



(12) Patentskrift

(10) SE 535 087 C2

(21) Patentansökningsnummer: 1050866-1
 (45) Patent meddelat: 2012-04-10
 (41) Ansökan allmänt tillgänglig: 2012-02-25
 (22) Patentansökan inkom: 2010-08-24
 (24) Löpdag: 2010-08-24
 (83) Deposition av mikroorganism: —
 (30) Prioritetsuppgifter: —

(51) Internationell klass:
B82B 1/00 (2006.01)
A61L 27/50 (2006.01)
B82Y 30/00 (2011.01)
B82Y 40/00 (2011.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

(73) Patenthavare: Hans Elwing, Askim Stationsväg 22, 436 49 Askim SE
 Mattias Berglin, Gustavsgatan 24, 416 69 Göteborg SE
 Anders Lundgren, Träslövägen 112, 432 92 Varberg SE

(72) Uppfinnare: Anders Lundgren, Varberg SE
 Mattias Berglin, Göteborg SE
 Hans Elwing, Askim SE
 Mats Hulander, Göteborg SE

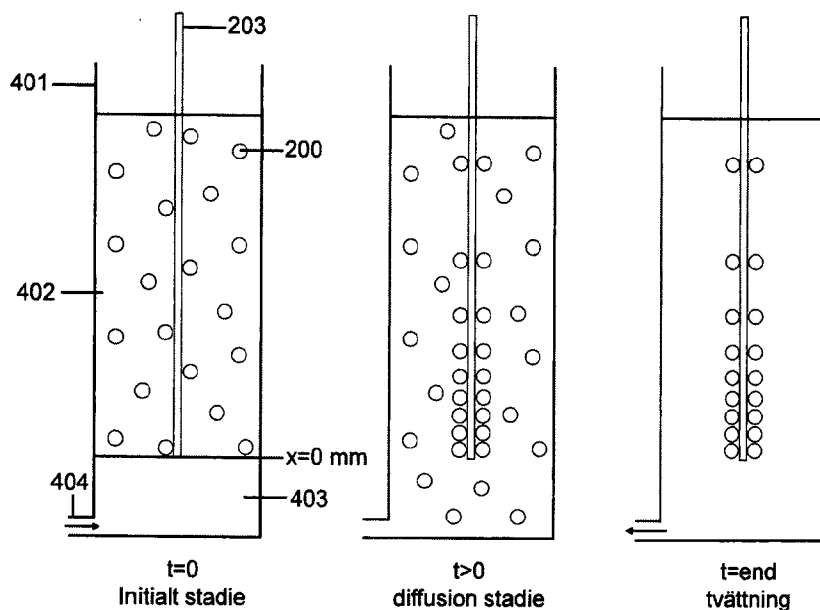
(74) Ombud: Ström & Gulliksson AB, Box 4188, 203 13 MALMÖ SE

(54) Benämning: En metod för att preparera en plan yta med en kontrollerad täthetsgradient av deponerade partiklar i nanostorlek

(56) Anförda publikationer: ---

(47) Sammandrag:

Föreliggande uppfinning är avsedd att användas vid analys av adsorptions och adhesionsfenomen av t.ex. proteiner eller celler på plana ytor som modifierats med adsorberade nanopartiklar. Enligt uppfinningen tillverkas en ytbunden gradient av antalet deponerade nanopartiklar längs med en plan yta vilket avsevärt minskar antalet preparerade ytor likväl som metodfelet vid analys av adsorptions- och adhesionsfenomen.



Sammandrag

Föreliggande uppfinning är avsedd att användas vid analys av adsorptions och adhesionsfenomen av t.ex. proteiner eller celler på plana ytor som modifierats med adsorberade nanopartiklar. Enligt uppfinningen tillverkas en ytbunden gradient av antalet deponerade nanopartiklar längs med en plan yta vilket avsevärt minskar antalet preparerade ytor likväl som metodfelet vid analys av adsorptions- och adhesionsfenomen.

Titel

En metod för att preparera en plan yta med en kontrollerad täthetsgradient av deponerade partiklar i nanostorlek.

Bakgrund till uppfinningen

Problematiken med fasta ytors interaktion med levande biologisk vävnad är ett återkommande tema inom medicinsk teknik. Man kan nämna tillämpningsområden såsom biomaterial, biosensorer och ”drug delivery”. Även inom tillämpningsområden som livsmedelsteknologi och Bioteknisk processkemi utgör fasta ytors oönskade, eller oönskade, interaktion med biologisk producerade substanser ett problemområde eller en möjlighet. Det finns således ett ständigt behov av nya material med bättre funktion än de som finns för närvarande. Det finns därmed även ett ständigt växande behov av experimentella ytmodifikationer som är optimalt lämpad för forskningsuppgiften.

Nano tekniken har gjort stora framsteg under de senaste decennierna kanske främst beroende på att nanostrukturerade material (1-1000 nm) har mycket intressanta egenskaper vad det gäller optimerad interaktion med biologiska vätskor och levande vävnad. Av betydelse för denna patentansökan är en nyligen publicerad artikel som beskriver en metod att göra experimentella nanostrukturerade ytor med nanostrukturer i storleksordningen 10 nm. [1] Metoden innefattar att en plan guldtyta får reagera med tiolterminerade linjära alkaner (ditioler) som därvid binder till guldtytan med en tiolgrupp och efterlämnar ett överskikt av opåverkade tiolgrupper. En elektrostatiskt stabiliserad lösning av negativt laddade guldpartiklar i storleksordningen 8-12 nm påfördes ytan varvid guldpartiklarna adsorberades till tiolagret. Vi fann då att avståndet mellan de adsorberade partiklarna kunde regleras genom att variera jonstyrkan på den citratbuffert som användes vid adsorptionen. Typiskt kunde avståndet varieras från ca 15 nm – 100 nm (center till center) när koncentrationen av bufferten varierades från 10 mM till ca 0 mM vilket kunde studeras med svepelektronmikroskopi (SEM). Liknande resultat har tidigare visats för partikeladsorption från elektrostatiskt stabiliserade lösningar innehållande ytladdade polymera partiklar till mineraltytor, exempelvis glas, kiseldioxid eller mica med motsatt laddning som ytan har nativt vid givet pH eller som ytan har erhållit genom kemisk modifikation. [2-5] Vidare har liknande resultat presenterats för adsorption av negativt ytladdade guldnanopartiklar från elektrostatiskt stabiliserade partikellösningar till glasytor eller kiseldioxidtytor som modifierats kemiskt att bli positivt laddade. [6]

Principen för elektrostatiskt kontrollerad partikeladsorption illustreras i figur 2. En elektrostatiskt stabiliserad lösning 202 innehållande elektriskt ytladdade nanopartiklar 200 appliceras i ett kärl 201. En yta 203 till vilken partiklarna 200 kan binda exempelvis elektrostatiskt, semikovalent, kovalent eller på annat sätt som leder till att partiklarna positioneras på ytan placeras i kärlet varpå partiklarna tillåts binda en viss tid till dess adsorptionen stabiliserats. Observera att detta tillstånd representerar ett slutgiltigt tillstånd för adsorptionen och att längre inkubationstider ej påverkar yttäckningen av partiklar. Då ytan tas ur partikellösningen sitter partiklarna bundna till ytan på så sätt att avståndet mellan närliggande partiklar kan uppskattas från partiklarnas parvisa interaktionspotential enligt DLVO-teorin [1, 7], figur 3. I korthet kan parpotentialen $U(r)$, där r är avståndet mellan två partiklar 200 beräknas såsom summan av en attraktiv potential $U_{\text{attraktiv}}(r)$ sprungen ur dispersionskrafterna mellan partiklarna samt en repulsiv potential $U_{\text{repulsiv}}(r)$ sprungen ur den elektrostatiske repulsionen mellan partiklarna. Vid större avstånd r mellan partiklarna dominerar den elektrostatiske repulsionen. Utseendet på den repulsiva potentialen kan beräknas på olika sätt, men varierar alltid med den s.k. Debye-längden som approximativt anger hur snabbt potentialen minskar utanför partikelytan. Kort Debye-längd betyder att den repulsiva potentialen faller snabbt utanför partikeln yta. Debye-längden är i sin tur beroende av jonstyrkan i partikellösningen 202 och beskrivs genom:

$$\kappa^{-1} = \left[\frac{\epsilon \epsilon_0 k T}{1000 e^2 N_A 2 I} \right]^{\frac{1}{2}}$$

där ϵ är den relativa permitiviteten, ϵ_0 är permitiviteten i vacuum, k är Boltzmannkonstanten, T är temperaturen, e är elementarladdningen, N_A är Avogadros tal samt jonstyrkan

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2$$

där c_i och z_i är den molära koncentrationen samt laddningen för jon i i lösningen.

Debye-längden och därmed den repulsiva potentialens utbredning minskar således med ökande jonkoncentration i partikellösningen 202. Detta medför att partiklarna kan binda närmare varandra på ytan då villkoret

$$U(r)/kT = 1/\lambda$$

där $U(r)$ är parpotentialen, kT den termiska energin och λ är en konstant, uppfylls för mindre r .

Ytor preparerade med ditioler samt guldnanopartiklar såsom beskrivits ovan samt i [1, 8] har använts till biologiska försök. Vid dessa försök gjordes mellanrummen mellan partiklarna protein avvisande med hjälp av konjugerade maleimidreagens som binder kovalent till tiolgrupper. Maleimiderna var konjugerade med polyetylenglykol (PEG) vilket resulterade i att mellanrummen mellan partiklarna blev avvisande för protein adsorption. Ytan på de adsorberade guldpartiklarna kunde sedan modifieras med hjälp av tiolreagens, t.ex. tiol med metylgrupper vilket ger de adsorberade guldpartiklarna hydrofoba egenskaper, se exempel 3-5. Ytor med guldpartiklar som tillverkas på detta sätt har en mycket fin grad av kontrollerad kemisk struktur och organisation i nanometerområdet vilket gör dessa ytor väl lämpade för adhesionsstudier av olika slag. Den beskrivna metoden är mycket flexibel för adhesionsstudier på grund av att det finns ett relativt stort antal kommersiella substanser med maleimidfunktioner, som kan binda mellan adsorberade partiklarna, och tiolreagenser som kan binda på de adsorberade guldpartiklarna.

Liknande experiment har genomförts där av polymerer stabiliserade guldnanopartiklar applicerats på kisel- och glasytor genom s.k. "dip-coat" teknik [9]. Observera att denna metod ej utnyttjar elektrostatisk repulsion mellan partiklar för att kontrollera partikelspridningen på ytan, utan avståndet definieras av de polymera strukturer som omger partiklarna i lösningen. Interaktionen mellan dessa partiklar och den adsorberande ytan är svag, varför partiklarna efter adsorption måste sintras fast i det underliggande substratet, en process i vilken även de runt partikeln organiserade polymererna försvinner från ytan. Ytan runt guldpartiklarna utgörs då av det underliggande kiselsubstratet vilket kan modifieras med funktionella silaner, exempelvis PEG-modifierade silaner som gör denna yta resistent mot bioadhesion. Ytan på partiklarna kan modifieras med tiolreagens, exempelvis tiolkonjugerade s.k. RGD-peptider, en aminosyrasekvens som medierar cellinteraktioner.

I experiment har även beskrivits att polymera partiklar i elektrostatisk stabiliserad lösning adsorberats till laddade mineraltytor och att avståndet mellan de adsorberade partiklarna reglerats med elektrostatisk repulsion enligt ovanstående beskrivning [10]. De adsorberande ytorna har antingen en nativ nettoladdning eller har erhållit sin laddning genom kemisk modifikation, exempelvis med funktionella silaner. Bindningen mellan ytan och partiklarna har då framförallt varit av elektrostatisk karaktär. Ytorna med adsorberade polymera partiklar har därefter använts som en litografisk mask med vars hjälp de av polymerpartiklar täckta delarna av ytan transformerats till "öar" av guld i storleksordningen 10-1000 nm omgivna av substratytans material. Den omgivande substratytan har sedan modifierats, exempelvis med poly-L-lysin-PEG, en positivt laddad polymer som adsorberar till negativt laddade ytor och i förekommande fall gör dessa resistent mot bioadhesion. Guldtytorna kan därefter modifieras med tiolreagens, exempelvis linjära alkantioler vilka gör guldtytorna hydrofoba. Till dessa hydrofoba ytor kan sedan proteiner adsorberas, exempelvis proteinet laminin. Sådana ytor har sedan använts för att studera cellers utbredning och ytinteraktion.

Samtliga ovan beskrivna tekniker kan användas för att utröna betydelsen av ytans nanostruktur för adhesionsprocessen och kan utgöra plattform för design av material med önskade biologiska egenskaper.

De flesta adhesionsstudier utförs vanligen på ytor som har en konstant kemi. När man vill studera betydelsen av en viss typ av ytmodifikation brukar man vanligen använda flera ytpreparationer och analysera adhesionsfenomenen var för sig. Detta förfarande är emellertid arbetskrävande beroende på att flera ytpreparationer måste göras i varje försöksserie och att de metodologiska mätfehlen ofta är stora vilket medför att aspekter på flera viktiga adhesionsfenomen kan förbises.

En generell metod för att begränsa metodfelet och minska arbetet med ytpreparationer är att göra gradienter i kemiska egenskaper längs med en yta. Ett exempel på en sådan metod är den s.k. vätkbarhetsgradienten, en yta som är hydrofob (vattenavstötande) i en ända och hydrofil (vattenälskande) i den andra [11]. Mellan dessa ytterligheter finns sedan en kontrollerad och kontinuerlig gradient av kemiska egenskaper. Denna typ av gradientyta reducerar väsentligt såväl arbetsbelastning som metodfel och har kommit till flitig användning i den akademiska världen [12-14].

