la temperatura ambiente, según se usa en la presente memoria, se refiere a la temperatura del entorno circundante. En una forma de realización, la temperatura ambiente es una media de la temperatura ambiente, considerada generalmente en el intervalo desde aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 25°C (desde aproximadamente 68°F hasta aproximadamente 77°F). Por supuesto, las temperaturas por debajo de aproximadamente 20°C no deben ser excluidas por la presente invención. De hecho, el secado podría realizarse a temperaturas tan bajas como de aproximadamente la temperatura de congelación del material de recubrimiento polimérico.

El secado del material de recubrimiento polimérico recubierto en el sustrato también puede llevarse a cabo a una temperatura elevada. La temperatura puede elevarse hasta aproximadamente la temperatura a la que un incremento adicional provocaría la degradación del material de recubrimiento polimérico. Consecuentemente, el material de recubrimiento polimérico recubierto en el sustrato puede secarse al menos parcialmente a una temperatura elevada desde aproximadamente 35°C hasta aproximadamente 120°C (desde aproximadamente 95°F hasta aproximadamente 248°F), más preferiblemente desde aproximadamente 45°C hasta aproximadamente 80°C (desde aproximadamente 113°F hasta aproximadamente 176°F), muy preferiblemente desde aproximadamente 50°C hasta aproximadamente 60°C (122°F hasta aproximadamente 140°F).

El periodo de tiempo durante el que el material de recubrimiento polimérico recubierto en el sustrato se seca puede variar dependiendo de la temperatura y del procedimiento de secado. Generalmente, el periodo de tiempo de secado puede variar desde aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 1 hora, o más. Por ejemplo, cuando el secado del material de recubrimiento polimérico recubierto en el sustrato se realiza a temperatura ambiente, dicho secado se lleva a cabo preferiblemente durante un periodo de tiempo de aproximadamente 1 hora, más preferiblemente durante un periodo de tiempo de desde aproximadamente 5 minutos hasta aproximadamente 1

hora, y muy preferiblemente durante un periodo de tiempo de desde aproximadamente 10 minutos hasta aproximadamente 30 minutos. El secado a temperatura ambiente puede continuarse en exceso de 1 hora sin perjudicar al material de recubrimiento polimérico.

- 5 Cuando el secado del material de recubrimiento polimérico recubierto en el sustrato se realiza a una temperatura elevada, dicho secado se lleva a cabo preferiblemente durante un periodo de tiempo de desde aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 20 minutos, más preferiblemente durante un periodo de tiempo de desde aproximadamente 2 minutos hasta aproximadamente 10 minutos. El secado a temperatura elevada puede tener lugar durante un periodo de 10 veces en exceso de aproximadamente 20 minutos, siempre que la combinación de tiempo y temperatura no produzca la degradación del polímero.

15 El sustrato con el material de recubrimiento polimérico seco aplicado en el mismo preferiblemente se aclara, tal como con agua desionizada, antes de su uso para la inmovilización de una muestra. Dicho aclarado es útil para eliminar los contraiones disociados, así como el exceso de material de recubrimiento polimérico que no ha interactuado iónicamente con el sustrato. Es preferible el secado del material polimérico recubierto en el sustrato previo al aclarado, dado que un error en la realización de la etapa de secado previa a la etapa de aclarado puede dar como resultado un sustrato recubierto en el que el recubrimiento esté incompleto (es decir, "parcheado"). El aclarado inmediatamente antes del recubrimiento permite eliminar las cantidades excesivas del material de recubrimiento polimérico que quedan en el sustrato recubierto con una capacidad limitada para la posterior inmovilización de una muestra. El secado del material de recubrimiento polimérico recubierto en un sustrato antes del aclarado (como se ha descrito anteriormente), facilita sin embargo una máxima interacción iónica entre el material de recubrimiento polimérico y el sustrato, lo que proporciona un sustrato recubierto con una cantidad máxima de material de recubrimiento polimérico aplicado sobre el mismo (es decir, una densidad de carga máxima) y que tiene por lo tanto una capacidad maximizada para la posterior inmovilización de una muestra.

25 La maximización de la capacidad de inmovilización es adicionalmente posible según la presente invención ya que se proporciona un procedimiento para la aplicación del material de recubrimiento polimérico en el sustrato de una forma controlada, tal que la etapa de aclarado se elimina completamente. El aclarado se incluye generalmente en el procedimiento de recubrimiento para retirar el exceso de material polimérico que no ha sido inmovilizado en el sustrato mediante interacciones iónicas. Esto es económicamente indeseable. En primer lugar, la etapa de aclarado aumenta el tiempo necesario para preparar los sustratos recubiertos, particularmente en la producción en masa, tal como con los portaobjetos de microscopios. En segundo lugar, el aclarado representa una pérdida de material. El exceso de material polimérico aplicado en el sustrato (es decir, el material polimérico que no se adhiere al sustrato) se pierde en el aclarado. De nuevo, en la producción en masa, la cantidad de material polimérico perdida en el aclarado puede suponer un coste sustancial.

35 La presente invención, sin embargo, resuelve estos problemas. En una forma de realización, la invención proporciona un procedimiento para la aplicación controlada de un material polimérico en un sustrato. En este procedimiento, se calcula el volumen de material polimérico necesario para una máxima integración iónica con los grupos iónicos de la superficie del sustrato, y sólo se aplica en el sustrato la cantidad necesaria de material polimérico. Consecuentemente, el sustrato está recubierto con el material polimérico, y no hay ningún exceso de volumen presente que requiera una etapa de aclarado. Preferiblemente, el material polimérico todavía se seca antes del uso del sustrato recubierto para la inmovilización de una muestra.

45 Otro aspecto sorprendente de la presente invención no reconocido antes en la técnica es que cuando el procedimiento de la invención excluye específicamente someter la superficie del sustrato a un proceso de limpieza antes de poner en contacto el sustrato con el material de recubrimiento polimérico, el sustrato recubierto resultante muestra unas propiedades de inmovilización mejoradas. Generalmente está aceptado en la técnica que los sustratos usados para la inmovilización de muestras sobre los mismos experimentan una intensa limpieza antes de la etapa de inmovilización. Por ejemplo, cuando el sustrato es un portaobjetos de microscopio, la práctica habitual es tomar el portaobjetos según se recibe del fabricante, y lavar el portaobjetos antes de proceder a cualquier etapa de inmovilización. Múltiples ejemplos de procesos de limpieza o de lavado se proporcionan en Cras, J. J., y col., Biosensors & Bioelectronics, 14 (1999) 683 - 688.

