



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 353 246**

51 Int. Cl.:

B82B 3/00 (2006.01)

G03F 7/20 (2006.01)

G03F 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06726950 .6**

96 Fecha de presentación : **28.04.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1888455**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.02.2008**

54 Título: **Procedimiento para crear un artículo utilizando la punta de un marcador de micromatrices.**

30 Prioridad: **04.05.2005 GB 0509213**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.02.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.02.2011

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

72 Inventor/es: **Badyal, Jas Pal Singh;**
McGettrick, James y
Harris, L. G.

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

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

La invención se refiere a un procedimiento para crear un artículo que incluye un sustrato con por lo menos una superficie modelada con una funcionalidad química presentando por lo menos una parte de dicha superficie un propiedad
5 física y/o química distinta, que es diferente a la del resto de dicha superficie.

El modelado químico de superficies sólidas es de crucial importancia en numerosos campos tecnológicos, incluyendo la fabricación matricial
10 genómica/proteómica, la microelectrónica, sensores, y la microhidráulica. Los procedimientos empleados actualmente para modelar incluyen: fotolitografía, ablación con laser, estampado de superficies, segregación de copolímeros bloque, litografía blanda. Muchas de estas técnicas tienen restricciones inherentes, en la mayoría de los casos la necesidad de sustratos
15 químicamente específicos muy planos, el empleo de láseres caros y máscaras prefabricadas, y el uso dañino para el medio ambiente de disolventes y agentes corrosivos.

Un medio general para producir patrones exactos de cualquier funcionalidad
20 química, sobre cualquier superficie o artículo, sin recurrir o limitarse a químicas y disolventes específicos, es por lo tanto una adición útil e innovadora para la técnica.

El uso preferido de técnicas de plasma, para generar por lo menos uno de los
25 revestimientos o superficies utilizados, hace que el procedimiento resulte de una utilidad incluso mayor y más extendida. Las técnicas de plasma son reconocidas por ser una alternativa limpia, seca y eficaz con la energía y los materiales a procedimientos estándar con sustancias químicas húmedas para producir superficies que incorporan funcionalidades adaptadas.

30 Los plasmas se han empleado con éxito en procedimientos anteriores para el modelado de superficies. La deposición de polímero de plasma a través de una máscara se ha utilizado para moldear nanotubos de carbono (Chen y otros, Appl. Phys. Lett. 2000, 76, 2719), polímeros (Dai y otros, J. Phys. Chem. B, 1997, 101, 9548), y células conductoras (France y otros, Chem. Mater. 1998, 10, 1176). Sin embargo, estas técnicas están limitadas a
35 sustratos llanos y planos (por ejemplo sílice o vidrio) con el fin de mantener

la premisa de un estrecho contacto físico con la máscara y asegurar adecuadamente una reproducción de alta definición de sus características.

5 Propuestas alternativas que pueden utilizar aspectos de modelado con plasma incluyen la litografía por nanoesfera, y la aplicación de técnicas de fotolitografía. En el caso de la litografía por nanoesfera, resulta difícil extender el patrón sobre zonas grandes, mientras que la fotolitografía depende de manera crítica de la aplicación de fotoresistencias y la vulnerabilidad del sustrato a daños por radiación.

10

Se ha empleado también la litografía basada en sonda de barrido, es decir, el raspado mecánico con puntas microscópicas tunelizadoras de barrido, puntas microscópicas de fuerza atómica, o puntas microscópicas de sonda de barrido, para modelar superficies (Nyffenegger y Penner, Chem. Rev. 1997, 15 97, 1195; Krämer y otros, Chem. Rev. 2003, 103, 4367). Se ha utilizado también la técnica de grabado empleando moldes para el modelado de superficies (Chou y otros, Appl. Phys. Lett. 1995, 67(21), 3114).

De acuerdo con esta invención, se dispone un procedimiento para la 20 fabricación de una superficie químicamente y/o físicamente modelada en un sustrato, incluyendo dicho procedimiento la disposición de por lo menos una superficie o subcapa homogénea de una funcionalidad química deseada y en la cual se aplica un material químicamente distinto para formar una capa adicional o superior que presenta una barrera física y química a la por lo 25 menos una subcapa o superficie y el patrón se crea eliminando selectivamente por lo menos parte de dicha capa adicional o superior mediante perforado utilizando una punta de un dispositivo de micromatrices para revelar la(s) funcionalidad(es) de la capa química subyacente de la por lo menos una superficie o subcapa homogénea que queda limitada 30 espacialmente al patrón deseada por la capa superior circundante existente.

En una realización, la por lo menos una subcapa está formada a través de unos medios que incluyen la deposición por lo menos de un material para formar la capa y/o la modificación de la superficie del sustrato para formar la 35 capa.

Se dispone, por lo tanto, en una realización un procedimiento para la fabricación de superficies químicamente y físicamente modeladas de alta definición en sustratos no planos. El citado procedimiento comprende típicamente generar inicialmente una(s) capa(s) homogénea(s) de una funcionalidad química deseada, a través de medios que incluyen la deposición de un(os) revestimiento(s) que lleva(n) dicha funcionalidad, o de otra manera modificando adecuadamente la superficie del sustrato. Después, puede aplicarse la capa superior químicamente distinta, la cual presenta una barrera física y química a la interacción de la(s) subcapa(s) con el entorno. El patrón puede crearse directamente de manera selectiva eliminando la capa superior mediante perforación utilizando una punta de un dispositivo de micromatrices para revelar la(s) funcionalidad(es) subyacentes, limitadas espacialmente al patrón deseado por la capa superior circundante existente. La(s) subcapa(s) activa(s) puede(n) utilizarse entonces por cualquier medio tal como es conocido en la técnica.

En una realización, puede aplicarse una serie de subcapas o revestimientos al sustrato antes de la aplicación de la capa superior o adicional, es decir, que la propia capa inferior funcionalizada citada comprende múltiples capas. La abrasión de la pila de múltiples capas resultante a profundidades variables permitiría entonces la formación de una variedad de características que mostrarían funcionalidades diferentes, posiblemente múltiples. Unos medios adecuados para conseguir la profundidad de abrasión variable/eliminación de revestimiento necesario son un marcador robótico de micromatrices equipado con una serie de puntas de distintas longitudes.

Las capas químicamente funcionalizadas que pueden modelarse con una gran utilidad posterior incluyen una gama de polímeros químicamente reactivos que pueden además reaccionar/derivatizar o presentar intrínsecamente propiedades útiles (incluyendo, aunque no limitándose a éstas, hidrofobicidad, bioactividad, unión a proteínas, resistencia a proteínas, adhesión celular y unión a ADN).

Un ejemplo específico de dicho polímero funcionalizado es poli(glicidil metacrilato) que presenta la capacidad de enlazarse covalentemente a nucleófilos tales como aminas. Una superficie que lleva un patrón de poli(glicidil metacrilato) tiene, por lo tanto, una gran utilidad para crear

matrices dirigidas espacialmente de biomoléculas terminadas en amina, tales como cadenas derivatizadas de ADN y proteínas.

