

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. Februar 2002 (07.02.2002)

PCT

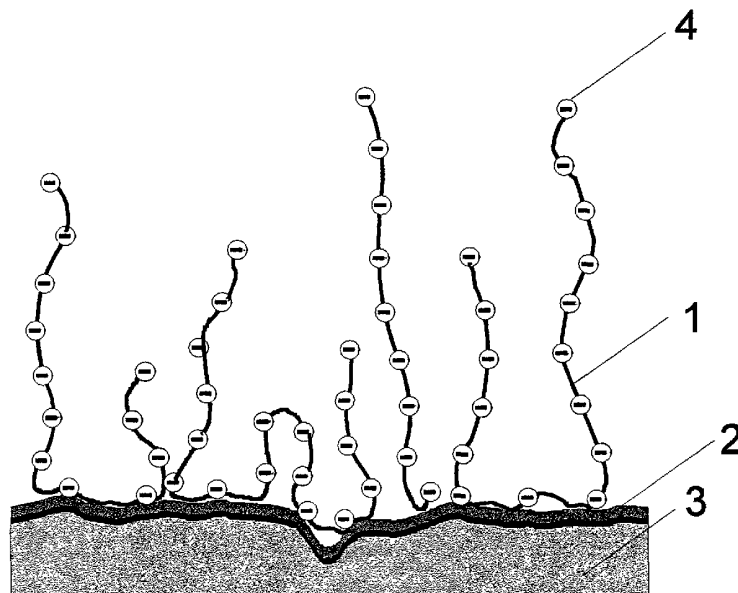
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/10759 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/543** (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **GEDIG, Erk** [DE/DE];
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/08701 Hammer Strasse 83, 48153 Münster (DE). **HAALCK,**
Lutz [DE/DE]; Gemenweg 101, 48149 Münster (DE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 27. Juli 2001 (27.07.2001) (74) Anwalt: **PFENNING, MEINIG & PARTNER GBR;**
Mozartstrasse 17, 80336 München (DE).
(25) Einreichungssprache: Deutsch
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.
(30) Angaben zur Priorität: 100 36 907.3 28. Juli 2000 (28.07.2000) DE
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **INSTITUT FÜR CHEMO- UND BIOSENSORIK**
MÜNSTER E.V. [DE/DE]; Mendelstrasse 7, 48149 Mün-
ster (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: COATING FOR VARIOUS TYPES OF SUBSTRATE AND METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF

(54) Bezeichnung: BESCHICHTUNG FÜR VERSCHIEDENARTIGE SUBSTRATE SOWIE VERFAHREN ZU DEREN HER-
STELLUNG



(57) Abstract: The invention relates to coatings for various types of substrate, whereby a hydrophilic polymer layer is bonded to a substrate by means of a polymer bonding agent layer. The invention also relates to a method for the production of said layer system. The inventive layers can be used, for example, as an immobilisation matrix, and to suppress non-specific protein adsorption in biosensors, MALDI targets and other bioanalytical appliances. Said layers can also be used to make implants biocompatible and to coat contact lenses. Optical elements provided with said coatings no longer steam up. Furthermore, the layers are dirt-repelling or self-cleaning.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 02/10759 A2



(84) **Bestimmungsstaaten** (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung bezieht sich auf Beschichtungen von verschiedenartigen Substraten, wobei eine hydrophile Polymerschicht über eine polymere Haftvermittlerschicht an ein Substrat gebunden wird. Ebenso wird ein Verfahren zur Herstellung dieser Schichtsysteme vorgestellt. Als Anwendung dieser erfindungsgemässen Schichten bietet sich der Einsatz z.B. als Immobilisierungsmatrix und zur Unterdrückung unspezifischer Proteinadsorption in Biosensoren, MALDI Targets und anderen bioanalytischen Geräten an. Weiterhin können sie zur Biokompatibilisierung von Implantaten und zur Beschichtung von Kontaktlinsen verwendet werden. Optische Elemente, die mit derartigen Beschichtungen versehen sind, beschlagen nicht mehr. Darüber hinaus sind die Schichten schmutzabweisend bzw. selbstreinigend.