55 Los procesos de limpieza que se deben evitar según la presente invención son procesos que comprenden el uso de productos químicos reconocidos como útiles para eliminar compuestos orgánicos de las superficies de sustratos. Algunos ejemplos de los procesos de limpieza que se deben evitar son procesos que incluyen el uso de ácidos (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido crómico y ácido cromosulfúrico), bases (por ejemplo, hidróxido de amonio, hidróxido sódico e hidróxido potásico) y disolventes orgánicos (por ejemplo, alcohol metílico, alcohol etílico, alcohol propílico, tolueno, acetona, cloruro de metileno y esencias minerales). Algunos procesos adicionales que se deben evitar incluyen procesos de silanización diseñados para exponer los grupos silano en los sustratos, tales como el vidrio. Los procesos tales como los descritos anteriormente (y adicionalmente descritos por Cras, J. J., y col.) incluyen un mecanismo de acción más allá del simple aclarado o barrido de una superficie de un sustrato. Consecuentemente, las etapas del proceso, tales como el aclarado de un sustrato con agua desionizada o el barrido de la superficie de un sustrato con un paño, no están excluidas según la invención. En otras palabras, la presente invención engloba los procesos en los que un sustrato se limpia de polvo o se aclara con agua antes de su

recubrimiento con el material polimérico no peptídico.

Los procesos de limpieza, tales como los descritos anteriormente, requieren tiempo y pueden incluir el uso de productos químicos tóxicos. El procedimiento de la presente invención es por lo tanto particularmente útil ya que dichas etapas de limpieza están completamente excluidas en las formas de realización preferidas. Consecuentemente, puede usarse un portaobjetos de microscopio, por ejemplo, según se recibe del fabricante, sin incluir ninguna etapa de limpieza. En otras palabras, en el procedimiento de la invención, el procedimiento excluye someter el sustrato a un proceso de limpieza antes de poner en contacto el sustrato con el material de recubrimiento polimérico no peptídico.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un sustrato prerrecubierto particularmente útil para inmovilizar una muestra biológica en el mismo. En una forma de realización, el sustrato prerrecubierto se prepara según el procedimiento descrito anteriormente.

Un sustrato prerrecubierto según la invención que utiliza el material de recubrimiento polimérico descrito en este documento es ventajoso porque incluso cuando la capa de recubrimiento del material de recubrimiento polimérico no peptídico es relativamente delgada, el sustrato prerrecubierto todavía es útil y eficaz para inmovilizar una muestra biológica. Por supuesto, la eficacia del recubrimiento no está limitada a dichos recubrimientos relativamente delgados, y el material de recubrimiento polimérico también es eficaz con recubrimientos relativamente gruesos. La capacidad de preparar un sustrato prerrecubierto según la invención es, sin embargo, particularmente ventajosa en términos del coste de la preparación de dichos portaobjetos. En otras palabras, la capacidad de preparar sustratos para la inmovilización de muestras en los mismos usando sólo un delgado recubrimiento del material de recubrimiento polimérico es económica porque reduce la cantidad de material polimérico que se puede usar.

El material de recubrimiento polimérico, cuando está recubierto sobre un sustrato, puede tener un espesor de desde aproximadamente 0,005 μm hasta aproximadamente 500 μm . Preferiblemente, el material de recubrimiento polimérico tiene un espesor de recubrimiento de desde aproximadamente 0,5 μm hasta aproximadamente 100 μm , más preferiblemente desde aproximadamente 1 mm hasta aproximadamente 50 μm . Preferiblemente, el material de recubrimiento polimérico está recubierto sobre el sustrato como una monocapa, lo que significa que no hay una intervención de capas intermedias de un material diferente entre dos o más capas del material de recubrimiento polimérico de la invención. Sin embargo, los recubrimientos multicapa también están contemplados por la presente invención.

El sustrato prerrecubierto de la presente invención es particularmente útil no sólo en términos de un aumento de la vida de almacenamiento, sino también en términos de su capacidad para inmovilizar una cantidad aumentada de una muestra biológica. Por ejemplo, en una forma de realización, el sustrato prerrecubierto de la invención puede caracterizarse por ser capaz de inmovilizar un número medio de células aumentado por área superficial con respecto a otros sustratos prerrecubiertos conocidos previamente.

En una forma de realización particular, el número medio de células por área superficial inmovilizadas en el sustrato prerrecubierto de la presente invención es de al menos aproximadamente un 10% mayor que el número medio de células por área superficial en la misma área de un sustrato no recubierto según los procedimientos de la presente invención que se ha puesto en contacto con la misma muestra celular. Preferiblemente, el número medio de células por área superficial inmovilizadas en el sustrato prerrecubierto de la presente invención es de al menos aproximadamente un 15% mayor que el número medio de células por área superficial en la misma área de un sustrato no recubierto según los procedimientos de la presente invención, muy preferiblemente al menos aproximadamente un 20% mayor.

El incremento en el recuento celular del material biológico asociado con un sustrato prerrecubierto según la presente invención puede determinarse usando diversos equipos y procedimientos que serían reconocidos por el experto en la técnica. Por ejemplo, es bien conocido en la técnica que puede usarse un hemocitómetro para contar las células manualmente en un número representativo de campos de visión, y a continuación extrapolar el número total de células por área.

Los recuentos celulares también pueden obtenerse mediante el uso de un equipo automatizado controlado por ordenador, tal como el sistema de lectura de portaobjetos automatizado FOCALPOINT™ Cell Profiler (disponible en TriPath Imaging, Inc.). El FOCALPOINT™ Cell Profiler usa unos algoritmos específicos para limitar el número de células incluidas en el recuento celular a una población con un valor diagnósticamente significativo (es decir, cuenta sólo las células reales y desestima alteraciones). Este recuento celular está acumulado a partir de aproximadamente 950 a 1.000 imágenes tomadas a alta resolución en campos de células evaluados como el mayor potencial.

Preferiblemente, los procedimientos usados para obtener los recuentos celulares, tales como los descritos anteriormente, son capaces de proporcionar resultados reproducibles y son capaces de proporcionar resultados que pueden ser evaluados de una forma estadísticamente significativa. Consecuentemente, una muestra biológica aplicada en un sustrato puede ser procesada usando un equipo estandarizado, de forma que las muestras procesadas usando el equipo pueden evaluarse comparativamente. Un ejemplo de dicho equipo de procesado es un

procesador PrepStain Slide (disponible en TriPath Imaging, Inc.). El procesador PrepStain Slide permite la preparación de un portaobjetos con un volumen de una muestra biológica aplicado sistemáticamente, de forma que el área del portaobjetos en la que se aplica la muestra es constante y reproducible. Dicho procesado es particularmente útil para evaluar una muestra biológica aplicada en un sustrato basándose en un recuento celular medio por área superficial del sustrato.

