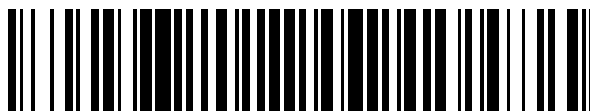


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 193**

51 Int. Cl.:

B32B 9/00 (2006.01)

B82B 1/00 (2006.01)

B82B 3/00 (2006.01)

C08J 5/18 (2006.01)

C08J 7/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2007** **E 07831170 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015** **EP 2082869**

54 Título: **Estructura polimérica similar a una película delgada y método para preparar la misma**

30 Prioridad:

27.10.2006 JP 2006292688

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.12.2015

73 Titular/es:

TAKEOKA, SHINJI (33.3%)
3-40-16-404, Tamagawa Setagaya-ku
Tokyo 158-0094, JP;
NANOTHETA CO., LTD. (33.3%) y
TORAY INDUSTRIES, INC. (33.3%)

72 Inventor/es:

TAKEOKA, SHINJI;
OKAMURA, YOSUKE;
FUJIE, TOSHINORI;
UTSUNOMIYA, SAORI y
GOTO, TAKAHIRO

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 553 193 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

Estructura polimérica similar a una película delgada y método para preparar la misma

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para preparar una estructura polimérica en película delgada que tiene sustancias funcionales idénticas o similares en su cara (superficie A) y en su cara posterior (superficie B).

10 **Antecedentes de la invención**

Como métodos para crear películas delgadas moleculares orgánicas se usan convencionalmente un método de recubrimiento por centrifugación, un método de polimerización electrolítica, un método de deposición en fase vapor, un método de polimerización por deposición en fase vapor y similares. Como un método para formar una capa de alineación, el método de Langmuir-Blodgett (LB) se conoce bien. Este método se realiza como sigue. Las moléculas anfífilas se disuelven en un disolvente orgánico volátil a desarrollarse en una interfaz gas-líquido. Después de que se vaporice el disolvente, la sustancia resultante se comprime. La capa monomolecular resultante se transfiere a un sustrato sólido. Con este método, el número de las capas de película delgada y el orden de laminación pueden controlarse. Sin embargo, este método es solamente aplicable a moléculas que pueden desarrollarse en una superficie de agua como una capa monomolecular y de esta manera es solamente eficaz para moléculas anfífilas, que son insolubles en agua. El método de LB no es eficaz debido a que el equipo a usarse es caro y no puede manejarse fácilmente.

Se ha establecido una tecnología para formar una monocapa auto-ensamblada (SAM) que incluye moléculas orgánicas alineadas regular y establemente en una superficie de un material metálico tal como oro o platino, o una superficie de un material inorgánico tal como silicio, sílice o vidrio. Las características de esta tecnología son que la monocapa se une fuertemente al sustrato y por lo tanto es estable y la monocapa puede formarse a bajo coste y de forma sencilla sin usar ningún equipo especial meramente sumergiendo el sustrato en una solución. Además, esta tecnología es aplicable a un sustrato que tenga una forma complicada. Esta tecnología está atrayendo la atención como, por ejemplo, una nanotecnología para construir un patrón de moléculas orgánicas en un patrón ultrafino formado por una tecnología de litografía⁽⁴⁾.

Está progresando un intento de construir una estructura tridimensional de forma ascendente laminando moléculas en un plano bidimensional, por ejemplo, por un método capa por capa (LbL) usando la interacción electrostática de los polielectrolitos. Este método de laminación se basa en el siguiente principio. Una superficie de sustrato se sumerge en una solución de polielectrolito que tiene la carga opuesta a la de la superficie del sustrato, de tal manera que una capa del polielectrolito se adsorbe a la superficie del sustrato por interacción electrostática. En este punto, la superficie del sustrato nuevamente se carga de forma opuesta por las cargas excesivas del polielectrolito adsorbente. Después, una capa del polielectrolito que tiene la carga opuesta a la de la capa del polielectrolito ya adsorbida se hace que se adsorba a la superficie. Repitiendo este proceso, puede formarse una estructura multicapa controlada para tener un grosor arbitrario. Por ejemplo, se ha informado que se inmoviliza una enzima, por interacción electrostática, en una estructura obtenida por el método LbL, para el fin de desarrollar nuevos dispositivos moleculares que incluyen reactores enzimáticos, biosensores y dispositivos emisores de luz⁽¹⁾. ⁽²⁾. Este método permite que se prepare una estructura tridimensional de forma sencilla sin usar ningún equipo especial y de esta forma es adecuada para inmovilizar moléculas de proteínas o similares que pueden volverse desnaturalizadas. En los últimos años, se ha propuesto⁽⁵⁾ un método, en donde se obtiene una estructura formando una estructura obtenida a través de un método LbL encima de una película de sacrificio y después la película de sacrificio se disuelve. Se ha informado también⁽⁶⁾ una tecnología para formar, encima de una SAM, una estructura obtenida a través de un método LbL y después transferir la estructura a una película de soporte.

Los presentes inventores previamente presentaron una estructura polimérica en película delgada de forma arbitraria y un método de preparación para la misma⁽³⁾. Por ejemplo, después de formar una monocapa auto-ensamblada en un cuerpo de sustrato de oro alrededor y posteriormente adsorbiendo y reticulando albúmina a la misma, la película delgada de polímero de albúmina alrededor se hace que exfolie fácilmente desde el cuerpo de sustrato de oro a través de un procesamiento tensioactivo.

Se sabe que puede obtenerse una estructura hueca que tiene un hueco de la forma del molde formando un complejo de polielectrolito en la superficie de un molde formado de una micropartícula o célula inorgánica o metálica y después disolviendo el molde⁽⁷⁾. Como la micropartícula que forma el molde, se usa sílice, perla de látex, resina de melanina o similares. El molde se disuelve con HF (fluoruro de hidrógeno), un disolvente orgánico, un ácido o similares. No hay problema donde se use una micropartícula esférica como un molde, pero un molde que tenga una forma complicada es altamente preciso y de esta manera es caro como una placa de impresión o un molde plástico. Por lo tanto, este método se usa solamente cuando el molde sea estable y reusable. Ya que las estructuras anteriormente descritas se forman de manera ascendente desde el sustrato, la superficie de una estructura tal en contacto con el sustrato no se modifica incluso después de que la estructura se libere del sustrato.

No hay informes relacionados con un método para modificar la superficie en contacto con el sustrato para una estructura obtenida por la nanotecnología existente. Además, no se conoce un método por el que la cara y la cara posterior de una estructura polimérica en película delgada en un estado de dispersión se modifiquen fácil y confiablemente con moléculas funcionales separadas.

Referencias

1. Patente japonesa n.º 3020428
2. Patente japonesa n.º 2966795
3. Opúsculo n.º WO 2006/025592
4. Daan, W et al., Angew. Chem. Int. Ed. 43, 2480-2495 (2004).
5. Mamedov, A. A. et al., Langmuir, 16, 5530-5533 (2000).
6. Stroock, A. D. et al., Langmuir, 19, 2466-2472 (2003).
7. David, I. et al., J. Phys. Chem. B, 105, 6846-6852 (2001).

Divulgación de la invención

La presente invención tiene como objetivo proporcionar un método para preparar una estructura polimérica que tiene sustancias funcionales idénticas o diferentes en su cara (superficie A) y en su cara posterior (superficie B).

Como resultado de estudios activos llevados a cabo para resolver los problemas anteriormente descritos, los presentes inventores descubrieron que se obtiene una estructura en película delgada formando una monocapa de patrón rectangular autoensamblada, por ejemplo, en un cuerpo de sustrato de silicio, provocando después que la albúmina como moléculas polifuncionales se adsorban a la misma y reticulando la albúmina, después uniendo una sustancia funcional a la cara, que es una de las superficies de la película delgada (la cara frontal, denominada la "superficie A"), exfoliando una película delgada de polímero de albúmina a partir del cuerpo de sustrato de oro a través del uso de una película de soporte soluble, uniendo una sustancia funcional idéntica o diferente a la otra superficie de la película delgada (denominada la "superficie B") y usando un disolvente para disolver la capa de soporte. Los presentes inventores también descubrieron lo siguiente. Se obtiene una estructura en película delgada uniendo una sustancia funcional a la superficie A de la película delgada, exfoliando la película delgada a partir del cuerpo de sustrato disolviendo la película de soporte soluble en un disolvente y después aplicando la superficie de la película delgada exfoliada encima de la película de soporte soluble formada en un cuerpo de sustrato diferente del anteriormente mencionado cuerpo de sustrato, uniendo una sustancia funcional idéntica a o diferente de la sustancia funcional anteriormente mencionada a la superficie B en la película delgada y después disolviendo la película de soporte en un disolvente. De esta manera, se ha completado la presente invención.

Como se define en las reivindicaciones, la invención proporciona métodos, para preparar una estructura polimérica en película delgada que tiene una sustancia funcional en la superficie A y en la superficie B de la película.

En la presente invención, la etapa de polimerizar y/o reticular las moléculas polifuncionales puede comprender adicionalmente la etapa de laminar polielectrolitos que tienen cargas opuestas entre sí de forma alterna para reticular los polielectrolitos en términos de cargas. Las moléculas polifuncionales pueden ser, por ejemplo, de un monómero polifuncional y/o de un macrómero polifuncional. El macrómero polifuncional es, por ejemplo, al menos uno de los siguientes seleccionados del grupo que consiste en una proteína, un ácido poliláctico, un copolímero de ácido poliláctico/ácido glicólico, policaprolactona, un polielectrolito y una perla polimérica. En la presente invención, los macrómeros polifuncionales se reticulan mediante, por ejemplo, reticulación física tal como desnaturalización térmica o plasticidad térmica o por fusión.

En la presente invención, la sustancia funcional es, por ejemplo, al menos una de las siguientes seleccionadas del grupo que consiste en: un compuesto polimérico, un polielectrolito, una proteína, un péptido, un polisacárido y un derivado de biotina.

Además, en la presente invención, la región es preferentemente una monocapa autoensamblada o una bicapa autoensamblada. En el presente documento, la monocapa autoensamblada puede estar formada por moléculas hidrófobas lineales que tienen al menos uno de los siguientes grupos seleccionados del grupo que consiste en, en un extremo, un grupo SH, un grupo cloroalquilsililo, un grupo alcoxiálquilsililo y un grupo vinilo.

En la presente invención, el cuerpo del sustrato puede estar total o parcialmente formado por una capa de cubierta de un metal o de un óxido del mismo, silicio, goma de silicio, sílice o vidrio, mica, un material de carbono tal como grafito, un material polimérico tal como polietileno, polipropileno, celofán o un elastómero o un compuesto de calcio tal como apatita.

En la presente invención, la película de soporte soluble o la región soluble puede estar formada por un polielectrolito tal como un ácido poliacrílico o un ácido polimetacrílico, polietilenglicol, poliácridamida, alcohol polivinílico, un polímero soluble en agua no iónico tal como un polisacárido tal como almidón o acetilcelulosa o una resina tal como novolac.

Además, en la presente invención, el disolvente puede seleccionarse de acetona, éter acético, un alcohol, agua o una solución acuosa y no disuelve la estructura polimérica en lámina delgada.

En la presente invención, la dispersión formada cuando la estructura se dispersa en líquido puede obtenerse disolviendo la película de soporte soluble o la región soluble en un disolvente.

En la presente invención, la estructura puede ser una estructura polimérica en película delgada adherida a la interfaz por aplicación, recubrimiento o similares. Los ejemplos de una interfaz incluyen al menos uno de los siguientes seleccionados del grupo que consiste en una célula, un tejido, un órgano interno, una pared vascular, una membrana mucosa, una córnea, piel, cabello o una uña.

La presente divulgación proporciona una estructura polimérica en película delgada que tiene una forma arbitraria con materiales funcionales idénticos o diferentes en su cara y en su cara posterior y un método para preparar la misma. La estructura de la presente divulgación, cuando se une con un sitio de marcaje diana o similares, puede usarse como un vehículo funcional o un sustituto de plaquetas en un sistema de transporte de fármacos, un material de recubrimiento de heridas, un inhibidor de la coagulación o un producto tópico para piel tal como un producto de cuidado de la piel.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un esquema de la producción de sustrato de ODMS-SiO₂ y la adsorción de HSA y el proceso de exfoliación.

La Figura 2 muestra una nanohoja de HSA encima de la película de PVA como se ve a través de los siguientes: (a) microscopio de luz y (b) microscopio fluorescente.

La Figura 3 muestra un esquema del proceso, en donde las perlas de látex marcadas con NBD se unen a la superficie de la nanohoja de HSA.

La Figura 4 muestra una nanohoja de HSA construida sobre un sustrato como se ve a través de un microscopio de fuerza atómica. La Figura 4(a) muestra una vista tridimensional; la Figura 4(b) muestra una vista bidimensional vista desde arriba; y la figura 4(c) muestra un diagrama patrón en sección transversal.

La Figura 5 muestra una hoja (HSA)LB como se ve a través de un microscopio electrónico de barrido.

La Figura 6 muestra el método de producción de una hoja (HSA)LB que tiene un material funcional diferente en sus superficies A y B.

La Figura 7 muestra una hoja (HSA)LB que tiene un material funcional diferente en sus superficies A y B como se ve a través de un microscopio láser confocal y un diagrama explicativo de la misma.

La Figura 8 muestra el método de producción de la nanohoja LbL.

La Figura 9 muestra una nanohoja LbL. La Figura 9(a) muestra la nanohoja LbL flotando en acetona después de la exfoliación del sustrato; la Figura 9(b) muestra la nanohoja en una atmósfera después de haberse recogido con una estructura metálica.

La Figura 10 muestra una nanohoja LbL readsorbida en un sustrato de SiO₂ como se ve a través de un microscopio de fuerza atómica. La Figura 10(a) muestra una vista bidimensional desde arriba; la Figura 10(b) muestra una vista tridimensional; y la Figura 10(c) muestra un diagrama patrón en sección transversal.

La Figura 11 muestra un análisis elipsométrico de la relación entre el grosor de la nanohoja LbL y el número del método LbL.

La Figura 12 muestra un método para modificar las superficies A y B de una nanohoja LbL que usa una película de soporte soluble en agua con una sustancia funcional diferente en cada superficie.

La Figura 13 muestra una nanohoja LbL modificada con perlas de látex como se ve a través de un microscopio de luz.

La Figura 14 muestra una nanohoja LbL modificada con diferentes perlas de látex en sus superficies A y B como se ve a través de un microscopio electrónico de barrido. En la Figura 14, la superficie A y la superficie B se modificaron con perlas de látex que tienen un diámetro de partícula de 200 nm y 2 μm, respectivamente.

La Figura 15 muestra la producción de una nanohoja que usa una película de soporte soluble en agua y un método para aplicar la nanohoja a la piel.

La Figura 16 muestra una nanohoja adherida encima de la piel. La Figura 16(a) muestra una nanohoja en goma de silicio adherida a la piel; la Figura 16(b) muestra la piel después de que se haya usado agua para disolver la película de soporte entre la goma de silicio y una nanohoja y la goma de silicio se ha exfoliado (en luz visible). La Figura 16(c) muestra la misma situación que el dibujo a su derecha (en exposición de luz negra).

La Figura 17 muestra la preparación de una nanohoja de PLGA que usa un patrón con forma de disco (3 mm) y un método para la modificación de doble cara con dodecapéptido derivado de fibrinógeno (H12).

La Figura 18 muestra la adsorción selectiva de una nanohoja de PLGA con patrón con forma de disco. La Figura 18(b) es una vista agrandada de la Figura 18(a).

La Figura 19 es una fotografía de microscopio electrónico de barrido que muestra la interacción entre una nanohoja de PLGA (doble flecha) y una plaqueta activada (flecha única).

La Figura 20 muestra una comparación del número de adhesiones al sustrato de colágeno de la nanohoja de H12-PLGA (180 segundos después del inicio del flujo).

La Figura 21(a) muestra una imagen de la adherencia plaquetaria en presencia de una nanohoja de H12-PLGA (180 segundos después del inicio del flujo); la Figura 21(b) muestra la adherencia plaquetaria en ausencia de una

nanohoja de H12-PLGA (180 segundos después del inicio del flujo); y la Figura 21(c) muestra el cambio a lo largo del tiempo en la adherencia plaquetaria en presencia (○) y ausencia (□) de una nanohoja de H12-PLGA.

La Figura 22(a) muestra la exfoliación de una nanohoja de PLA que usa una película de soporte de PVA a partir de un sustrato de SiO₂; la Figura 22(b) muestra una nanohoja de PLA dispersada en una solución acuosa; la Figura 22(c) muestra una nanohoja de PLA transparente incolora recogida en una estructura metálica.

La Figura 23 muestra las mediciones del ángulo de contacto de una nanohoja de PLA en la que se adsorbe rHSA solamente en la superficie A. La Figura 23(a) muestra la superficie A antes de la adsorción de rHSA; la Figura 23(b) muestra la superficie A después de la adsorción de rHSA; y la Figura 23(c) muestra la superficie B.

La Figura 24 muestra un ciego de rata al que se ha aplicado una nanohoja LbL que soporta una pequeña cantidad de pigmento luminiscente como se ve en una luz negra.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

En lo sucesivo en el presente documento, se describirán las realizaciones de la presente invención. Las siguientes realizaciones se dan para ilustrar la presente invención y no pretenden limitar la presente invención de ningún modo. La presente invención puede llevarse a cabo en diversas realizaciones siempre que dichas realizaciones no salgan del alcance de la misma.

En lo sucesivo en el presente documento, se describirá un método para preparar una estructura polimérica en película delgada de acuerdo con la presente invención (en lo sucesivo en el presente documento, denominada una "hoja") que tiene una sustancia funcional diferente en cada uno de sus dos lados.

1. Producción de una estructura polimérica en película delgada que tiene una sustancia funcional en la superficie A y en la superficie B de la película (1)

En un aspecto (no reivindicado) de la presente divulgación, se forma una película delgada en una región de forma arbitraria soluble en la interfaz entre una fase líquida y un cuerpo de sustrato (en lo sucesivo a veces denominado un "sustrato") adsorbiendo moléculas polifuncionales en el mismo, polimerizando y/o reticulando estas moléculas polifuncionales. A partir de entonces, se une una sustancia funcional a la cara (superficie A) de la película delgada y se forma una película de soporte soluble en la misma (encima del cuerpo de sustrato en el que se formó la película delgada). Después, dichas película delgada y película de soporte soluble se exfolian del cuerpo de sustrato, se une una sustancia funcional idéntica a o diferente de la sustancia funcional anteriormente citada a la superficie B de la película delgada y la película de soporte soluble se disuelve con un disolvente. En el presente documento, "superficie A" y "superficie B" significan un lado y el otro lado de la película delgada, respectivamente y la superficie A se describe como la cara, mientras que la superficie B se describe como la cara inversa en esta memoria descriptiva. En el aspecto anterior de la presente invención, para la película formada encima del cuerpo de sustrato, el lado adsorbido al cuerpo de sustrato es la superficie B y el lado opuesto a aquel que se adsorbe al cuerpo de sustrato es la superficie A.