Otros polímeros que poseen una gran utilidad cuando se aplican en patrones
5 superficiales incluyen, aunque no se limitan a éstos, polímeros
funcionalizados de aldehído, tales como poli (3-vinilbenzaldehído) y poli (10-
undecenal), que pueden derivatizarse posteriormente con biomoléculas
funcionalizadas de amina; polímeros funcionalizados de tiol, tales como poli
(alil mercaptano), que pueden derivatizarse posteriormente con grupos
10 terminados en tiol (a través de la química del puente disulfuro); polímeros
funcionalizados de piridina, tales como poli (4-vinil piridina), que son ambos
superhidrófilos y pueden derivatizarse o cuaternizarse posteriormente con
especies que incluyen haloalcanos; y polímeros funcionalizados de halógeno,
tales como poli (2-bromoetilacrilato) y poli (4- cloruro de vinil bencil), que
15 pueden utilizarse como sitios iniciadores para procedimientos de injerto (por
ejemplo, polimerización de radicales con transferencia de átomos).

En realizaciones alternativas de la invención, la capa funcionalizada
modelada puede ser de naturaleza no polimérica. Ejemplos adecuados
20 incluyen metales, semiconductores, elementos no metálicos, cerámica, y
otras superficies inorgánicas tales como nitruro de silicio y dióxido de titanio.
Las superficies de dióxido de silicio son particularmente útiles debido a su
predisposición a reacciones de acoplamiento con una enorme gama de
reactivos de alcoxisilano y clorosilano fácilmente disponibles.

25 Las superficies funcionales citadas anteriormente pretenden ser ilustrativas y
no limitativas. Debería ser claro para cualquier experto en la técnica que
existe una enorme gama de grupos funcionales que pueden resultar
beneficiosos si se modelan de acuerdo con el procedimiento de la invención.
30 De hecho, cualquier funcionalidad que confiera propiedades opuestas a las
de la capa superior que estén modeladas pueden ser adecuadas para su uso
en la invención. Ejemplos de propiedades que pueden dar valor a un sustrato
cuando se expone en un patrón incluyen, aunque no limitan a éstas,
hidrofobicidad, hidrofiliidad, reactividad química específica, capacidad de
35 detección química, resistencia al desgaste, barrera de gas, filtración,
comportamiento anti-reflectante, liberación controlada, resistencia a líquidos o
manchas, lubricidad mejorada, adhesión, resistencia a proteínas,

biocompatibilidad, bioactividad, estímulo del crecimiento celular, y capacidad de unirse selectivamente a biomoléculas.

La capa superior que se aplica sobre la superficie funcional debe presentar una barrera a cualquier interacción de su(s) capa(s) inferior(es) con el entorno en la escala de tiempo del uso al cual está destinado. Además, la citada capa superior debe ser bastante blanda para facilitar su extracción por perforación, revelando así la capa inferior funcionalizada en el patrón deseado. Capas particularmente adecuadas para este fin son revestimientos finos poliméricos, metálicos, o inorgánicos que son substancialmente inertes e insolubles respecto tanto a su capa inferior funcionalizada como a cualquier procedimiento posterior (por ejemplo derivatización química).

En una realización de la invención, la capa superior es de naturaleza polimérica. En una realización particularmente preferida de la invención, la capa superior es una película fina de polímero de plasma pulsado. En otra realización preferida de la invención, la capa superior es una fina película polimerizada de plasma pulsado de poliestireno.

El grosor óptimo de dicha capa superior utilizada en el procedimiento de la invención depende de una serie de factores. Éstos incluyen las características de barrera del material de la capa superior respecto a cualquier entorno exterior que pueda experimentar, las propiedades de la superficie funcional subyacente y su intervalo eficaz, las características del sustrato (por ejemplo composición, nivel de planaridad, rugosidad), y los medios de eliminación de la capa superior a emplear (por ejemplo perforando con una punta de un dispositivo de micromatrices).

La preocupación más fundamental es que la capa superior sea lo suficientemente gruesa para evitar cualquier interacción significativa de la superficie funcional subyacente con el entorno. De este modo, se crea un contraste entre zonas en las que se ha eliminado la capa superior, y zonas circundantes de funcionalidad protegidas por la capa superior existente.

En realizaciones de la invención en las que la funcionalidad modelada interacciona por contacto directo con su entorno, la capa superior puede ser muy fina. Por ejemplo, si la capa inferior funcionalizada comprende un

- polímero reactivo, tal como poli(glicidil metacrilato) que, tras el moldeo, se utiliza para unirse directamente a biomoléculas (tales como cadenas de ADN terminadas en amina), la capa superior de protección solamente requiere una durabilidad suficiente para presentar un obstáculo químico y difusional a la química de enlace de ADN de solución-fase. Estas condiciones de barrera las puede cumplir una película fina de cualquier material substancialmente inerte e insoluble, por ejemplo poliestireno, de un espesor menor de 1000 nm, y más preferiblemente de un espesor menor de 200 nm.
- 10 Puede utilizarse una diversidad de medios para generar las capas utilizadas en el procedimiento de la invención. La(s) capa(s) inicial(es) que lleva(n) la funcionalidad puede(n) crearse aplicando un revestimiento (o revestimientos) a un sustrato, modificando químicamente una superficie preexistente (por ejemplo, por modificación química húmeda o utilizando un tratamiento superficial de plasma), o puede comprender la funcionalidad superficial innata del sustrato (por ejemplo, la funcionalidad del silanol reactivo inherente a superficies de sílice las hace adecuadas para modelado sin modificación adicional).
- 15 Si la creación de una capa utilizada en el procedimiento de la invención se consigue mediante la aplicación de un revestimiento, puede utilizarse cualquier medio que sea conocido en la técnica. Procedimientos adecuados incluyen, aunque no se limitan a éstos: deposición química húmeda, deposición de plasma, deposición de vapor químico, deposición sin corriente eléctrica, deposición fotoquímica, recubrimiento por rotación, moldeo por disolvente, rociado, polimerización, polimerización de injerto, deposición por haz de electrones, y deposición por haz de iones.
- 20 La capa superior (que actúa de barrera y posteriormente se elimina de manera selectiva) puede depositarse encima de la capa inicial que lleva la funcionalidad por cualquier medio tal como es conocido en la técnica (incluyendo, aunque no se limita a éstos, recubrimiento por rotación, moldeo por disolvente, rociado, deposición de vapor químico, y procedimientos de plasma). La única limitación es que los medios para generar la capa superior no deben dañar o de otra manera comprometer la utilidad de la(s) capa(s) funcional(es) inferior(es) (excepto presentando una barrera físicamente eliminable a su interacción con el entorno).
- 30
- 35

En una realización específica del procedimiento, la(s) capa(s) que lleva(n) la funcionalidad se deposita(n) sobre el sustrato por medio de plasmas de desequilibrio que funcionan a baja presión, presiones subatmosféricas, o a presión atmosférica.