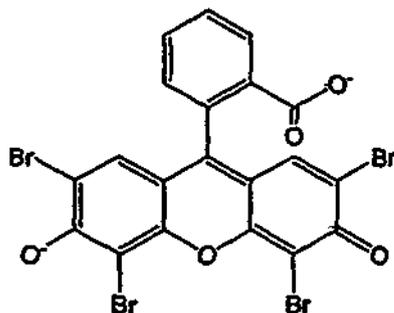
Una forma de realización particular de la invención proporciona un sustrato prerrecubierto adaptado para inmovilizar una muestra biológica para su análisis. El sustrato puede ser cualquier sustrato según se describe en este documento que está recubierto con un material de recubrimiento polimérico no peptídico, según se describió anteriormente. El sustrato prerrecubierto en esta forma de realización de la invención se caracteriza porque es capaz de inmovilizar un número medio de células por área superficial. Dicha capacidad de inmovilización puede evaluarse basándose en la inmovilización de una línea celular. Por ejemplo, la capacidad de un sustrato prerrecubierto de inmovilizar células puede evaluarse usando células de carcinoma cervical humano, habitualmente conocidas como línea celular SiHa. Las células SiHa están fácilmente disponibles, tales como en la American Type Culture Collection (ATCC) identificadas mediante el número de ATCC HTB-35.

Según una forma de realización de la invención, se proporciona un sustrato prerrecubierto donde la superficie del sustrato prerrecubierto es capaz de inmovilizar un número medio de células por área superficial de al menos aproximadamente 20.000 células/cm² cuando el sustrato prerrecubierto se pone en contacto con 1 ml de una suspensión de células de la línea celular SiHa. Preferiblemente, la superficie del sustrato prerrecubierto es capaz de inmovilizar una media de al menos aproximadamente 21.000 células/cm² cuando el sustrato prerrecubierto se pone en contacto con 1 ml de una suspensión de células de la línea celular SiHa, más preferiblemente al menos aproximadamente 22.000 células/cm², muy preferiblemente al menos aproximadamente 23.000 células/cm².

La capacidad de inmovilización mejorada del sustrato prerrecubierto según la presente invención puede observarse asimismo a través de procedimientos analíticos adicionales. Un procedimiento adecuado para su uso en la cuantificación de la densidad de carga del sustrato recubierto sería medir directamente la densidad de carga en términos de densidad de carga por área de sustrato recubierto. Otro procedimiento sería medir indirectamente la densidad de carga mediante correlación con otra propiedad mensurable. Por ejemplo, la densidad de carga del material de recubrimiento polimérico recubierto en el sustrato puede cuantificarse mediante una medición espectrográfica de un pigmento asociado al sustrato recubierto (por ejemplo, adsorbido en el mismo).

Según se mencionó previamente, la capacidad de un sustrato recubierto de adherir una muestra biológica (generalmente por estar cargado negativamente) está relacionada directamente con la cantidad de exceso de carga positiva en la superficie del portaobjetos. Cuando un pigmento cargado negativamente está asociado con la superficie del portaobjetos, el exceso de carga positiva en la superficie del portaobjetos puede cuantificarse mediante un análisis espectrográfico del pigmento. Es bien conocido en la técnica que la absorción de radiación electromagnética por un pigmento a una longitud de onda dada es directamente proporcional a la concentración del pigmento. Por lo tanto, dada una relación proporcional entre el pigmento aniónico y el material de recubrimiento catiónico, una medición de la absorbancia del pigmento asociado al material de recubrimiento es un indicador fiable de la cantidad de exceso de carga positiva en la superficie del sustrato recubierto. En otras palabras, cuanto mayor es la densidad de carga, mayor es la concentración del pigmento adsorbido en el sustrato recubierto, y mayor es la absorción por parte del pigmento de la radiación electromagnética a una longitud de onda dada. Dicha técnica de medición la describen Tadao Sakai y Akihiko Hirose (Talanta 59 (2003) 167 - 175), que se incorpora al presente documento como referencia.

Múltiples pigmentos conocidos en la técnica son útiles en una técnica analítica para cuantificar la densidad de carga de un material de recubrimiento polimérico recubierto en un sustrato según la presente invención. Una clase de pigmentos particularmente útil para cuantificar la densidad de carga de un sustrato recubierto en la presente invención es los pigmentos de xanteno, tales como eosina y tetrayodofluoresceína. Un pigmento particularmente útil según la presente invención es Eosina Y (mostrada continuación en la fórmula 8) que es, en una disolución acuosa neutra, dianiónico. Como especie dianiónica, el pigmento se une a especies monocatiónicas en una relación de 1:2.



(8)

La Eosina Y adsorbida en un polímero catiónico, tal como el PDDA, tiene una longitud de onda de absorción máxima ($\lambda_{m\acute{a}x}$) de aproximadamente 542 nm. Por lo tanto, las mediciones de absorción a esta longitud de onda son eficaces para la cuantificación del exceso de carga positiva en la superficie de un sustrato recubierto. Dichas mediciones pueden ser realizadas con cualquier dispositivo analítico conocido en la técnica como útil para dichas mediciones, tal como un espectrofotómetro de UV-Vis. Un ejemplo de la medición de la densidad de carga de un sustrato recubierto con un material de recubrimiento polimérico según la presente invención se proporciona a continuación en el Ejemplo 4.

Un sustrato recubierto según la presente invención, recubierto con un material de recubrimiento polimérico, tiene un exceso de sitios de carga positiva, siendo dicho exceso de una cantidad tal que une eficazmente una muestra biológica. El material de recubrimiento polimérico del sustrato recubierto es eficaz para unir una muestra biológica según la presente invención cuando el material de recubrimiento polimérico muestra al menos una densidad de carga mínimamente aceptable. Puede observarse fácilmente que la densidad de carga de un sustrato prerrecubierto preparado según la presente invención, a través de una medición cuantitativa, es mucho mayor que la densidad de carga de un sustrato prerrecubierto que no está preparado según la presente invención. Cuando se usa el pigmento Eosina Y en un procedimiento de cuantificación como el descrito anteriormente, un sustrato prerrecubierto según la presente invención mostraría una absorbancia que es al menos dos veces mayor que la absorbancia sobre un sustrato no preparado según la presente invención. Más preferiblemente, la absorbancia mostrada por un sustrato según la presente invención es al menos tres veces mayor que la absorbancia en un sustrato no preparado según la presente invención. Incluso más preferiblemente, la absorbancia mostrada por un sustrato según la presente invención es al menos cuatro veces mayor que la absorbancia en un sustrato no preparado según la presente invención.

Según una forma de realización de la presente invención, se proporciona un portaobjetos de vidrio prerrecubierto adaptado para la inmovilización de una muestra biológica para su análisis. El portaobjetos de vidrio tiene una pluralidad de grupos aniónicos, y el portaobjetos está recubierto con un material de recubrimiento polimérico no peptídico que comprende una pluralidad de grupos catiónicos. El portaobjetos de vidrio prerrecubierto tiene una densidad de carga tal que cuando el pigmento Eosina Y se adsorbe en el portaobjetos recubierto, y a continuación se somete a una radiación electromagnética a una longitud de onda de 542 nm, el pigmento muestra una absorbancia de al menos aproximadamente 0,05, lo que es indicativo de una densidad de carga mínimamente aceptable (es decir, un exceso de carga positiva) en el material de recubrimiento polimérico que recubre el portaobjetos de vidrio. Preferiblemente, la absorbancia es de al menos aproximadamente 0,1. Más preferiblemente, la absorbancia es de al menos aproximadamente 0,15.