Det finns flera principer för att göra kontinuerliga kemiska gradienter längs en yta och en av de tidigare kända är den s.k. diffusionsmetoden, figur 0. I typfallet fungerar metoden på så sätt att ett reagens 001, t.ex. metylklorosilan blandas i ett lösningsmedel med hög specifik vikt 002 t.ex. trikloetylenacetat (tri). Blandningen skiktas sedan under ett annat lösningsmedel 003, t.ex. xylol med låg densitet. Mellan dessa skikt finns den yta 004, t.ex. glas på vilken en gradient ska bildas. Med tiden börjar lösningsmedlen att diffundera in i det varandra varvid även reagenset 001 diffunderar och binder till ytan 004. Vid en viss diffusionstid har det uppstått en bunden gradient av hydrofoba metylgrupper till den hydrofila glasytan [11]. Hur mycket reagens som binder till ytan vid en viss position och därmed grad av hydrofobicitet vid denna position bestäms av koncentrationen av reagenset 001 över ytan vid den positionen samt den tid under vilken ytan har kontakt med reagenslösningen. Detta innebär att den erhållna gradientens egenskaper bestäms genom kinetisk kontroll.

Att fabricera en jämn gradient i partikeltäthet med den ovan beskrivna metoden torde vara svårt, då inbindningen av nanopartiklar från en elektrostatiskt stabiliserad lösning till en yta som binder dessa partiklar vanligen är en mycket snabb process relativt partiklarnas diffusionshastighet, vilken är långsam jämfört med små molekyler såsom exempelvis metylklorosilan. Försök att kontrollera avståndet mellan nanopartiklar på ytor, där nanopartiklarna fått adsorbera på bindande ytor från elektrostatiskt stabiliserade lösningar, genom att variera partikelkoncentration och tid för inkubation har visat att det är svårt att kontrollera lägre täckningsgrader av partiklar samt att partiklarna inte uppvisar samma goda grad av organisation på ytan som vid elektrostatiskt kontrollerad adsorption som beskrivits ovan [6, 15].

Nyligen beskrevs en gradient i guldpartiklar på ett kiselsubstrat där struktureringen av de bundna partiklarna var god [16]. Denna gradient beskriven i [16] tillverkades enligt en modifierad "dip-coat"-procedur dock utan att utnyttja elektrostatisk kontroll eller diffusionsgradienter. Den erhållna gradienten hade begränsad dynamik och det minsta uppvisade partikelavståndet var ca 50 nm. Gradienterna modifierades kemiskt med PEG mellan partiklarna och RGD-peptider ovanpå partiklarna. Gradientytorna använde sedan i experiment för att undersöka cellulär adhesion. Denna publikation visar generellt att intresset för att göra ytbundna täthetsgradienter av guldpartiklar är mkt stort av skäl som angivits ovan. Den tekniska lösningen för att göra gradienter enligt [16] är emellertid betydligt mer komplicerad än den innevarande uppfinningen.

Beskrivning av uppfinningen

Uppfinningen beskriver en metod för att enkelt tillverka plana ytor av gradienter med adsorberade nanopartiklar på fasta ytor. I typfallet utföres metoden på följande sätt:

1. Endimensionell diffusion, figur 4

Plana ytor 203 som har förmåga att binda elektriskt ytladdade nanopartiklar 200 från en elektrostatiskt stabiliserad partikellösning iföres i en kyvett 401. En saltfri eller nära saltfri lösning 402 med

ytladdade partiklar 200 påföres sedan kyvetten. En saltlösning 403 med relativt hög densitet skitas försiktigt under lösningen 402 på så sätt att den gravitationsbetingade fasgränsen mellan lösningen 403 och lösningen 402 kommer i nivå med nederdelen på ytan 203. Med tiden kommer lösningen 403 att diffundera upp i lösningen 402 och bilda en gradient av jonstyrka i densamma.

Den elektrostatiske betingade repulsionen mellan partiklarna minskar då jonstyrkan över ytan 203 ökar. Partiklarna adsorberar därvid gradvis tätare till ytan med högst deponeringsgrad närmast den ursprungliga fasgränsen mellan lösningen 402 och lösningen 403. Lägst deponeringsgrad av partiklar finns överst i kyvetten där jonstyrkan över ytan 203 är låg och därmed den elektrostatiske repulsionen som störst. Efter avpassad diffusionstid töms kyvetten på vätska från undersidan genom samma rör 404 som användes vid skiktning av lösningen 403 under den partikelinnehållande lösningen 402

I frånvaro av konvektion samt att avståndet från ytans underkant $x=0$ mm till botten av kyvetten är tillräckligt stort samt att avståndet från ytans underkant $x=0$ mm till ovanytan av lösningen 402 är tillräckligt stort samt att diffusionen inte får fortgå för lång tid så kan den graduella distributionen av saltkoncentration i lösningen ovan ytan 203 beskrivas med Ficks andra diffusionslag i en dimension:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}$$

med den för ovan angivna villkoren lösningen

$$c(x,t) = \frac{1}{2} c_0 \left(1 - \operatorname{erf} \frac{x}{2\sqrt{Dt}} \right)$$

där c är den molära saltkoncentrationen, x positionen i kyvetten relativt $x=0$ som sammanfaller med ytans 203 underkant, t är diffusionstiden, c_0 är saltkoncentrationen i lösningen 403 vid $t=0$ och D är diffusionskonstanten för det aktuella saltet.

Detta innebär att längden och lutningen på den erhållna partikelgradienten enkelt kan varieras genom att ändra den initiala saltkoncentrationen c_0 och diffusionstiden t vilket ger en stor flexibilitet i fabriktionsmetoden.

I en vidareutveckling av uppfinningen beskriven i figur 5 användes kyvetter 501 som tillåter att flera ytor kan användas vid samma diffusionsförfarande som beskrivits i figur 4. En fördel med denna metod är att samtliga ytor i kyvetten blir behandlade på samma sätt med avseende på lösningen av guldpartiklar, molariteten av den använda saltlösningen och diffusionstiden. Detta säkerställer att ytor kan prepareras med hög grad av likformighet i samma preparationsomgång

Den i figur 0 beskrivna och publicerade [11] diffusionsmetoden har tekniska likheter med innevarande uppfinning men skiljer sig på avgörande principiella aspekter. De viktigaste skillnaderna är att den komponent, nanopartiklar, som ska binda till ytan finns i konstant koncentration och diffunderar ej som gradient, det salt som diffunderar binder ej till ytan samt att den gradientbildande principen (graderad elektrostatisk repulsion mellan nanopartiklar) äger rum i lösningen av nanopartiklarna och ej på ytan.

2. Tredimensionell diffusion.

Med den endimensionella diffusionsmetoden erhålls gradientytor i en dimension, d.v.s. hög täthet av deponerade partiklar i ena änden av gradienten och lägre täthet i den andra. Vi har även utvecklat en metod för att göra cirkulära gradienter av partiklar på en yta vilken beskrivs i figur 6:

I botten på en petriskål 601 läggs en plan yta 203. En saltfri eller nära saltfri suspension 602 bestående av nanopartiklar och en matris som tillåter diffusion av nanopartiklar men som motverkar

konvektionsströmmar, hålls sedan i petriskålen. En sådan suspension kan bestå av polysaccarider i vatteninnehållande partikelform t.ex. gelpartiklar som användes vid gelfiltrering t.ex. Sephadex G-25 eller något liknande material. Efter att fritt lösningsmedel, exempelvis vatten, sugits av det plana suspensionslagret, placeras en reservoar 603, exempelvis en rund skiva av läskpapper av tillräcklig tjocklek på suspensionen. Reservoaren 603 har dessförinnan blivit fylld med saltlösning 403 med hög molaritet, exempelvis genom att indränka ett läskpapper i sådan lösning. Systemet lämnas sedan för diffusion. Lösningen 403 kommer att diffundera in suspensionen 602 och den cirkulära diffusionsfronten når efter ett tag ytan 203 och det uppstår slutligen en cirkulär yta med en radiell koncentrationsgradient av joner. Slutligen spolas suspensionen 602 bort med lösningsmedel, exempelvis vatten. Slutresultatet är en cirkulär yta av adsorberade partiklar, vars packningsdensitet är högst i mitten av ytan och lägst i periferin.

En viktig aspekt av innevarande uppfinning är den analytiska dynamiken, d.v.s. spannet mellan den del av gradientytan som har störst mängd adsorberade partiklar per ytenhet och den del som har minst mängd adsorberade partiklar per ytenhet. Ju större detta spann är, desto mer analytisk information erhålls vid adhesions- och adsorptionsförsök. En metodologisk osäkerhet är att elektriskt laddade partiklar i låg koncentration i saltfritt lösningsmedel såsom rent vatten har en benägenhet att deponera irreguljärt på ytorna i oförutsägbara mönster. Sådan mönsterbildning försvårar tolkningen av efterkommande adhesion och adsorptionsförsök. Vi vill därför även skydda en metod för att motverka uppkomsten av irreguljära mönster, vilken illustreras i figur 6B. Metoden innefattar att de elektriskt laddade ytbindande partiklarna 200 blandas med elektriskt laddade partiklar 604 som ej binder till ytan 203. Funktionen hos de senare nämnda partiklarna är att bättre dispergera de laddade och bindande partiklarna i lösningen så att bindningsmönstret ej blir irreguljärt.

Typiska försök och utvärderingsmetoder.

En gradientregion med deponerade partiklar är i normalfallet 1-10 mm. På denna yta kan adsorptionsförsök med biopolymerer och adhesionsförsök med celler göras och resultatet av försöken kan sedan härledas till en kontinuerlig gradient av deponerade nanopartiklar/ytenhet. Vid enkla biopolymer adsorptionsförsök kan man använda ytkänsliga optiska metoder och för försök med hela celler kan man använda ljusmikroskopi för detaljstudier av cellerna samt fluorescensmikroskopi för ytterligare detaljstudier.

I en tillämpning av uppfinningen, figur 7, appliceras partikelgradienten på en yta 700 som försetts med en skalning för att underlätta undersökning i mikroskop. Skallstrecken kan vara vertikala 702, vågräta 703 eller radiella 704. Skallor respektive skalstreckmarkeringar kan göras på olika nivåer för att passa olika typ av undersökning, exempelvis på millimeternivå för okulär undersökning och på nivån 10-500 μm för undersökning med ljusmikroskop eller svepelektronmikroskop vilket illustreras i förstoringen 705. Skallstrecken kan bestå av försänkningar helt eller delvis genom den partikelbindande ytan, exempelvis en ditiolmodifierad guldyta, så att det underliggande substratet, exempelvis glas eller kisel kommer i dagen. Alternativt kan skalstrecken bestå av upphöjningar, exempelvis av guld, på en partikelbindande yta, exempelvis tiolsilanmodifierad glas eller kiselyta. Den mönstrade ytan tillverkas lämpligen med fotolitografisk teknik.

I en tillämpning av uppfinningen, figur 8, finns en med nanopartikelgradient försedd yta 203 eller 700 närvarande på en yta 800, t.ex. ett objektglas tillsammans med ytterligare två ytor 801 och 802. Dessa två ytor modifieras kemiskt på så sätt att den ena av ytorna 802 erhåller samma ytkemi som ytan av nanopartiklarna och den andra ytan 801 erhåller samma ytkemi som den yta som omger partiklarna i gradienten. När alla tre typytorna finns med i ett biologiskt försök, till exempel bakterieadsorption, kan operatören undersöka i mikroskop om bakterierna adsorberar i någon region till gradientytan. Operatören får även information om hur bakterien adsorberar till ytor som ej innehåller nanopartiklar utan endast oblandade ytkemier. På det sättet kan operatören avgöra om adhesionen av bakterierna är relaterade till närvaro av nanopartiklar eller ej, samt vilken täthetsgrad av partiklar som behövs för adsorption. De olika ytorna 203/700, 801 och 802 kan separeras på ytan 800 med barriärer 803 för att underlätta användningen samt fabrikationen av ytan. Barriärerna kan bestå av nedsänkningar eller mellanrum mellan ytorna 203/700, 801 och 802 på ytan 800 så att det underliggande substratet 804

kommer i dagen. Alternativt kan barriärerna bestå av upphöjningar mellan ytorna 203/700, 801 och 802, särskilt i de fall partikelgradienten applicerats på underliggande substratet 804.

En tillämpning av uppfinningen är en produkt bestående av en yta, exempelvis ett objektglas med de tre typytorna enligt ovan: 1, guldnanopartikelgradientyta där guldnanopartikelgradienten tillverkats på en ditiolmodifierad guldyta varpå fria ditioler mellan partiklarna reagerats med maleimide-PEG samt ytan på partiklarna reagerats med en funktionell tiol, exempelvis metylterminerad, aminterminerad, syraterminerad eller peptidterminerad, 2, en guldyta som modifierats med ditiol och maleimid-PEG, 3 en guldyta som modifierats med samma funktionella tiol som ytan på partiklarna.

En tillämpning av uppfinningen är en produkt bestående av en yta, exempelvis ett objektglas med de tre typytorna enligt ovan: 1, guldnanopartikelgradientyta där guldnanopartikelgradienten tillverkats på en ditiolmodifierad guldyta varpå fria ditioler mellan partiklarna reagerats med maleimid-PEG, 2, en guldyta som modifierats med ditiol och maleimid-PEG, 3 en ren guldyta. Med denna produkt kan operatören själv välja vilket tiolreagens som ska användas. Det finns en stor mängd kommersiella tioler som har betydelse för adhesion, t.ex. tioler konjugerade med amingrupper, mono- och polysackarider.