2. Producción de una estructura polimérica en película delgada que tiene una sustancia funcional en la superficie A y en la superficie B de la película (2)

De acuerdo con la invención, se forma una película delgada en una región de forma arbitraria soluble en la interfaz entre una fase líquida y un cuerpo de sustrato adsorbiendo moléculas polifuncionales en el mismo, polimerizando y/o reticulando estas moléculas polifuncionales. A partir de entonces, se une una sustancia funcional a la superficie A de la película delgada y dicha película delgada se exfolia del cuerpo de sustrato disolviendo la región soluble con un disolvente. Después, la superficie de la película delgada exfoliada se aplica encima de la película de soporte soluble formada en un cuerpo de sustrato diferente del cuerpo de sustrato anteriormente citado, se une una sustancia funcional idéntica a o diferente de la sustancia funcional anteriormente citada a la superficie B de la película delgada y la película de soporte soluble se disuelve con un disolvente para exfoliar la película delgada. La etapa de polimerizar y/o reticular las moléculas polifuncionales también comprende la etapa de laminar polielectrolitos que tienen cargas opuestas entre sí de forma alterna para reticular los polielectrolitos en términos de cargas.

El método de la presente invención ha permitido, por primera vez, que la película delgada se exfolie del cuerpo de sustrato (o un vehículo sólido) y que pueda obtenerse fácil y confiadamente una estructura polimérica en película delgada que tenga una sustancia funcional en su superficie A y en su superficie B. El método de la presente invención también hace posible fabricar grandes cantidades de la estructura en película delgada.

La estructura polimérica en película delgada de la presente invención es una película delgada de capa única o una película delgada multicapa en la que las moléculas polifuncionales se polimerizan y/o se reticulan.

La estructura puede obtenerse como una dispersión del polímero en película delgada. Una dispersión que tiene la estructura polimérica en película delgada de la presente invención dispersada en un líquido se abarca en el ámbito de la presente invención.

Una estructura polimérica en película delgada a la que se adhiere la estructura polimérica en película delgada de la

presente invención por aplicación, recubrimiento o similares en una interfaz tal como al menos una de las superficies seleccionadas de las siguientes: un tejido, un órgano interno, una pared vascular, una membrana mucosa, piel, etc. también se abarca en el ámbito de la presente invención. Además, el ámbito de la presente invención también abarca estructuras poliméricas en película delgada que cultivan piel, una córnea, tejidos de órganos internos, etc.

5 encima de un cuerpo de sustrato/película de soporte soluble/estructura polimérica en película delgada y se exfolian junto con estructuras.

(1) Área de una forma arbitraria en una interfaz entre el cuerpo del sustrato y una superficie de agua

10 En la presente invención, la expresión “interfaz entre el cuerpo del sustrato y una fase líquida” se refiere a una interfaz en la que el cuerpo de sustrato sólido está en contacto con un líquido tal como agua, una solución acuosa o un disolvente orgánico.

15 La forma del área a la que se hacen adsorberse las moléculas polifuncionales puede ser idéntica a la forma del cuerpo de sustrato o una parte del mismo y no tiene limitación específica. El área puede ser, por ejemplo, circular, rectangular, elíptica, con forma de cinta, con forma de cuerda, ramificada en una pluralidad de puntos o con forma de estrella.

20 En la presente invención, es deseable formar una monocapa autoensamblada (SAM) o una bicapa autoensamblada (SAB) en la interfaz entre un cuerpo de sustrato y una fase líquida.

25 La expresión “monocapa autoensamblada (SAM)” se refiere a una película formada por moléculas hidrófobas lineales que tienen, en un extremo, un grupo funcional que puede unirse al cuerpo de sustrato. Las moléculas hidrófobas lineales se anclan a la superficie del cuerpo de sustrato a través del grupo funcional para formar la monocapa. La expresión “bicapa autoensamblada (SAB)” se refiere a una bicapa construida con, por ejemplo, moléculas anfífilas que contienen una cadena de hidrocarburos hidrófobos tal como un lípido y un grupo de cabeza polar hidrófila. La bicapa autoensamblada (SAB) se forma por autoensamblaje en un área hidrófila de la superficie del cuerpo de sustrato o en un área de la superficie del cuerpo de sustrato que tiene la carga opuesta a aquella del grupo de cabeza polar de las moléculas anfífilas. Alternativamente, una estructura en bicapa formada por autoensamblaje de moléculas anfífilas en un área hidrófoba formada en una SAM y cuya superficie de película se vuelve una región hidrófila también puede considerarse una SAB.

En el presente documento, la expresión “capa autoensamblada” se refiere a una película formada espontáneamente.

35 En la presente invención, el cuerpo de sustrato puede ser cualquier cosa que permita que las moléculas polifuncionales se adsorban al mismo sin limitación específica. Donde se forma una SAM o una SAB en un cuerpo de sustrato, el cuerpo de sustrato puede ser cualquier cosa que permita que la SAM o la SAB se formen en el mismo sin limitación específica. El cuerpo de sustrato puede ser, por ejemplo, una placa metálica formada por oro, plata, platino, cobre, hierro, aluminio, titanio, cinc o similares o una placa plana que tiene un material metálico tal depositado por vapor en el mismo. El cuerpo de sustrato puede formarse entera o parcialmente por lo siguiente, solo o bien en una combinación apropiada: un material metálico descrito anteriormente o una capa de cobertura de óxido del mismo, silicio, goma de silicio, sílice o vidrio, mica, un material de carbono tal como grafito, un material polimérico tal como polietileno, polipropileno, celofán o un elastómero o un compuesto de calcio tal como apatita.

45 De acuerdo con la presente invención, una parte hidrófoba de las moléculas hidrófobas que forman la SAM pueden formarse por moléculas hidrófobas lineales que tienen, en un extremo, un grupo SH, un grupo cloroalquilsililo, un grupo alcoialquilsililo, un grupo vinilo, un grupo amino, un grupo carbonilo o similares. Normalmente, la parte hidrófoba está formada por una cadena de hidrocarburos saturados que tiene un número de carbonos de 4 a 40, preferentemente de 8 a 18. Una molécula hidrófoba lineal que tiene un grupo SH es, por ejemplo, alcanotiol. Los ejemplos de alcanotiol incluyen undecanotiol, dodecanotiol y tetradecanotiol. La molécula hidrófoba puede tener alqueno o alquino que contenga un enlace insaturado, un esqueleto isoprenoide que tenga una estructura ramificada o un anillo esteroide.

55 Una SAM puede formarse espontáneamente en un cuerpo de sustrato de oro disolviendo las moléculas hidrófobas anteriormente descritas que tienen un grupo SH en un disolvente tal como etanol y poniendo el cuerpo de sustrato de oro en contacto con, o sumergiendo el cuerpo de sustrato de oro en, la solución resultante. Se obtiene una SAM en un cuerpo de sustrato de silicio por moléculas de cadena larga que tienen un grupo vinilo. Se obtiene una SAM en la superficie de un cuerpo de sustrato de sílice o de metal por moléculas de cadena larga que tienen un grupo cloroalquilsililo o un grupo alcoialquilsililo. Los ejemplos de una molécula hidrófoba de cadena larga que tienen un grupo tal incluyen octadecildimetilclorosilano, trialcoxihexadecilsilano y octadeciltrimetoxisilano (ODMS). Por ejemplo, se obtiene una SAM depositando en fase vapor ODMS en un cuerpo de sustrato de óxido de silicio. La expresión “deposición en fase vapor” se refiere a calentar y vaporizar una sustancia en una condición al vacío o una condición cercana al vacío, de tal manera que una película delgada de la sustancia vaporizada se forma en la superficie de un cuerpo de sustrato.

65 En la presente invención, las moléculas anfífilas que forman la SAB pueden ser cualquier tipo de moléculas que

incluyen una parte hidrófoba y una parte polar hidrófila en ellas. Los ejemplos de la molécula anfífila que se puede usar para formar la SAB incluyen lípidos tales como un fosfolípido hidrófobo, un lípido basado en aminoácidos y un glucolípido y lípidos catiónicos tales como sal de dialquilamonio.

- 5 Una SAB se forma como sigue. Una capa que tiene una estructura en bicapa puede formarse fácilmente a través del recubrimiento por medio de un disolvente orgánico, obtenido disolviendo moléculas anfífilas tales como moléculas lipídicas, a un sustrato. A partir de entonces, una cierta área se enmascara y se realiza una radiación de haz de electrones o similar para descomponer y de esta manera retirar la estructura en bicapa del área no enmascarada. De esta manera, se forma un área que tiene la estructura en bicapa.

10 Alternativamente, una SAB puede formarse espontáneamente como sigue. Un cuerpo de sustrato que incluye un área aniónica o un área catiónica como resultado de un tratamiento de la superficie se pone en contacto con, o se sumerge en, una dispersión de lípido catiónico o de lípido aniónico. La SAB se forma en el área.

- 15 Una SAB también puede formarse espontáneamente como sigue. Un cuerpo de sustrato que incluye un área que tiene una SAM formada en la misma se pone en contacto con, o se sumerge en, una solución o una dispersión de moléculas anfífilas.

20 Se puede provocar que estas moléculas poliméricas se adsorban a, o modifiquen químicamente, un área arbitraria del cuerpo de sustrato usando la tecnología de enmascaramiento descrita más tarde.

25 En la presente invención, un área de un cuerpo de sustrato tratado en superficie, es decir, un área de un cuerpo de sustrato que se ha formado una SAM, un área de un cuerpo de sustrato que se ha formado una SAB o un área de un cuerpo de sustrato que se ha formado una fotorresistencia puede formarse para que tenga una forma arbitraria usando enmascaramiento. Un método de fotoenmascaramiento se describirá a continuación, pero un experto en la materia puede seleccionar apropiadamente los elementos para el enmascaramiento. El método no se limita al método descrito a continuación.

30 En primer lugar, se forma una resistencia en un cuerpo de sustrato tratado en superficie. Por ejemplo, puede recubrirse una fotorresistencia positiva sobre el cuerpo de sustrato tratado en superficie por un recubridor por centrifugación a 800 rpm durante 3 segundos y después recubrirse a 7000 rpm durante 20 segundos y calentarse, por ejemplo, a 110 °C durante 90 segundos para secarse. El grosor de la fotorresistencia se disminuye aumentando la velocidad de rotación y el tiempo de rotación. La temperatura de calentamiento y el tiempo de calentamiento no se limitan a lo anterior y pueden alterarse apropiadamente siempre que se vaporice el disolvente de la resistencia.

35 Después, se forma una fotomáscara en la resistencia y la resistencia se expone a la luz. La resistencia puede exponerse a la luz irradiando un haz de electrones, un rayo ultravioleta, un rayo-X o similares durante 1 a 60 segundos, preferentemente durante 5 a 20 segundos. La fotomáscara puede ser, por ejemplo, una máscara rectangular que tenga un tamaño de 10 μm $\times$ 30 μm . Después, el área expuesta de la resistencia en el cuerpo de sustrato se desarrolla y se seca, mientras que se retira el área no expuesta de la resistencia. Después, un área de la

40 SAM o de la SAB que no está protegida por la resistencia se retira por tratamiento plasmático de O₂, tratamiento plasmático de CO o ataque químico de ion reactivo usando gas halógeno. Finalmente, la resistencia se retira por un disolvente soluble en la resistencia tal como acetona, THF o diclorometano. De esta manera, puede formarse un área de una forma deseable (por ejemplo, que tenga un micropatrón) que tenga una estructura en película.

45 En la presente invención, la expresión "región soluble" incluye, pero no se limita a: una película polimérica soluble en un disolvente tal como acetona, éter acético, un alcohol, agua o una solución acuosa. Puede seleccionarse un disolvente que no disuelve la estructura de la estructura polimérica en película delgada por sí mismo. Alternativamente, puede seleccionarse un disolvente que no disuelva la estructura polimérica en película delgada durante el procesamiento por condiciones tales como temperatura, pH e intensidad iónica. Los ejemplos de la región soluble incluyen aquellos formados a partir de, por ejemplo, un polielectrolito tal como un ácido poliacrílico o un ácido polimetacrílico, polietilenglicol, poliácridamida, alcohol polivinílico, un polímero soluble en agua no iónico tal como un polisacárido tal como almidón o acetilcelulosa o una resina tal como novolac o poli(N-alquilcianoacrilato). En la solución polimérica que forma la región soluble, el peso molecular del polímero es de 1000 a 1.000.000, preferentemente de 5000 a 500.000. La concentración de la solución es del 1 al 20 % en peso, preferentemente del

50 2 al 10 % en peso. Alternativamente, es deseable una solución con una viscosidad de 0,2 a 0,5 Pa·s (200 a 500 cP). La región soluble se forma recubriendo la solución anteriormente mencionada sobre un cuerpo de sustrato antes de la formación de la estructura polimérica en película delgada y después secando el cuerpo de sustrato resultante durante 10 minutos a 24 horas, preferentemente de 1 a 12 horas. Alternativamente, el método para formar la región soluble es deseablemente, pero no se limita a, el uso de un molde o un recubrimiento por centrifugación para

55 recubrir la solución anteriormente mencionada sobre un cuerpo de sustrato, calentando el cuerpo de sustrato recubierto durante 90 segundos en una placa de hierro calentada a 110 °C para volatilizar el disolvente.

(2) Adsorción, polimerización y reticulación de moléculas polifuncionales

- 65 Los ejemplos de la sustancia que tiene que adsorberse en un área (por ejemplo, un área que tiene una estructura SAM o SAB) en una interfaz entre el cuerpo de sustrato anteriormente mencionado y la fase líquida, es decir, la

sustancia que se vuelve el elemento estructural de la película delgada, incluye moléculas polifuncionales tales como monómeros polifuncionales y macrómeros polifuncionales.

5 Un monómero o macrómero polifuncional incluye dos o más grupos funcionales homogéneos o heterogéneos en una molécula. Los ejemplos del monómero polifuncional incluyen monómeros, tales como aminoácidos y azúcares, que contienen una pluralidad de grupos amino, grupos carboxilo, grupos hidroxilo, grupos mercapto, grupos isocianato, grupos aldehído, grupos epoxi, grupo cianúrico y similares; y monómeros que contienen una pluralidad de grupos vinilo tales como divinilbenceno, diviniléter, divinilsulfona, bismaleimida y similares. Los ejemplos del macrómero polifuncional incluyen proteínas, polilisina, ácido poliglutámico, sustancias obtenidas por hidrólisis de copolímeros de poliestireno/ácido maleico anhidro, quitosano, ácido alginico, perlas poliméricas, un ácido poliláctico, un copolímero de ácido poliláctico/ácido glicólico, policaprolactona y similares, pero pueden incluir aquellos macrómeros que tienen grupos funcionales terminales o grupos funcionales de cadena lateral múltiple de la unidad de repetición.

15 Puede usarse un monómero mono-funcional o un macrómero mono-funcional en una mezcla con un monómero polifuncional o un macrómero polifuncional. Por ejemplo, también pueden usarse perlas formadas por un polímero tal como poliestireno o poli(ϵ -caprolactona) o un ácido L-láctico y un copolímero de ácido glicólico a cuya superficie se adhiere una molécula polifuncional (tal como la albúmina) o cuya superficie se modifica químicamente.

20 Puede usarse cualquier proteína; no hay limitaciones particulares. Los ejemplos de la proteína soluble en agua incluyen albúminas tales como BSA (albúmina de suero bovino) y HSA (albúmina de suero humano), hemoglobina, mioglobina, colágeno soluble y fibrinógeno. También puede usarse una proteína que no es originalmente soluble en agua pero que recubre una película de soporte y puede exfoliarse o una proteína que no es originalmente soluble en agua pero puede dispersarse de manera estable en un disolvente cuando se disuelve en el mismo una película de soporte. Puede usarse una proteína obtenida purificando una muestra derivada de un cuerpo vivo por un método conocido o un péptido sintetizado por un sintetizador de péptidos. Alternativamente, es usable una proteína recombinante producida en un huésped tal como una célula de mamífero, una *Escherichia coli* o una levadura por un método conocido usando la información de la secuencia de las bases de genes que codifican una proteína diana y después purificada (véase Sambrook J y Russel D. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición, CSHL Press, 2001). Puede utilizarse una sustancia obtenida uniendo, por ejemplo, un grupo disulfuro piridilo, un grupo maleimida o un grupo succinimida a un grupo funcional de una proteína tal como un grupo amino, un grupo carboxilo o un grupo hidroxilo a través de un espaciador de una longitud apropiada. Puede usarse una proteína en la forma de perlas de látex cubiertas con la proteína.

35 La expresión "perlas poliméricas" se refiere a los siguientes tipos de partículas: partículas obtenidas tratando un monómero que tiene un grupo vinilo con polimerización por emulsión o polimerización por suspensión; partículas granuladas a través de una emulsión O/W; partículas obtenidas polimerizando en anillo abierto un compuesto con forma de anillo como un monómero y después emulsionando el polímero resultante con un tensioactivo; o partículas obtenidas polimerizando un macrómero polifuncional. Los ejemplos de las perlas poliméricas incluyen perlas de látex formadas por poliestireno-co-divinilbenceno o similares. Las perlas poliméricas biodegradables producidas a partir de un ácido poliláctico, un copolímero de ácido poliláctico/ácido glicólico, policaprolactona o similares pueden usarse como perlas poliméricas. La molécula polifuncional (por ejemplo, el monómero o macrómero polifuncional) puede ser anfífila. Los ejemplos de la molécula anfífila incluyen un fosfolípido polimerizable que tiene un grupo dieno o un grupo vinilo en la cadena 1-acilo y en la cadena 2-acilo, un lípido basado en aminoácidos y lípidos azucarados.

45 La película delgada (polímero en película delgada) puede estar formado por un tipo de moléculas o una combinación de una pluralidad de tipos de moléculas. La combinación puede ser una combinación de una pluralidad de monómeros polifuncionales, una combinación de una pluralidad de macrómeros polifuncionales o una combinación de un monómero polifuncional y un macrómero polifuncional. Por ejemplo, las perlas poliméricas cubiertas con una proteína pueden usarse como moléculas polifuncionales.

50 Un polímero polifuncional se adsorbe a una SAM o a una SAB en un cuerpo de sustrato tratado en superficie para formar una película delgada polimérica. Por lo tanto, las moléculas adsorbentes (por ejemplo, las moléculas que incluyen una parte hidrófoba y que forman la película delgada) se disponen con la parte hidrófoba alineándose a lo largo de la SAM o similares. Después de que las moléculas polifuncionales adsorban, se realiza la polimerización y/o el reticulado como sea necesario para formar una película delgada polimérica en el cuerpo de sustrato tratado en superficie (por ejemplo, en la SAM).

60 Para hacer que las moléculas funcionales se adsorban a una SAM, el cuerpo de sustrato que se ha formado una SAM puede ponerse en contacto con, o sumergirse en, una solución o una dispersión de las moléculas polifuncionales. De esta manera, puede formarse una película delgada de las moléculas polifuncionales. Para provocar que las moléculas polifuncionales se adsorban a una SAB para formar una película delgada polimérica, puede provocarse que un polielectrolito que tiene la carga opuesta a aquella de la superficie de la SAB se adsorba a la SAB.