Como conocerá el experto en la técnica, la elección del sustrato podría afectar a la absorbancia medida del pigmento adsorbido sobre el material de recubrimiento usado para recubrir el sustrato. Consecuentemente, si se usa un sustrato distinto a un portaobjetos de vidrio según la presente invención, los valores de la absorbancia podrían variar del intervalo proporcionado anteriormente. No obstante, como se mencionó anteriormente, un sustrato recubierto según la presente invención mostraría una absorbancia que es al menos aproximadamente dos veces mayor que la absorbancia mostrada cuando el mismo sustrato está recubierto mediante un procedimiento que no es según la presente invención, preferiblemente al menos aproximadamente tres veces mayor, muy preferiblemente al menos aproximadamente cuatro veces mayor.

La muestra para su inmovilización sobre el sustrato recubierto con el material de recubrimiento polimérico puede ser cualquier muestra con grupos aniónicos capaces de interactuar con los grupos catiónicos del material de recubrimiento polimérico, y ser por tanto inmovilizada sobre el mismo. Preferiblemente, la muestra comprende un componente biológico. Algunos ejemplos de muestras biológicas para su inmovilización sobre el sustrato recubierto según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células, tejido, fluidos, ácidos nucleicos, incluyendo polinucleótidos y oligonucleótidos (por ejemplo, ADN, ARN y fragmentos de los mismos), polipéptidos y proteínas.

En una forma de realización según la presente invención, se inmoviliza una monocapa de la muestra biológica sobre el sustrato recubierto con el material de recubrimiento polimérico. La expresión "monocapa" pretende indicar que sólo se deposita una capa del material en, y se inmoviliza sobre, el sustrato recubierto. Consecuentemente, no se inmovilizan capas adicionales además de, particularmente sobre, la muestra biológica, que podrían obstruir la visión e impedir el análisis de la muestra biológica inmovilizada directamente sobre el material de recubrimiento polimérico en el sustrato.

La muestra biológica puede inmovilizarse en el sustrato recubierto para una variedad de usos. Preferentemente, el uso es un uso diagnóstico. Por ejemplo, la muestra biológica podría inmovilizarse con el fin de una extracción a partir de una muestra mayor, para un procesado o pruebas adicionales, y para diversos procedimientos analíticos. Algunos ejemplos específicos no limitantes de usos del sustrato recubierto incluyen, micromatrices de tejido (TMA), micromatrices citológicas (CMA), micromatrices de ácidos nucleicos y otros diagnósticos citológicos o histológicos. Además de dichos usos específicos, los sustratos prerrecubiertos de la presente invención también podrían usarse para la inmovilización de varias muestras biológicas para kits de ensayo diagnóstico manuales o automatizados.

El sustrato prerrecubierto de la invención puede usarse en una variedad de procedimientos diagnósticos. Por ejemplo, el sustrato prerrecubierto podría usarse para inmovilizar un anticuerpo que es selectivo para una proteína en particular. En otro ejemplo, el sustrato prerrecubierto podría usarse para inmovilizar un sustrato reactivo, que sería particularmente útil para aislar una proteína en particular, que es una enzima capaz de actuar sobre el sustrato reactivo. Otros usos diagnósticos similares también están englobados por la presente invención.

En una forma de realización de la presente invención, se proporciona una microesfera prerrecubierta. Preferiblemente, la microesfera prerrecubierta está adaptada para extraer un componente biológico a partir de una muestra. La microesfera en esta forma de realización tiene una superficie que comprende una pluralidad de grupos aniónicos capaces de interactuar con los grupos catiónicos de un material de recubrimiento polimérico no peptídico, según se describió anteriormente. Consecuentemente, la microesfera tiene un material de recubrimiento polimérico no peptídico superyacente y unido iónicamente a la superficie de la microesfera. Por lo tanto, la microesfera recubierta tiene una pluralidad de grupos catiónicos expuestos para interactuar con los grupos aniónicos de los componentes biológicos de interés de la muestra. Entonces el componente biológico puede ser inmovilizado en la superficie de la microesfera y ser extraído a partir de la muestra.

La microesfera prerrecubierta comprende preferentemente un material elegido del grupo que consiste en vidrio, polímeros, sílices, metales, óxidos metálicos y cerámicas. En una forma de realización particularmente preferida, la microesfera comprende un polímero elegido del grupo que consiste en poliestireno, poliacrilato, polimetacrilato, polietileno, polipropileno, poliéster, poliuretano, poliamida, policarbonato, polidimetilsiloxano, polidialquilsiloxano, celulosa, derivados de los mismos, copolímeros de los mismos y combinaciones de los mismos.

Las microesferas prerrecubiertas según la presente invención pueden usarse en una variedad de procedimientos de extracción y separación, tales como los que se han descrito previamente, y estarían fácilmente contemplados por el experto en la técnica. Por ejemplo, las microesferas prerrecubiertas podrían usarse en varios procedimientos de separación cromatográfica. Adicionalmente, las microesferas prerrecubiertas podrían insertarse en una muestra y eliminarse selectivamente para extraer un componente biológico de la misma.

Por supuesto, la presente invención también incluye otras múltiples formas de realización donde un sustrato prerrecubierto según se describe en este documento puede usarse en un procedimiento diagnóstico, y la invención no está limitada por la presente desvelación. Por ejemplo, las formas de realización donde el sustrato prerrecubierto es un portaobjetos de microscopio se han descrito previamente en este documento.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de análisis de una muestra biológica. El procedimiento comprende generalmente proporcionar un sustrato prerrecubierto adaptado para inmovilizar una muestra biológica, donde el sustrato está recubierto con un material de recubrimiento polimérico según se describe en este documento, inmovilizando la muestra biológica en el sustrato prerrecubierto, y analizando la muestra biológica inmovilizada en el sustrato prerrecubierto.

En una forma de realización particular, la etapa de analizar la muestra biológica inmovilizada en el portaobjetos prerrecubierto se realiza mediante el uso de un instrumento diagnóstico; sin embargo, la presente invención también contempla el análisis de la muestra inmovilizada por un individuo sin la ayuda de instrumentación adicional (es decir, únicamente mediante el uso de los sentidos).

Algunos ejemplos de instrumentos diagnósticos útiles en el análisis de la muestra inmovilizada según el presente procedimiento incluyen, pero no se limitan a, microscopios (tales como microscopios ópticos o microscopios electrónicos), cromatógrafos, espectrómetros y dispositivos de imagen (tales como cámaras digitales, videocámaras y cámaras de dispositivo de carga acoplada (CCD)).

La presente invención también incluye varias formas de realización donde el sustrato prerrecubierto de la invención tiene otros usos distintos a los diagnósticos, según se describió previamente. Por ejemplo, en una forma de realización, se proporciona un dispositivo útil para la recolección de uno o más contaminantes biológicos. En esta forma de realización, como antes, el sustrato comprende un material con una pluralidad de grupos aniónicos que está recubierto con un material de recubrimiento polimérico no peptídico. En la forma de realización particularmente preferida de esta forma de realización, el sustrato comprende un material fibroso. El material fibroso puede ser natural o sintético y puede ser tejido o no tejido. Algunos ejemplos no limitantes de materiales fibrosos útiles como dispositivo de recolección de contaminantes biológicos incluyen algodón, celulosa y polietileno.