En tillämpning av uppfinningen är en produkt bestående av en yta, exempelvis ett objektglas med de tre typytorna enligt ovan: 1, guldnanopartikelgradientyta där guldnanopartikelgradienten tillverkats på en ditiolmodifierad guldyta, 2, en guldyta som modifierats med ditiol, 3 en ren guldyta. Med denna produkt kan operatören själv välja både maleimidreagens som binder mellan partiklarna och tiolreagens, som binder på partiklarna. De experimentella möjligheterna för operatören ökar därmed ytterligare.

En tillämpning av uppfinningen är en produkt bestående av en yta, exempelvis ett objektglas med de tre typytorna enligt ovan: 1, guldnanopartikelgradientyta där guldnanopartikelgradienten tillverkats på en tiolsilanmodifierad glas eller kiselyta varpå fria tiolsilaner mellan partiklarna reagerats med maleimid-PEG samt ytan på partiklarna reagerats med en funktionell tiol, exempelvis metylterminerad, aminterminerad, syraterminerad eller peptidterminerad, 2, en glas eller kiselyta som modifierats med tiolsilan och maleimid-PEG, 3 en guldyta som modifierats med samma funktionella tiol som ytan på partiklarna.

En tillämpning av uppfinningen är en produkt bestående av en yta, exempelvis ett objektglas med de tre typytorna enligt ovan: 1, guldnanopartikelgradientyta där guldnanopartikelgradienten tillverkats på en tiolsilanmodifierad glas eller kiselyta varpå fria tiolsilaner mellan partiklarna reagerats med maleimid-PEG, 2, en glas eller kiselyta som modifierats med tiolsilan och maleimid-PEG, 3 en omodifierad guldyta. Med denna produkt kan operatören själv välja vilket tiolreagens som ska användas.

En tillämpning av uppfinningen är en produkt bestående av en yta, exempelvis ett objektglas med de tre typytorna enligt ovan: 1, guldnanopartikelgradientyta där guldnanopartikelgradienten tillverkats på en tiol- eller aminsilanmodifierad glas eller kiselyta varpå silanerna under och mellan partiklarna tagits bort på sådant sätt, exempelvis genom plasmabehandling, att partiklarna sintras fast i glas eller kiselytan varpå ytorna mellan partiklarna reagerats med PEG-silan samt ytan på partiklarna reagerats med en funktionell tiol, exempelvis metylterminerad, aminterminerad, syraterminerad eller peptidterminerad, 2, en glas eller kiselyta som modifierats med PEG-silan, 3 en guldyta som modifierats med samma funktionella tiol som ytan på partiklarna.

En tillämpning av uppfinningen är en produkt bestående av en yta, exempelvis ett objektglas med de tre typytorna enligt ovan: 1, guldnanopartikelgradientyta där guldnanopartikelgradienten tillverkats på en tiol- eller aminsilanmodifierad glas eller kiselyta varpå silanerna under och mellan partiklarna tagits bort på sådant sätt, exempelvis genom plasmabehandling, att partiklarna sintras fast i glas eller kiselytan varpå ytorna mellan partiklarna reagerats med PEG-silan, 2, en glas eller kiselyta som

modifierats med PEG-silan, 3 en omodifierad guldyta. Med denna produkt kan operatören själv välja vilket tiolreagens som ska användas.

En tillämpning av uppfinningen är en produkt bestående av en yta, exempelvis ett objektglas med de tre typytorna enligt ovan: 1, guldnanopartikelgradientyta där guldnanopartikelgradienten tillverkats på en tiol- eller aminsilanmodifierad glas eller kiselyta varpå silanerna under och mellan partiklarna tagits bort på sådant sätt, exempelvis genom plasmabehandling, att partiklarna sintras fast i glas eller kiselytan, 2, en glas eller kiselyta, 3 en omodifierad guldyta. Med denna produkt kan operatören själv välja ytkemi samt modifikationsmetod för de olika ytorna.

För ovan nämnda tillämpningar kan de tre typytorna vid fabrikation göras separat och sedan sättas samman på objektglaset med något adhesiv. Man kan också tänka sig att preparera typytorna direkt på objektglaset.

Vid enkla biopolymer adsorptionsförsök kan man använda ytkänsliga optiska metoder som ellipsometri och ytplasmon resonans (SPR). Ett specialfall av ytplasmonresonans är den s.k. avbildande iSPR-metoden som tillåter samtidig kvantifiering av såväl adsorberade nanopartiklar samt efterföljande bioadhesion i en hel gradient region (se exempel). En uppställning för iSPR analys av en gradientyta illustreras i figur 9A. En apparat 900 för avbildande SPR såsom den beskriven i [17], vanligen styrd av en dator 905, appliceras i kontakt med ett SPR-substrat vanligen bestående av en glasyta 901 på vilken en tunn guldfilm 902 applicerats. Övan guldfilmen appliceras en kammare 904 innehållande vätska, exempelvis buffert på så sätt att guldfilmen kommer i kontakt med vätskan. Kammaren 904 kan ha ett inlopp 907 och ett utlopp 908 och fungera som flödessystem för att transportera vätska och analyter till och från ytan.

I en tillämpning av uppfinningen har guldytan 902 modifierats kemiskt med filmen 903 för att binda nanopartiklar från lösning och en gradient av nanopartiklar har applicerats på ytan. Vid mätning kan SPR-responsen från olika positioner på gradientytan relateras till partikeldensiteten vid denna position. Utifall bioadhesion, exempelvis protein-, trombocyt- eller bakterieadsorption sker till gradientytan kan också detta detekteras som en additiv respons, figur 9B.

På senare tid har elektrokemiska tekniker och då särskilt impedansmätning använts för studier av f.f.a. cellers interaktion med ytor [18]. Elektrokemiska tekniker kan också användas för att uppskatta antalet nanopartiklar på en elektrodyta, detta gäller i synnerhet för ledande nanopartiklar t.ex. av guld [19]. I en tillämpning av uppfinningen beskriven i figur 10 appliceras en nanopartikelgradient på en yta 1000 vilken består av n partikelbindande ytor 1001 av ett elektriskt ledande material exempelvis guld som modifierats med kemin 1003 för att binda nanopartiklar. Ytorna 1001 placeras på ett icke ledande substrat 1002 på sådant sätt att ytorna 1001 kan fungera som elektroder elektriskt isolerade från varandra. Nanopartikelgradienten fabriceras på sådant sätt att den partikelbindande elektrodytan 1 på ytan 1000 får en hög partikeldensitet medan partikelbindande elektrodytan n på ytan 1000 får låg partikeldensitet. Detta kan ske genom att använda ytan 1000 såsom yta 203 i figur 4 och låta position 0 på ytan 1000 sammanfalla med $x=0$ i figur 4.

Ytan 1000 appliceras i kontakt med elektrolyt, exempelvis buffert, i en elektrokemisk cell 1004 som också kan ha ett inlopp 1005 och utlopp 1006 för att underlätta transport av elektrolyt och analyt till ytan 1000. Utöver elektroderna 1-n lokaliserade på ytan 1000 kan det för vissa tillämpningar behövas ytterligare en referenselektrod 1007 och en motelektrod 1008 applicerade i elektrolyten. I vissa tillämpningar kan även elektroderna 1007 och/eller 1008 vara placerade på ytan 1000. Samtliga elektroder 1-n på ytan 1000 samt i förekommande fall 1007 och 1008 kontakteras individuellt av ett system för elektrokemisk mätning 1009. Systemet 1009 kan vara ett system kapabelt till olika slags elektrokemiska mätningar exempelvis voltammetri, amperometri, coulometri, impedansspektroskopi eller impedansbestämning. Alternativt kan systemet 1009 vara ett system avsett för endast viss slags elektrokemisk bestämning såsom impedansmätning. Den elektrokemiska responsen från de olika elektroderna på ytan 1000 kan mätas antingen mellan olika elektroder på ytan 1000 eller genom att använda sig av elektroderna 1007 och 1008 i en konventionell trelektroduppställning [20]. Vid

mätning kan den elektrokemiska responsen från olika elektroder med olika positioner på ytan 1000 relateras till partikeldensiteten vid denna position. Utifall bioadhesion, exempelvis celladhesion sker till gradientytan kan också detta detekteras som en additiv, vanligen negativ förändring av den elektrokemiska responsen. Utifall ett redox-aktivt ämne kommer i kontakt med ytan kan också detta detekteras som en additiv, vanligen positiv förändring av den elektrokemiska responsen.

Exempel 1. Utvärdering av graduell partikeladsorption med svepelektronmikroskopi

Guldytor med storleken 11x20 mm fabricerades genom förångning av först 5 nm Cr och sedan 200 nm Au på substrat av SiO₂. Dessa tvättades och förseddes med monolager av ditiol enligt den procedur som beskrivits utförligt i [1, 8]. I korthet så inkuberades de rena guldytorna i etanollösning av oktanditiol varpå de reaktiverades med ditiolthreitol (DTT). En elektrostatiskt stabiliserad guldpartikellösning med guldpartiklar i storleksordningen 10 nm i diameter tillverkades enligt den procedur som beskrivs i detalj i [1, 8]. Guldlösningen centrifugerades vid 16000 g för att reducera jonstyrkan i lösningen samt öka partikelkoncentrationen. Efter centrifugeringen spädades guldpartikelpelleten till en ungefärlig partikelkoncentration av 55 nM i rent vatten med en konduktivitet av 18,2 MΩ*cm. Denna partikellösning hälldes i ett kärl avsett för gradienttillverkning enligt figur 5 varpå ett antal av de ditiolreparerade ytorna placerades i kärlet med ett visst avstånd till botten av detsamma. Därefter applicerades citratbuffert med koncentrationen 1 M och pH4.0 i botten av gradientkärlet så att utrymmet under ytorna fylldes med denna. Citratbufferten fick därefter ostört diffundera upp över ytorna under 30 minuter varefter proceduren avbröts genom att all vätska i gradientkärlet tömdes underifrån. I annan tillämpning så applicerades citratbuffert med koncentrationen 50 mM under ytorna vilken sedan fick diffundera under 90 minuter, vilket ger en längre gradient med svagare lutning relativt den som erhålls med 1 M buffert under 30 minuter. Ytorna analyserades med svepelektronmikroskopi vid olika positioner på gradientytan. Ett urval av bilder presenteras i figur 11.

Exempel 2. Utvärdering av graduell partikeladsorption med hjälp av iSPR

Linjära gradienter med 10 nm guldnanopartiklar preparerades som beskrivits i exempel 1 med hjälp av ditiolkemi. Som substrat användes glasytor på vilka ett tunt lager Au, ca 50 nm, förångats. Dessa ytor är lämpliga för analys med ytplasmonresonans, SPR. Efter gradienttillverkningen så placerades ytorna i ett instrument för avbildande SPR, vilket finns utförligt beskrivet i [17]. Två olika gradienter analyserades, se figur 12. En gradient hade preparerats med 50 mM citratbuffert som fått diffundera under 90 minuter ("lång" gradient) samt en gradient hade preparerats med 1M citratbuffert under 30 minuter ("kort" gradient). Respektive partikelgradient hade också reagerats med maleimid-PEG för att minimera bioadhesion mellan de distribuerade partiklarna samt med oktantiol ovanpå partiklarna vilket gjorde ytan på partiklarna hydrofob vilket främjar bioadhesion. Ett område om ca 1x5 mm analyserades för varje gradientyta, inom vilket hela eller väsentliga delar av gradienten avbildades. SPR-våglängden som presenteras i 3D-grafens z-axel är proportionell mot yttäckningen av guldnanopartiklar. I figur 13 presenteras ett linjescan över en "kort" gradient tillsammans med linjescan för en positiv kontrollyta, i detta fall en yta modifierad med endast oktanditiol, samt en negativ kontrollyta, modifierad med oktanditiol och maleimid-PEG. Varje linjescan representerar ett medelvärde av samtliga scan över ytan

Exempel 3 Utvärdering av fibrinogenadsorption samt trombocytadsorption till hydrofoba nanopartikelgradienter med iSPR samt fluorescensmikroskopi.

"Korta" gradienter med 10 nm guldnanopartiklar fabricerades på guldytor avsedda för SPR-analys samt modifierades med maleimid-PEG och oktantiol enligt exempel 2 ovan. Detta gav gradienter av hydrofoba partiklar mot en bakgrund av proteinavvisande PEG. Ytorna analyserades med iSPR. Sekventiellt adsorberades först fibrinogen (0.5 mg/ml i PBS) under 5 minuter och därefter trombocyter (väsentligen serumfri preparation från frisk donator) under 30 minuter till ytor med gradienter, positiva kontrollitor (endast ditiol) samt negativa kontrollitor (ditiol modifierad med maleimid-PEG). I figur 14 presenteras responsen från fibrinogen- samt trombocytadsorption för en gradientyta samt en positiv kontrollityta. Blå kurva visar adsorptionen av fibrinogen, grön kurva den ackumulerade responsen från både fibrinogen samt trombocyter. Responsen från underliggande ytor, motsvarande det som visas i figur 13, har subtraherats från resultaten i figur 14. Observera att den positiva ytan adsorberar såväl

fibrinogen samt trombocyter homogent över ytan, medan gradientytan adsorberar såväl protein såsom trombocyter graduellt. De negativa kontrollytorna gav ingen väsentlig respons.

Efter trombocytadsorption så sköljdes ytorna med PBS-buffert samt fixerades under 15 minuter med 2% glutaraldehyd. Ytorna färgades (infärgning av aktinskelett) enligt sedvanliga protokoll samt analyserades med fluorescensmikroskopi vid olika positioner på ytorna. Figur 15 visar representativa trombocyter vid positioner med hög (A) respektive låg (B) partikeltäckning.