65 En la presente invención, puede provocarse que las moléculas polifuncionales se adsorban a la SAM o a la SAB repitiendo una operación de extraer el cuerpo de sustrato que forma la SAM o la SAB de la solución de las

moléculas polifuncionales a una velocidad apropiada o usar un gas tal como aire o nitrógeno para arrastrar la solución fuera del cuerpo de sustrato sobre el que la solución de la molécula polifuncional se eliminó y crear el flujo de solución de la molécula polifuncional en la superficie del cuerpo de sustrato. En este caso, el contacto se realiza usando la tensión superficial en una interfaz gas-líquido. Por lo tanto, a veces puede provocarse que las moléculas polifuncionales se adsorban a la capa más selectivamente que en el líquido.

En la presente invención, el término "polimerización" se refiere a una reacción para producir un polímero. Las moléculas pueden polimerizarse por policondensación, poli-adición, adición-condensación, polimerización en apertura de anillo, polimerización por adición (polimerización radical, polimerización aniónica, polimerización catiónica), polimerización en fase sólida por calor, fotopolimerización, radio polimerización, polimerización de plasma o similares.

En la presente invención, el término "reticulación" se refiere a formar un enlace químico entre algunos átomos específicos en los polímeros lineales. La reticulación forma una estructura neta tridimensional.

Las moléculas pueden reticularse por enlaces uretano o enlaces urea por un grupo isocianato, por la formación de una base de Schiff por un grupo aldehído, por un enlace disulfuro por un grupo mercapto o similares. Los ejemplos del reticulador incluyen alquilimidatos, acildiazidas, diisocianatos, bismaleimidas, triazinilos, compuestos diazo, glutaraldehído, N-succinimidil-3-(2-piridilditio)alquilonato y bromociano.

La reticulación entre los macrómeros polifuncionales puede ser reticulación física tal como coagulación por desnaturalización térmica cuando los macrómeros son proteínas. Cuando los macrómeros son perlas poliméricas termoplásticas, la superficie de las perlas puede fusionarse parcialmente por calentamiento para realizar la reticulación física. Alternativamente, las perlas poliméricas pueden fusionarse completamente por calentamiento para formar una película delgada que tiene una forma arbitraria. En resumen, el fin de esta etapa es la insolubilización de la película. En consecuencia, la etapa puede incluir interacción electrostática, interacción dipolar, enlace de hidrógeno y enlace hidrófobo, siempre que la reticulación física cumpla este fin. Las condiciones de tratamiento de una proteína pueden establecerse apropiadamente de acuerdo con las propiedades de la proteína. Por ejemplo, la albúmina puede desnaturalizarse térmicamente para realizar la reticulación tratándose de 60 a 120 °C, preferentemente de 70 a 100 °C, durante 1 a 60 minutos, preferentemente de 1 a 30 minutos. Las perlas poliméricas, por ejemplo, las perlas de látex formadas de poliestireno-co-divinilbenceno pueden fusionarse parcialmente para realizar la reticulación tratándose de 100 a 150 °C, preferentemente de 110 a 120 °C, durante 1 segundo a 5 minutos, preferentemente durante 10 a 60 segundos. Alternativamente, las perlas poliméricas pueden fusionarse completamente para realizar la reticulación tratándose por calor de 100 a 150 °C, preferentemente de 110 a 120 °C, durante 30 segundos a 10 minutos, preferentemente de 1 a 5 minutos. Por ejemplo, cuando las perlas poliméricas son perlas poliméricas biodegradables formadas a partir de un copolímero de ácido poliláctico/ácido glicólico, las perlas poliméricas pueden fusionarse parcialmente para realizar la reticulación tratándose por calentamiento de 30 a 100 °C, preferentemente de 50 a 70 °C, durante 1 segundo a 30 minutos, preferentemente de 60 segundos a 20 minutos. Alternativamente, las perlas poliméricas biodegradables pueden fusionarse completamente tratándose por calor de 100 a 180 °C, preferentemente de 130 a 160 °C, durante 30 segundos a 10 minutos, preferentemente de 1 minuto a 5 minutos.

Después de la polimerización o la reticulación, puede provocarse que las moléculas polifuncionales se adsorban a, por ejemplo, el cuerpo de sustrato que ha formado una SAM o una SAB en el que la película delgada ya se ha formado. La polimerización o la reticulación pueden repetirse de esta forma para la formación de película delgada adicional.

De acuerdo con la presente invención, puede usarse un polielectrolito como un macrómero polifuncional incluido en la película delgada. Por ejemplo, un cuerpo de sustrato tratado en superficie tal como una SAM o una SAB se sumerge en soluciones diluidas de polielectrolitos (policación y polianión) que tienen las cargas opuestas entre sí de forma alterna, de tal manera que los polielectrolitos puedan adsorberse espontáneamente a la SAM o a la SAB. Por lo tanto, se repite una etapa en la que los polielectrolitos en exceso se lavan. De esta manera, se forma una película delgada que tiene un policación y un polianión laminados de forma alterna en la misma. Para producir una película delgada lisa, se usa el método de recubrimiento por centrifugación. Un ejemplo es un método LbL, en donde un polímero que se ha dejado caer en un cuerpo de sustrato plano se extiende de forma alterna y se lamina con un recubridor por centrifugación. Los ejemplos del policación incluyen quitosano, colágeno, polilisina, poliarginina, polihistidina, ioneno, piridina poli(cuaternizada), polímeros de sal de dialildialquilamonio y polialilamina. Los ejemplos del polianión incluyen ácido algínico, ácido hialurónico, ácido poliglutámico, ácido polimetacrílico, ácido poliacrílico, ácido poliestirensulfónico, sales de metales alcalinos de los mismos y sales de metales alcalinotérreos de los mismos. También puede usarse el producto de la hidrólisis alcalina de un copolímero alternante de anhídrido maleico y estireno.

Una película LbL también puede formarse adsorbiendo un polielectrolito a una resina termoendurecible tal como una fotorresistencia soluble en un disolvente orgánico. Aunque el método LbL es un método para producir una película delgada a través del uso de uniones electrostáticas entre polielectrolitos que tienen cargas opuestas, también es posible formar una película a través del uso de enlaces de hidrógeno e interacciones dipolares entre polímeros.

Los policationes y los polianiones incluidos en las capas laminadas formadas por el método de adsorción alternada se reticularan en términos de cargas por una fuerza electrostática, formando de esta manera una película delgada. De forma alternativa, un grupo amino en un complejo poliónico y un resto de ácido carboxílico en un complejo poliónico pueden someterse a deshidratación-condensación y de esta manera reticularse a través de un grupo amida que es un enlace covalente, formando de esta manera una película delgada.

Las películas delgadas formadas por los métodos anteriormente mencionados también se incluyen en el alcance de la presente invención.

La película delgada formada en una interfaz entre el cuerpo de sustrato y la fase líquida puede ser una película de capa única o una película multi-capas.

En la presente invención, el cuerpo de sustrato puede lavarse antes y después de la adsorción y la polimerización/reticulación de las moléculas polifuncionales. El cuerpo de sustrato puede lavarse sumergiendo el cuerpo de sustrato en, o poniendo el cuerpo de sustrato en contacto con, un líquido de lavado una vez o una pluralidad de veces.

(3) Película delgada que tiene una sustancia funcional unida a la superficie A de la misma

En la presente invención, una sustancia funcional puede unirse a la superficie A de una película delgada obtenida polimerizando o reticulando moléculas polifuncionales. De manera alternativa, también puede producirse una estructura polimérica en película delgada no permitiendo que una sustancia funcional se una en este punto, con respecto a una porción del grupo polifuncional de la superficie A como una sustancia funcional, exfoliando la película delgada con el método exfoliante descrito después y uniendo la sustancia funcional a la superficie B.

La expresión "sustancia funcional" se refiere a, por ejemplo, una sustancia que tiene una capacidad de reconocimiento molecular tal como una proteína de reconocimiento o un ligando de la misma, un antígeno o un anticuerpo existente en una membrana celular, una sustancia para promover una reacción específica de un catalizador, una enzima o similares, una sustancia implicada en una reacción específica de un antioxidante, un eliminador de radicales o similares o un grupo o un ligando tal como un grupo carboxilo, un grupo amino, un grupo mercapto o un grupo maleimida implicados en una carga o una reacción. La expresión "sustancias funcionales" también incluye sustancias que usan la carga (interacción electrostática) de los polielectrolitos para provocar la expresión de funciones. Los ejemplos de sustancias funcionales incluyen pero no se limitan a al menos uno de los siguientes seleccionados del grupo que consiste en polímeros tales como poli(etilenglicol) o una cadena de azúcar, una proteína, un péptido, una cadena de azúcar, un derivado de biotina, un polielectrolito policatiónico y un polielectrolito polianiónico. Los ejemplos tales como aquellos descritos anteriormente pueden darse para un polication y un polianión.

Las sustancias funcionales pueden unirse a través de métodos químicos o físicos. Como un método de enlace químico, la reacción de unión entre las moléculas funcionales y la película delgada puede provocarse uniendo a través de un grupo funcional que puede unirse a un grupo amino, a un grupo carboxilo, a un grupo hidroxilo, a un grupo mercapto, a un grupo isocianato, a un grupo aldehído, a un grupo epoxi, a un grupo cianúrico o a un grupo vinilo introducido en un monómero o un macrómero polifuncionales. Por ejemplo, la reacción de unión entre las moléculas funcionales y la película delgada puede provocarse usando un enlace uretano o un enlace urea por una reacción entre un grupo hidroxilo o un grupo amino y un grupo isocianato, usando la formación de una base de Schiff por una reacción entre un grupo amino y un grupo aldehído, usando un enlace disulfuro por una reacción entre grupos mercapto, usando una reacción entre un grupo mercapto y un grupo piridildisulfuro o un grupo maleimida, usando una reacción entre un grupo carbonilo y un grupo succinimida o similares.

Los siguientes pueden usarse como métodos para provocar la unión físicamente: interacción electrostática entre el lado de la sustancia funcional y el lado de la película delgada, interacción hidrófoba, enlace de hidrógeno o fuerza intermolecular.

Alternativamente, puede introducirse un ligando en el lado de la película delgada o en el lado de la sustancia funcional, de tal manera que la sustancia funcional pueda inmovilizarse en la película delgada usando un complejo del ligando y un aceptor introducido en la sustancia funcional o en la película delgada. Los ejemplos de la combinación incluyen biotina y avidina, una cadena de azúcar y lectina, un antígeno y un anticuerpo, un fármaco y un receptor y una enzima y un sustrato.

Los ejemplos de la enzima incluyen, pero no se limitan a, catalasa, peroxidasa de rábano rusticano, quimiotripsina, citocromo, α -amilasa, β -amilasa, galactosidasa, glicocerebrosidasa, factor de coagulación de la sangre, peroxidasa, proteasa, celulasa, hemicelulasa, xilanasas, lipasa, pululanasa, isomerasa, glucoamilasa, glucosa isomerasa, glutaminasa, β -glucanasa y serina proteasa. El método para la unión de la sustancia funcional siguiendo la introducción de un ligando o similares a la superficie A de una película delgada también puede llevarse a cabo en una película de soporte o la reacción puede llevarse a cabo en la dispersión que es el producto de la disolución de la película de soporte.

(4) Formación de la película de soporte soluble y exfoliación de la película delgada

En la presente invención, la película de soporte soluble está comprendida por una capa polimérica soluble en un disolvente tal como acetona, acetato de etilo, un alcohol, agua o una solución acuosa, pero no se limita a lo anterior. Debe seleccionarse un disolvente que no disuelva la estructura polimérica de la película delgada. La película de soporte soluble se forma a partir de, por ejemplo, un polielectrolito tal como un ácido poliacrílico o un ácido polimetacrílico, un polímero soluble en agua no iónico tal como un poli(etilenglicol), una poliacrilamida, un alcohol polivinílico, un polisacárido tal como almidón o acetilcelulosa o una resina tal como novolac o poli(N-alquilcianoacrilato). En la solución polimérica usada para producir la película de soporte soluble o la región soluble, es deseable una solución con las siguientes propiedades: un peso molecular del polímero de 1000 a 1.000.000, preferentemente de 5000 a 500.000 y una concentración del 1 al 20 %, preferentemente del 2 al 10 %. La película de soporte soluble se forma aplicando la solución anteriormente mencionada a un cuerpo de sustrato con una estructura polimérica en película delgada formada en el mismo y después secando la película resultante durante 10 minutos a 24 horas, preferentemente de 1 a 12 horas. Los métodos para aplicar la solución anteriormente mencionada al cuerpo de sustrato incluyen, pero no se limitan a, moldeo y recubrimiento por centrifugación. Se usa un par de pinzas o similares para exfoliar la película de soporte soluble y la estructura polimérica en película delgada del cuerpo de sustrato. En este punto, la película delgada puede exfoliarse simultáneamente y transferirse a la película de soporte mediante una fuerza de unión secundaria tal como una interacción electrostática, un enlace de hidrógeno o una fuerza de Van der Waals en el hueco entre la película de soporte soluble y la estructura polimérica en película delgada. En contraste, disolviendo la región soluble encima del cuerpo de sustrato, puede obtenerse una dispersión creada cuando la película delgada se dispersa en un líquido. En este punto, el tamaño de la dispersión es suficiente para dejar fijo el cuerpo de sustrato sobre el cual se forma la estructura polimérica en película delgada. Además, la dispersión puede exfoliarse del cuerpo de sustrato dejando el cuerpo de sustrato en reposo en un recipiente que es insoluble en el disolvente. Raspando las cuatro esquinas del sustrato formado con un objeto afilado tal como una aguja de inyección, el sustrato puede retirarse más rápidamente.

(5) Unión de la sustancia funcional a la superficie B de la película delgada en el lado de la película de soporte, disolución de la película de soporte

En la presente invención, la estructura puede ser la estructura que se transfirió a la película de soporte soluble o la pretendida interfaz y la superficie B se coloca de tal manera que se sumerja o flote de tal manera que contacte con la interfaz entre el cuerpo de sustrato y la fase líquida. En este punto, la película de soporte soluble puede permitir que la sustancia funcional anteriormente mencionada se una en la solución insoluble o poco soluble. Alternativamente, también puede producirse una estructura polimérica en película delgada respecto a una porción del grupo polifuncional de la superficie B como una sustancia funcional sin permitir que se una una sustancia funcional.

Por ejemplo, cuando se usa un ácido poliacrílico como una película de soporte, sumergiendo la película de soporte en una solución acuosa con un pH de 1 a 6, preferentemente un pH de 3 a 5 y una concentración de sal de 10 mM a 1 M, preferentemente de 100 mM a 500 mM, puede provocarse que la sustancia funcional reaccione sin disolver el ácido poliacrílico o antes de que el ácido poliacrílico se disuelva. Los métodos, sin embargo, no se limitan a lo siguiente. Como un método para unir químicamente la sustancia funcional a la superficie B en la película delgada, la unión puede provocarse a través de un grupo funcional que pueda unirse a un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo, un grupo mercapto, un grupo isocianato, un grupo aldehído, un grupo epoxi, un grupo cianúrico o un grupo vinilo introducido en un monómero o macrómero polifuncional. Por ejemplo, la reacción de unión entre las moléculas funcionales y la película delgada puede provocarse usando un enlace uretano o un enlace urea por una reacción entre un grupo hidroxilo o un grupo amino y un grupo isocianato, usando la formación de una base de Schiff por una reacción entre un grupo amino y un grupo aldehído, usando un enlace disulfuro por una reacción entre grupos mercapto, usando una reacción entre un grupo mercapto y un grupo piridildisulfuro o un grupo maleimida, usando una reacción entre un grupo carbonilo y un grupo succinimida o similares. Los siguientes pueden usarse como métodos para provocar la unión físicamente: interacción electrostática entre la sustancia funcional y la película delgada, interacción hidrófoba, enlace de hidrógeno o fuerza intermolecular. Alternativamente, puede introducirse un ligando en el lado de la película delgada o en el lado de la sustancia funcional, de tal manera que la sustancia funcional pueda inmovilizarse en la película delgada usando un complejo del ligando y un aceptor introducido en la sustancia funcional o en la película delgada. Los ejemplos de la combinación incluyen biotina y avidina, una cadena de azúcar y lectina, un antígeno y un anticuerpo, un fármaco y un receptor y una enzima y un sustrato. El método anteriormente mencionado para la unión de la sustancia funcional siguiendo la introducción de un ligando o similares a la superficie B de una película delgada también puede llevarse a cabo en una película de soporte y la reacción puede llevarse a cabo en la dispersión que es el producto de la disolución de la película de soporte.

Después de provocar que se una una sustancia funcional, puede obtenerse una dispersión líquida de una estructura polimérica en película delgada que tiene una sustancia funcional en la superficie A y en la superficie B de la misma disolviendo la película de soporte. La sustancia funcional unida a la superficie A y a la superficie B puede ser idéntica o bien diferente. En este momento, la sustancia funcional sin unir y la película de soporte disuelta pueden retirarse a través de separación por centrifuga y por filtración o ultrafiltración. El término "diferente" significa divergente el uno del otro e indica que la sustancia funcional unida a la superficie A y la sustancia funcional unida a la superficie B son

distintas en términos de tipo y propiedades. Por ejemplo, una relación entre la biotina y la avidina, una cadena de azúcar y la lectina, un antígeno y un anticuerpo, un fármaco y un receptor o una enzima y un sustrato, es una relación entre una sustancia y una sustancia de acoplamiento a la misma y puede decirse que son dos sustancias funcionales diferentes. Por el contrario, cuando una sustancia funcional idéntica se une a la superficie A y a la superficie B, por ejemplo, un compañero de unión idéntico puede unirse a la sustancia funcional en la superficie A y en la superficie B. En este ejemplo, si el compañero de unión de una sustancia funcional tiene un único sitio reactivo, puede formarse una estructura en la que el compañero de unión se une a la superficie A y a la superficie B a través de la sustancia funcional. Si el compañero de unión de una sustancia funcional tiene dos o más sitios reactivos, la estructura forma un agregado con el compañero de unión a través de la sustancia funcional. Además, si se inserta una cantidad mayor de la sustancia funcional o bien de su compañero de unión, puede inducirse la desagregación del agregado. Incluso si una sustancia funcional no se une a la superficie A y a la superficie B, si el método LbL se usa de tal manera que, por ejemplo, la superficie A es un polication y la superficie B es un polianión, puede producirse una estructura polimérica en película delgada con respecto al grupo disociable de la estructura como una sustancia funcional.

En la presente invención, la expresión "derivado de biotina" se refiere a biotina que tiene un grupo funcional tal como un grupo amino o un grupo carboxilo o un grupo éster activo tal como un grupo piridildisulfuro o un grupo succinimidilo unido a la misma.

La hoja obtenida por el método de la presente invención puede usarse como un vehículo de fármacos (por ejemplo, un vehículo funcional o un sustituto de plaquetas en un sistema de transporte de fármacos). Cuando la modificación anteriormente mencionada se usa como un vehículo de fármacos, la modificación puede ser, por ejemplo, (a) fármacos, (b) sustancias que incluyen un sitio que reconoce específicamente un tejido/célula diana (sustancias de reconocimiento específico) o (c) sustancias para estabilizar la estructura en el cuerpo. Los ejemplos específicos de estas sustancias funcionales son como sigue:

(a) Fármacos: fármacos anti-inflamatorios, agentes hemostáticos, agentes vasodilatadores, agentes trombolíticos, agentes anti-arterioesclerosis, etc.

(b) Sustancias de reconocimiento específico: colágeno, laminina, VCAM-1, selectina, fibrina, etc.