En una forma de realización preferida, el dispositivo de recolección de contaminantes biológicos se elige del grupo que consiste en gasa, paños y apósitos médicos. Consecuentemente, el dispositivo de recolección de contaminantes biológicos pueden usarse en la transferencia de muestras, en procedimientos médicos y en otras situaciones donde sea útil recoger o recolectar material biológico posible o conocido para evitar que el material biológico contamine un material o una zona. Por ejemplo, el dispositivo de recolección de contaminantes biológicos podría usarse para mantener un portaobjetos con una muestra de ADN en el mismo. Consecuentemente, se evita que ADN extraño, tal como el del individuo que maneja el portaobjetos, contamine la muestra de ADN del portaobjetos. De forma análoga, el dispositivo de recolección de contaminantes podría usarse en una zona quirúrgica para recoger material biológico

para evitar que el material biológico contamine la zona quirúrgica.

En una forma de realización particularmente preferida de la invención, el dispositivo de recolección de contaminantes biológicos es un guante, tal como un guante quirúrgico. El guante podría estar formado por un material fibroso recubierto con un material de recubrimiento polimérico según se describió anteriormente. Alternativamente, el guante podría estar formado por un polímero natural o sintético (por ejemplo, un guante de "caucho").

Algunas formas de realización adicionales de la presente invención se describen con más claridad según los siguientes ejemplos experimentales.

EXPERIMENTAL

La presente invención se ilustra más completamente mediante los siguientes ejemplos, que se establecen para ilustrar la presente invención y no deben interpretarse como limitantes de la misma.

EJEMPLO 1

Prerrecubrimiento de un portaobjetos de vidrio para microscopio con PDDA

En la preparación de un portaobjetos de vidrio para microscopio prerrecubierto, se preparó una disolución de PDDA en agua desionizada de forma que la concentración final de la disolución era de 1% de PDDA (+/- 0,05%) p/v. El pH de la disolución se ajustó entonces a 9,0 (+/- 0,2) mediante la adición de NaOH 1 N.

La disolución de PDDA con el pH ajustado se puso en un baño de tinción de portaobjetos manual. Se cargó una rejilla de tinción de portaobjetos manual con portaobjetos de vidrio para microscopio, y la rejilla con los portaobjetos de vidrio para microscopio se añadió a la disolución de PDDA del baño, con la disolución cubriendo los portaobjetos hasta el borde esmerilado de los portaobjetos. Los portaobjetos se dejaron reposar en la disolución de PDDA durante aproximadamente 10 segundos. Se retiró la rejilla del baño, los portaobjetos se extrajeron de la rejilla y los portaobjetos se colocaron en una posición vertical ligeramente angulada, y se dejaron secar a temperatura ambiente. Los portaobjetos con la disolución de PDDA aplicada en los mismos se dejaron secar hasta sequedad visual y después se aclararon con agua desionizada. Los portaobjetos aclarados se dejaron secar de nuevo proporcionando portaobjetos recubiertos con PDDA listos para su uso en el análisis de muestras aniónicas.

EJEMPLO 2

Comparación de un portaobjetos para microscopio recubierto con PDDA con un portaobjetos para microscopio recubierto con PLL

Se preparó una disolución de PDDA y se recubrieron múltiples portaobjetos de vidrio para microscopio usando la disolución según Ejemplo 1. De forma similar se recubrieron múltiples portaobjetos para microscopio adicionales usando reactivo de recubrimiento para portaobjetos PREPSTAIN™ (PLL) (disponible en TriPath Imaging, Inc.).

Los portaobjetos recubiertos con PDDA y los portaobjetos recubiertos con PLL se separaron en dos grupos. Un grupo de portaobjetos recubiertos con PDDA se almacenó durante 16 semanas a temperatura ambiente. De forma análoga, un grupo de portaobjetos recubiertos con PLL se almacenó durante 16 semanas a temperatura ambiente. Un segundo grupo de portaobjetos recubiertos con PDDA, y un segundo grupo de portaobjetos recubiertos con PLL, se almacenaron durante 5 semanas a temperatura ambiente y se almacenaron durante 9 semanas adicionales a 45°C, para un total de 16 semanas de almacenamiento. Al final de las 16 semanas, se extrajeron los cuatro grupos de portaobjetos de su almacenamiento para unas pruebas adicionales, según se describe a continuación. Como comparativo en la experimentación se preparó un conjunto de portaobjetos recubiertos con PLL reciente según el mismo procedimiento al descrito previamente para la comparación con los Grupos de Estabilidad.

Los portaobjetos de cada uno de los cinco grupos descritos anteriormente se sometieron a un único conjunto de material citológico y subsiguientemente se tiñeron usando el método de PREPSTAIN™. Los portaobjetos de los cinco grupos se compararon entonces sobre la base de la cantidad de material citológico que se había adherido a la superficie recubierta.

Se apreció que los portaobjetos recubiertos con PLL tenían una estabilidad reducida, que disminuía con el tiempo y la temperatura. Esta estabilidad reducida era visiblemente reconocible a partir de la cantidad disminuida de material citológico adherido y teñido presente en los portaobjetos recubiertos con PLL. El portaobjetos 1, el portaobjetos de control, se recubrió de nuevo con PLL en el momento de la evaluación, y no se sometió a las 16 semanas de prueba. El portaobjetos 2, recubierto con PLL, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 16 semanas. Una comparación del portaobjetos 2 con el portaobjetos 1 indicó menos material citológico teñido adherido al portaobjetos 2, lo que era indicativo de una degradación del recubrimiento polimérico durante el periodo de 16 semanas. El portaobjetos 4, también recubierto con PLL, reposó durante 5 semanas a temperatura ambiente y

durante 9 semanas a 45°C. La degradación del polímero en este portaobjetos era incluso más apreciable. Una inspección visual del portaobjetos 4 indicó sólo un mínimo de material citológico adherido a la superficie del portaobjetos (es decir, prácticamente no hay material citológico teñido visible).

5 El portaobjetos 3 se recubrió con PDDA y se almacenó a temperatura ambiente durante 16 semanas. El portaobjetos 5 se recubrió con PDDA, se almacenó a temperatura ambiente durante 5 semanas y después se almacenó a 45°C durante 9 semanas. Ambos portaobjetos 3 y 5 indicaron poca o ninguna degradación del recubrimiento. Esto era visiblemente apreciable por la completa y uniforme distribución del material citológico teñido adherido a los portaobjetos recubiertos. Además, en comparación con el portaobjetos de control recién recubierto con PLL (portaobjetos 1), los portaobjetos con PDDA, incluso después de reposar durante 16 semanas, mostraron una tinción más profunda del recubrimiento, indicando una concentración aumentada del polímero (y por lo tanto de los sitios de unión catiónicos) en los portaobjetos recubiertos con PDDA en comparación con los portaobjetos recubiertos con PLL.