En otra realización específica del procedimiento, la capa superior (que actúa de barrera y posteriormente se elimina de manera selectiva) es un revestimiento depositado sobre la capa que lleva la funcionalidad por medio de un plasma de desequilibrio a baja presión, presiones subatmosféricas, o a presión atmosférica.

Por lo tanto, en realizaciones preferidas de la invención, cualquiera o ambas capas (la capa inferior que lleva la funcionalidad para ser modelada, y la capa superior de barrera) son revestimientos depositados por medio de plasma de desequilibrio.

En otras realizaciones preferidas de la invención, los revestimientos de plasma depositados son depositados por medio de técnicas de polimerización de plasma pulsado.

Puede utilizarse una variedad de procedimientos para eliminar selectivamente la capa superior de la capa inferior funcionalizada. Dichos medios son preferiblemente de naturaleza física y se basan en abrasión tribológica para eliminar la capa de barrera y exponer la capa funcional en el patrón espacial deseado. Resultan especialmente favorables las técnicas que permiten la preparación de características a escala micrométrica y nanométrica. Dichos patrones resultan muy difíciles de preparar por medios alternativos y permiten la preparación de una variedad de dispositivos incluyendo, aunque no limitándose a estos: microelectrónica genómica/proteómica de alto rendimiento, sensores, y microhidráulica.

En la presente invención se utiliza la punta de un dispositivo de micromatrices para eliminar selectivamente la capa superior y exponer la capa inferior funcionalizada. Los dispositivos de micromatrices (tales como los fabricados por Genetix Limited, Hampshire, Reino Unido) se utilizan normalmente generar matrices de proteína/ADN, utilizando una punta para transferir

pequeñas gotas de una solución proteína/ADN desde unas cavidades de almacenamiento sobre una superficie reactiva en lugares dirigidos espacialmente ("marcado"). En una realización preferida del procedimiento de la invención, la punta de marcado del citado dispositivo micromatrices está

5 configurada de manera que penetra en la capa superior, exponiendo la superficie funcional inferior. El tamaño y la forma de las características creadas por esta técnica dependen del área en sección transversal de la punta, típicamente de 1-200 μm . Es evidente que esta etapa de eliminación de la capa superior puede ir acompañada del suministro simultáneo de una

10 pequeña gota de líquido, posibilitando la modelación y la derivatización concomitante de una superficie. La utilización en el procedimiento de una capa superior que actúa de barrera a cualquier interacción de pequeñas gotas con la capa funcional en el exterior del diámetro de la punta, permite el marcado a resoluciones mucho mayores de lo que es posible utilizando

15 técnicas de micromatriz existentes.

En otra realización preferida del procedimiento, en la que la capa superior se aplica sobre una pila de varias capas de revestimientos funcionales, se requiere que los medios para eliminar el revestimiento puedan aplicarse a

20 diferentes profundidades. La aplicación de dichos medios de eliminación permite la formación de características que muestren diferentes combinaciones de funcionalidad expuesta en el mismo sustrato. Aparatos capaces de suministrar la profundidad variable necesaria de abrasión/eliminación de revestimiento incluyen marcadores robóticos de

25 micromatrices equipados con una multitud de puntas de diferentes longitudes.

Sin embargo, son especial de utilidad aquellos medios de eliminación de la capa superior capaces de crear patrones y características a escalas suficientemente pequeñas para permitir la producción de micromatrices

30 biológicas. Para tal fin, son especialmente deseables características menores de 100 μm .

Puede disponerse un artículo en forma de sustrato que presente por lo menos una superficie o subcapa con una primera funcionalidad química y una capa

35 superior aplicada encima que presente una funcionalidad química distinta en el que parte de dicha capa superior se elimine de manera selectiva por perforación utilizando una punta de un dispositivo de micromatrices para

formar un patrón deseado para exponer la funcionalidad química del material de dicha superficie y/o subcapa limitada al patrón deseado.

5 En una realización preferida, se aplica por lo menos una subcapa al sustrato, con dicha capa superior aplicada encima. En una realización se aplica una pluralidad de subcapas y la capa superior y la(s) subcapa(s) seleccionada(s) se elimina(n) para exponer selectivamente el material de la(s) subcapa(s) seleccionada(s) en partes predefinidas del sustrato.

10 Típicamente se eliminan partes del material de la capa superior para formar un patrón preferido de áreas expuestas de la subcapa y/o la superficie.

La capa superior actúa típicamente de barrera a la exposición de la superficie cubierta y/o subcapa al entorno exterior.

15

En realizaciones preferidas de la invención cualquiera o ambas capas (la capa inferior que lleva la funcionalidad para ser modelada, y la capa superior de barrera) son polímeros de plasma. Los polímeros de plasma se generan típicamente sometiendo un precursor que forma el revestimiento a un campo
20 eléctrico ionizante bajo condiciones de baja presión. Aunque los plasmas a presión atmosférica y subatmosférica (incluyendo dispositivos de pulverización atomizada) son conocidos y utilizados para este fin en la técnica, la deposición se produce cuando especies excitadas generadas por la acción del campo eléctrico sobre el precursor (radicales, iones, moléculas
25 excitadas, etc.) polimerizan en la fase gaseosa y reaccionan con la superficie del sustrato para formar una película de polímero creciente.

Sin embargo, se ha observado que la utilidad de revestimientos depositados con plasma se ve a menudo comprometida por una excesiva fragmentación
30 del precursor que forma el revestimiento durante el procesamiento del plasma. Este problema se ha tratado en la técnica pulsando el campo eléctrico aplicado en una secuencia que produzca una potencia media muy baja limitando así la fragmentación de monómeros y aumentando la semejanza del revestimiento a su precursor (es decir, mejorando la “retención
35 de monómeros”). Ejemplos de dichas secuencias incluyen aquellas en las cuales el plasma se encuentra activo durante 20 μ s e inactivo entre 1000 μ s y 20000 μ s. La solicitud de patente internacional WO9858117 (The Secretary of

State for Defence, GB) describe dicho proceso en el cual se producen revestimientos de repelentes al aceite por polimerización de plasma pulsado de monómeros de acrilato perfluorados.

- 5 Las condiciones precisas bajo las cuales la deposición de plasma pulsado del (de los) revestimiento(s) utilizado(s) en el procedimiento de la invención se produce de manera eficaz varían en función de factores tales como la naturaleza del (de los) monómero(s), el sustrato, el tamaño y la arquitectura de la cámara de deposición del plasma, etc. y se determinará utilizando
10 procedimientos y/o técnicas ordinarios que se ilustran más adelante. En general, sin embargo, se efectúa adecuadamente una polimerización utilizando vapores o pequeñas gotas atomizadas de los monómeros a presiones de 0,01 a 1000 mbar. Los plasmas más apropiados son aquellos que funcionan a bajas presiones, es decir, menores de 10 mbar,
15 particularmente a aproximadamente 0,2 mbar, aunque los plasmas a presión atmosférica (mayor o igual de 1000 mbar) y presión subatmosférica (10 a 1000 mbar) son conocidos y se utilizan para la deposición de polímeros plasma en la técnica.
- 20 Después se provoca una descarga luminiscente aplicando una tensión de alta frecuencia, por ejemplo a 13,56 MHz. Los campos aplicados son convenientemente de una potencia media de hasta 50 W.