(c) Sustancias para estabilizar la estructura: poli(etilenglicol), polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, polisacáridos, ácido poliglutamínico, etc.

Una sustancia funcional arbitraria puede unirse a través de, por ejemplo, un enlace uretano o un enlace urea entre un grupo hidroxilo o un grupo amino de la sustancia arbitraria y un grupo isocianato de la estructura; activar un grupo carboxilo de la sustancia arbitraria y unir un grupo amino de la estructura resultante con un grupo amida; unir un grupo amino de la sustancia arbitraria y un grupo amino de la estructura en una base de Schiff a través del uso de glutaraldehído; unir un grupo carboxilo de la sustancia arbitraria a un grupo amino de la estructura o un grupo hidroxilo de la estructura a través de un enlace amida o un enlace éster; un método, en donde la sustancia arbitraria es un polisacárido y un grupo hidroxilo de la misma se reticula con un grupo amino de la estructura después de que el bromuro de cianógeno forme carbonato de imida; y un enlace disulfuro entre un grupo mercapto de la sustancia arbitraria y un grupo mercapto activado de la estructura. Alternativamente, un reticulador tal como alquilimidatos, acildiazidas, diisocianatos, bismaleimidas, triazinilos, compuestos diazo, glutaraldehído, alquilonato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) y bromociano pueden usarse para facilitar el reticulado con el grupo funcional correspondiente. Todavía alternativamente, cuando la sustancia arbitraria es hidrófoba, la sustancia arbitraria puede unirse a un área hidrófoba de la estructura en película delgada por interacción hidrófoba. Cuando la sustancia arbitraria puede enlazarse con hidrógeno, la sustancia arbitraria puede unirse a un área que se puede enlazar con hidrógeno de la estructura por un puente de hidrógeno. Cuando la sustancia arbitraria se carga, la sustancia arbitraria puede unirse a un área de la estructura que tenga la carga opuesta por interacción electrostática.

En otra realización diferente más de la presente invención, una sustancia funcional idéntica o diferente se une a la superficie B en la estructura polimérica en película delgada que se aplica a la película de soporte soluble formada en el cuerpo de sustrato. Esta estructura, junto con la película de soporte y el cuerpo de sustrato, se adsorbe a la interfaz arbitraria y después se disuelve la película de soporte. De este modo, el cuerpo de sustrato también se exfolia y la estructura polimérica en película delgada puede transferirse al lado de la interfaz.

Por ejemplo, como se muestra en los ejemplos, si el alcohol polivinílico se recubre por centrifugación encima de un sustrato de polipropileno, se exfolia una hoja de alcohol polivinílico del sustrato de polipropileno en acetona y la hoja de alcohol polivinílico se monta (se re-adsorbe) encima del sustrato de goma de silicio. Si la hoja de alcohol polivinílico se disuelve con agua cuando la hoja de alcohol polivinílico con una estructura polimérica en película delgada montada en la misma se aplica a la piel, la estructura polimérica en película delgada puede transferirse a la piel. En este punto, además de la goma de silicio, puede usarse como el sustrato un material polimérico con fin general tal como polietileno o polipropileno o un elastómero o una goma que tenga elasticidad. La interfaz a la que se hará la adhesión puede ser la superficie de un sitio biológico tal como una célula, un tejido, un órgano interno, una pared vascular, una membrana mucosa, una córnea, piel, cabello o una uña. Una estructura puede obtenerse también cultivando piel, una córnea, etc. en las estructuras poliméricas en película delgada y exfoliándose junto con dichas estructuras. Por ejemplo, una estructura polimérica en película delgada puede obtenerse cultivando piel, una

córnea, tejidos de los órganos internos, etc. encima de cuerpos de sustrato/películas de soporte solubles/estructuras poliméricas en película delgada y exfoliándose junto con dichas estructuras. El estado de las estructuras poliméricas en película delgada que se unieron a la interfaz polimérica por aplicación, recubrimiento o similares pueden diferir de aquel de las estructuras poliméricas en película delgada dispersadas en líquido. Por ejemplo, los primeros son formas que se expanden y se fijan encima de la interfaz, mientras que los últimos son formas dinámicas que se expanden, se enrollan en una pelota o se doblan. También hay ejemplos de los primeros en los que la estructura de las sustancias funcionales cambia debido a la interacción con la interfaz.

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle a modo de ejemplos específicos, pero la presente invención no se limita a estos ejemplos específicos.

Ejemplo 1

Producción de una nanohoja de albúmina que tiene diferentes sustancias funcionales en la superficie A y en la superficie B de la misma

Ejemplo 1-1 Producción de una nanohoja de albúmina (HSA) en un sustrato microestructurado hidrófilo/hidrófobo

Se depositó en fase vapor octadeciltrimetoxisilano (ODMS) en un sustrato de óxido de silicio (SiO_2). Después se recubrió una fotorresistencia positiva en el mismo por un recubridor por centrífuga (800 rpm, 3 s + 7000 rpm, 20 s) y se calentó para secarse (100 °C, 90 s). Se formó una fotomáscara (rectangular, 10 μm × 30 μm) en el sustrato resultante y el sustrato se irradió con UV (7 s). Después del desarrollo y el secado, se obtuvo un patrón de resistencia en el sustrato. Una parte del ODMS sin proteger por la resistencia se retiró por tratamiento de plasma con O_2 (30 s) y después la resistencia se retiró con acetona. De esta manera se produjo un sustrato microestructurado hidrófilo/hidrófobo (ODMS-sustrato de SiO_2) (Figura 1).

A la HSA, se añadió LC-SPDP (10 equivalentes) (temperatura ambiente, 20 minutos) y la sustancia resultante se purificó por GPC (cromatografía de permeabilidad en gel), obteniendo de este modo PD-HSA. Después, el grupo PD se redujo con ditioneitol (DTT). Basándose en la 2-tiopiridona liberada (2TP, $\epsilon = 8,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 343 nm), se confirmó que $7,4 \pm 1,2$ moléculas de grupo PD se unieron a una molécula de rHSA. Después de la purificación por GPC, se obtuvo rHSA-SH. El ODMS-sustrato de SiO_2 se sumergió en HSA-SH marcada con rodamina (temperatura ambiente, 1 hora). Después de retirar la HSA-SH no adsorbida, el ODMS-sustrato de SiO_2 se sumergió en solución de tampón acetato que contenía iones cobre ($[\text{Cu}^{2+}] = 100 \mu\text{M}$, temperatura ambiente, 12 horas) y se reticuló con disulfuro, formando por lo tanto una nanohoja de HSA.

Ejemplo 1-2 Exfoliación de la nanohoja de HSA usando alcohol polivinílico (PVA) como una película de soporte

Después de moldear la solución de PVA (2,5 % en peso) en el sustrato, la nanohoja de HSA se dejó fija en un desecador (temperatura ambiente, 12 horas) para secarse. Después de secarse, la película de PVA se exfolió fácilmente con pinzas (Figura 1, Figura 2a). Después, la película de PVA o el ODMS-sustrato de SiO_2 donde se exfolió la película de PVA se observó con un microscopio fluorescente y se observó una nanohoja de HSA dispuesta en un patrón en el PVA (Figura 2b). Después de la exfoliación de la película de PVA, no pudo confirmarse una nanohoja de HSA en el sustrato. Esto es un resultado del hecho de que, durante el secado, no hay interacción hidrófoba entre la nanohoja de HSA y el ODMS y que solamente existen fuerzas de Van der Waals entre los dos. Por el contrario, ya que la interacción electrostática se induce entre la nanohoja de HSA y la película de PVA, el patrón de la nanohoja se transfirió a la película de PVA. En consecuencia, se confirmó que el PVA puede usarse para exfoliar fácilmente la nanohoja. Se mostró que este método puede usarse para modificar la superficie A y la superficie B de la hoja con sustancias funcionales diferentes usando una película de PVA como una película de soporte.

Ejemplo 1-3 Modificación con perlas de látex de la superficie B de la nanohoja de HSA

Se hizo reaccionar 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl) con HSA, obteniendo de esta manera HSA marcada con NBD. Las perlas de látex (LB) (diámetro 100 nm) se añadieron a la HSA marcada con NBD (temperatura ambiente, 2 horas) y el producto se ultracentrifugó y se redispersó, obteniendo de esta manera (NBD)HSA-LB. Con el grupo amino del resto de lisina de la HSA adsorbida como una diana, se añadieron LC-SPDP (temperatura ambiente, 20 minutos) y DTT (temperatura ambiente, 10 minutos) en secuencia, obteniendo de esta manera SH-(NBD)-LB.

Una nanohoja de HSA marcada con rodamina ($E_x = 545 \text{ nm}$, $E_m = 580 \text{ nm}$) se exfolió en la película de PVA y después se dio la vuelta tal cual. Directamente después de recubrir con un tampón ftalato (pH 4,0), se añadió éster de N-[ϵ -maleimidocaproyloxi]succinimida (EMCS) (temperatura ambiente, 5 minutos) y se introdujo un grupo maleimido. Después de que la película de PVA se disolviera con PBS, se añadió un NBD ($E_x = 475 \text{ nm}$, $E_m = 540 \text{ nm}$)-marcado con SH-LB y se unieron LB a la superficie B de la nanohoja de HSA (Figura 3).

Cuando la nanohoja de HSA modificada con LB se activó a 543 nm y se observó con un microscopio confocal a una

longitud de onda detectada de (> 560 nm), la totalidad de la superficie de la hoja curvada emitió una luz roja. Después, cuando la nanohoja de HSA modificada con LB se activó a 458 nm y la longitud de onda detectada se estableció a (505 a 530 nm para el NBD solo, se confirmó la emisión de una luz amarilla en la forma de la hoja. Sin embargo, podía observarse una interrupción (transferencia de energía fluorescente) notable de la sección curva.

5 Esto mostró que las perlas de látex existen en la superficie B de la sección curva.

Ejemplo 1-4 Observación AFM de la nanohoja de HSA

Después de que la nanohoja de HSA se formara en el ODMS-sustrato de SiO_2 , se confirmó a través de la observación a través de un microscopio de fuerza atómica, como con observación a través de un microscopio de fluorescencia, que la HSA se adsorbió de forma selectiva solamente en un sitio de una región ODMS hidrófoba rectangular ($10 \times 30 \mu\text{m}$) (Figura 4a). En consecuencia, los cálculos basados en la diferencia de altura entre la superficie de SiO_2 y la nanohoja de HSA revelaron que el grosor de la película era de 6,5 nm. De forma similar, el grosor de la película de la región ODMS de la HDA no adsorbida era 3,5 nm y esta diferencia se usó para confirmar un grosor de la película de la nanohoja de HSA de aproximadamente 3 nm (Figuras 4b, c). En consecuencia, las nanohojas de HSA eran casi todo moléculas HSA (columna con forma de triángulo equilátero; triángulo equilátero, 1 lado = 8 nm, altura = 3 nm) con una capa estando reticulada bidimensionalmente.

Ejemplo 2

20 Producción de una nanohoja de fusión por calor de perlas de látex adsorbida en HSA (hoja (HSA) LB) que tiene una sustancia funcional diferente en cada uno de los dos lados de la misma

Ejemplo 2-1 Una capa de soporte de ácido poli(acrílico) (PAA) de la hoja (HSA)LB se exfolia

25 En la región DMS del sustrato patrón (DMS- SiO_2) de dodeciltrimetoxisilano (DMS), se adsorbió selectivamente una (HSA)LB y se sometió a fusión por calor, obteniendo de esta manera una nanohoja. En dicho sustrato, se disolvió ácido poliacrílico (peso molecular medio en peso 450.000, 50 mg) en un disolvente mezclado metanol/agua (9/1) (volumen/volumen); se moldeó una hoja en un sustrato que formó una (HSA)LB y se secó durante toda la noche. A partir de entonces, la película de soporte de PAA se exfolió del sustrato y se obtuvo de esta manera una película transparente flexible aunque fuerte. El PAA era capaz de exfoliarse mientras apoyaba la hoja de (HSA)LB como una película de soporte.

30 Un filtro de membrana que capturó la hoja (HSA)LB se observó con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Hitachi S-4500, 10 kV, recubierto de tetróxido de osmio). Ya que la superficie de la Figura 5(a) es llana, se cree que dicha superficie es el lado del sustrato (superficie B) de cuando se forma la hoja. Ya que la textura de las partículas aparece en la superficie de la Figura 5(b), se cree que dicha superficie es el lado del fluido de dispersión (superficie A) de cuando se forma la hoja.

40 **Ejemplo 2-2** Producción de una hoja (HSA)LB modificada con diferentes moléculas fluorescentes en la superficie A y en la superficie B de la misma (Figura 6)

Se añadieron 300 μl de hidróxido sódico acuoso 0,1 normal a 5-(y-6)-isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) (5 mg) y el producto se agitó y se disolvió. Después, se añadieron 900 μl de solución salina con tampón fosfato al producto resultante, de esta manera neutralizándolo. Después, se añadieron 2 μl del producto resultante a una solución salina con tampón fosfato, dando como resultado 5 ml de líquido y se obtuvieron de esta manera 3,76 $\mu\text{mol/l}$ de solución acuosa de TRITC. En un vial de 10 ml, el sustrato en el que se formó la hoja (HSA)LB se dejó fijo y se añadió 1 ml de solución acuosa de TRITC. Después, el sustrato se sumergió durante 20 minutos en una solución acuosa de TRITC y se unió TRITC a la HSA de la superficie A. Después, la hoja (HSA)LB se lavó con agua destilada y después se secó.

Se disolvió ácido poliacrílico (peso molecular medio en peso 450.000, 50 mg) en un disolvente mezclado metanol/agua (9/1) (volumen/volumen), después la solución resultante se moldeó en el sustrato formado de la hoja (HSA)LB y se secó durante toda la noche. Después, se exfolió una película de soporte de ácido poliacrílico del sustrato; y se exfolió de esta manera una hoja (HSA)LB modificada con TRITC.

Se añadieron 300 μl de hidróxido sódico acuoso 0,1 normal a fluoresceín-4-isotiocianato (FITC) (5 mg) y el producto se agitó y se disolvió. Después, se añadieron 900 μl de solución salina con tampón fosfato al producto resultante, de esta manera neutralizándolo. Después, se añadieron 2 μl del producto resultante a un tampón ftalato saturado con cloruro sódico, dando como resultado 5 ml de líquido y se obtuvieron de esta manera 4,28 $\mu\text{mol/l}$ de una solución acuosa de TRITC. La hoja se colocó dentro de un vial de 10 ml de tal manera que la superficie B esté hacia arriba; se añadió gradualmente 1 ml de solución acuosa de FITC y el producto resultante se dejó fijo; y el FITC se unió a la superficie B de la hoja. Siguiendo a la reacción, se retiró el sobrenadante, se añadió solución salina con tampón fosfato y se disolvió el ácido poliacrílico.

La dispersión de la nanohoja de la que ambos lados se modificaron con (HSA)LB se filtró por presión usando un filtro de membrana (diámetro de poro 0,4 μm) y gas N_2 . En lo sucesivo en el presente documento, el filtro se lavó con agua destilada y se obtuvo de esta manera una nanohoja de la que ambos lados se modificaron con (HSA)LB (Figura 6).

Un tampón fosfato (pH 7,6) se dejó caer sobre el filtro de membrana usado para recuperar la hoja (HSA)LB en cuya superficie A y superficie B se unió el TRITC o el FITC. En lo sucesivo en el presente documento, se aplicó la hoja (HSA)LB en una placa de vidrio. La hoja (HSA)LB se transfirió a la placa de vidrio y después se fijó con agar. La observación con un microscopio confocal reveló que la rodamina y el FITC se unieron sin mezclar a la superficie A y la superficie B de la hoja (HSA)LB, respectivamente. Se confirmó que la cara y la cara posterior de la hoja (HSA)LB reaccionaron separadamente con la sustancia fluorescente (Figura 7). En consecuencia, se probó que una sustancia funcional puede unirse a la superficie A y a la superficie B de la hoja (HSA)LB con el grupo amino (derivado de HSA) de la superficie (HSA)LB como una diana si la película de PAA es difícil de disolver debido a las condiciones de la misma (bajo pH, alta fuerza iónica).

Ejemplo 3

Producción de una nanohoja capa a capa (LbL) que tiene una sustancia funcional diferente en la superficie A y en la superficie B de la misma

Ejemplo 3-1 Producción de una nanohoja LbL

En el presente ejemplo, se produjo una nanohoja LbL por las siguientes etapas (Figura 8).

1. La resistencia se recubrió por centrifugación (800 rpm, 3 segundos / 7000 rpm, 20 segundos) como una película de soporte sobre una oblea de silicio (2 cm x 2 cm).
2. La oblea de silicio se sumergió en una solución acuosa de quitosano (Pm: 88 kDa, 1 mg/ml, ácido acético al 1 % / NaCl 0,5 M) a temperatura ambiente durante 20 minutos.
3. La superficie del sustrato se lavó con agua destilada (temperatura ambiente, 1 minuto) y después se secó con nitrógeno gas.
4. Se recubrió por centrifugación alginato sódico (Pm: 106 kDa, 1 mg/ml, NaCl 0,5 M) sobre la superficie del sustrato (4500 rpm, 15 segundos) después el agua destilada se recubrió por centrifugación dos veces sobre la superficie del sustrato, que se lavó después.
5. El quitosano se recubre por centrifugación de acuerdo con las condiciones de la etapa 4.
6. A continuación en el presente documento, las etapas de 4. a 6. anteriores se repiten, se produce un sustrato fijado de nanohoja LbL que comprende 21 capas, la película de soporte se disuelve en acetona y la nanohoja LbL se exfolia y después se recupera.

Ejemplo 3-2 Observación de la nanohoja LbL

Cuando el sustrato alternativamente laminado por recubrimiento por centrifugación se sumergió en acetona, solamente la capa de resistencia soluble se disolvió gradualmente por la acetona. Desde el borde del sustrato, podía observarse la exfoliación gradual de una nanohoja LbL incolora transparente. Además, después de dejar fijar (aproximadamente 20 minutos), la forma de un sustrato se mantuvo completamente y se exfolió exitosamente la nanohoja LbL con una relación de aspecto que excede 1.000.000 (Figura 9a). La hoja exfoliada puede recogerse con una estructura metálica y extraerse en atmósfera. La hoja no se fracturó incluso cuando se secó (Figura 9b).

Cuando la nanohoja LbL exfoliada se adsorbió a la superficie de otro sustrato de SiO_2 y se observó con un microscopio de fuerza atómica, se observó que la superficie de la nanohoja LbL era extremadamente lisa como aquella del sustrato de SiO_2 (Figuras 10a,b). Se cree que esto es el resultado de la difusión horizontal de electrolito del polímero que se da junto con una reacción mecánica específica del método de recubrimiento por centrifugación. La reducción de la interacción de electrolitos entre las cadenas poliméricas dentro de la nanohoja LbL debido al efecto de enmascaramiento de las cadenas laterales en el electrolito polimérico asociada a la adición de NaCl también se cree que contribuye a la lisura potenciada. Cuando se midió la diferencia de peso entre la superficie de SiO_2 y la nanohoja LbL, se confirmó que el grosor de la película era $30,2 \pm 4,3$ nm (Figura 10c). Se confirmó por elipsometría que este grosor es casi el mismo que el de la película LbL ($30,7 \pm 4,5$ nm) comprendida por el par 10,5 y producida sin usar resistencia en el sustrato de SiO_2 (Figura 11).