15 EJEMPLO 3

Comparación de portaobjetos de microscopio recubiertos usando diversas metodologías de recubrimiento

20 Se recubrieron dos conjuntos de portaobjetos de microscopio con PDDA según el procedimiento de la presente invención y el procedimiento descrito previamente. A continuación se proporciona una comparación de las capacidades de inmovilización de los portaobjetos.

25 Se recubrieron doce portaobjetos de microscopio con PDDA según la presente invención. Particularmente, se preparó una disolución de PDDA en agua desionizada al 0,25% (p/v) y se ajustó el pH usando NaOH hasta un pH final de 9,2. Los 12 portaobjetos de microscopio se extrajeron del envase según se recibieron del fabricante y no se sometieron específicamente a ningún proceso de limpieza previo al recubrimiento con la disolución de PDDA. Después, los portaobjetos sin limpiar se sumergieron manualmente en la disolución de PDDA, se extrajeron, se dejaron secar en las condiciones ambientales hasta sequedad visual, y después se aclararon con agua desionizada para eliminar cualquier PDDA residual. Los portaobjetos aclarados se dejaron secar antes de su uso.

30 Se prepararon doce portaobjetos de microscopio adicionales según procedimientos de preparación conocidos, para su comparación con los portaobjetos recubiertos con PDDA de la invención. En primer lugar, los 12 portaobjetos, tomados nuevos del mismo envase y fabricante, se limpiaron según el Método 2 desvelado por Cras, J. J., y col., Biosensors & Bioelectronics, 14 (1999) 683 - 688. Entonces los portaobjetos limpios se recubrieron con una disolución acuosa de PDDA al 1,0% según el procedimiento proporcionado por Seyfert, S., y col., Biomaterials, 16 (1995) 201 - 207. Particularmente, los portaobjetos limpios se sumergieron manualmente la disolución de PDDA al 1%, se extrajeron de la disolución e inmediatamente se aclararon para eliminar cualquier disolución residual de PDDA (es decir, no se realizó un secado del recubrimiento antes del aclarado). Los portaobjetos aclarados se dejaron secar antes de su uso.

40 Para preparar la muestra celular para su inmovilización en los portaobjetos de microscopios, se obtuvieron tres frascos de células de control SiHa (de TriPath Imaging, Inc.). Las células SiHa usadas en la experimentación procedían de una única línea celular descrita por primera vez por Friedl, F., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 135 (1970) 543 - 545. El contenido de los tres frascos se centrifugó (800 g durante 10 minutos) para compactar las células en un sedimento. El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en agua desionizada. Entonces las células se volvieron a compactar en un sedimento mediante centrifugación (800 g durante 10 minutos). El sobrenadante se desechó, y las células se resuspendieron en aproximadamente 30 ml de agua desionizada. Se transfirió un ml de la suspensión celular a cada uno de los 24 tubos cónicos, y las muestras se procesaron según el protocolo estándar usando un instrumento de procesamiento de portaobjetos TriPath Imaging PREPSTAIN™ (las muestras se aplicaron a los portaobjetos y se tiñeron).

50 Después de teñir los portaobjetos y cubrirlos, los portaobjetos se evaluaron con un analizador de portaobjetos TriPath Imaging FOCALPOINT™ Slide Profiler. El instrumento contó el número de células de cada portaobjetos, y se extrajo el recuento celular de cada portaobjetos de microscopio a partir de la base de datos del instrumento (siendo el recuento celular directamente proporcional al número de objetos registrados por el analizador de portaobjetos).

60 La muestra celular de cada portaobjetos de microscopio se preparó como un círculo uniforme con un diámetro conocido de 1,3 cm (13 mm). Consecuentemente, el área de muestra de cada portaobjetos era de 1,33 cm² (132,7 mm²). El número de células inmovilizadas en cada portaobjetos se muestra continuación. La Tabla 1 proporciona el número de células inmovilizadas sobre los portaobjetos preparados según los procedimientos de la presente invención, y la Tabla 2 proporciona el número de células inmovilizadas sobre los portaobjetos preparados según procedimientos descritos previamente.

65

Tabla 1	
Portaobjetos nº	Recuento celular
1	28.997
2	27.914
3	25.992
4	24.398
5	22.525
6	39.738
7	41.413
8	36.446
9	38.968
10	26.200
11	27.023
12	35.053
Media	31.222

Tabla 2	
Portaobjetos nº	Recuento celular
13	25.521
14	24.361
15	24.712
16	25.086
17	26.011
18	25.419
19	23.528
20	29.788
21	28.230
22	22.035
23	25.843
24	24.146
Media	25.390

- 5 La comparación de los recuentos celulares proporcionados anteriormente en la Tabla 1 y en la Tabla 2 usando la distribución de la *t* de Student revela un nivel de significación de menos del 0,005. Consecuentemente, los recuentos celulares ilustran con significación estadística que los portaobjetos recubiertos con PDDA preparados según la presente invención inmovilizan un mayor número medio de células que los portaobjetos recubiertos con PDDA preparados según procedimientos conocidos previamente. En particular, los portaobjetos recubiertos con PDDA de la invención inmovilizaron un número medio de células un 22,97% mayor que el número medio de células inmovilizadas sobre los portaobjetos recubiertos con PDDA preparados según los procedimientos conocidos previamente.

- 15 Según se mencionó anteriormente, el área de muestra celular de cada portaobjeto era de 1,33 cm² (132,7 mm²). Consecuentemente, es posible calcular el número medio de células inmovilizadas en un área superficial dada. Con los portaobjetos preparados según la presente invención, el número medio de células por área superficial inmovilizadas era de 23.475 células/cm² (235,2 células/mm²). Por el contrario, los portaobjetos preparados según procedimientos conocidos previamente tenían un número medio de células por área superficial inmovilizadas de sólo 19.090 células/cm² (191,3 células/mm²).

20 EJEMPLO 4

Análisis de los portaobjetos recubiertos con PDDA mediante la absorción UV del pigmento Eosina Y adsorbido

Se obtuvieron quince portaobjetos de microscopio ESCO (número de catálogo 2951). Tres portaobjetos se apartaron

para su uso como portaobjetos de control. Los restantes doce portaobjetos se dividieron en cuatro grupos de tres portaobjetos cada uno. Los portaobjetos del Grupo 1 se recubrieron con una disolución de PDDA al 1% a un pH de aproximadamente 9,2. Los portaobjetos recubiertos se dejaron secar durante 1 hora, se aclararon con agua desionizada, y se dejaron secar durante 1 hora adicional. Los portaobjetos del Grupo 2 se recubrieron con una disolución de PDDA al 1% a un pH de aproximadamente 9,2. Los portaobjetos recubiertos se aclararon inmediatamente con agua desionizada (no se secó el recubrimiento de PDDA), y los portaobjetos aclarados se dejaron secar durante 1 hora. Los portaobjetos del Grupo 3 se recubrieron con una disolución de PDDA al 1% a un pH de aproximadamente 5,3. Los portaobjetos recubiertos se dejaron secar durante 1 hora, se aclararon con agua desionizada, y se dejaron secar durante 1 hora adicional. Los portaobjetos del Grupo 4 se recubrieron con una disolución de PDDA al 1% a un pH de aproximadamente 5,3. Los portaobjetos recubiertos se aclararon inmediatamente con agua desionizada (no se secó el recubrimiento de PDDA), y los portaobjetos aclarados se dejaron secar durante 1 hora. Los portaobjetos del Grupo 5 (los portaobjetos de control) no se recubrieron.