Los campos se aplican adecuadamente durante un período suficiente para
25 formar el revestimiento deseado. En general, éste será de 30 segundos a 60 minutos, preferiblemente de 1 a 15 minutos, dependiendo de la naturaleza de los monómeros, el sustrato y el fin al cual se destine la película de polímero plasma (es decir, el revestimiento funcional o la capa superior de barrera), etc.

30 Convenientemente, la potencia media de la descarga de plasma pulsado es baja, por ejemplo menor de $0,05 \text{ W/cm}^3$, preferiblemente menor de $0,025 \text{ W/cm}^3$ y preferiblemente menor de $0,0025 \text{ W/cm}^3$.

35 El régimen de pulsación al que se suministrarán dichas bajas descargas de potencia media variará en función de la naturaleza del sustrato, el tamaño y la naturaleza de la cámara de descarga etc. Sin embargo, pueden determinarse

disposiciones pulsantes adecuadas mediante procedimientos ordinarios en cualquier caso particular. Una secuencia típica es aquella la cual se aplica potencia entre 10 μ s y 100 μ s, y se desactiva entre 1000 μ s y 20000 μ s.

- 5 Plasmas adecuados para utilizarse en el procedimiento de la invención incluyen plasmas de desequilibrio tales como los generados por audiofrecuencias, radiofrecuencias (RF) o frecuencias de microondas. En otra realización, el plasma se genera mediante un dispositivo de cátodos huecos. En otra realización, el plasma pulsado se produce por corriente continua
10 (CC).

El (los) plasma(s) puede(n) funcionar a bajas presiones por debajo de la atmosférica o a atmosférica tal como es conocido en la técnica. Los monómeros pueden introducirse en el plasma como vapor o una pulverización
15 atomizada de gotas líquidas (WO03101621 y WO03097245, Surface Innovations Limited). El (los) monómero(s) también puede(n) introducirse en el aparato de deposición de plasma pulsado de manera continua o de manera pulsada mediante, por ejemplo, una válvula de impulsos de gas.

20 El sustrato al cual se aplican el (los) revestimiento(s) se dispondrá preferiblemente substancialmente dentro del plasma pulsado durante la deposición del revestimiento. Sin embargo, el sustrato puede disponerse alternativamente fuera del plasma pulsado, evitando de este modo un daño excesivo al sustrato o revestimiento creciente.

25 El (los) monómero(s) será(n) excitado(s) típicamente directamente dentro de la descarga de plasma. Sin embargo, pueden utilizarse procedimientos de deposición de plasma "remotos" tal como es conocido en la técnica. En dichos procedimientos el monómero se introduce en el aparato de deposición
30 substancialmente "a continuación" del plasma pulsado, reduciendo potencialmente de este modo los efectos perjudiciales del bombardeo de especies de gran energía y corta duración tales como iones.

En las realizaciones alternativas de la invención dentro del aparato de
35 deposición del plasma hay presentes materiales adicionales al (a los) precursor(es) del revestimiento de polímero de plasma. Los materiales adicionales pueden introducirse en el aparato de deposición del revestimiento

de manera continua o de manera pulsada mediante, por ejemplo, una válvula de impulsos de gas.

5 Dichos materiales aditivos pueden ser inertes y actuar de tampón sin incorporarse ninguna de sus estructuras atómicas en el polímero de plasma creciente (ejemplos adecuados incluyen gases nobles). Puede ser necesario un tampón de este tipo para mantener una presión de proceso necesaria. El tampón inerte puede requerirse alternativamente para mantener la descarga de plasma. Por ejemplo, el funcionamiento de plasmas de descarga
10 luminiscente a presión atmosférica (APGD) requiere a menudo grandes cantidades de helio. Este diluyente de helio mantiene el plasma mediante un mecanismo de ionización de *Penning* sin llegarse a incorporar dentro del revestimiento depositado.

15 En otras realizaciones de la invención, los materiales aditivos tienen la capacidad de modificar y/o incorporarse en el material que forma el revestimiento y/o el revestimiento de plasma depositado resultante. Ejemplos adecuados incluyen otros gases reactivos tales como halógenos, oxígeno, y amoníaco.

20 En una realización, las partes se eliminan para así formar un patrón espacial de dichas partes con la(s) citada(s) funcionalidad(es) química(s).

25 En una realización, las partes expuestas son modificadas posteriormente por medio de cualquier reacción o interacción química o biológica.

En una realización, la deposición de plasma se utiliza para generar cualquiera, o ambas, de la superficie funcional deseada y/o dicha capa.

30 La invención se describirá ahora particularmente a modo de ejemplos con referencia a los dibujos que se acompañan, en los cuales:

La figura 1 muestra un análisis de imágenes de AFM topográfica y de sección transversal que no forma parte de la presente invención de una bicapa
35 modelada de polímero de plasma pulsado depositado en un sustrato de silicio, que comprende 20 nm de poliestireno sobre un revestimiento de 1500

nm de grosor de poli(glicidil metacrilato), selectivamente erosionado con la punta de una sonda AFM antes de la formación de imágenes.

La figura 2 muestra una imagen óptica de una bicapa modelada de polímero de plasma pulsado depositado en un sustrato de silicio, que comprende 20 nm de poliestireno sobre un revestimiento de 1500 nm de grosor de poli(glicidil metacrilato), selectivamente erosionado con la punta de una sonda AFM, que no forma parte de la presente invención, antes de la formación de imágenes.

10

La figura 3 muestra un mapa de fluorescencia de una bicapa modelada de polímero de plasma pulsado depositado en un sustrato de silicio, que comprende 20 nm de poliestireno sobre un revestimiento de 1500 nm de grosor de poli(glicidil metacrilato), selectivamente erosionado con la punta de una sonda AFM y posteriormente derivatizado con un colorante funcionalizado con amina (perclorato de cresil violeta) antes de la formación de imágenes.

15

La figura 4 es un esquema que muestra la fabricación de matrices de microcavidades. El sustrato se trata primero con un polímero de plasma reactivo (capa blanca), el cual es enmascarado después con un segundo polímero de plasma inerte (la capa oscura delgada). Después se utiliza una punta de un marcador robótico de micromatrices para pinchar repetidamente la superficie, produciendo una matriz de microcavidades que contienen el polímero de plasma reactivo expuesto.

25

La figura 5 muestra una imagen de microscopía de fluorescencia de una matriz de microcavidades derivatizada de oligonucleótidos marcados con Cy5 fabricada formada sobre una bicapa de poli (3-vinilbenzaldehído) y polímeros de plasma de poliestireno. El tamaño y la separación de las zonas brillantes corresponde al impacto de la punta de marcado, y confirma la exposición de la capa de poli (3-vinilbenzaldehído) reactiva.