Ejemplo 3-3 Producción de una nanohoja de LbL que tiene diferentes sustancias funcionales en la superficie A y en la superficie B de la misma que usa una película de soporte soluble en agua

En el presente ejemplo, se produjo una nanohoja LbL que tiene diferentes sustancias funcionales en la superficie A y en la superficie B de la misma por las siguientes etapas (Figura 12):

1. Aproximadamente 1 ml de una solución acuosa de alcohol polivinílico (PVA) se dejó caer sobre un sustrato de SiO_2 , que se secó después.

2. Una nanohoja LbL se adsorbió a la superficie de un sustrato de SiO_2 en fase sólida de PVA.
3. Un sustrato al que se adhirió una nanohoja se sumergió (temperatura ambiente, 15 minutos) en una dispersión líquida (1 mg/ml, pH 4) que tiene perlas de látex (LB) con un diámetro de partícula de 200 nm.
4. En la superficie A, una nanohoja modificada con LB de 200 nm se exfolió disolviendo un PVA con un tampón fosfato que tiene un pH de 7,0.
5. La nanohoja exfoliada en 4. anterior se invirtió y después, con su superficie B hacia arriba, se readsorbió al sustrato de SiO_2 en fase sólida de PVA.
6. Un sustrato modificado en la superficie A producido en 5. anterior al que se adhirió una nanohoja se sumergió (temperatura ambiente, 15 minutos) en un líquido de dispersión (1 mg/mol, pH 4) que tiene LB con un diámetro de partícula de 2 μm .
7. A continuación en el presente documento, disolviendo el PVA con un tampón fosfato de 7,0 de acuerdo con el método en 4. Anterior, la nanohoja LbL que tiene diferentes diámetros de partícula en la superficie A y en la superficie B de la misma se exfolia y después se recupera.

Ejemplo 3-4 Observación de nanohoja LbL modificada con LB

Cuando un sustrato de PVA al que se adsorbió una nanohoja LbL se sumergió en un líquido de dispersión LB ([suspensión] = 5 mg/ml, pH 4) con un diámetro de partícula de 2 μm y las LB se unieron selectivamente en la superficie A de la nanohoja, se observó que el color de la estructura de la nanohoja que tenía el pliegue del borde de la nanohoja como el límite era diferente y que el grupo LB de la superficie plegada estaba cubierto por la nanohoja. Se confirmó que, en particular, el color de la estructura de la nanohoja en la periferia del grupo LB en la superficie doblada es idéntico al color de la estructura de la superficie que no estaba plegada (Figura 13). Se cree que la razón para lo anterior es que las partículas de LB se localizan en el interior de películas delgadas lisas como nanohojas y que la interferencia de la película delgada se suprime parcialmente como resultado. Debido a lo anterior, solamente la superficie A de la nanohoja se modificó selectivamente de forma exitosa con LB.

Después, se unieron LB de 2 μm y de 200 nm en la superficie A y la superficie B de la nanohoja, respectivamente, usando el método del Ejemplo 3-3. Tras la observación con un microscopio electrónico de barrido, se observó que las LB de 200 nm apoyadas en la superficie A se dispersan a lo largo de las LB de 2 μm apoyadas en la superficie B (Figura 14). El perfil de las LB de la superficie B se expresó por el recubrimiento de la nanohoja y, ya que no eran visibles áreas fracturadas en la superficie A de la hoja, se confirmó la flexibilidad de la nanohoja.

Ejemplo 3-5 Producción de una nanohoja LbL usando una película de soporte soluble y adhesión de dicha película a la piel

En el presente ejemplo, se produjo una nanohoja y se adhirió a la piel a través de las siguientes etapas (Figura 15).

1. El alcohol polivinílico (PVA) se recubrió por centrifugación (800 rpm, 3 segundos/7000 rpm, 20 segundos) en un sustrato de polipropileno (5 cm x 5 cm) como una película de soporte.
2. El PVA se exfolió como una hoja (tamaño aprox. 5 cm x 5 cm, grosor aprox. 1,3 μm) a partir de un sustrato de polipropileno en acetona.
3. Montaje (adsorción) de una hoja de PVA en un sustrato de goma de silicio.
4. Se adsorbió una nanohoja LbL apoyada con pigmento luminiscente en un sustrato de goma de silicio con PVA montado en el mismo.
5. El sustrato de goma de silicio en 4. anterior se adhirió a la piel, después el sustrato de goma de silicio se exfolió mientras se disolvía la hoja de PVA con agua, después de lo que la nanohoja LbL apoyada con pigmento luminiscente se adhirió a la piel.

Una nanohoja LbL apoyada con pigmento luminiscente se adsorbió en un sustrato de goma de silicio de PVA. Cuando el sustrato de goma de silicio se aplicó a la superficie de la piel, una ligera reflexión de la superficie de la nanohoja hizo posible confirmar la existencia de una nanohoja en la forma del sustrato de goma de silicio de PVA (flecha de la Figura 16a). La superficie de la piel se humedeció con una pequeña cantidad de agua. Además, cuando el sustrato de goma de silicio-PVA se aplicó de la misma manera que anteriormente, la capa de PVA se disolvió instantáneamente y la exfoliación de la goma de silicio que forma el cuerpo de sustrato así como la transferencia sencilla de la nanohoja LbL sobre la piel fueron exitosas. La nanohoja LbL adsorbida en la superficie de la piel es difícil de verificar bajo luz visible (Figura 16b). La nanohoja LbL es altamente adhesiva. Por otro lado, cuando el sitio de la piel al que la hoja se ancló se irradió con una luz negra, la emisión de luz del pigmento luminiscente hizo posible observar que la nanohoja LbL mantenía su forma en el sustrato de goma de silicio cuando se aplicaba a la superficie de la piel (Figura 16c). Lo anterior mostró que una nanohoja con una relación de aspecto que excede 1.000.000 es capaz de aplicarse a la piel.

Ejemplo 4

Producción de una nanohoja fusionada por calor de nanopartículas de poli(láctida-co-glicolida) (nanohoja de PLGA) que tiene una sustancia funcional idéntica unida a la superficie A y a la superficie B de la misma.

Ejemplo 4-1 Preparación de una nanohoja de PLGA usando un patrón con forma de disco (3 μm) y modificada en ambos lados con un dodecapéptido derivado de fibrinógeno (H12) (Figura 17).

En este ejemplo, se formó una nanohoja de PLGA y ambos lados se modificaron con H12. Cuando la dispersión de nanopartículas de PLGA (1×10^{11} partículas/ml, pH 7,4) se dejó caer sobre el sustrato patrón con forma de disco ODS y se soplo con gas N_2 , las nanopartículas de PLGA se adhirieron uniformemente a la totalidad de la sustancia. Sin embargo, cuando el sustrato se lavó varias veces con agua destilada, se observó que las nanopartículas de PLGA se mantuvieron densamente adheridas solamente a la región ODS y se adhirieron selectivamente (Figura 18(a)). Las nanopartículas adheridas se dispusieron densamente en un patrón de puntos y mantuvieron una forma circular (Figura 18(b)). Después de la fusión por calor (60 $^{\circ}\text{C}$, 2 minutos), se preparó una nanohoja de H12-PLGA dispersa con H12 unido tanto a su cara como a su cara posterior.

Ejemplo 4-2 Interacción entre la nanohoja de H12-PLGA y las plaquetas activadas

Después de que las plaquetas (600 μl , $6,0 \times 10^6$ plaquetas) se añadieran a la lámina de H12-PLGA (300 μl , aproximadamente $3,0 \times 10^6$ hojas); las plaquetas se activaron con adenosín 5'-difosfato (1 mM, 90 μl) y se agitaron (30 min, 37 $^{\circ}\text{C}$). Después de la fijación con glutaraldehído (1,0 %), se realizó la adsorción al sustrato fijado de poli(L-lisina) (1 h, t.a.), se realizó la fijación con tetróxido de osmio al 1 % (p/v) seguida de deshidratación alcohólica y se llevaron a cabo observaciones de la misma manera que fueron con un microscopio electrónico de barrido.

Como resultado, las plaquetas se unieron específicamente a ambas caras de la hoja y se mantuvo la forma de disco de la nanohoja (Figura 19).

Ejemplo 4-3 Observación del comportamiento de adhesión de la nanohoja de H12-PLGA en condiciones de flujo

La nanohoja de H12-PLGA ($8,0 \times 10^6$ hojas) se añadió a sangre ([PLT] = $20 \times 10^4/\mu\text{l}$, 500 μl) a la que se añadió anticoagulante PPACK (f.c. 40 μM), la sangre se dejó fluir en el sustrato fijado con colágeno a una tasa de cizalla baja (100 s^{-1}), después se grabó un vídeo usando un microscopio fluorescente y una cámara CCD.

Aunque la dispersión de la nanohoja de PLGA no unida a H12 marcada con FITC se añadió a la sangre, después de que la sangre se dejara fluir (tasa de cizalla 100 s^{-1}) sobre el sustrato de colágeno inmovilizado y se dejara contactar con (rodar sobre) el sustrato, la mayoría de las hojas no se adhirieron (Figura 20). Cuando una dispersión de nanohojas de PLGA con H12 unido solamente a la superficie A o una dispersión de nanohojas de HA-PLGA con H12 unido a ambos lados se dejó fluir del mismo modo, la cantidad de H12 unido aumentó (comparando la modificación de la superficie A junto con la modificación de ambos lados) y aumentó irreversiblemente la adherencia de la hoja (Figura 20). Se determinó que este efecto estaba causado por la interacción específica entre el H12 unido a la hoja y las plaquetas activadas unidas al sustrato de colágeno. En consecuencia, para poseer tanto la función adhesiva (velocidad ralentizada) y la función de adhesión irreversible con plaquetas activadas, se cree que puede ser ventajoso modificar H12 en ambos lados.

Ejemplo 4-4 Evaluación de la capacidad para promover la agregación plaquetaria de la nanohoja de H12-PLGA

Cuando se marcaron con FITC solamente las plaquetas (f.c. $1,0 \times 10^4/\mu\text{l}$) en sangre con trombocitopenia y se dejaron fluir (tasa de cizalla 100 s^{-1}) sobre un sustrato inmovilizado de colágeno, las plaquetas se adhirieron a lo largo del tiempo y la cobertura de la superficie (SC) fue el 0,9 % después de 180 segundos (Figura 21(b) y el "□" en la Figura 21(c)). Después, cuando se añadió una dispersión de hojas de H12-PLGA sin marca fluorescente, la SC de las plaquetas aumentó precipitadamente después de que transcurrieran 60 segundos y la SC aumentó aproximadamente un 300 % (SC: 2,6 %) después de 180 segundos (Figura 21(a) y los "○" en la Figura 21(c)). Esto sugiere que la adhesión de la hoja de H12-PLGA se indujo en primer lugar por la adhesión de las plaquetas al sustrato. Se considera que una hoja de H12-PLGA se adhirió a las plaquetas y que esta adhesión dio lugar a la inducción y la adhesión de las plaquetas que fluían.

En consecuencia, se mostró la posibilidad de que la hoja de H12-PLGA se vuelve un andamiaje plano, que el área superficial aumenta y que la hoja de H12-PLGA aumenta la capacidad para promover la agregación de las plaquetas que fluyen.

Ejemplo 5

Producción de una nanohoja de ácido poliláctico (PLA), una nanohoja de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y una nanohoja de plicaprolactona (PCL) que tienen una relación de aspecto enorme y una sustancia funcional diferente en la superficie A y en la superficie B de las mismas

Ejemplo 5-1 Exfoliación de una nanohoja de PLA que usa una hoja de soporte soluble

Una solución de cloruro de metileno (5 mg/ml) de PLA (peso molecular medio en peso: 80.000) se recubrió por

centrifugación en el sustrato de SiO₂ y se calentó hasta secarse (50 °C, 90 segundos). Después, se usó un lápiz medidor de espesor para medir el grosor de la película, que era 23 ± 5 nm. Después, cuando se moldeó una solución acuosa de alcohol polivinílico (PVA) al 2 % en peso y se calentó hasta secarse (70 °C, 15 minutos), fue posible exfoliar fácilmente una película moldeada de PVA con pinzas, obteniendo de esta manera una película transparente fuerte pero flexible (Figura 22(a)). Cuando una película moldeada de PVA se sumergió en agua purificada, el PVA se disolvió instantáneamente y, simultáneamente, se obtuvo una dispersión de nanohoja de PLA incolora, transparente (Figura 22(b)).

Usando este método, es posible exfoliar nanohojas de PLA de diversos grosores. Además, se obtuvieron dispersiones de nanohoja de PLGA (grosor de la película ± 6 nm), nanohoja de PLC (grosor de la película 18 ± 5 nm). También, la dispersión de nanohoja de PLA puede recogerse con una estructura metálica y extraerse en atmósfera. La hoja no se fracturó incluso cuando se secó (Figura 22(c)).

Ejemplo 5-2 Formación de una nanohoja de PLA que tiene una sustancia funcional diferente en la superficie A y en la superficie B de la misma

Una solución acuosa de PVA de 20 mg/ml se recubrió por centrifuga en un sustrato de SiO₂ y se secó por calentamiento (70 °C, 15 minutos). Después, una solución de diclorometano de PLA de 5 mg/ml se recubrió por centrifugación y se secó por calentamiento (70 °C, 15 minutos) para producir una nanohoja de PLA.

El ángulo de contacto de la superficie A del sustrato de SiO₂ de la nanohoja de PLA era $74 \pm 5^\circ$ (Figura 23(a), Tabla 1). La superficie A de la nanohoja de PLA encima del sustrato de SiO₂ se recubrió con una solución acuosa de albúmina de suero humano recombinante (rHSA) (50 mg/ml) y se dejó fijar durante 1 hora a temperatura ambiente. La superficie A del sustrato se lavó después con agua pura. Después de secar, el ángulo de contacto se disminuyó significativamente a $21 \pm 3^\circ$ (Figura 23(b), Tabla 1). La disminución del ángulo de contacto se consideró que era el resultado de la modificación con rHSA de la superficie A del sustrato.

Después, cuando este sustrato se sumergió en agua pura, la película de sacrificio de PVA se disolvió y la nanohoja de PLA se exfolió. Esta nanohoja de PLA se aplicó al sustrato de tal manera que la superficie B de dicha nanohoja quedara hacia arriba, después de lo que el sustrato de SiO₂ se limpió con agua pura y después se secó. Este ángulo de contacto era $78 \pm 6^\circ$ (Figura 23(c), Tabla 1), casi idéntico a aquel de la superficie A antes de la adsorción de rHSA. Se consideró que la rHSA no existía en la superficie B. En consecuencia, se formó exitosamente una nanohoja de PLA que tiene una sustancia funcional diferente en la superficie A y en la superficie B de la misma.

[Tabla 1]

Medición del ángulo de contacto de la nanohoja de PLA con adsorción de rHSA en la superficie A solamente		
		Ángulo de contacto (°)
Superficie A de la nanohoja de PLA	Antes de la adsorción de rHSA	74 ± 5
	Después de la adsorción de rHSA	21 ± 3
Superficie B de la nanohoja de PLA		78 ± 6

Ejemplo 6

El presente ejemplo muestra una nanohoja LbL aplicada a un ciego de rata. En el método explicado en (1) a (5) a continuación, se formó una nanohoja LbL directamente en un sustrato de SiO₂.

(1) Se realizó recubrimiento por centrifugación (4500 rpm, 15 segundos) usando una solución acuosa de quitosano (Pm: 88 kDa, 1 mg/ml, ácido acético al 1 %/NaCl 0,5 M).

(2) La superficie del sustrato se recubrió por centrifugación y se lavó con agua destilada dos veces.

(3) Se realizó recubrimiento por centrifugación (4500 rpm, 15 segundos) usando una alginato sódico (Pm: 106 kDa, 1 mg/ml, NaCl 0,5 M).

(4) La superficie del sustrato se recubrió por centrifugación y se lavó con agua destilada dos veces.

(5) A continuación en el presente documento, las etapas de (1) a (4) anteriores se repiten para producir un sustrato fijado de nanohoja LbL que comprende 21 capas.

Después, una solución acuosa de alcohol polivinílico (PVA) al 10 % en peso se moldeó en un sustrato de SiO₂ de una nanohoja LbL que soporta una pequeña cantidad de pigmento luminiscente. Después de que el sustrato se secara en un desecador (temperatura ambiente, 12 horas), la película moldeada de PVA sobre la que se transfirió la nanohoja LbL se exfolió adecuadamente del sustrato.

Después, la nanohoja LbL que tiene una película de PVA se aplicó de tal manera que el ciego de rata contactó con el lado de la nanohoja LbL. Cuando el PVA se disolvió en una solución salina normal, solamente se mantuvo la nanohoja LbL (observada en una luz negra) y la nanohoja LbL podía aplicarse de forma ajustada en la forma del ciego (Figura 24).

Aplicabilidad industrial

- 5 El método de la presente invención proporciona una estructura polimérica en película delgada que tiene sustancias funcionales idénticas o diferentes en su cara y en su cara posterior. La estructura obtenida por el método de la presente invención puede usarse como un vehículo funcional o un sustituto plaquetario en un sistema de transporte de fármacos, un material de recubrimiento de heridas, un inhibidor de la coagulación o un producto tópico de la piel tal como un producto de cuidado de la piel.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una estructura polimérica delgada que tiene una sustancia funcional en la cara (superficie A) y en la cara posterior (superficie B) de la película, obteniéndose dicha estructura polimérica por las etapas de:
 - (a) adsorber moléculas polifuncionales en una primera película de soporte soluble de una forma arbitraria en una interfaz entre un primer cuerpo de sustrato y una fase líquida;
 - (b) polimerizar y/o reticular las moléculas polifuncionales que se adsorben para formar una película delgada polimérica;
 - (c) unir una sustancia funcional a la superficie A de la película delgada formada y después;
 - (d) exfoliar la película delgada del primer cuerpo de sustrato disolviendo la primera película de soporte soluble con un disolvente;
 - (e) aplicar la superficie A de la película delgada exfoliada sobre una segunda película de soporte soluble formada en un segundo cuerpo de sustrato distinto del primer cuerpo de sustrato anteriormente mencionado; y
 - (f) unir a la superficie B de la película delgada una sustancia funcional idéntica a o diferente de la sustancia funcional anteriormente mencionada y después disolver la segunda película de soporte soluble con un disolvente.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de polimerizar y/o reticular las moléculas polifuncionales comprende adicionalmente la etapa de laminar polielectrolitos que tienen cargas opuestas entre sí de forma alterna para reticular los polielectrolitos en términos de cargas.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la molécula polifuncional es un monómero polifuncional y/o un macrómero polifuncional.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el macrómero polifuncional es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en una proteína, un ácido poliláctico, un copolímero de ácido poliláctico/ácido glicólico y policaprolactona.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el macrómero polifuncional es un polielectrolito.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el macrómero polifuncional es una perla polimérica.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las moléculas polifuncionales son de un macrómero polifuncional y los macrómeros polifuncionales se reticular por reticulación física o fusión.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la sustancia funcional es al menos una de las siguientes, seleccionadas del grupo que consiste en un compuesto polimérico, un polielectrolito, una proteína, un péptido, un polisacárido y un derivado de biotina.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el compuesto polimérico comprende poli(etilenglicol).
10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende adicionalmente una etapa de dispersar la estructura polimérica de película delgada en un líquido.
11. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la estructura polimérica de película delgada se adhiere a una interfaz.