Todos los portaobjetos de los anteriores 5 grupos se prepararon para tratamiento colocando cada portaobjetos en una base de soporte de portaobjetos de microscopio Hettich y posicionando una cámara de sedimentación Hettich en los portaobjetos para aislar una porción del portaobjetos. La porción aislada de la superficie de cada portaobjetos se trató con 200 ml de una disolución de Eosina Y al 5% p/v en agua desionizada durante 1 minuto. La disolución de colorante se eliminó mediante succión a vacío, y cada portaobjetos se trató dos veces con 2,5 ml de agua desionizada, dejando cada aclarado reposar durante 1 minuto antes de eliminarlo con la succión a vacío. Cada portaobjetos se trató entonces dos veces con 2,5 ml de isopropanol, dejando reposar cada aclarado durante 1 minuto antes de eliminarlo mediante la succión a vacío. Cada portaobjetos se extrajo entonces del soporte de portaobjetos y se dejó secar durante al menos 10 minutos. Cada portaobjetos tratado con el pigmento tenía una porción circular teñida con un área de aproximadamente 240 mm², estando el centro de la porción circular teñida a aproximadamente 17,5 mm del extremo corto no esmerilado del portaobjetos.

El análisis espectrográfico se realizó usando un espectrofotómetro de UV-Vis a 542 nm. El instrumento se calibró a cero usando un portaobjetos de vidrio no recubierto, no tratado, plano. La absorbancia medida para cada portaobjetos (proporcionada a continuación en la Tabla 6) indicó una diferencia significativa entre los portaobjetos recubiertos sin secado del recubrimiento polimérico antes del aclarado con respecto a aquellos recubiertos mediante el procedimiento de la presente invención. La adsorción de la Eosina Y sobre las superficies cargadas positivamente de los portaobjetos recubiertos con PDDA era mucho mayor en los portaobjetos que se dejaron secar a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora antes de ser aclarados con agua desionizada.

Tabla 3

Procedimiento de tratamiento del portaobjetos	Absorbancia media
Grupo 1 - recubierto con PDDA (1%), pH 9,2, secado antes del aclarado	0,158
Grupo 2 - recubierto con PDDA (1%), pH 9,2, no secado antes del aclarado	0,037
Grupo 3 - recubierto con PDDA (1%), pH 5,3, secado antes del aclarado	0,109
Grupo 4 - recubierto con PDDA (1%), pH 5,3, no secado antes del aclarado	0,023
Grupo 5 - no recubierto	0,002

Una comparación directa de los portaobjetos recubiertos sin secado (Grupo 2) con los portaobjetos recubiertos según los procedimientos de la presente invención (Grupo 1), ambos a pH 9,2, indican que el exceso de carga positiva fue aproximadamente 4,3 (+/- 0,8) veces mayor en los portaobjetos preparados según la presente invención. De forma análoga, una comparación directa de los portaobjetos sin secado (Grupo 4) y los portaobjetos recubiertos según los procedimientos de la presente invención (Grupo 3), ambos a pH 5,3, indica que el exceso de carga positiva fue aproximadamente 4,7 (+/- 3,0) veces mayor en los portaobjetos preparados según la presente invención. La contribución del propio vidrio a la adsorción del pigmento de Eosina Y es despreciable, según indicaron los valores de absorción próximos a cero de los portaobjetos no recubiertos (portaobjetos de control). La adsorción del pigmento de Eosina Y puede por tanto atribuirse únicamente a las cargas positivas portadas por el PDDA recubierto sobre los portaobjetos.

A la mente del experto en la técnica a la que pertenecen estas invenciones acudirán muchas modificaciones y otras formas de realización de las invenciones establecidas en este documento, teniendo el beneficio de las enseñanzas presentadas en la descripción anterior. Por lo tanto, debe entenderse que las invenciones no están limitadas a las formas de realización específicas desveladas, y que las modificaciones y otras formas de realización pretenden estar incluidas en el ámbito de las reivindicaciones anexas. Aunque en este documento se emplean términos específicos, se usan en un sentido genérico y descriptivo únicamente, y no con fines limitantes.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar un sustrato recubierto adaptado para inmovilizar una muestra biológica, comprendiendo dicho procedimiento:
- 5 proporcionar un sustrato con una superficie que comprende una pluralidad de grupos aniónicos;
poner en contacto el sustrato con una composición que comprende una disolución de un material polimérico catiónico no peptídico, teniendo la disolución un pH de 8 a 14, para formar un recubrimiento del material polimérico no peptídico en al menos una porción de la superficie del sustrato;
- 10 secar el recubrimiento del material polimérico no peptídico; y
aclamar el sustrato con el recubrimiento del material polimérico no peptídico seco sobre el mismo, donde el recubrimiento del material polimérico no peptídico esta posicionado para inmovilizar una muestra biológica.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, donde el procedimiento comprende formar un recubrimiento de una única capa del material polimérico no peptídico sin ninguna capa intermedia de un material de recubrimiento diferente entre dos o más capas del material de recubrimiento polimérico no peptídico.
3. El procedimiento según la reivindicación 1, donde dicha etapa de secado del sustrato recubierto se lleva a cabo a temperatura ambiente, o a una temperatura de 35°C a 120°C; o donde dicha etapa de secado del sustrato recubierto se lleva a cabo durante un periodo de tiempo de desde aproximadamente 5 minutos hasta aproximadamente 1 hora.
- 20 4. El procedimiento según la reivindicación 3, donde dicha etapa de secado del sustrato recubierto se lleva a cabo a una temperatura de 35°C a 120°C; y durante un periodo de tiempo de 1 minuto a 20 minutos.
- 25 5. El procedimiento según la reivindicación 1, donde el sustrato se elige de entre portaobjetos, placas, microesferas, tubos de ensayo, cubetas, tiras reactivas, hisopos y gasa; o donde el sustrato es un portaobjetos de microscopio.
6. El procedimiento según la reivindicación 5, donde el portaobjetos comprende un material elegido de entre vidrio, cerámica y materiales poliméricos.
- 30 7. El procedimiento según la reivindicación 6, donde el portaobjetos comprende un polímero elegido de entre poliestireno, polihidroxiacetato, tereftalato de polietileno, politetrafluoroetileno, etileno fluorado, polidimetilsiloxano, copolímeros o terpolímeros de los mismos, y combinaciones de los mismos.
- 35 8. El procedimiento según la reivindicación 1, donde el material polimérico no peptídico comprende al menos un monómero elegido de entre dialildimetilamonio, alilamina, metilacrilamidopropiltrimetilamonio, acrilamida, ácido acrílico, metacriloxietiltrimetilamonio, 4-vinil-benciltrimetilamonio, ácido metacrílico, acrilato de hidroxietilo, metacrilato, metacrilato de metilo, metacrilato de hidroxietilo, 4-vinilpiridinio, 4-vinil-1-metilpiridinio, acrilato de metilo, acrilato de etilo, acrilato de butilo, acrilato de 2-etil hexilo, acrilato de dimetilaminoetilo, cloruro cuaternario de dimetilaminoetilacrilato de metilo, dimetilaminopropilacrilamida, dimetilaminopropilacrilamida cloruro de metilo cuaternario, acriloxietildimetilbencilamonio, acriloxietiltrimetilamonio, metacrilato de dimetilaminoetilo, metacriloxietildimetilamonio, metacriloxietiltrimetilbencilamonio, eteno, etilenoimina, propeno, estireno, cloruro de vinilo, isobutileno, trimetil-2-metacrilooletilamonio, trimetil-2-metacrilaminopropilamonio, y mezclas de los mismos.
- 40 9. El procedimiento según la reivindicación 1, donde el material polimérico no peptídico comprende un polímero elegido de entre polímeros alifáticos, polímeros vinílicos y mezclas de los mismos.
10. El procedimiento según la reivindicación 1, donde el material polimérico no peptídico comprende polidialildimetilamonio, polialilamina o un copolímero de dialildimetilamonio y al menos un monómero adicional.
- 50 11. El procedimiento según la reivindicación 1, donde el material de recubrimiento polimérico no peptídico está presente en disolución a una concentración del 0,01% (p/v) al 10% (p/v) o del 0,15% (p/v) al 0,75% (p/v); o donde el material de recubrimiento polimérico no peptídico tiene un peso molecular medio de al menos 75.000 Da o de 400.000 Da a 500.000 Da.
- 55 12. El procedimiento según la reivindicación 1, donde la superficie del sustrato no ha sido sometida a un proceso de limpieza previo al contacto del sustrato con la disolución del material polimérico no peptídico.
- 60 13. El procedimiento según la reivindicación 12, donde la superficie del sustrato no ha sido sometida a un proceso de limpieza que incorpora un ácido, una base o un disolvente orgánico previo al contacto del sustrato con la disolución del material polimérico no peptídico.
- 65 14. El procedimiento según la reivindicación 1, donde la superficie del sustrato no ha sido sometida a un proceso de silanización previo al contacto del sustrato con la disolución del material polimérico no peptídico.