30

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la presente invención aunque no pretenden limitarla:

35

Ejemplo 1

Se utilizó polimerización de plasma pulsado para depositar una capa de poli(glicidil metacrilato) reactiva sobre un sustrato de obleas de silicio. La superficie funcionalizada con epóxido resultante se cubrió entonces con una
5 capa superior de poliestireno, de nuevo por polimerización de plasma pulsado. La configuración se obtuvo utilizando una punta de una sonda de un microscopio de fuerza atómica (AFM) que no forma parte de la presente invención para rasgar zonas de esta capa de barrera de poliestireno. Las zonas expuestas a la funcionalidad subyacente de poli(glicidil metacrilato)
10 fueron selectivamente derivatizadas después con un colorante fluorescente funcionalizado de amina. La eficacia del modelado fue confirmada por microscopía de fluorescencia.

La deposición de plasma pulsado de la capa funcional inicial de poli(glicidil metacrilato) se llevó a cabo tal como sigue. Se cargó un precursor de
15 polímero de plasma de glicidil metacrilato (Fluka, >97% de pureza) en un tubo de vidrio que puede volverse a sellar y se purificó utilizando varios ciclos de congelación-bombeo-descongelación. La polimerización de plasma pulsado del monómero funcionalizado con epóxido se realizó en un reactor de vidrio
20 cilíndrico (4,5 cm de diámetro, 460 cm³ de volumen, a una presión de base de 2×10^3 mbar, tasa de fuga de $1,4 \times 10^9$ mols⁻¹) rodeado por una bobina de cobre (4 mm de diámetro, 10 vueltas, situada a 15 cm de la entrada del precursor) y encerrado en una jaula de Faraday. La cámara fue evacuada utilizando una bomba rotativa de 30 L min⁻¹, conectada a través de una
25 trampa fría de nitrógeno líquido, y la presión se controló con un manómetro de *Pirani*. Todos los adaptadores estaban libres de grasa. Durante la deposición de plasma pulsado la fuente de alimentación de radiofrecuencia (13,56 MHz) fue activada por un generador de señal rectangular y la forma del pulso resultante fue controlada con un osciloscopio. La impedancia de
30 salida de la fuente de alimentación de RF coincidía con la carga de gas parcialmente ionizado utilizando una red adaptadora L-C.

Antes de utilizarse, el aparato fue limpiado cuidadosamente por frotamiento con detergente, aclarado en propan-2-ol, y secado en un horno. En esta
35 etapa, el reactor volvió a montarse y se evacuó a una presión de base. Se llevó a cabo una limpieza adicional que consistió en pasar plasma atmosférico de onda continua a 0,2 mbar y 40 W durante 30 minutos. Después, se insertó

una oblea de silicio (10 mm x 15 mm) en el centro del reactor y el sistema se volvió a evacuar a presión de base. El vapor del monómero se introdujo entonces en la cámara a una presión de 0,2 mbar para 5 mm antes de la ignición del plasma. Se encontró que una retención del grupo funcional de epóxido óptima en la superficie requería ráfagas de onda continua de 40 W que duraban 20 μ s (t_{on}) intercaladas por períodos de desconexión (t_{off}) de 20000 μ s. La potencia media suministrada al sistema durante este intervalo de pulsación fue por lo tanto de 0,04 W. Tras 60 minutos de deposición, el generador de RF se desconectó y se dejó purgar el precursor a través del sistema durante 5 minutos más. Finalmente, la cámara se volvió a evacuar a presión de base y se ventiló a la atmósfera.

La espectroscopia fotoelectrónica por rayos X (XPS), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) y reflectometría confirmaron la creación de una capa gruesa de 1565 nm de poli(glicidil metacrilato) en la oblea de silicio.

La deposición subsiguiente de la capa superior de poliestireno se consiguió utilizando un procedimiento de polimerización de plasma pulsado análogo al descrito anteriormente. Un monómero de estireno (Sigma, > 99% de pureza, purificado adicionalmente por varios ciclos de congelación-bombeo-descongelación) fue polimerizado en un aparato de deposición de plasma idéntico, a una presión de vapor de 0,2 mbar, durante 5 minutos, utilizando ráfagas de onda continua de 40 W que duraban 100 μ s (t_{on}) intercaladas por períodos de desconexión (t_{off}) de 4000 μ s (la potencia media era por lo tanto de 0,98 W).

La presencia de una sobrecapa de poliestireno de ~20 nm de grosor encima de las obleas de silicio recubiertas de epóxido fue confirmada por XPS, reflectometría, y mediciones del ángulo de contacto con el agua (el ángulo de contacto con el agua aumentaba de $64^\circ \pm 4^\circ$, indicativo del poli(glicidil metacrilato), a $86^\circ \pm 1^\circ$, indicativo de poliestireno).

El modelado de la bicapa de plasma depositado en poli(glicidil metacrilato)/poliestireno se realizó y se observó utilizando un microscopio de fuerza atómica (Digital Instruments Nanoscope III, equipado con módulo de control, electrónica de prolongación y un módulo de acceso a señal). Tres zonas de la

capa superior de poliestireno fueron rasgadas físicamente utilizando una punta en modo de contacto intermitente (Nanoprobe, constante de rigidez 42-83 N/m) aplicada en modo contacto en el patrón seleccionado utilizando un programa escrito en el software de nanolitografía Veeco (versión 5.30r1). Las imágenes de las muestras modeladas se obtuvieron posteriormente en modo contacto a una velocidad de exploración de 1 Hz. Unos análisis topográficos y de sección transversal confirmaron la creación de tres zonas (5x5 μm , 5x6 μm , y 5X10 μm) donde la capa superior de poliestireno había sido eliminada a una profundidad de -20 nm, figura 1.

El éxito de la propuesta de modelado físico mediado por AFM se demostró mediante la fijación de un colorante funcionalizado de amina a los grupos epóxido expuestos de la película de poli(glicidil metacrilato) subyacente. La tinción comprendió sumergir la muestra modelada en una solución acuosa de un 1% de peso/volumen de perclorato de cresil violeta (Sigma) durante 1 hora antes de aclarar en agua destilada durante 24 horas y secar. Se utilizó un sistema de microscopía de fluorescencia (LABRAM, Tobin Yvon Ltd, equipado con un láser He-Ne de 633 nm) para representar ópticamente y trazar fluorescentemente la superficie modelada, figura 2 y figura 3. La representación por fluorescencia mostró claramente que la fijación del colorante cresil violeta se limitaba a zonas de poli(glicidil metacrilato) expuestas dentro de los cuadrados erosionados. Esto confirma que la polimerización de plasma pulsado es una metodología adecuada para la producción de capas tanto funcionales como barrera de la invención, y que la punta de una sonda de AFM es un medio eficaz y altamente controlable para la eliminación de la capa superior.