Exempel 4. Utvärdering av mikrobiell adhesion till hydrofoba nanopartikelgradienter

”Långa” gradienter med 10 nm guldnanopartiklar fabricerades på guldytor modifierades med maleimid-PEG och oktantiol enligt exempel 2 ovan. Detta gav gradienter av hydrofoba partiklar mot en bakgrund av proteinavvisande PEG. Fimbrierade E-coli adsorberades till ytorna under statiska förhållanden samt utsattes för kontrollerad sköljning under tio minuter. Kvarvarande bakterier färgades med accredineorange samt DAPI varpå ytorna analyserades med lupp samt fluorescensmikroskop. Figur 16 visar en sektion av en gradientyta med adsorberade E-coli färgade med accredineorange vid låg förstoring samt en positiv kontrollyta (oktantiol) samt en negativ kontrollyta (ditiol modifierad med maleimid-PEG). Yttäckningen av nanopartiklar vid olika positioner i gradienten bestämdes med SEM, den relativa yttäckningen anges i respektive bild. Den infällda bilden visar två stycken bakterier färgade med DAPI vid större förstoring. Notera att utbredningen av bakterier förändras kraftigt vid 20% yttäckning.

Referenser

1. Lundgren A. O., et al., *Self-Arrangement Among Charge-Stabilized Gold Nanoparticles on a Dithiothreitol Reactivated Octanedithiol Monolayer*. Nano Letters, 2008. 8(11): p. 3989-3992.
2. Adamczyk Z., et al., *Structure and ordering in localized adsorption of particles*. Journal of Colloid and Interface Science, 1990. 140(1).
3. Hanarp P., et al., *Control of nanoparticle film structure for colloidal lithography*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering aspects, 2003. 214: p. 23-36.
4. Johnson C. A. and Lenhoff A. M., *Adsorption of charged latex particles on Mica studied by atomic force microscopy*. Journal of Colloid and Interface Science, 1996. 179: p. 587-599.
5. Semmler M., et al., *Diffusional deposition of charged latex particles on water-solid interfaces at low ionic strength*. Langmuir, 1998. 14: p. 5127-5132.
6. Kooij E. Stefan, et al., *Ionic strength mediated self-organisation of gold nanocrystals: an AFM study*. Langmuir, 2002. 18: p. 7677-7682.
7. Verwey E.J.W. and Overbeek J.Th.G., *Theory of the stability of lyophobic colloids*. 1948, Amsterdam: Elsevier Publishing Company Inc.
8. Lundgren A. O., *PCT/SE2009/051060*. 2009.
9. Arnold M., et al., *Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces*. ChemPhysChem, 2004. 5: p. 383-388.
10. Michel R., et al., *A novel approach to produce biologically relevant chemical patterns at the nanometer scale: selective molecular assembly patterning combined with colloidal lithography*. Langmuir, 2002. 18: p. 8580-8586.
11. Elwing H., et al., *A wettability gradient-method for studies of macromolecular interactions at the liquid solid interface*. Journal of Colloid and Interface Science, 1987. 119(1): p. 203-210.
12. Kim M.S., Khang G., and Lee H.B., *Gradient polymer surfaces for biomedical applications*. Progress in polymer science, 2008. 33(1): p. 138-164.
13. Morgenthaler S., Zink C., and Spencer N.D., *Surface-chemical and -morphological gradients*. SOFT MATTER, 2008. 4(3): p. 419-434.
14. Liedberg B. and Tengvall P., *Molecular gradients of omega-substituted alkanethiols on gold - preparation and characterization*. Langmuir, 1995. 11(10): p. 3821-3827.
15. Grabar Katherine C., et al., *Kinetic control of interparticle spacing in Au colloid-based surfaces: Rational nanometer-Scale Architecture*. Journal of the American Chemical Society, 1996. 118: p. 1148-1153.
16. Arnold M., et al., *Induction of cell polarization and migration by a gradient of nanoscale variations in adhesive ligand spacing*. Nano Letters, 2008. 8(7): p. 2063-2069.
17. Andersson O., et al., *Gradient Hydrogel Matrix for Microarray and Biosensor Applications: An Imaging SPR Study*. Biomacromolecules, 2009. 10: p. 142-148.
18. K'owino I. O. and Sadik O. A., *Impedance spectroscopy: A powerful tool for rapid biomolecular screening and cell culture monitoring*. Electroanalysis, 2005. 17(23): p. 2101-2113.
19. Zhao J. J., et al., *Nanoparticle-mediated electron transfer across ultrathin self-assembled films*. Journal of Physical Chemistry B, 2005. 109(48): p. 22985-22994.
20. Bard A. J. and Faulkner L. R., *Electrochemical Methods*. 2:nd ed. 2001: John Wiley & Sons Inc.

PATENTKRAV

1. En metod för att preparera en kontinuerlig gradient av deponerade och elektriskt laddade nanopartiklar (200), 1-1000 nm, längs med en plan fast yta som
5 innefattar att mängden deponerade partiklar/ytenhet är relativt hög på den ena sidan av gradientytan och relativt låg på den motsatta sidan och som också innefattas av att avståndet mellan de deponerade partiklarna regleras med hjälp av elektrostatisk repulsion av partiklar i lösning vid deponeringstillfället, kännetecknad av att
en plan fast yta (203) placeras i en saltfri eller nära saltfri lösning (402) med
10 ytladdade nanopartiklar (200);
en saltlösning (403) skiktas under lösningen (402) och tillåts diffundera in i lösningen (402);
så att graden av elektrostatisk repulsion mellan deponerade partiklar åstadkommes genom avpassad diffusion av en saltlösning (403) in i lösning (402)
15 innehållande nanopartiklar (200).
2. Metod enligt krav 1, samt att diffusionen av saltlösningen åstadkommes genom att en saltlösning med relativt hög densitet och koncentration skiktas under saltfri lösning i en särskild anordning och att den gradvisa deponeringstätheten av
20 mängd nanopartiklarna på den sagda ytan regleras genom diffusionstiden och koncentrationen av salt i saltlösningen.
3. Metod enligt krav 1 samt att diffusionen av saltlösningen görs från en avgränsad behållare som anbringas på en plan matris som också innehåller nanopartiklar
25 och vars bottenyta helt eller delvis har kontakt med den sagda plana ytan.
4. Metod enligt något av kraven 1-3 samt att nanopartiklarna utgöres av metall, keramiskt material inklusive glas eller polymermaterial.
- 30 5. Metod enligt något av kraven 1-4 samt att sagda yta utgöres av metall, keramiskt material inklusive glas eller polymermaterial.
6. Metod enligt något av kraven 1-5 samt att bindningskrafter mellan nanopartiklar och sagda yta helt eller delvis består av kovalent bindning,
35 metallbindning, van der Waals-bindning, vätebindning, dipol-dipolbindning eller jon-dipolbindning.

7. Metod enligt något av kraven 1-2 samt att den sagda plana ytan utgöres av en guldyta som fått binda ditiolreagens och att guldpartiklar kovalent också binder till tiol grupper på ditiolguldytan.

5

8. Metod enligt något av kraven 1-2 samt att negativt laddade, men ej ytbindande, nanopartiklar blandas med ytbindande nanopartiklar vid deponeringstillfället i avsikt att förbättra spridningsgrad, och förhindra klusterbildning av ytbindande deponerade partiklar.

10

9. Metod enligt något av kraven 1-6 samt att en ytpreparation, avsedd för analys av adsorptionsfenomen, tillverkas så att ytpreparationen innehåller tre separata ytor varav en yta har samma ytkemi som partikelytan, en yta har samma ytkemi som den sagda ytan samt en yta som utgöres av sagd gradient yta.

15

10. Metod enligt något av kraven 1-3 eller 9, samt att positioner markeras på den sagda gradientytan så att mikroskopisk analys av adhesionsförsök underlättas.

11. Metod enligt något av kraven 1-3 eller 9, samt att utvärderingsmetoden vid adsorptionsförsök på sagd gradientyta utgöres av iSPR.

20

12. Metod enligt något av kraven 1-3 eller 9, samt att utvärderingsmetoden vid adsorptionsförsök på gradientyta utgöres av elektrokemisk metodik på en för ändamålet avsedd gradientyta med närliggande elektriskt isolerade avsnitt.