15. Un sustrato prerrecubierto preparado según el procedimiento de la reivindicación 1.
16. Un sustrato prerrecubierto, preparado según la reivindicación 1, adaptado para la inmovilización de una muestra biológica para su análisis, comprendiendo el sustrato una superficie con una pluralidad de grupos aniónicos, donde el sustrato está recubierto con una única capa de un material polimérico no peptídico que comprende una pluralidad de grupos catiónicos sin la intervención de capas intermedias de un material de recubrimiento diferente entre dos o más capas del material de recubrimiento polimérico no peptídico, y donde la superficie del sustrato prerrecubierto es capaz de inmovilizar un número medio de células por área superficial de al menos aproximadamente 20.000 células/cm² cuando el sustrato prerrecubierto se pone en contacto con 1 ml de una suspensión de células procedentes de la línea celular SiHa.
17. El sustrato prerrecubierto según la reivindicación 16, donde la superficie del sustrato prerrecubierto es capaz de inmovilizar un número medio de células por área superficial de al menos aproximadamente 22.000 células/cm² o de al menos aproximadamente 23.000 células/cm² cuando el sustrato prerrecubierto se pone en contacto con 1 ml de una suspensión de células procedentes de la línea celular SiHa.
18. El sustrato prerrecubierto según la reivindicación 16, donde el sustrato es un sustrato según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.
19. El sustrato prerrecubierto según la reivindicación 18, donde el sustrato es un portaobjetos de microscopio y el material polimérico no peptídico es un material polimérico no peptídico según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10.
20. El sustrato prerrecubierto según la reivindicación 18, donde el sustrato es un portaobjetos de microscopio y el material polimérico no peptídico recubierto sobre el portaobjetos tiene un espesor de capa de 0,005 μm a 500 μm, o un espesor de capa de 1 μm a 50 μm.
21. El sustrato prerrecubierto según la reivindicación 16, donde el material polimérico no peptídico tiene un peso molecular medio de al menos aproximadamente 75.000 Da, o de desde aproximadamente 400.000 Da hasta aproximadamente 500.000 Da.
22. El sustrato prerrecubierto según la reivindicación 18, donde el sustrato es un portaobjetos de microscopio y el portaobjetos está particularmente adaptado para la inmovilización para el análisis de una muestra biológica elegida del grupo que consiste en una muestra de ADN, una muestra de un polipéptido, una muestra de fluido, una muestra celular, una muestra de un nucleótido, una micromatriz de tejido, una micromatriz citológica y una micromatriz de ácidos nucleicos.
23. El sustrato prerrecubierto según la reivindicación 16, donde el material polimérico no peptídico recubierto sobre el sustrato se aplica al sustrato como una disolución, donde el material polimérico no peptídico está presente a una concentración del 0,01% (p/v) al 10% (p/v) o del 0,15% (p/v) al 0,75% (p/v).
24. Un procedimiento para analizar una muestra biológica que comprende:
- proporcionar un sustrato prerrecubierto de la reivindicación 15 ó 16;
 aplicar una muestra biológica al sustrato prerrecubierto para inmovilizar la muestra biológica en el sustrato; y
 analizar la muestra biológica inmovilizada en el sustrato prerrecubierto.
25. El procedimiento según la reivindicación 24, donde dicha etapa de análisis comprende el uso de un instrumento diagnóstico elegido del grupo que consiste en microscopios, cromatógrafos, espectrómetros y dispositivos de imagen.
26. El procedimiento según la reivindicación 24, donde la muestra biológica se elige de entre células, tejido, fluidos, ácidos nucleicos, polinucleótidos, oligonucleótidos, polipéptidos y proteínas.
27. El procedimiento según la reivindicación 24, donde el sustrato está adaptado para la inmovilización para su análisis de una muestra biológica elegida de entre una muestra de ADN, una muestra de un polipéptido, una muestra de fluido, una muestra celular, una muestra de un nucleótido, una micromatriz de tejido, una micromatriz citológica y una micromatriz de ácidos nucleicos.
28. El procedimiento según la reivindicación 24, donde el material polimérico no peptídico recubierto sobre el sustrato se aplica al sustrato como una disolución, donde el material polimérico no peptídico está presente a una concentración del 0,01% (p/v) al 10% (p/v) o del 0,15% (p/v) al 0,75% (p/v).