Ejemplo 2

Se utilizó polimerización de plasma pulsado para depositar una capa reactiva de poli(3-vinilbenzaldehído) sobre un cubreobjetos de vidrio de borosilicato. El revestimiento funcionalizado de aldehído resultante se protegió después con una capa superior inerte de poliestireno, de nuevo por polimerización de plasma pulsado. El modelado se realizó utilizando la punta de un marcador robótico de micromatrices para pinchar la capa de barrera de poliestireno, exponiendo las zonas subyacentes de poli(3-vinilbenzaldehído), figura 4. Estas microcavidades funcionalizadas de aldehído reaccionaron entonces

selectivamente con un oligonucleótido marcado fluorescentemente terminado en amina utilizando la química de aminación reductiva.

La polimerización de plasma pulsado se realizó utilizando un aparato y un procedimiento idénticos en términos generales al descrito en el ejemplo 1. La deposición de plasma pulsado de la capa reactiva de poli (3-vinilbenzaldehído) se realizó a partir de monómero de 3-vinilbenzaldehído (Aldrich, 97% de pureza, purificado adicionalmente por repetidos ciclos de liberación-bombeo-descongelación) a una presión de vapor de 0,2 mbar, durante 5 minutos, utilizando ráfagas de onda continua de 40 W que duraban 50 μ s intercaladas por períodos de desconexión (t_{off}) de 4000 μ s (la potencia media era por lo tanto de 0,49 W). Un análisis XPS y reflectometría confirmaron la deposición de una película de 200 nm de grosor que presentaba una buena retención estructural de la funcionalidad del monómero.

La deposición subsiguiente de una capa superior de poliestireno utilizó los mismos parámetros del plasma descrito en el ejemplo 1. Sin embargo, una mayor duración de la deposición tuvo como resultado una capa superior de ~180 nm de grosor de poliestireno sobre el cubreobjetos de vidrio recubierto con aldehído.

El sistema bicapa de poli(3-vinilbenzaldehído)/poliestireno resultante fue modelado utilizando un marcador robótico de micromatrices, equipado con una punta de acero inoxidable, para formar orificios en la superficie de la muestra. Este procedimiento generó una matriz de microcavidades (separación = 350 μ m) que contenían poli (3-vinilbenzaldehído) expuesto.

La creación satisfactoria de la funcionalidad de aldehído accesible se demostró por su derivatización con un oligonucleótido marcado con Cy5-fluoroforo utilizando la química de aminación reductiva. Este procedimiento comprendió la inmersión de la muestra modelada en un tampón de citrato de sodio salino con un pH 4,5 que contenía el nucleótido de la sonda (Sigma-Genosys, secuencia de oligonucleótidos: 5'-3' AACGATGCACGAGCA, desalación, purificación de fase inversa con amina primaria en extremo 3' y fluoroforo Cy5 en extremo 5') a 42° C, durante 16 horas. Posteriormente se añadió 3,5 ml ml^{-1} de NaCN (BH_3) (Aldrich, 99%) y la solución se agitó

- lentamente durante 3 horas más. El exceso de oligonucleótidos fisisorbidos se eliminó entonces mediante un lavado secuencial en agua de alta pureza; tampón de citrato de sodio salino (SSC, citrato de sodio 0,3M, NaCl 3M, pH 7, Sigma) con dodecilsulfato de sodio a 1% (Sigma, solución al 10%); agua de alta pureza; solución de 10% stock tampón de SSC en agua de alta pureza con 0,1% dodecilsulfato de sodio (peso/volumen); agua de alta pureza; 5% stock tampón de SSC en agua de alta pureza; y finalmente, agua de alta pureza.
- 10 La fijación del oligonucleótido marcado fluorescentemente a la matriz de sitios de poli(3-vinilbenzaldehído) expuesto se verificó utilizando un microscopio fluorescente (LABRAM, Tobin Yvon Ltd , equipado con un láser He-Ne de 633 nm). La representación por fluorescencia mostró claramente que la fijación del oligonucleótido marcado con Cy5 se limitaba a zonas de poli(3-
- 15 vinilbenzaldehído) expuestas en las paredes de las microcavidades y que la capa superior de poliestireno actuaba de barrera substancialmente inerte a la química de aminación reductiva, figura 5.
- Este resultado demuestra que la polimerización de plasma pulsado es una
- 20 metodología adecuada para la producción de capas funcionales y de barrera de la invención. Además, una punta de marcado de micromatriz muestra ser un medio eficaz para pinchar la capa superior inerte posibilitando la creación de matrices multiplex de sitios reactivos localizados en el espacio.
- 25 De este modo, la presente invención ilustra la manera en la cual puede crearse una superficie químicamente modelada mediante la eliminación selectiva de partes de la superficie y/o profundidades seleccionadas de los revestimientos superficiales para así permitir que atributos químicos seleccionados químicamente activos o inactivos y/o particulares queden
- 30 expuestos en la superficie del substrato para un uso posterior.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la fabricación de una superficie químicamente y/o físicamente modelada sobre un sustrato, incluyendo dicho procedimiento la
5 disposición de por lo menos una superficie o subcapa homogénea de una funcionalidad química deseada y en el que se aplica un material químicamente distinto para formar una capa adicional o superior que presenta una barrera física y química a la por lo menos una subcapa o superficie y el patrón se crea eliminando de manera selectiva por lo menos parte de dicha
10 capa adicional o superior por perforación utilizando una punta de un dispositivo de micromatrices para revelar la(s) funcionalidad(es) química(s) subyacente(s) de la por lo menos una superficie o subcapa homogénea que queda limitada espacialmente al patrón deseado por la capa superior circundante existente.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la por lo menos una subcapa se forma a través de medios que incluyen la deposición de por lo menos un material para formar la subcapa y/o la modificación de la superficie del sustrato.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el material de la por lo menos una capa se utiliza en las zonas en las que el mismo ha quedado expuesto al entorno exterior.
- 25 4. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que se aplica sucesivamente una serie de revestimientos de subcapa al sustrato antes de la aplicación de la capa superior.
- 30 5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por el hecho de que la abrasión de la pila de múltiples capas resultante se realiza a profundidades variables en zonas seleccionadas para permitir la formación de una variedad de características que muestran funcionalidades diferentes, posiblemente múltiples, en zonas especificadas de la superficie del sustrato.
- 35 6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por el hecho de que se utiliza un marcador robótico de micromatrices equipado con una serie de

puntas de diferentes longitudes para eliminar selectivamente el material a la profundidad necesaria.

5 7. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la por lo menos una subcapa que se forma incluye cualquiera de una gama de polímeros químicamente reactivos que adicionalmente pueden reaccionarse/derivatizarse.

10 8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por el hecho de que los polímeros incluyen cualquiera de las propiedades, o cualquier subsección, de hidrofobicidad, bioactividad, unión a proteínas, resistencia a proteínas, adhesión celular y unión a ADN.