FIG 1

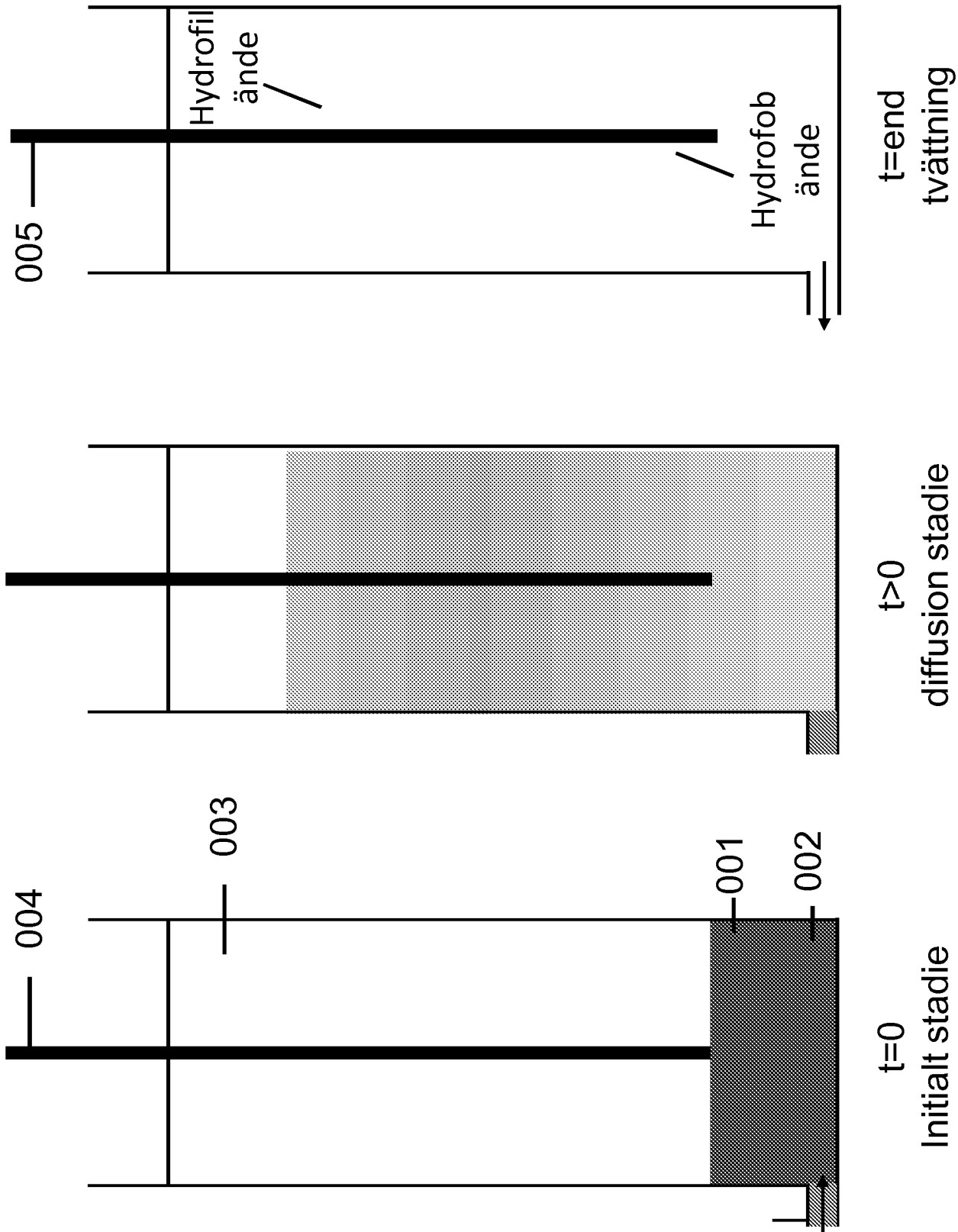


FIG 2

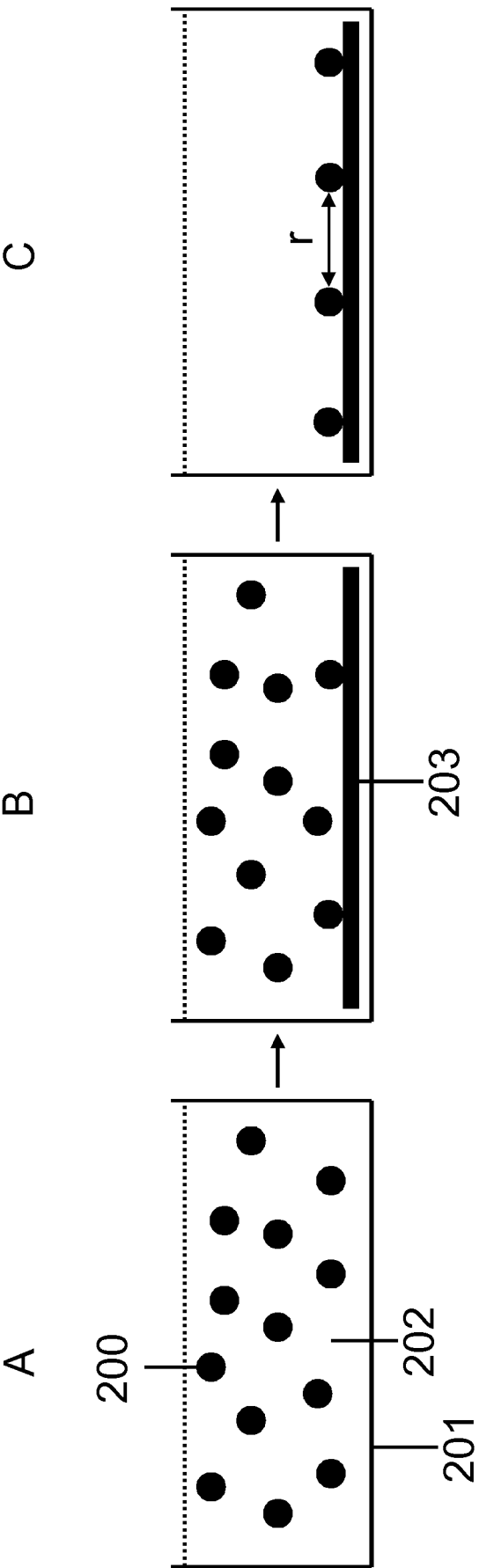


FIG 3

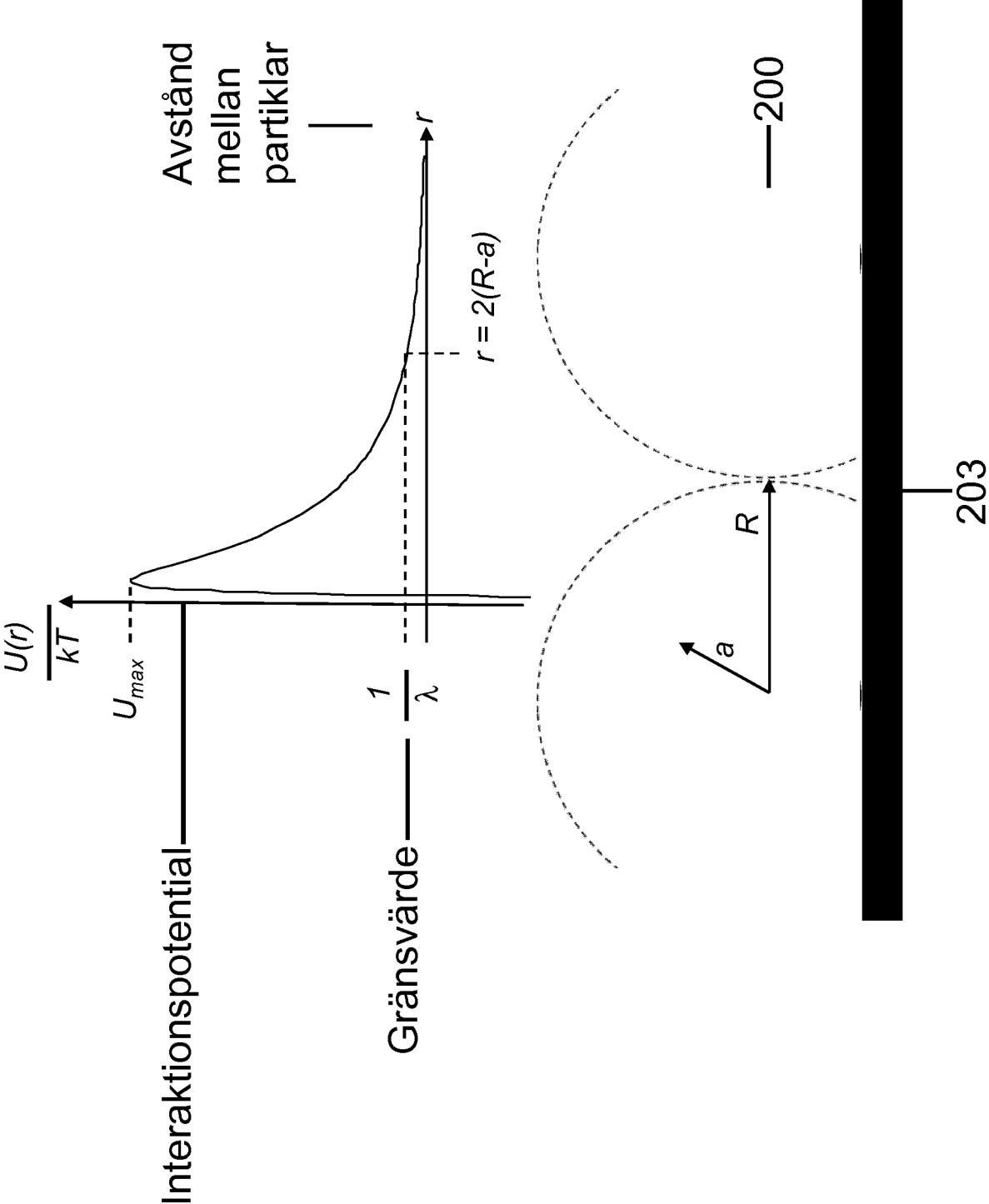


FIG 4

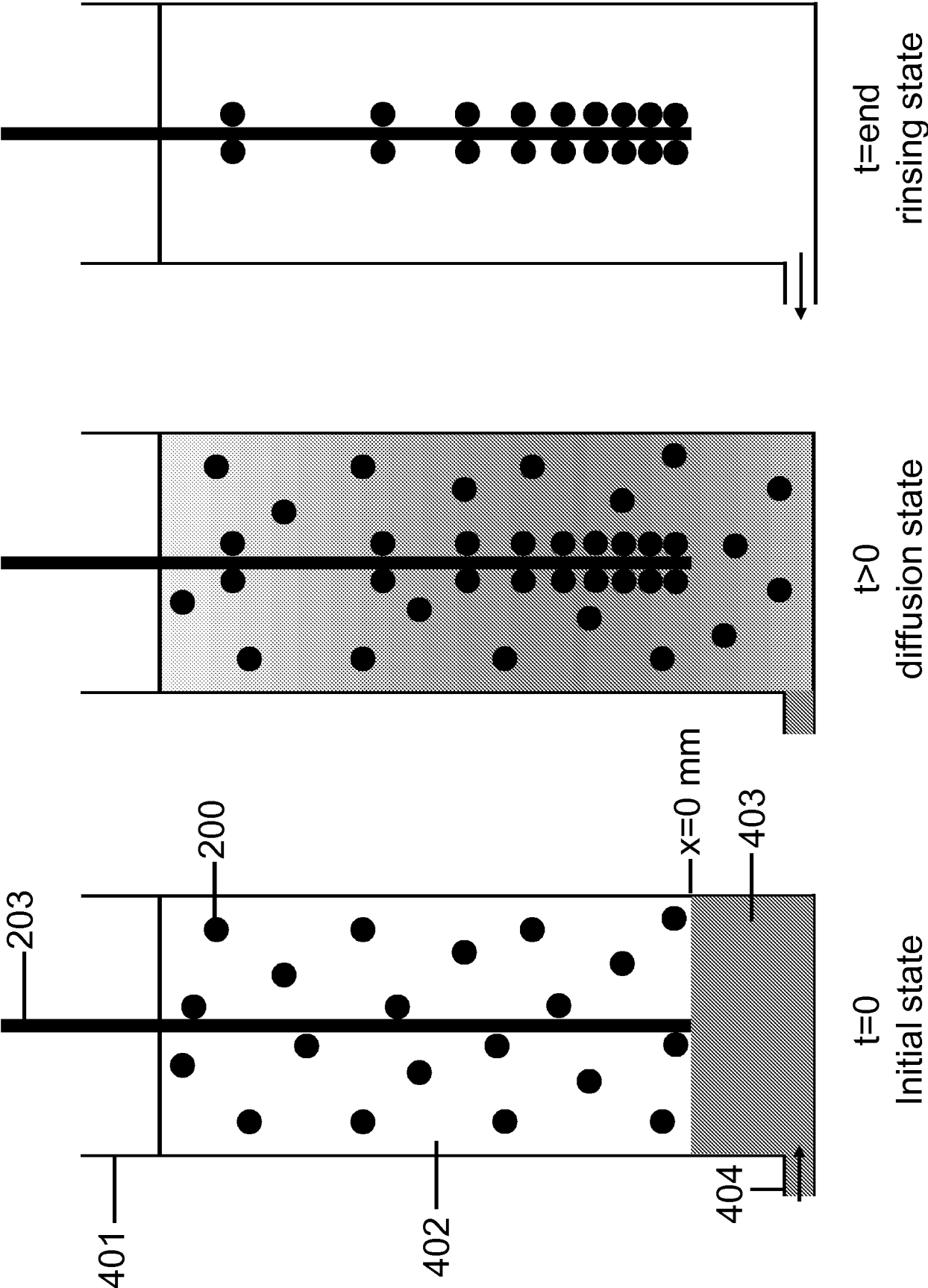


FIG 5