FIG. 1

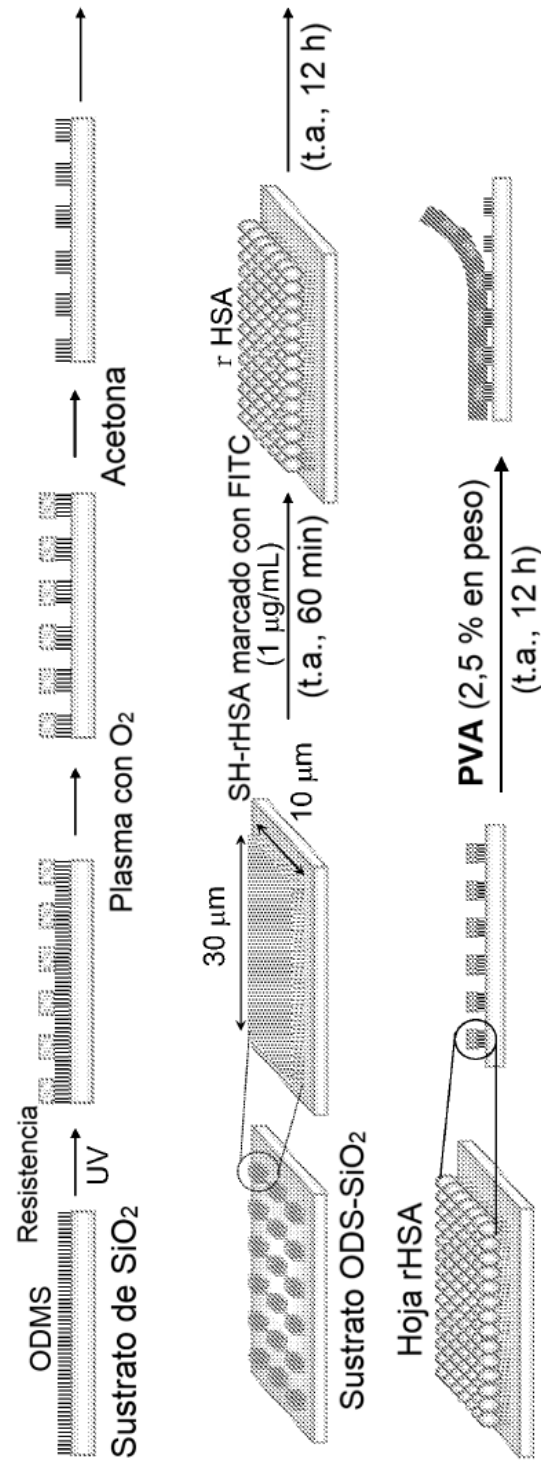


FIG.2

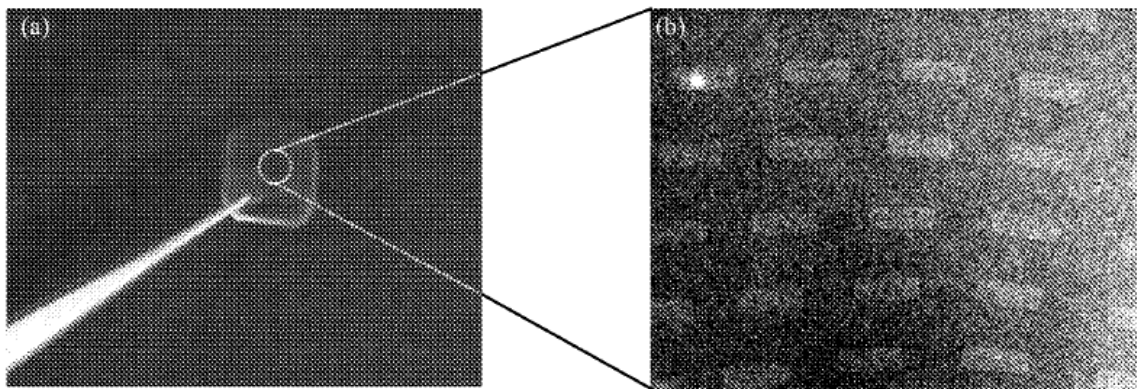


FIG.3

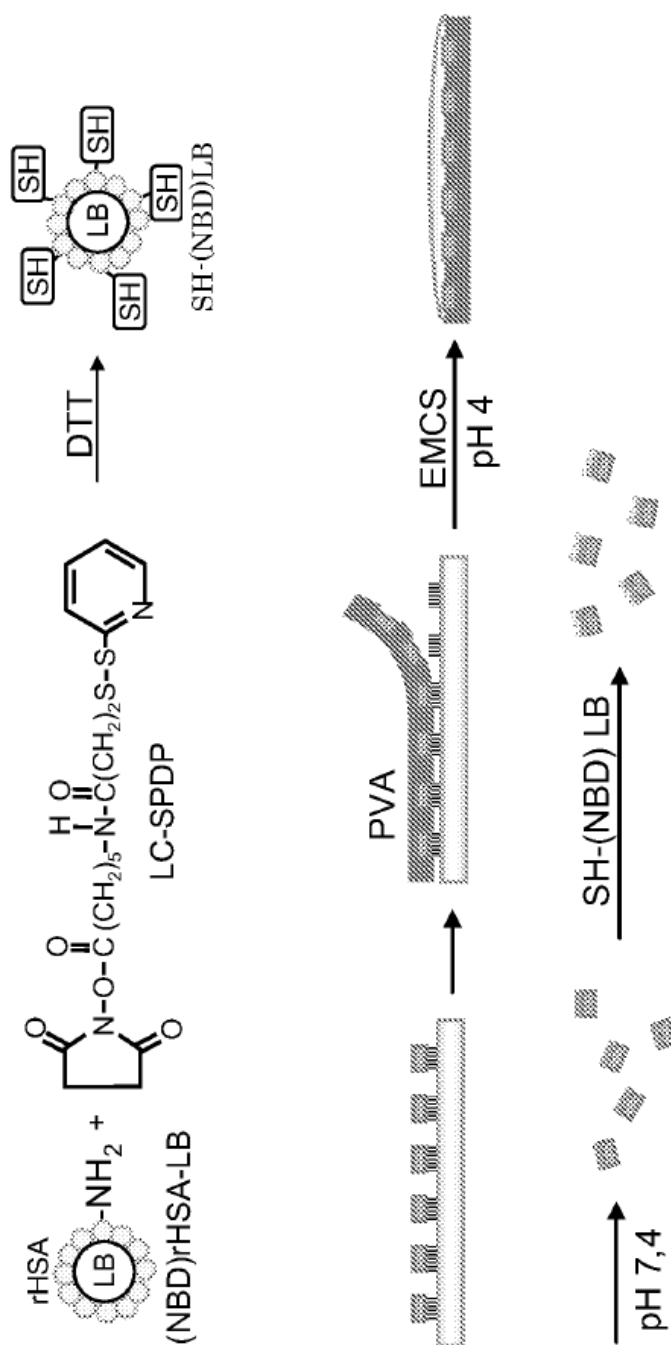


FIG.4

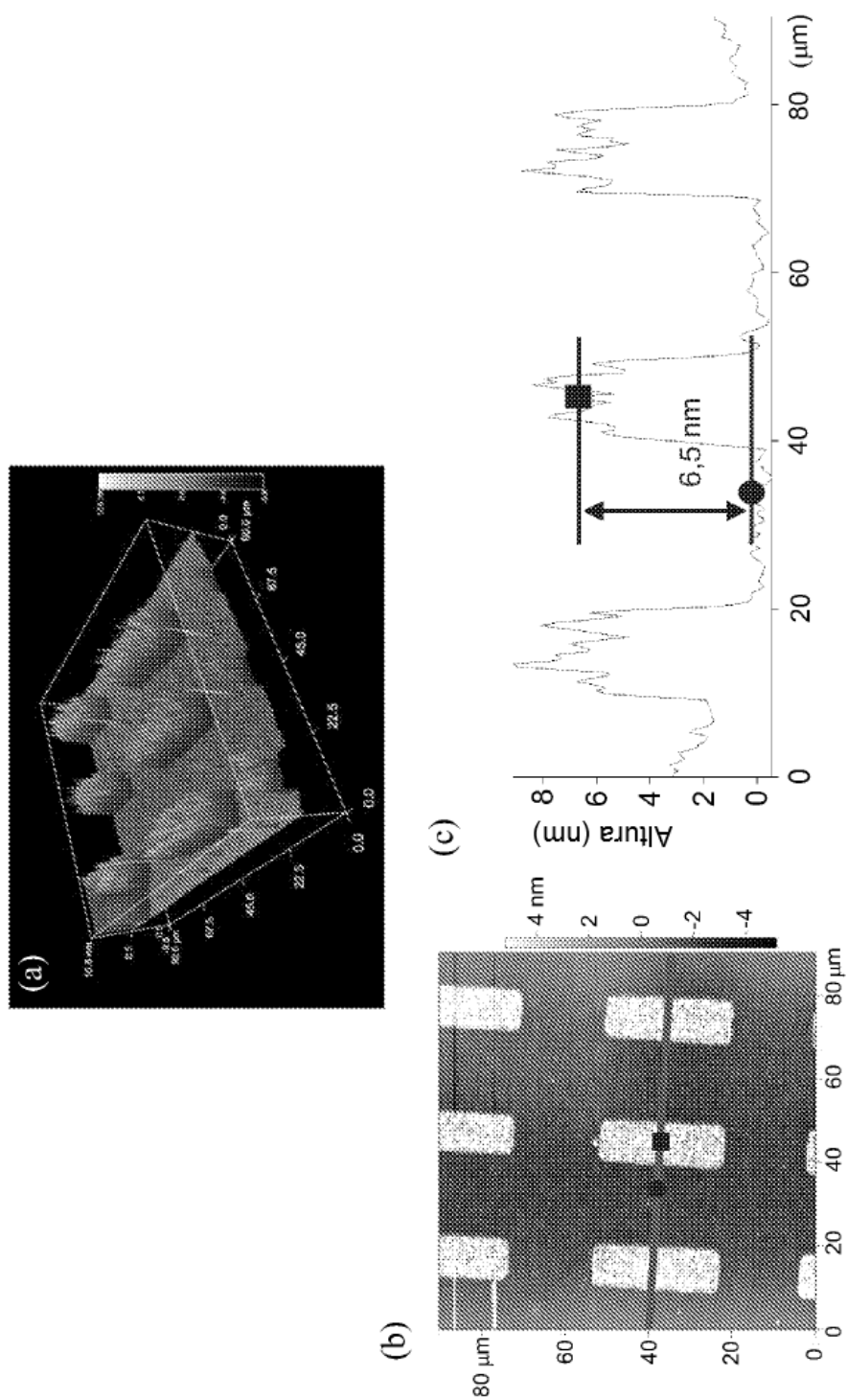


FIG.5

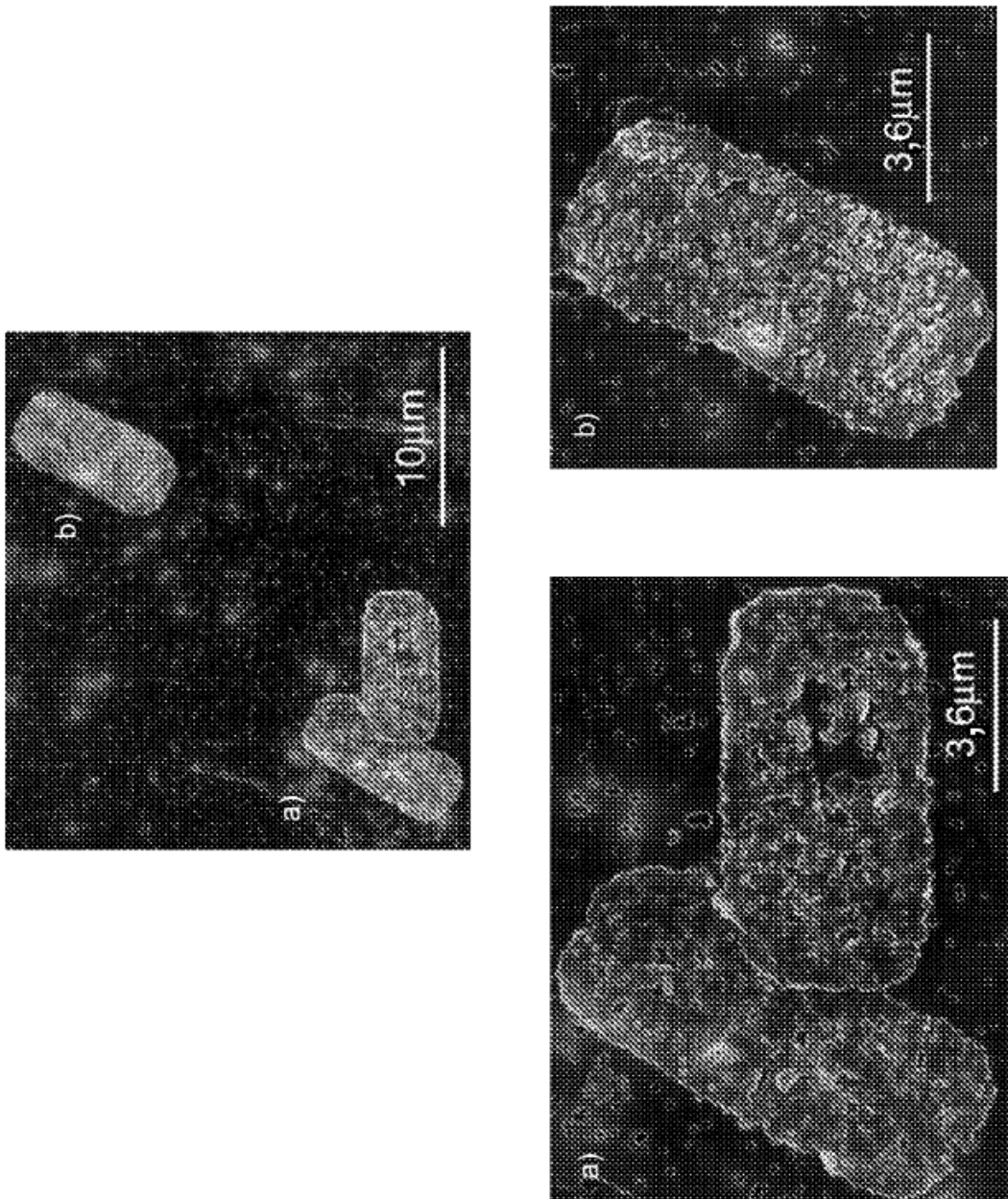


FIG. 6

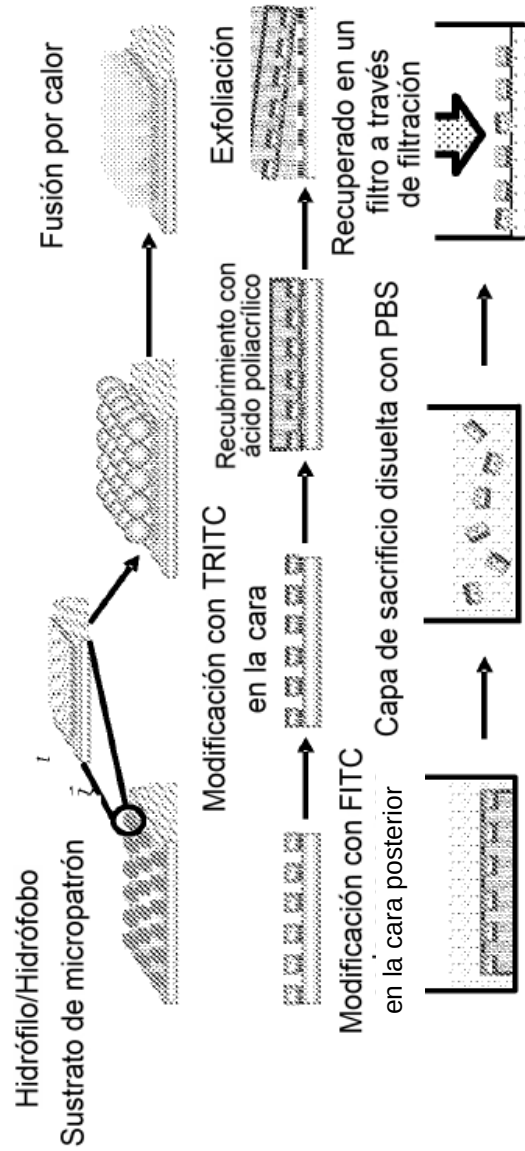


FIG. 7

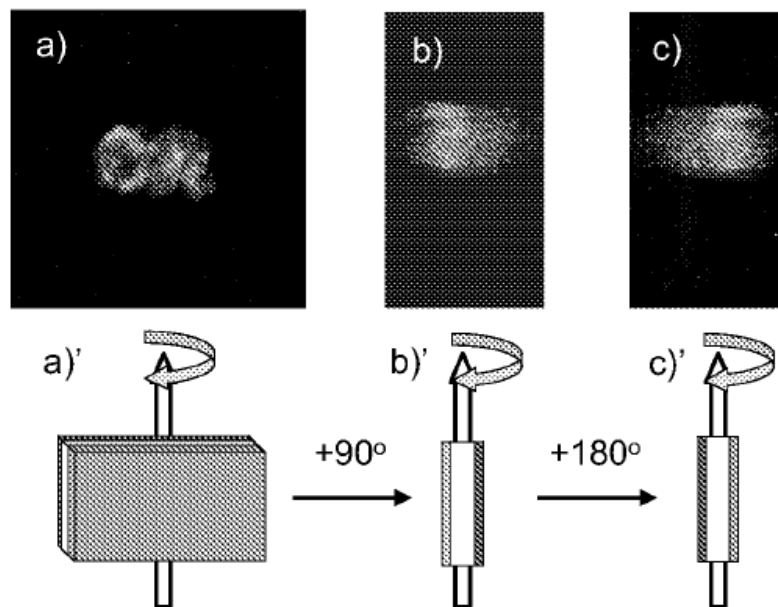
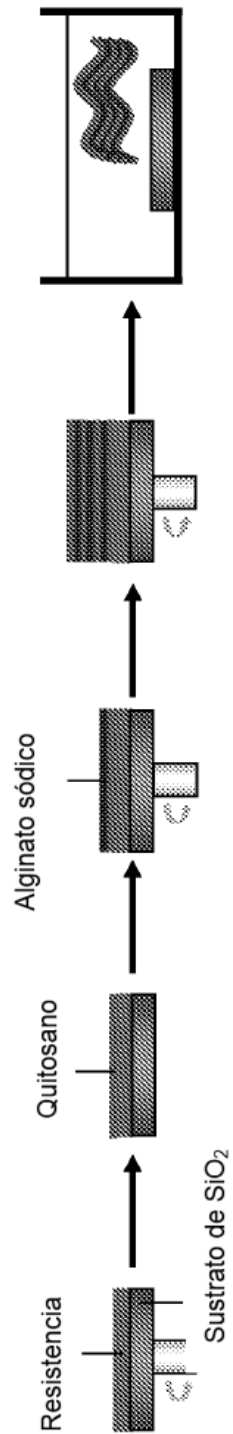