15 9. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por el hecho de que el polímero es poli(glicidil metacrilato).

20 10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado por el hecho de que se crea una superficie de substrato que presenta un patrón de poli(glicidil metacrilato) expuesto sobre la superficie creando matrices espacialmente dirigidas de biomoléculas terminadas en amina.

25 11. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado por el hecho de que se crean cadenas derivatizadas de ADN y proteínas en las zonas expuestas de la superficie del substrato.

30 12. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por el hecho de que se utilizan polímeros o cualquier combinación de polímeros funcionalizados de aldehído que puedan derivatizarse posteriormente con biomoléculas funcionalizadas de amina; polímeros funcionalizados de tiol que puedan derivatizarse posteriormente con grupos terminados en tiol, polímeros funcionalizados de piridina que sean superhidrófilos y que puedan derivatizarse o cuaternizarse posteriormente con especies que incluyan haloalcanos y/o polímeros funcionalizados de halógeno que puedan utilizarse como sitios iniciadores para procedimientos de injerto.

35

13. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la por lo menos un subcapa está formada para ser de naturaleza no polimérica.
- 5 14. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado por el hecho de que los materiales utilizados para formar la subcapa incluyen cualquiera de, o cualquier combinación de, metales, semiconductores, elementos no metálicos, cerámica, y/o superficies inorgánicas tales como nitruro de silicio y dióxido de titanio.
- 10 15. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que se aplica un material con una funcionalidad que confiere propiedades opuestas a las de un material utilizado para formar la capa superior con el fin de formar la por lo menos un subcapa.
- 15 16. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado por el hecho de que propiedades que pueden considerarse cuando la subcapa se expone a un patrón incluyen cualquiera de, o cualquier combinación de, hidrofobicidad, hidrofiliidad, reactividad química específica, capacidad de detección química,
- 20 resistencia al desgaste, barrera de gas, filtración, comportamiento anti-reflectante, liberación controlada, resistencia a líquidos o manchas, lubricidad mejorada, adhesión, resistencia a proteínas, biocompatibilidad, bioactividad, estímulo del crecimiento celular, y capacidad de unirse selectivamente a biomoléculas.
- 25 17. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la capa superior que se aplica sobre la subcapa presenta una barrera a cualquier interacción con la subcapa cubierta con el entorno circundante en una escala de tiempo específica.
- 30 18. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la capa superior es lo suficientemente blanda para facilitar la eliminación por perforación para revelar la subcapa funcionalizada en el patrón deseado.
- 35 19. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la capa superior es de naturaleza polimérica.

20. Procedimiento según la reivindicación 19, caracterizado por el hecho de que la capa superior es una película fina de polímero.
21. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de
5 que la capa superior se aplica utilizando un plasma pulsado.
22. Procedimiento según la reivindicación 21, caracterizado por el hecho de que la capa superior es una película fina polimerizada de poliestireno que se aplica con un plasma pulsado.
- 10 23. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la capa superior es lo suficientemente gruesa para evitar cualquier interacción significativa de la subcapa cubierta con el entorno circundante al sustrato.
- 15 24. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la por lo menos una subcapa comprende un polímero reactivo para utilizarse, donde quede expuesto, para unirse directamente a biomoléculas y la capa superior presenta un obstáculo químico y difusional a la química de
20 enlace de ADN de solución-fase.
25. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la por lo menos una subcapa se deposita sobre el sustrato por medio de un plasma de desequilibrio.
- 25 26. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la capa superior es un revestimiento depositado sobre la por lo menos una subcapa por medio de un plasma de desequilibrio.
- 30 27. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que una punta de marcado de dicho dispositivo de micromatrices está configurada para penetrar la capa superior, exponiendo la superficie funcional por debajo.
- 35 28. Procedimiento según la reivindicación 27, caracterizado por el hecho de que la etapa va acompañada por el suministro simultáneo de una pequeña

gota de líquido, posibilitando el modelado concomitante de la superficie y la derivatización de la subcapa expuesta.

29. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de
5 que la por lo menos un subcapa se elimina además de la capa superior en por lo menos una posición para formar dispositivos que muestran diferentes combinaciones de funcionalidad expuesta en el mismo sustrato.

30. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de
10 que cualquiera o ambas de la capa superior y/o subcapa son polímeros de plasma.

31. Procedimiento según la reivindicación 30, caracterizado por el hecho de
15 que el plasma utilizado para aplicar los polímeros de plasma es pulsado.

32. Procedimiento según la reivindicación 31, caracterizado por el hecho de
que se inicia una descarga luminiscente aplicando una tensión de alta frecuencia, presentando los campos aplicados una potencia media de hasta 50 W.

33. Procedimiento según la reivindicación 31, caracterizado por el hecho de
20 que la secuencia de pulsación para el plasma es que se aplica potencia entre 10 μ s y 100 μ s, y se desactiva entre 1000 μ s y 20000 μ s.

34. Procedimiento según la reivindicación 32, caracterizado por el hecho de
25 que el sustrato al cual se aplica(n) el (los) revestimiento(s) se sitúa(n) substancialmente dentro del plasma pulsado durante la deposición del revestimiento.

35. Procedimiento según la reivindicación 32, caracterizado por el hecho de
30 que en la deposición de plasma hay presentes materiales adicionales al (a los) precursor(es) del revestimiento de polímero de plasma.

36. Procedimiento según la reivindicación 35, caracterizado por el hecho de
35 que dichos materiales aditivos son inertes y actúan de tampón sin incorporarse ninguna de sus estructuras atómicas en el polímero de plasma creciente.

37. Procedimiento según la reivindicación 35, caracterizado por el hecho de que material aditivo posee la capacidad de modificar y/o incorporarse en el material que forma el revestimiento y/o el revestimiento depositado de plasma resultante.
- 5