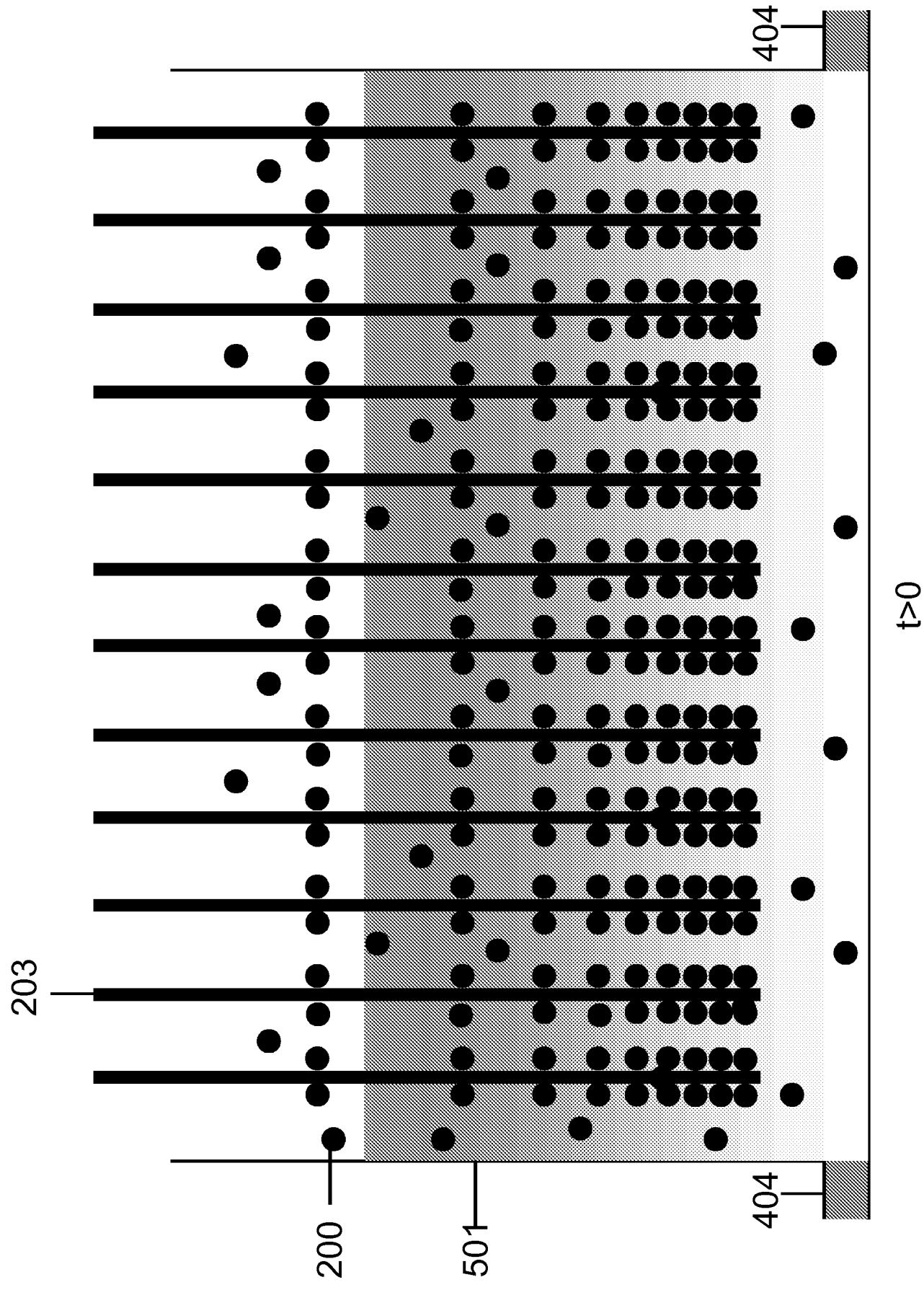


FIG 6

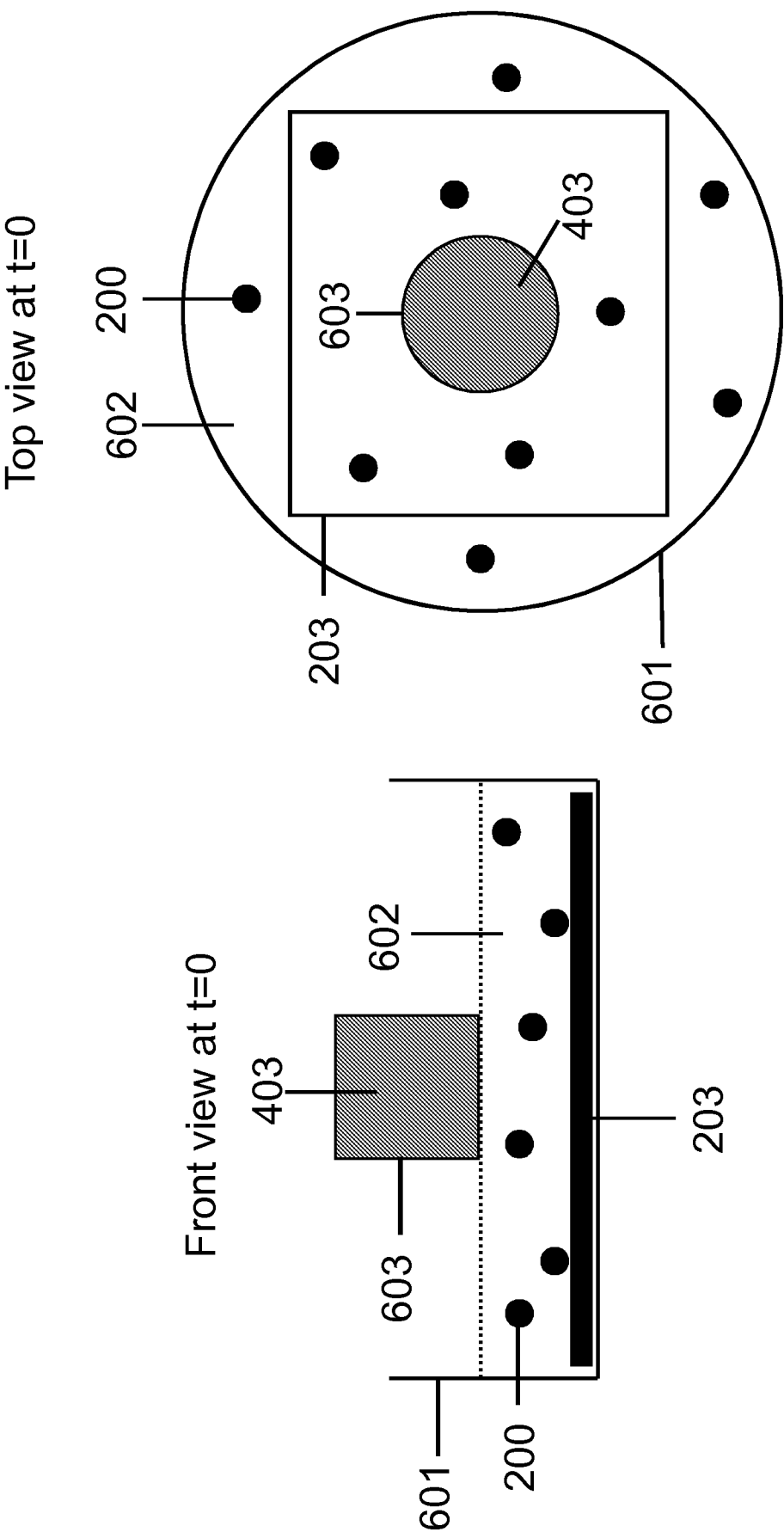


FIG 6B

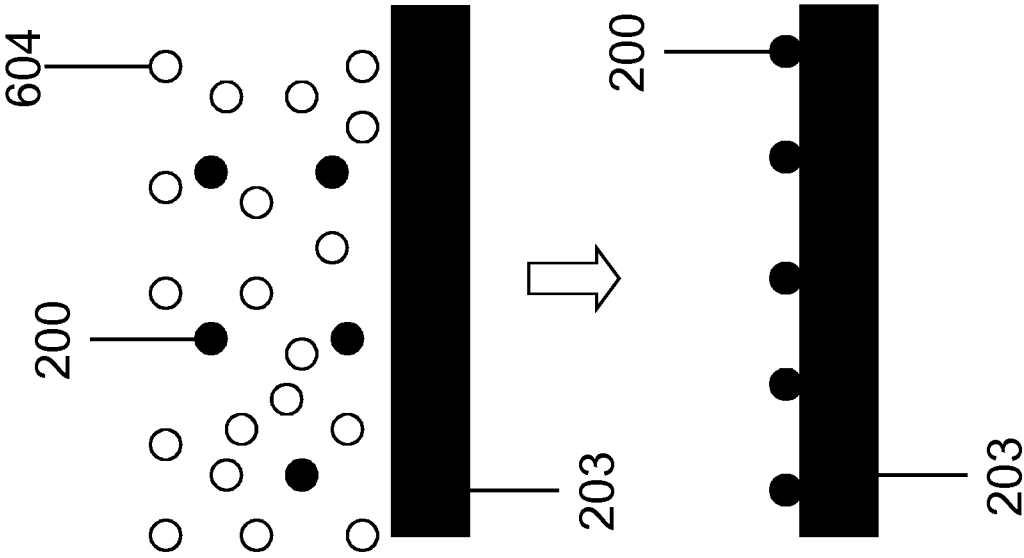


FIG 7

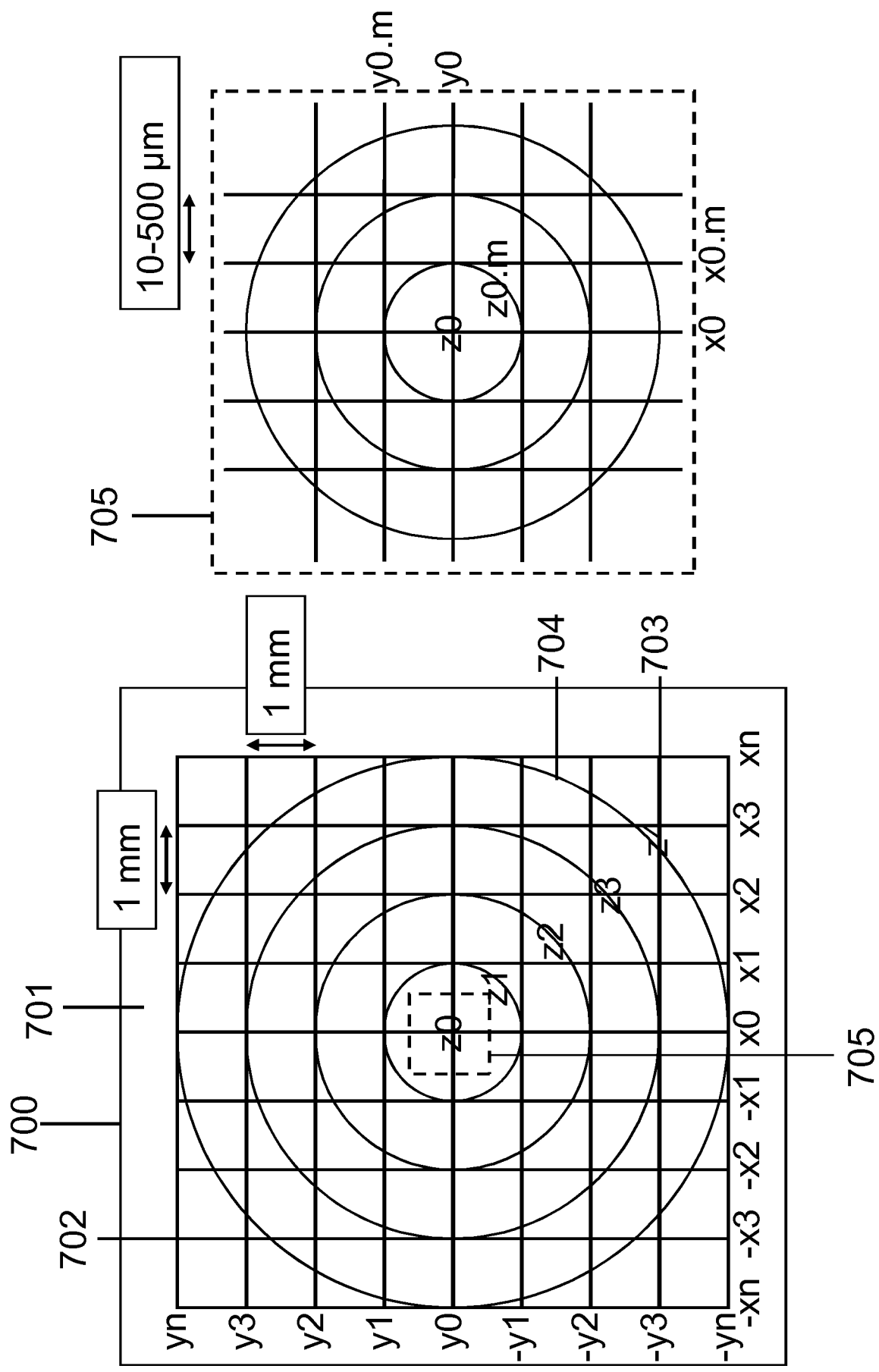
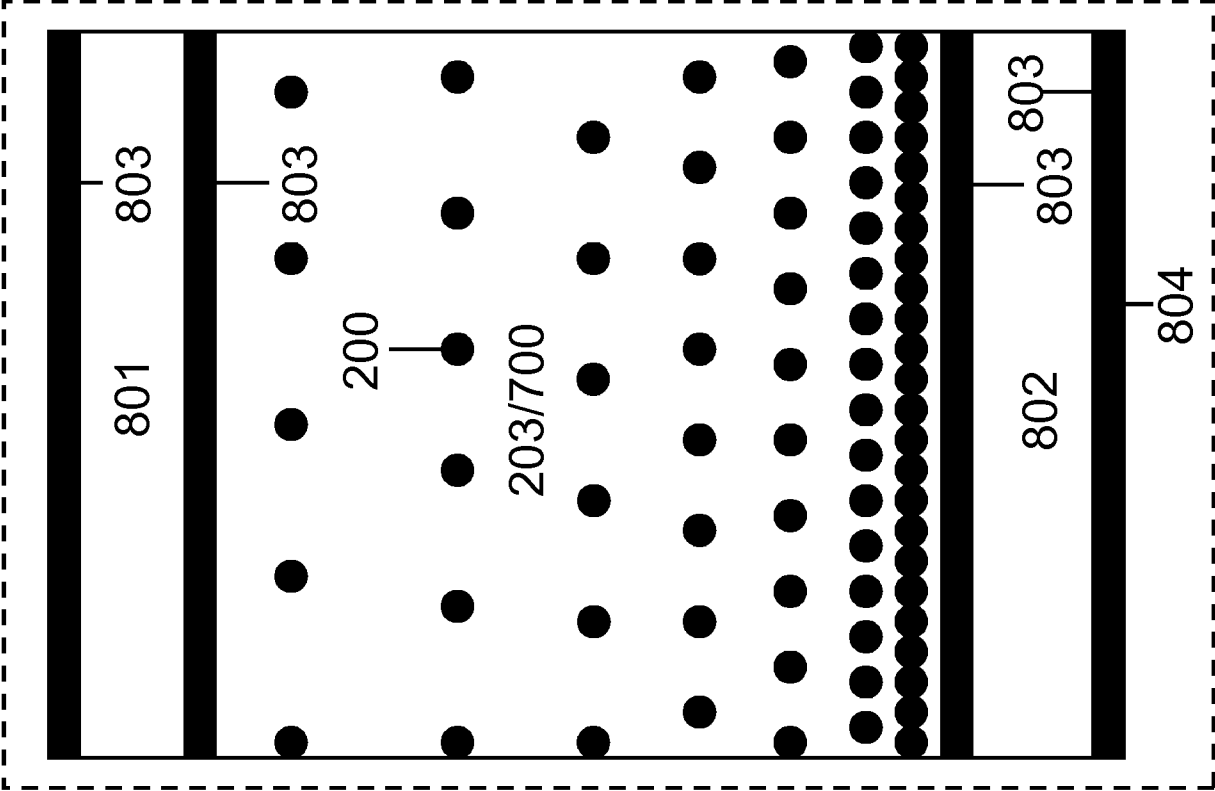