FIG. 8



Formación de la 1ª capa de polielectrolito Laminado sucesivamente por recubrimiento por centrifugación

Recuperación de la nanohoja de LbL en acetona

FIG. 9

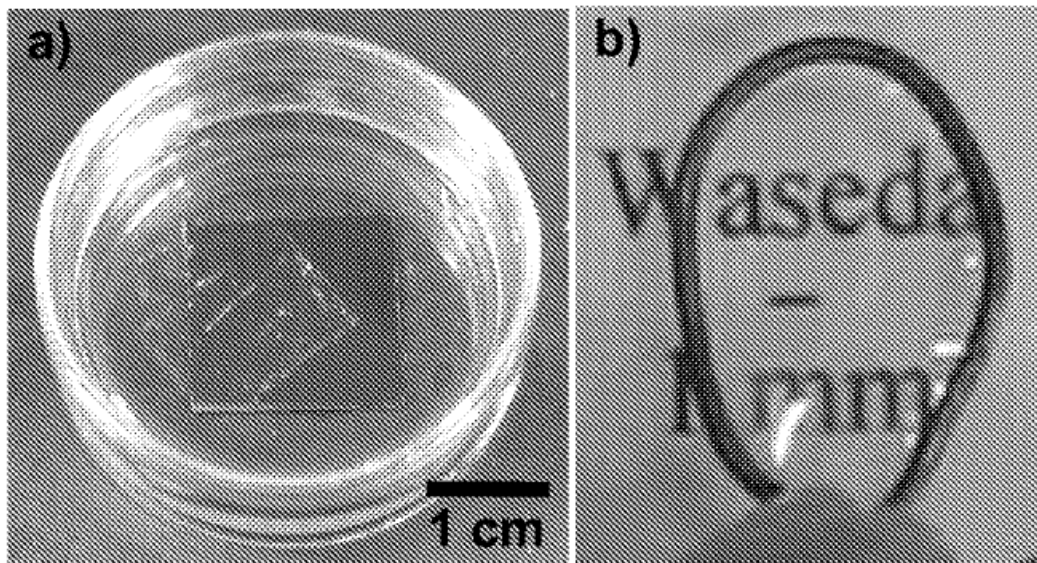


FIG. 10

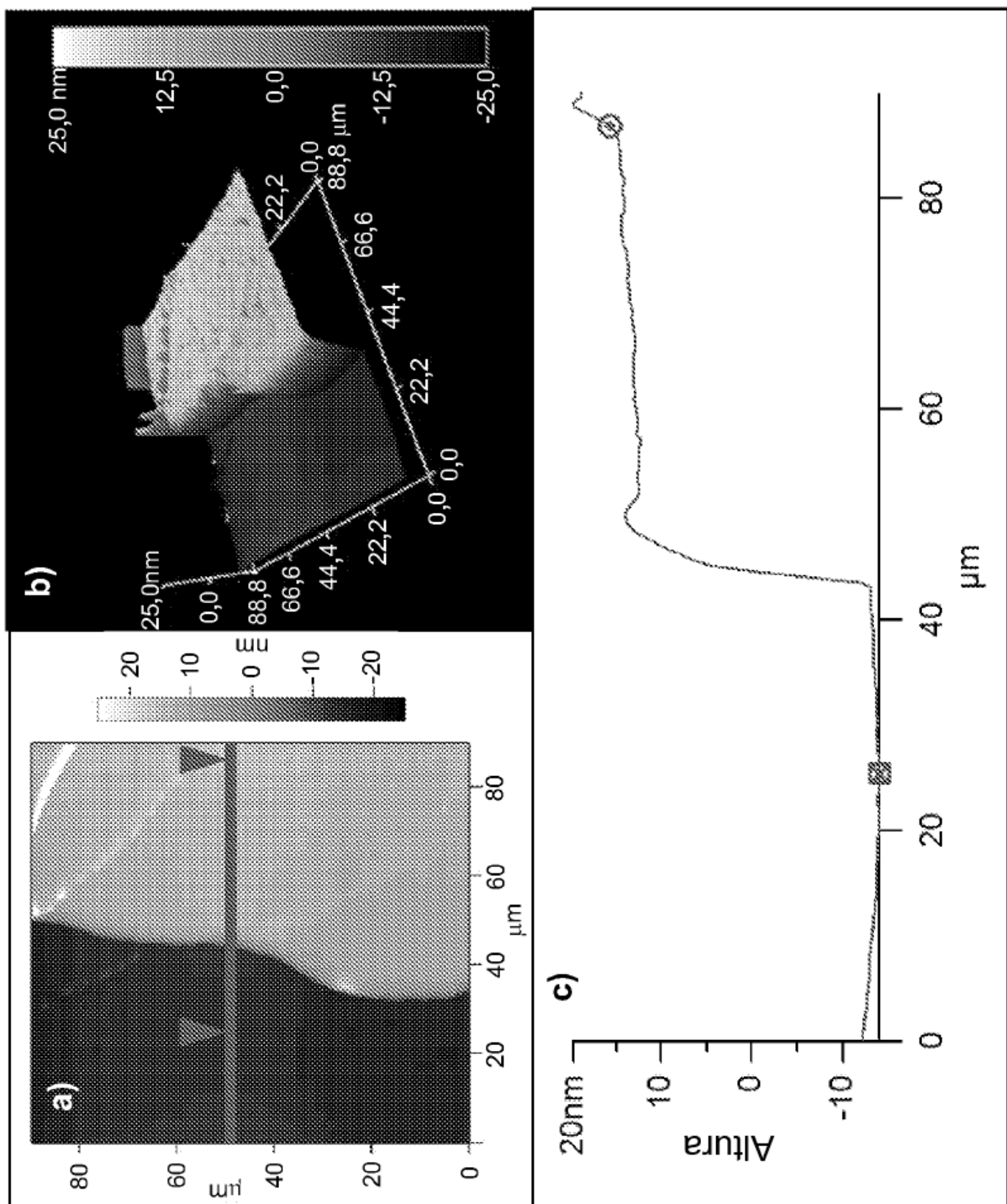


FIG. 11

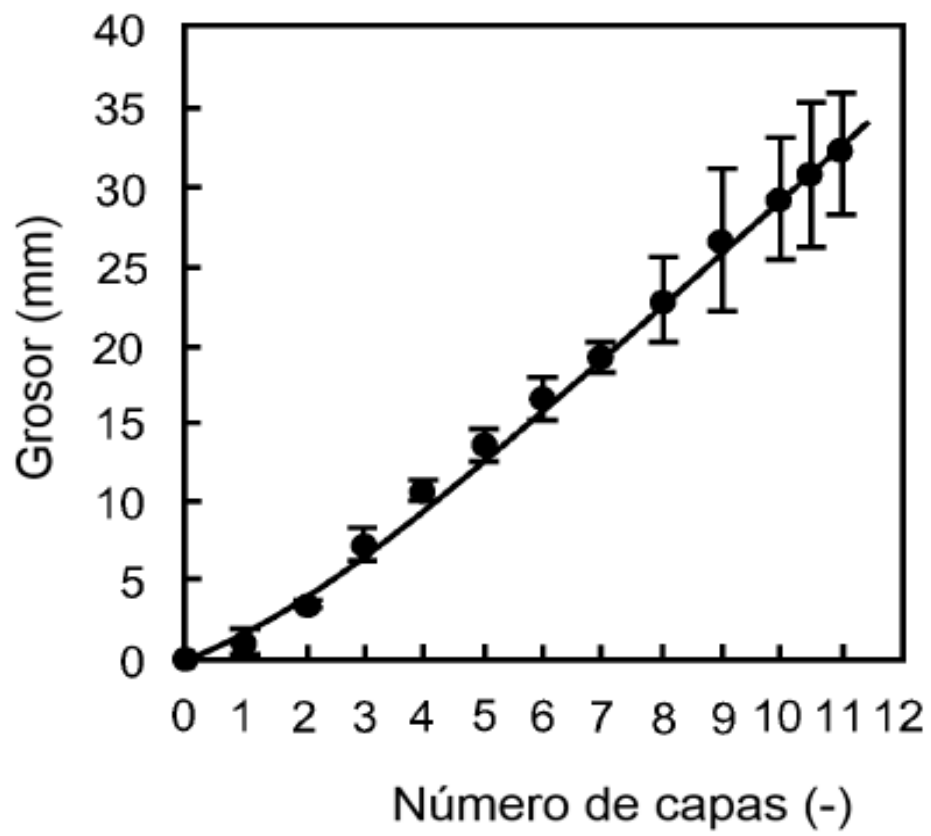


FIG.12

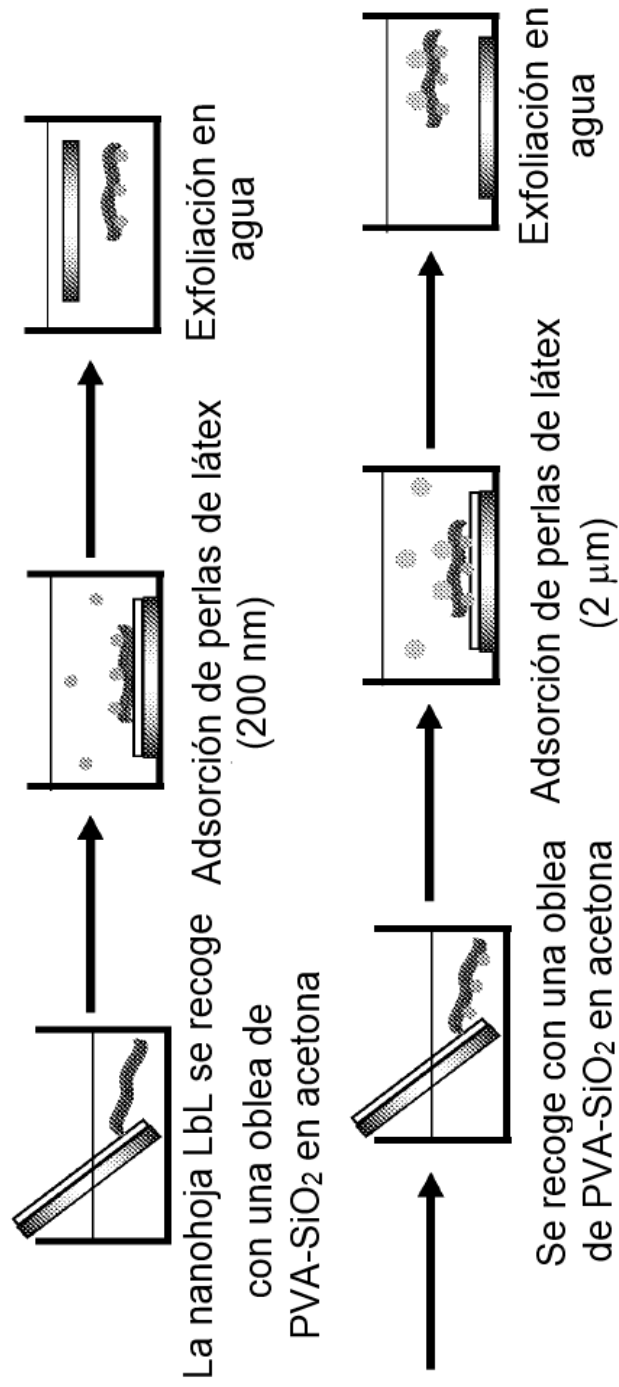


FIG.13

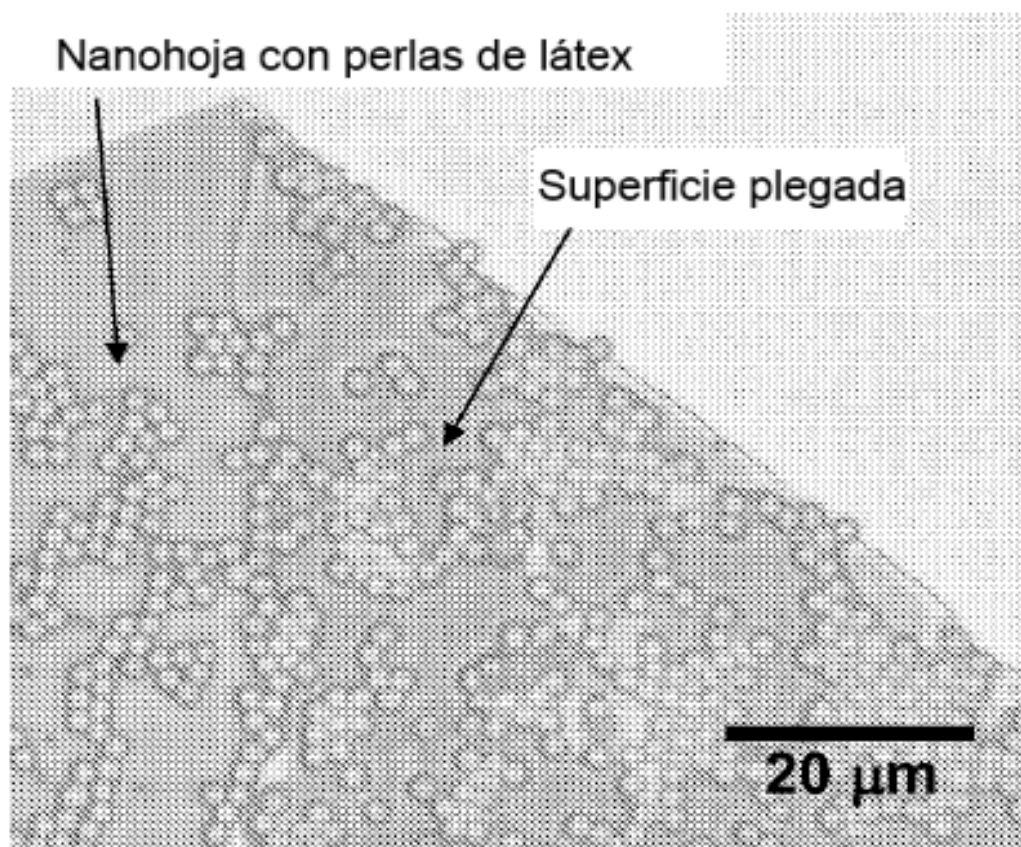


FIG.14

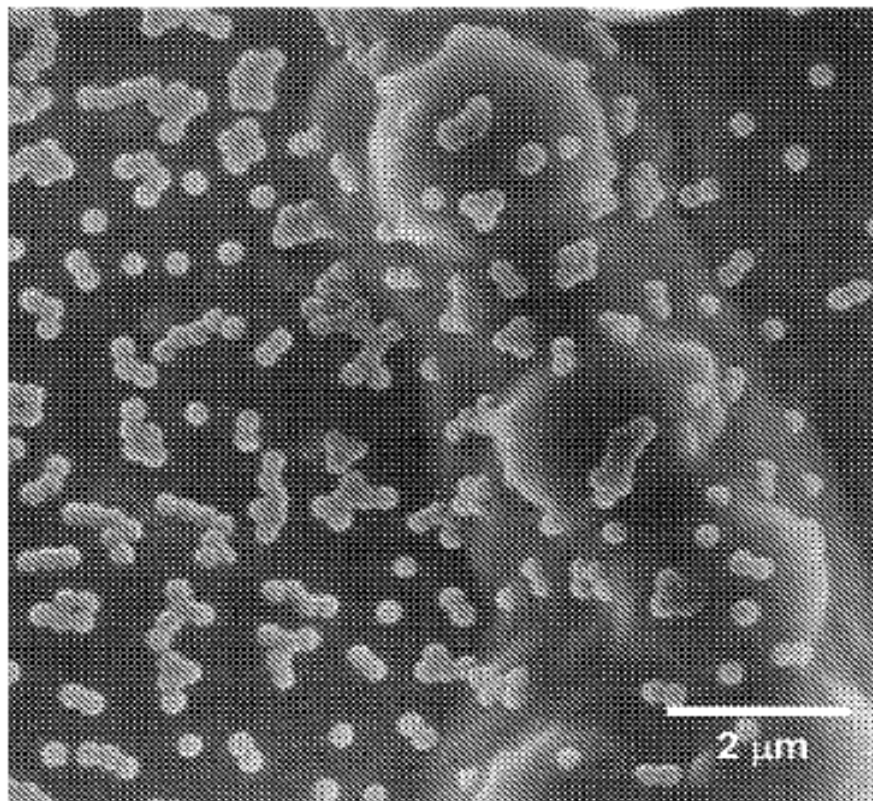


FIG.15