FIG. 1

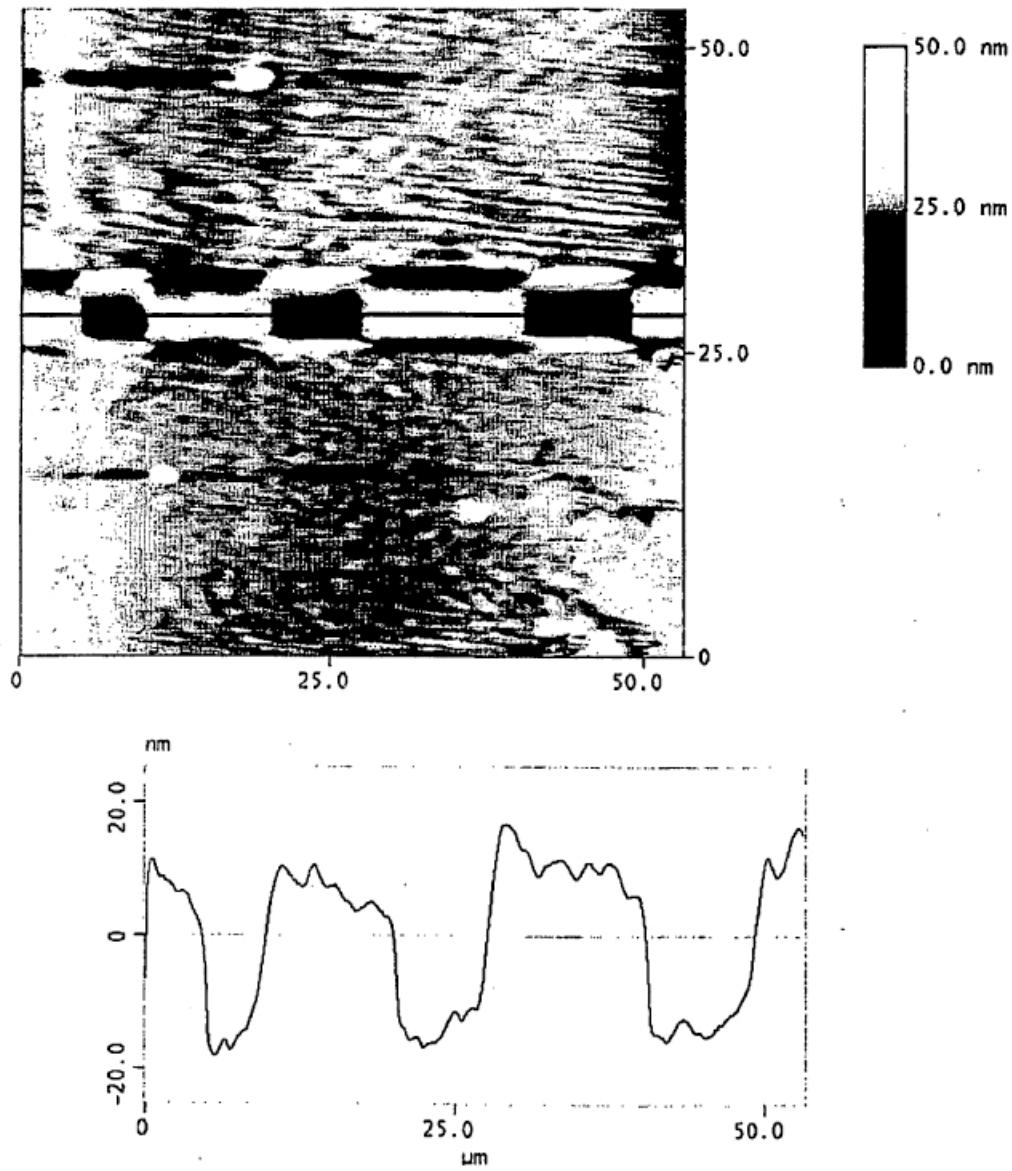


FIG. 2

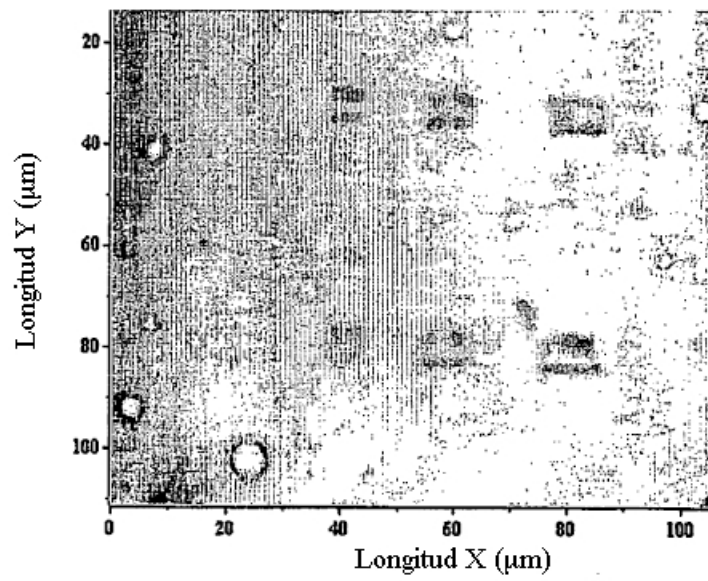


FIG. 3

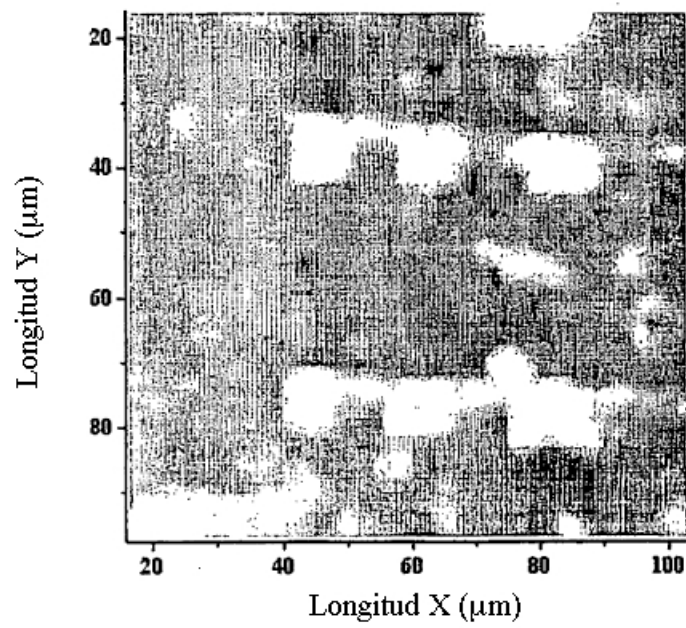


FIG. 4

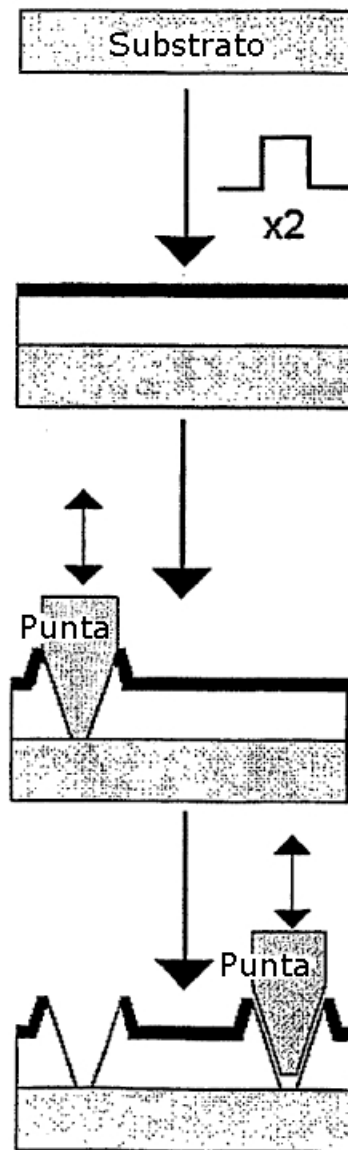


FIG. 5