FIG 8

Top view



Side view

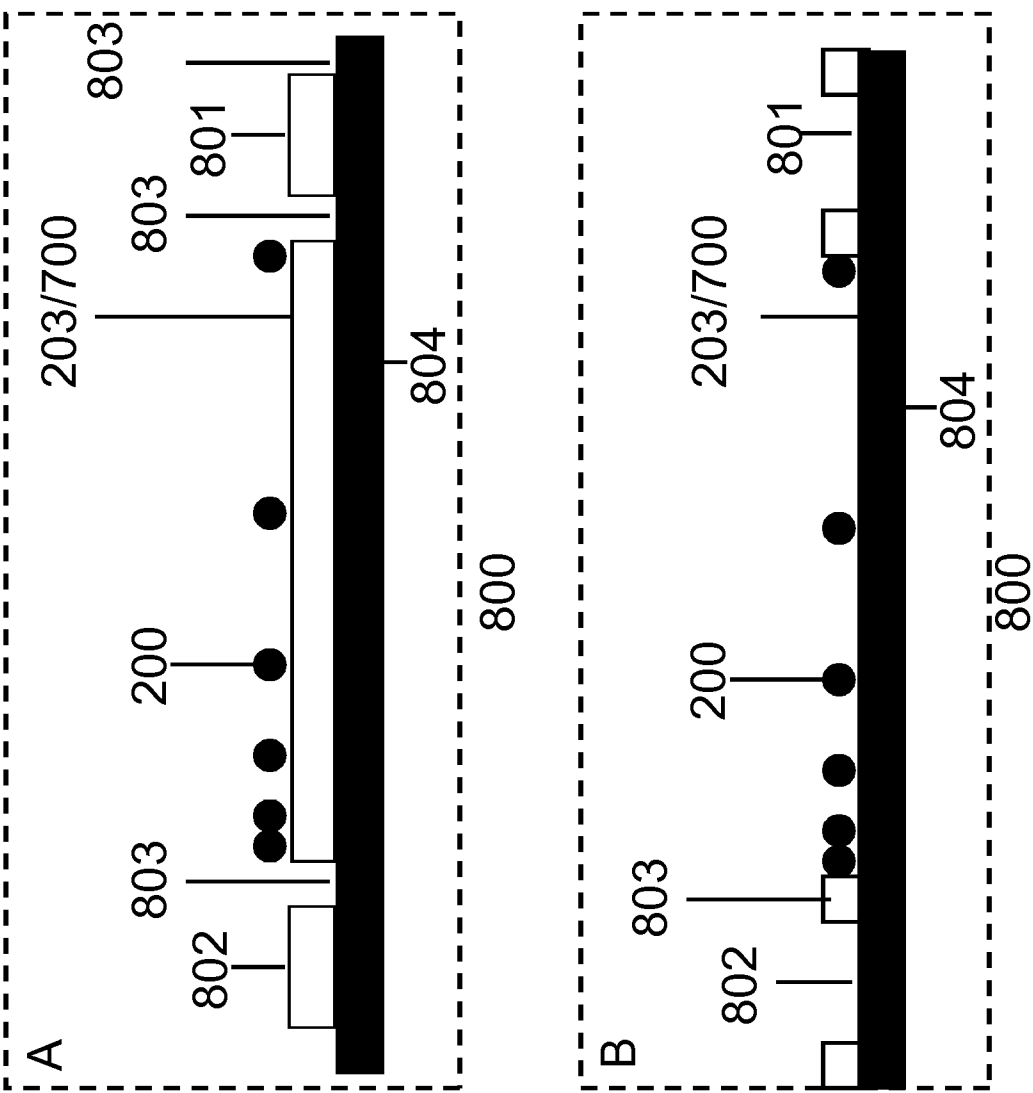


FIG 9

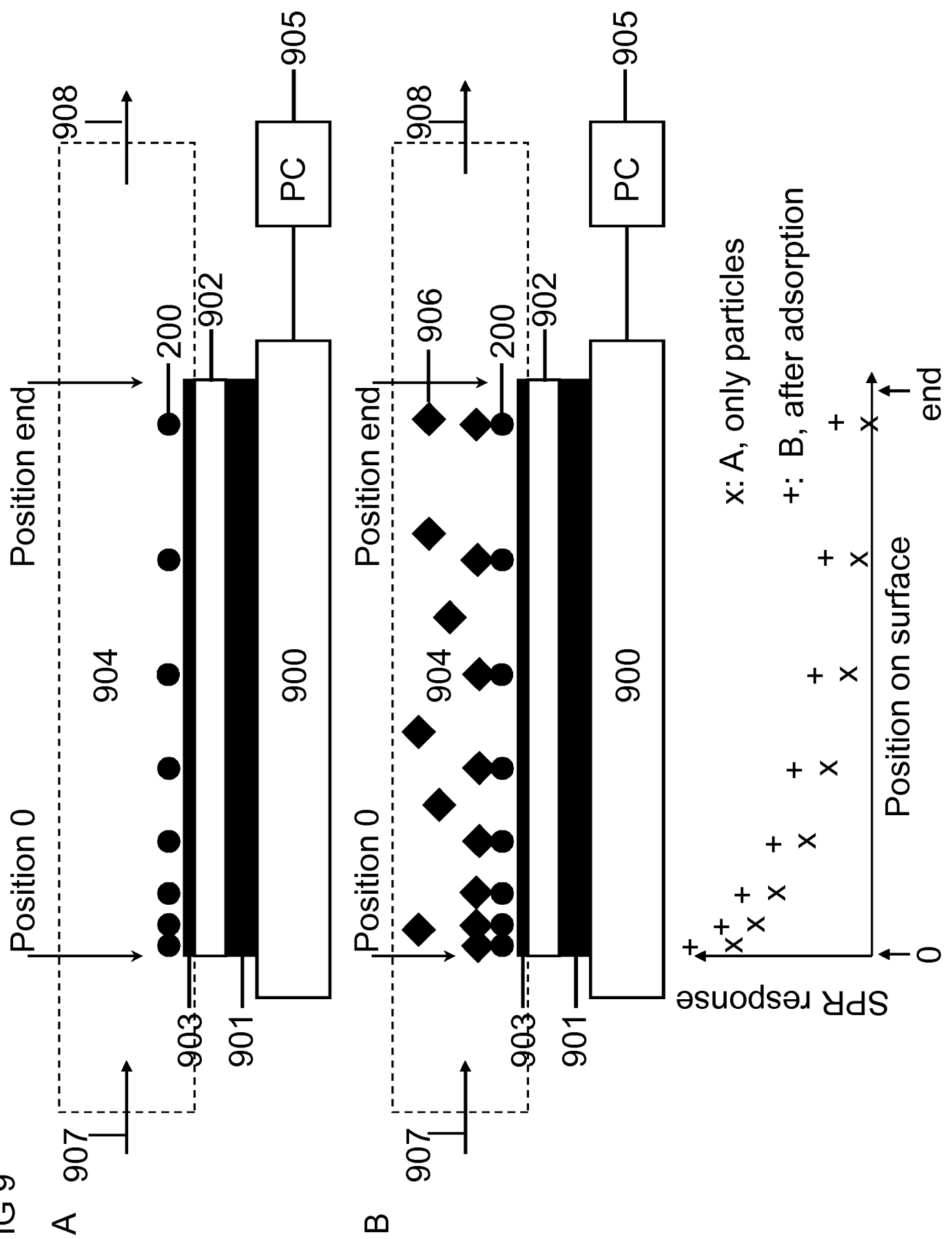


FIG 10

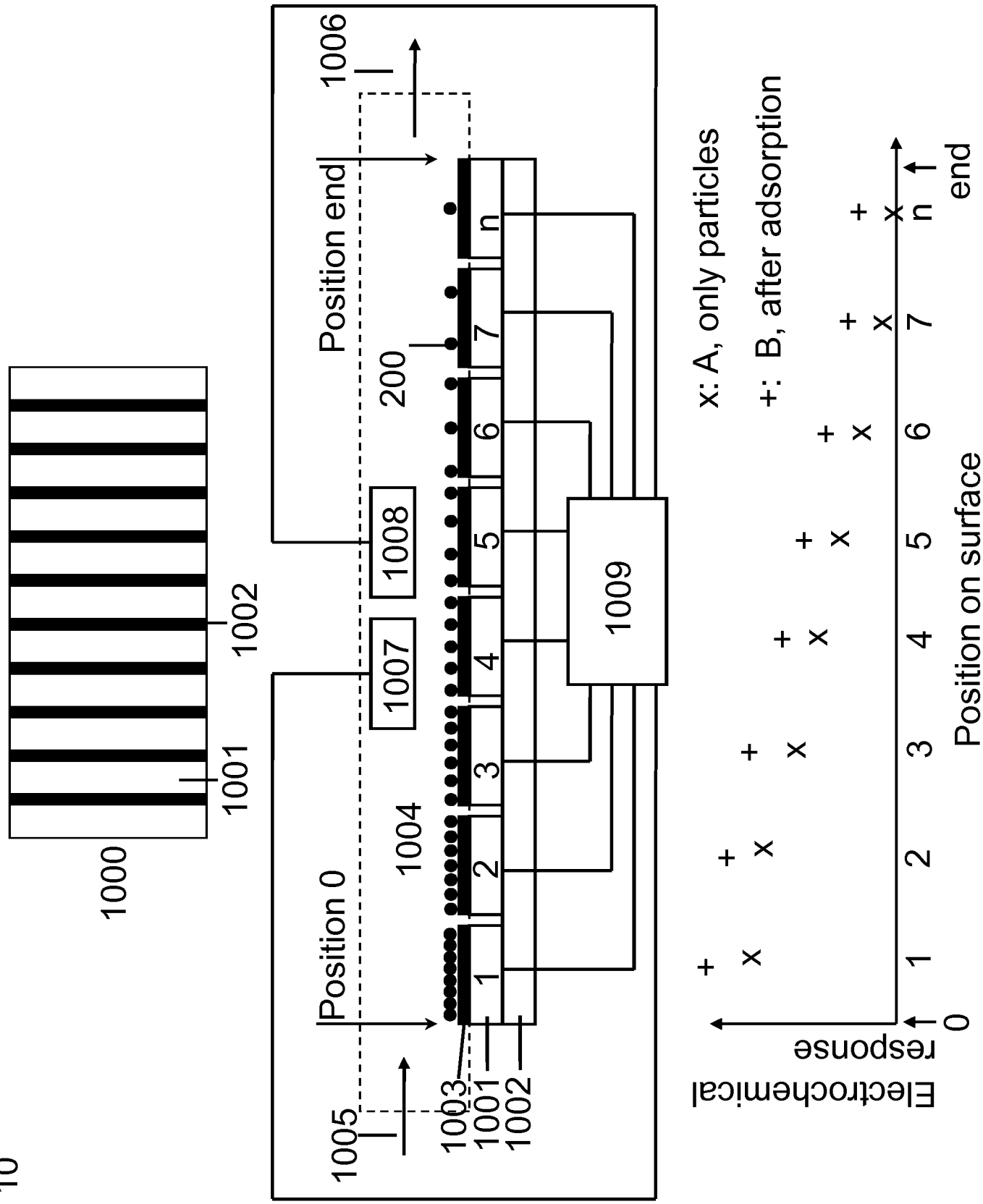
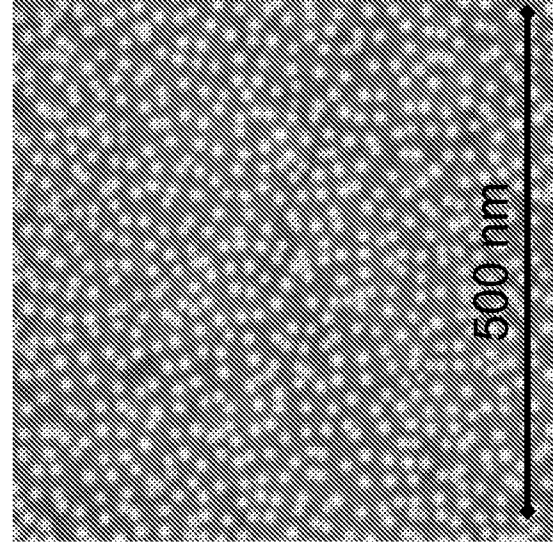
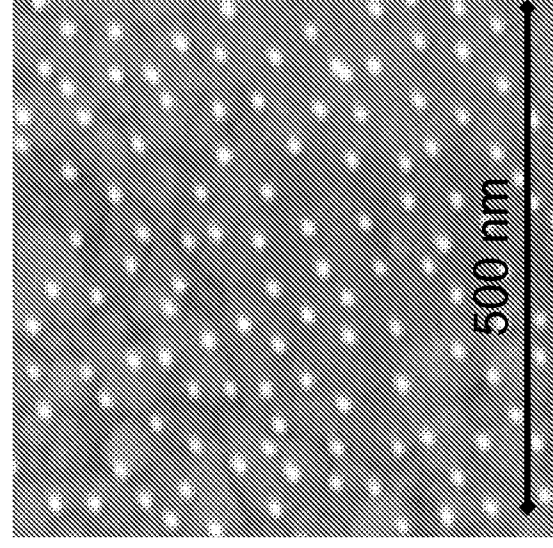


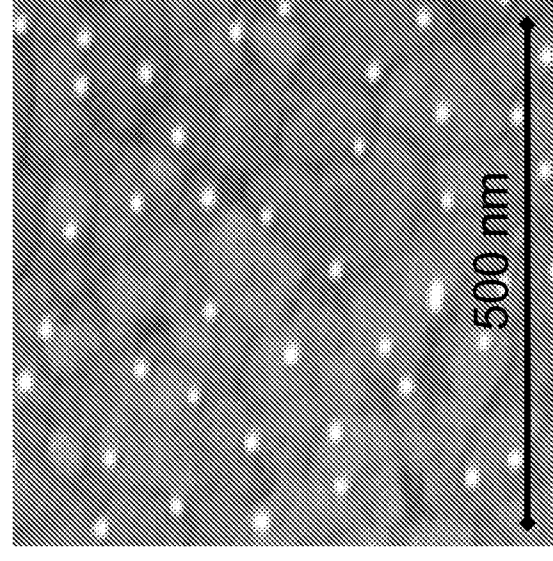
FIG 11



4.0 mm



6.5 mm



9.0 mm



Position x on gradient surface relative edge of surface ($x=0$)