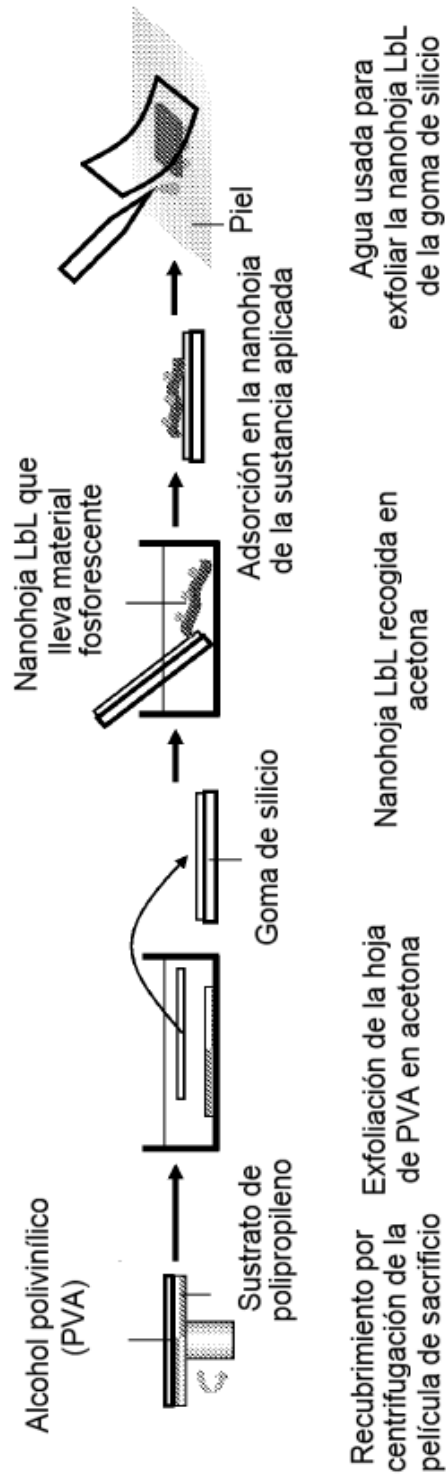


FIG.16

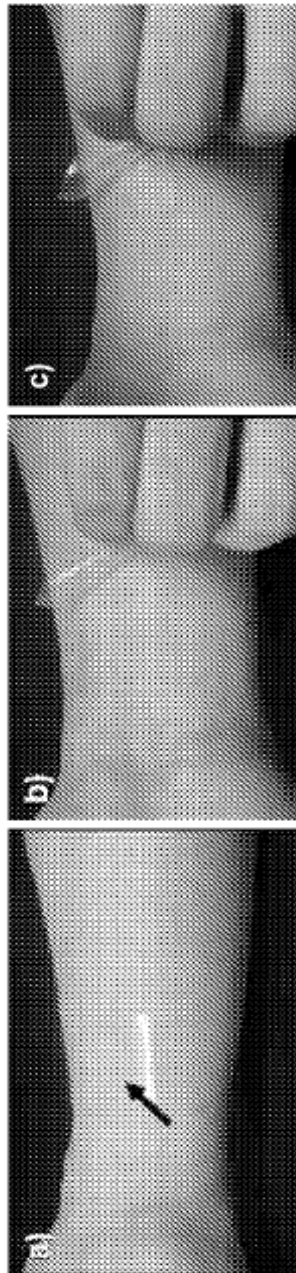


FIG.17

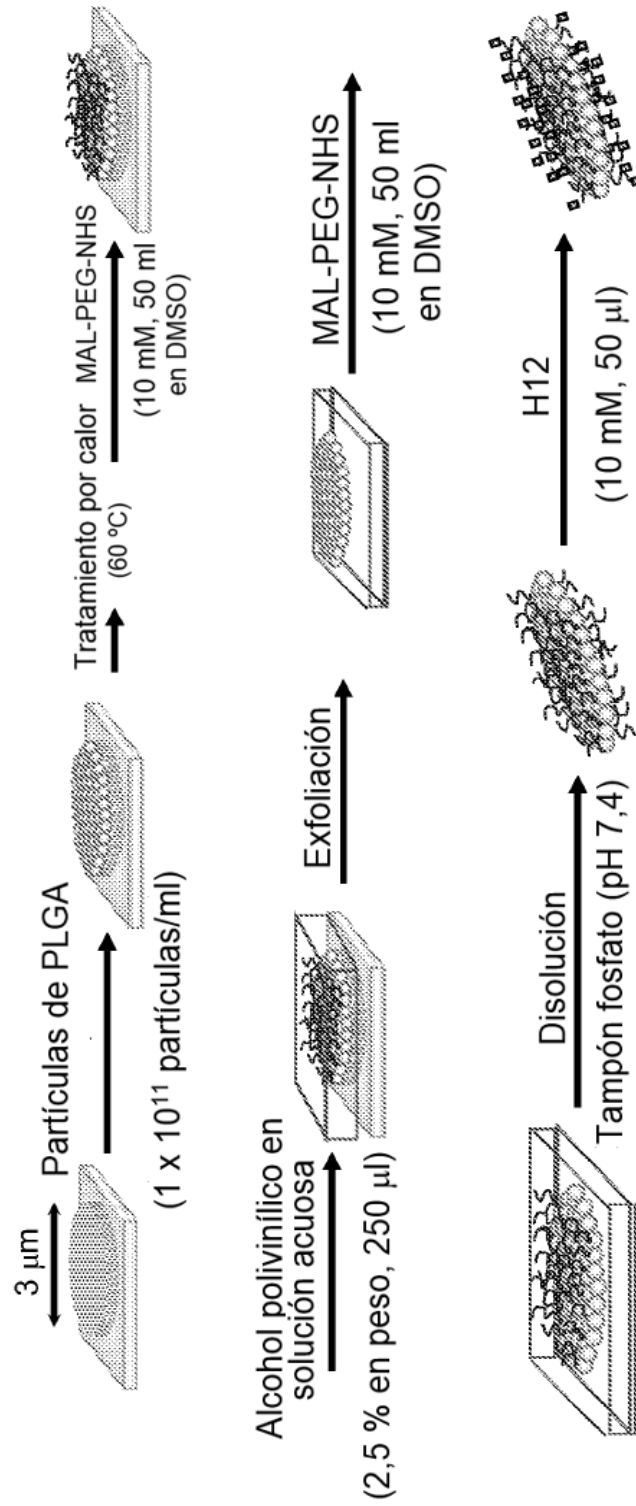


FIG.18

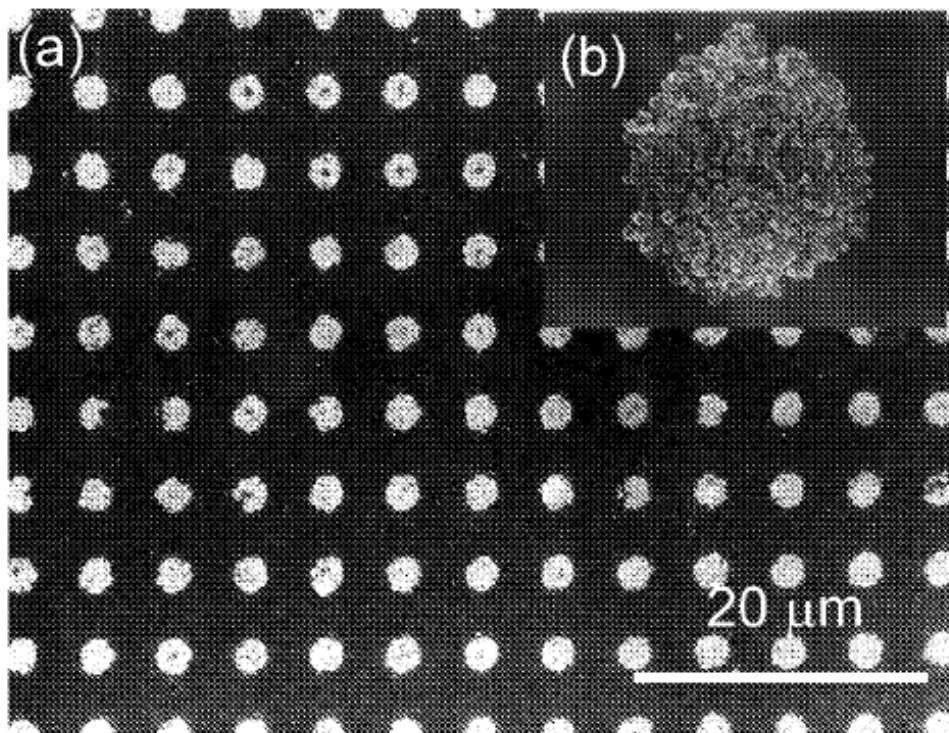


FIG.19

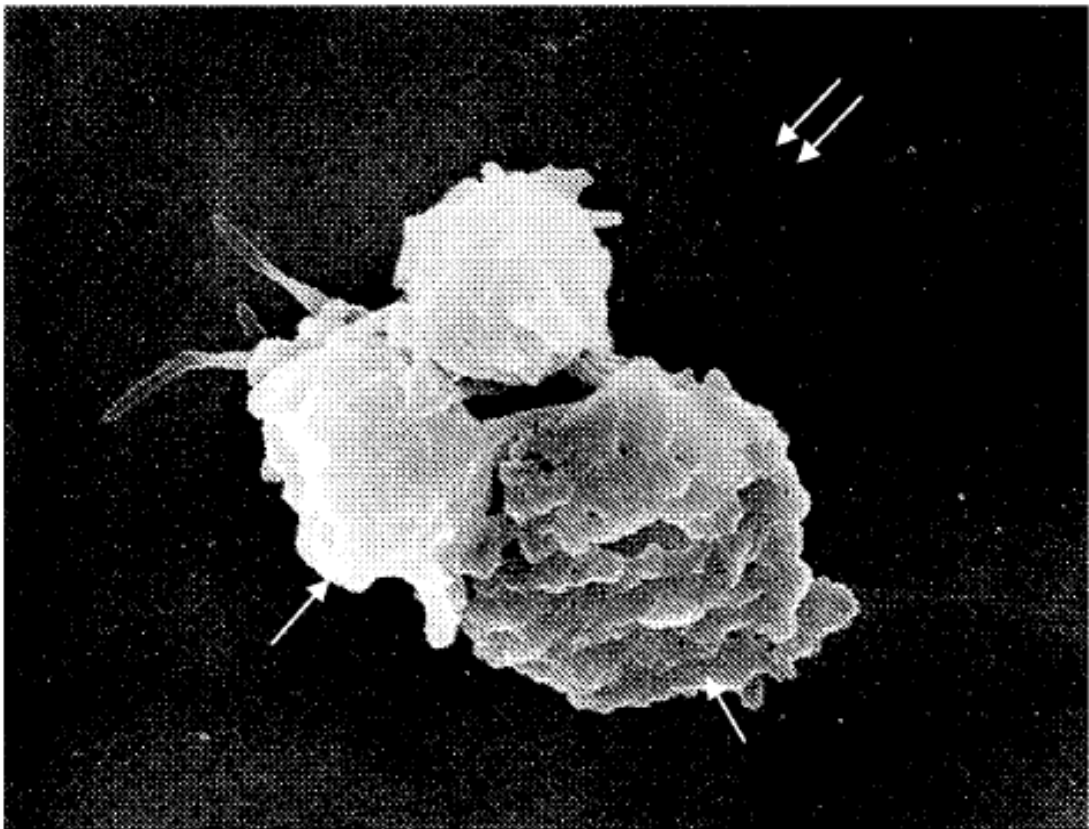


FIG.20

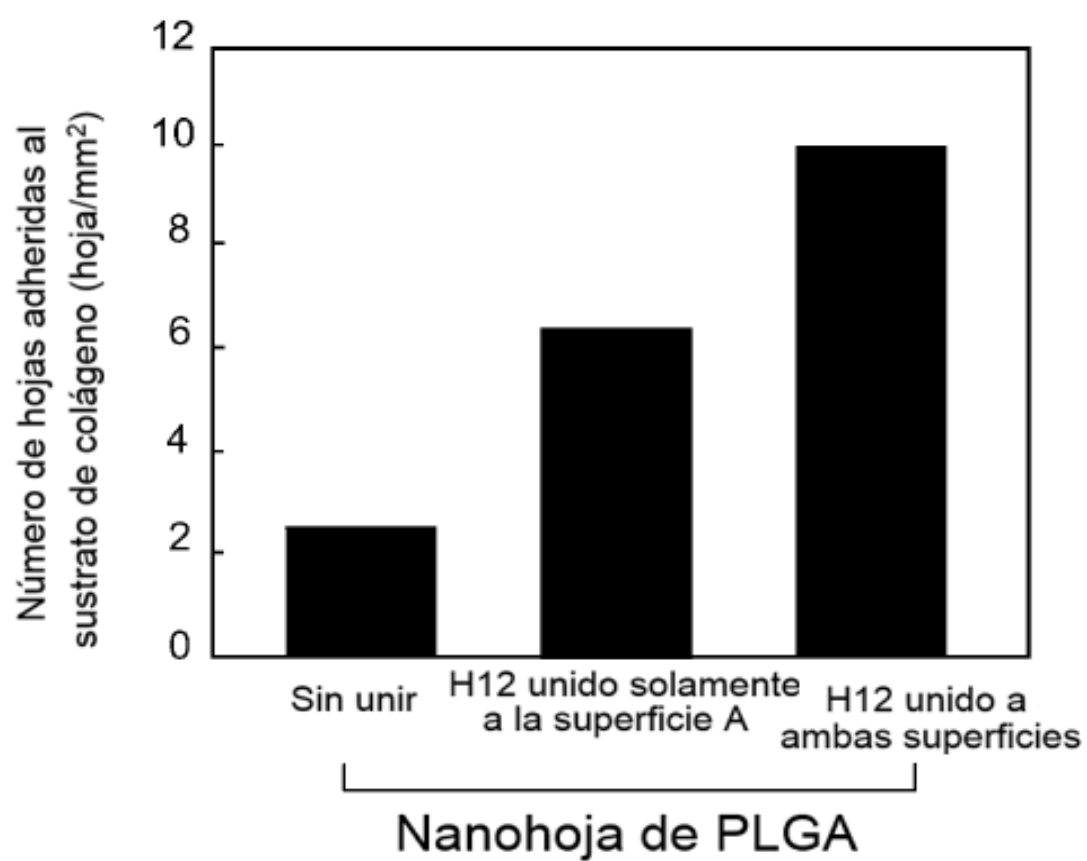


FIG.21

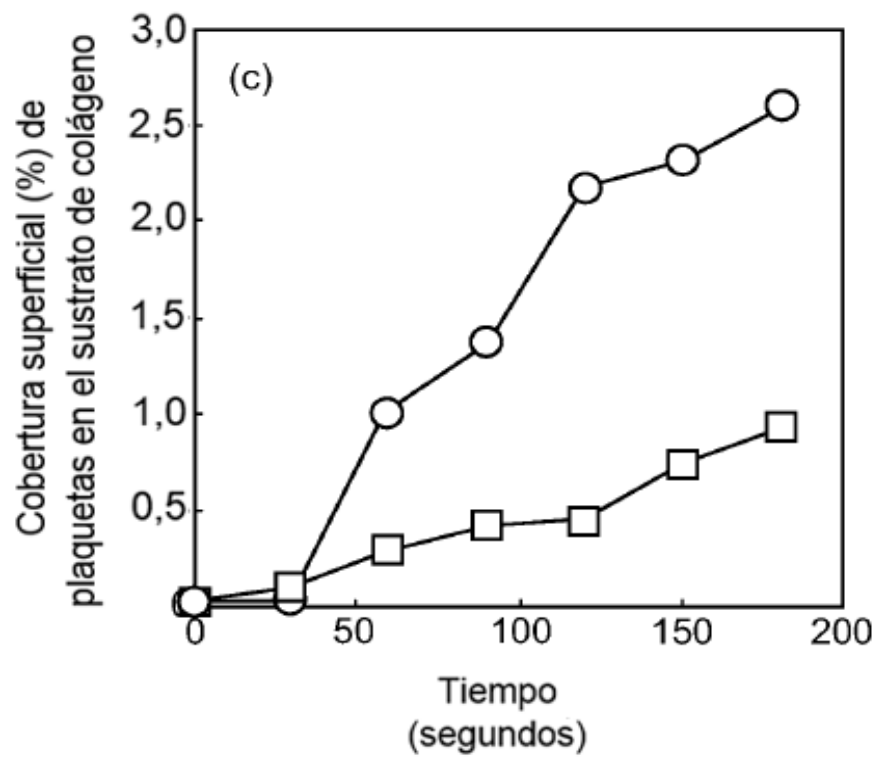
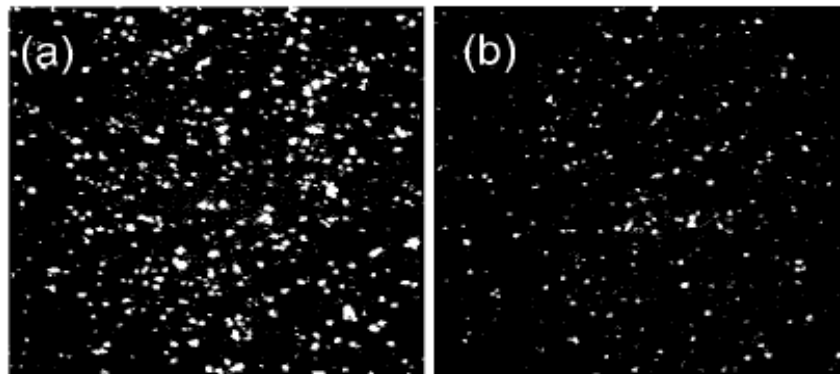


FIG.2 2

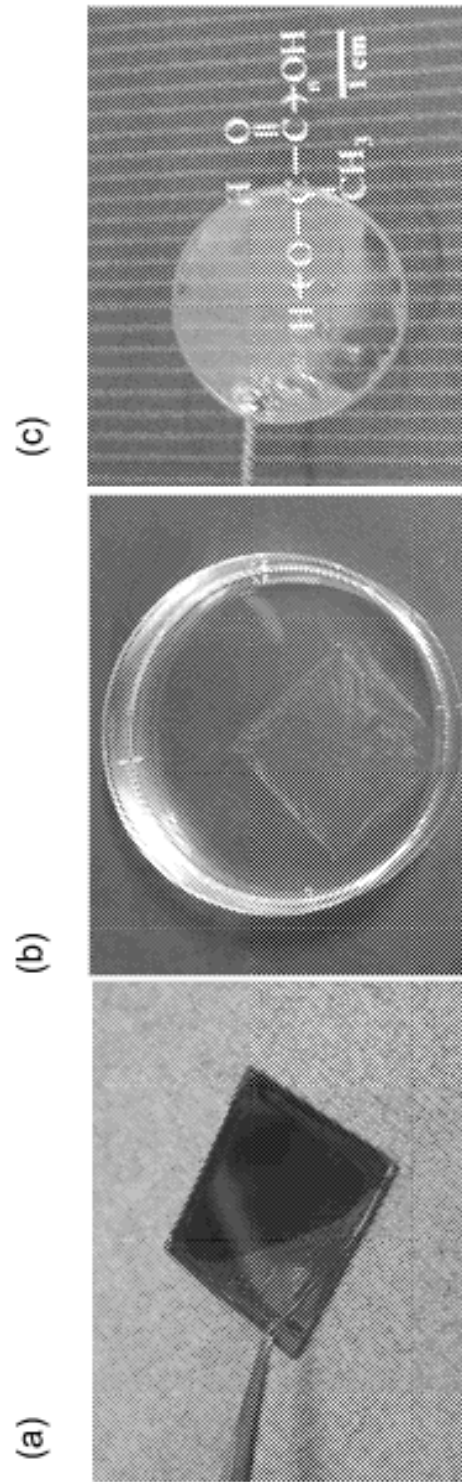


FIG.2 3

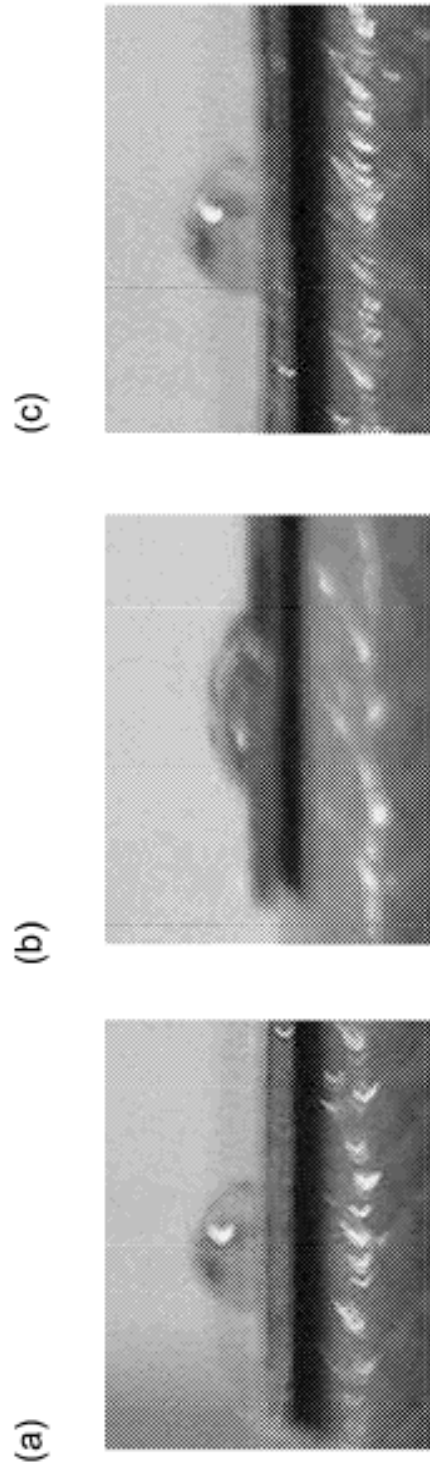


FIG.2 4