FIG 12

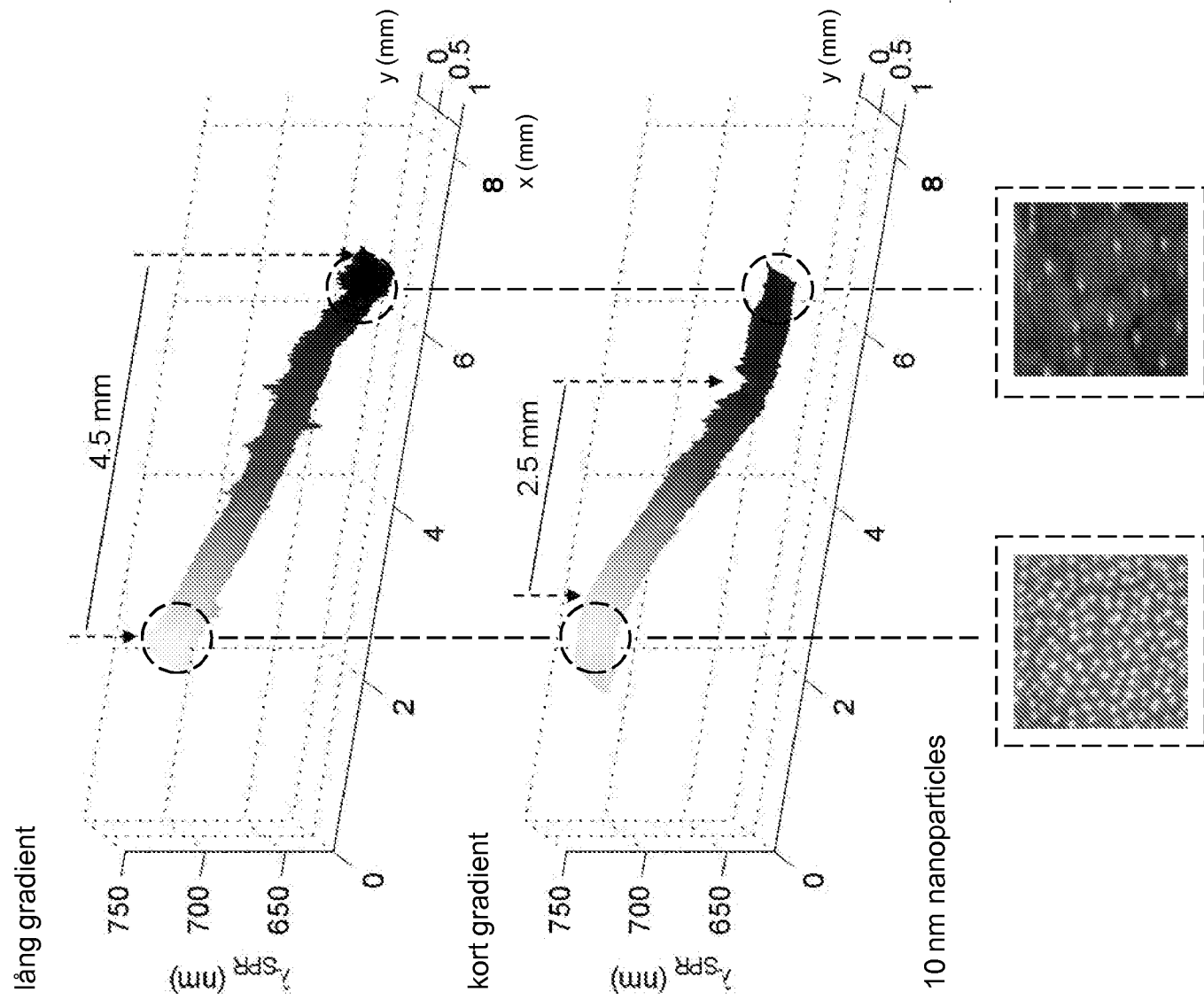


FIG 13

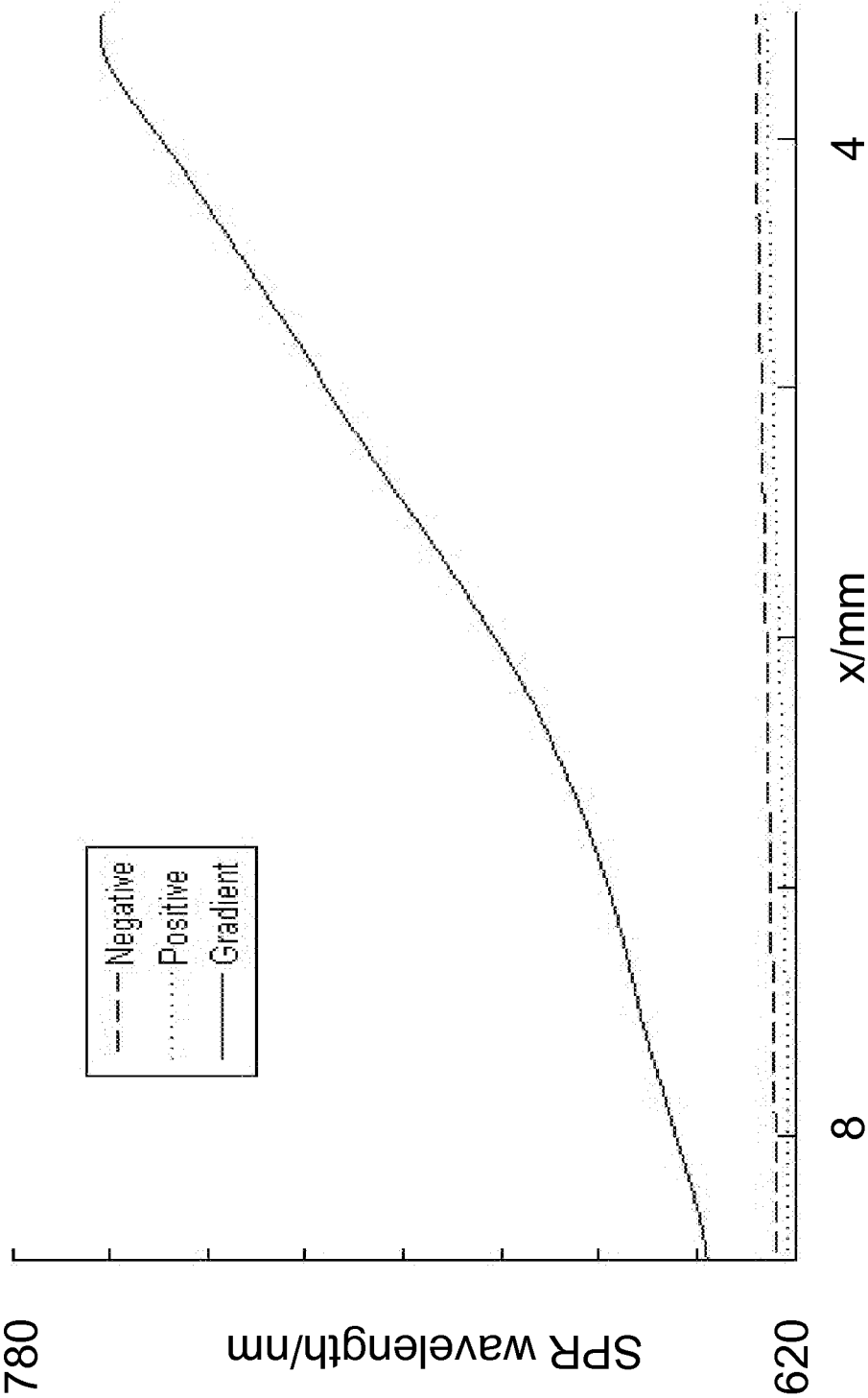


FIG 14

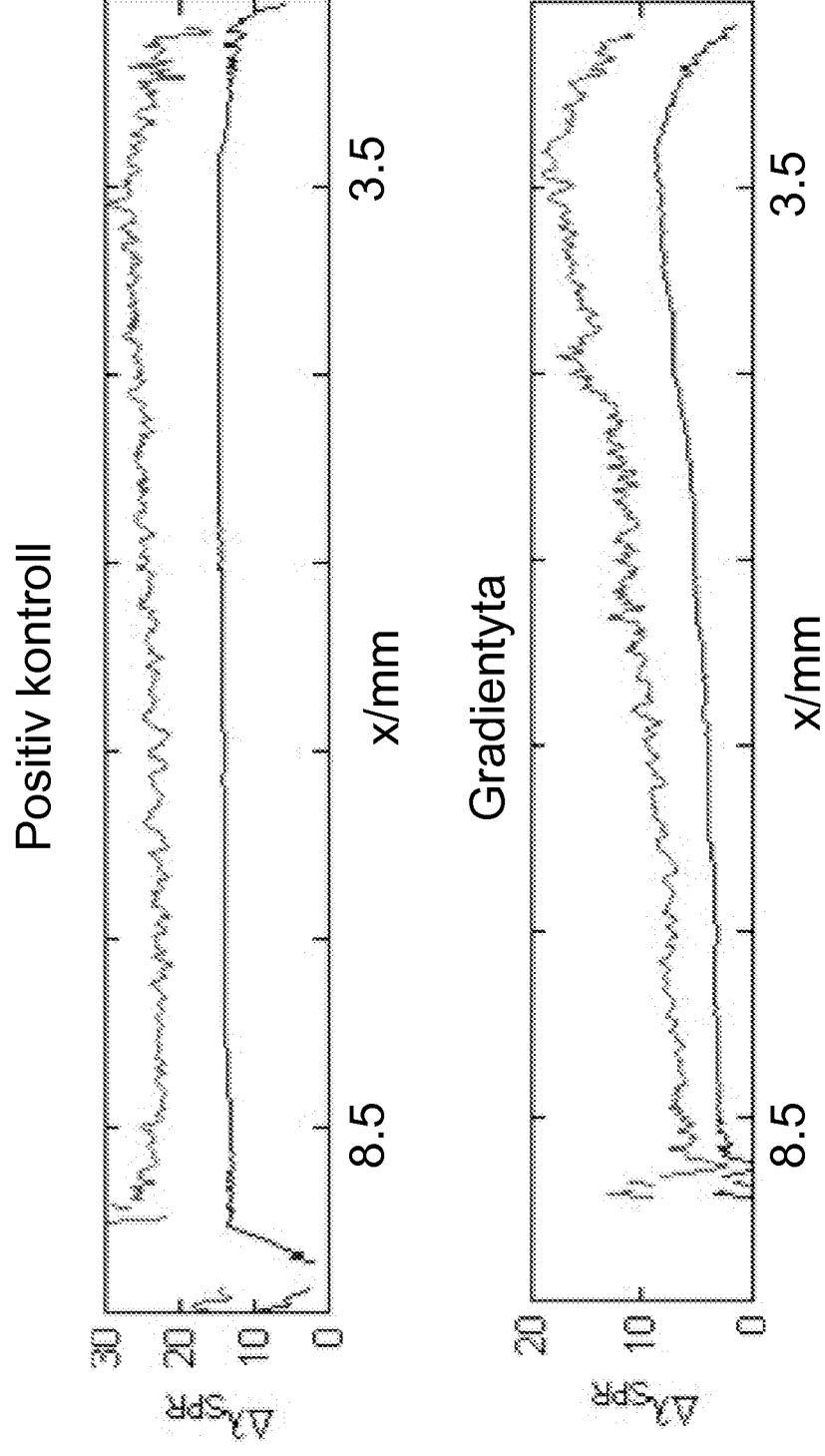
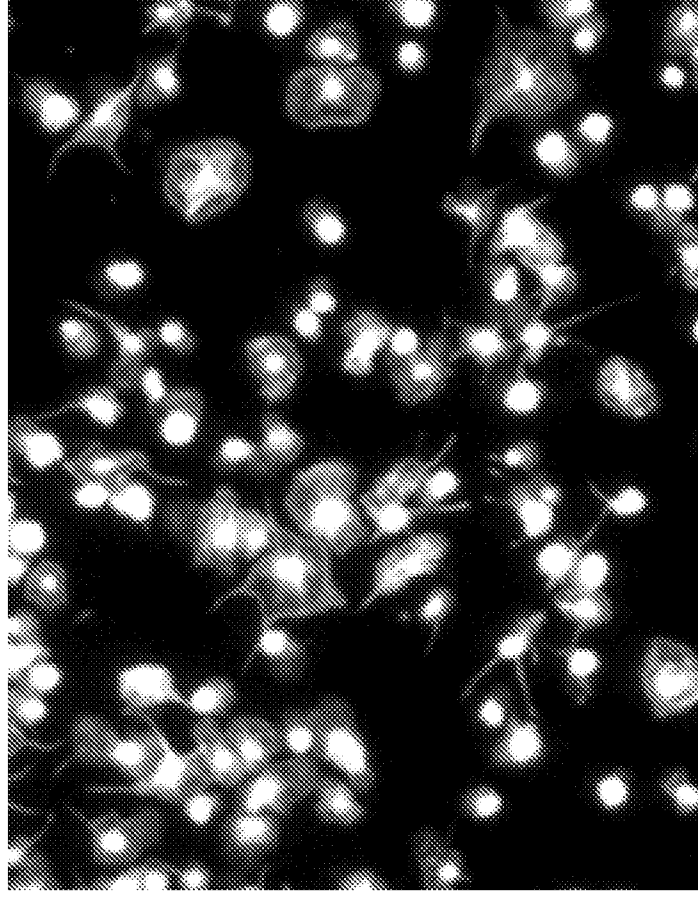


FIG 15

A



B

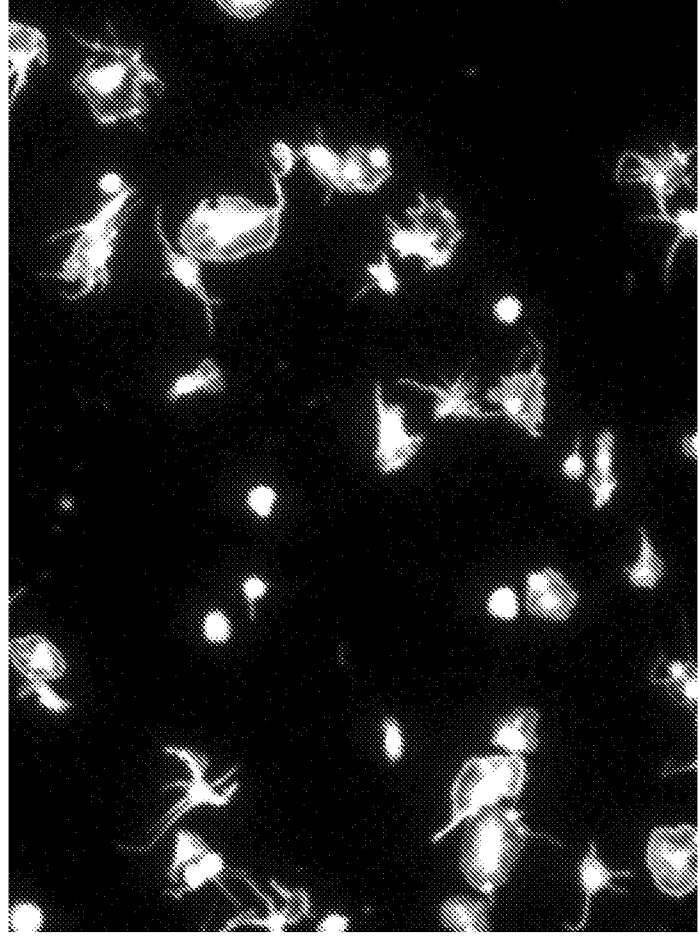


FIG 16