Beschichtung für verschiedenartige Substrate sowie
Verfahren zu deren Herstellung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft polymere Beschich-
tungen für verschiedenartige Substratoberflächen, um
deren bioinerten Charakter zu erhöhen. Derartige Sub-
stratbeschichtungen werden häufig für Vorrichtungen
verwendet, die in Kontakt mit biologischen Medien
10 stehen, wie z.B. bioanalytische Vorrichtungen oder
Implantate. Hierfür werden weitestgehend bioinerte -
also möglichst wechselwirkungsarme - Oberflächen be-
vorzugt.

15 Nach dem Stand der Technik finden meist hydrophile
Polymere als Substratbeschichtung Verwendung. Hierzu
zählen Polyether, wie z.B. Polyethylenglycol; Poly-
saccharide, wie Heparin oder Dextran; Polyalkohole,
wie z.B. Polyvinylalkohol; oder auch Polyamide, wie
20 z.B. Polyacrylamid. Für biosensorische Zwecke haben

sich dünne Hydrogelschichten aus carboxylierten Polysacchariden, wie beispielsweise Carboxymethyl-dextran bewährt (US Patent 5,436,161), da diese die Sensoroberfläche nicht nur gegen unspezifische Wechselwirkungen abschirmen, sondern über die Carboxylfunktionalitäten auch eine effiziente Immobilisierung von verschiedenen Biomolekülen ermöglichen.

Die verwendete Methode zur Anbindung der Polymere an das Substrat ist in der Regel vom verwendeten Substratmaterial abhängig.

An Glas und andere oxidische Oberflächen wird üblicherweise zunächst ein kupplungsfähiges Silan gebunden (Silanisierung), an welches in einem zweiten Schritt ein hydrophiles Polymer gekoppelt wird. Die Herstellung qualitativ hochwertiger Silanschichten bedingt allerdings den Einsatz organischer Lösungsmittel und ist relativ arbeitsaufwendig.

Edelmetalle können über einen Monolayer aus bifunktionellen langkettigen Alkylmercaptanen funktionalisiert werden. An die aktivierten funktionellen Gruppen werden dann dünne Polysaccharidschichten kovalent gebunden, welche zwecks Einführung kupplungsfähiger Funktionalitäten später carboxymethyliert werden. Da die selbstorganisierten Monolagen den Nanorauigkeiten der Metalloberfläche folgen, kommt es zu punktuellen Inhomogenitäten, den sog. Pinhole-defects. Weiterhin läßt sich die Dichte der später eingeführten Carboxylfunktionen nicht, bzw. nur schwer einstellen.

Kunststoffsubstrate lassen sich durch den Einsatz von Oxidationsmitteln, Plasma oder ionisierender Strahlung unselektiv funktionalisieren. Weiterhin wurden Polyamine in dünner Schicht adsorbiert, woran wieder-

um Polyethylenglycol (PEG) kovalent gebunden werden konnte (Bergström et al. (1992) *J. Biomed. Mat. Res.*, **26**, 779-790). Ein Nachteil bei dieser Methode besteht jedoch darin, daß zur nachfolgenden kovalenten Immo-
5 bilisierung von Liganden lediglich die terminale funktionelle Gruppe der PEG-Kette zur Verfügung steht. Aus demselben Grund ist auch die Immobilisierungsdichte von Polyethylenglycol nicht besonders hoch.

10 Eine substratunabhängige Möglichkeit zur Oberflächen-derivatisierung besteht in der Plasmaabscheidung von dünnen Polymerfilmen geeigneter Funktionalität auf dem Substrat mit anschließender kovalenter Anbindung
15 des gewünschten hydrophilen Polymers über Oxirangruppen (WO 94/06485). Auch diese Methode bedingt einen vergleichsweise hohen apparativen Aufwand und liefert dazu häufig nur geringe Dichten an kupplungsfähigen Gruppen. Darüber hinaus ist die Dicke der abgeschie-
20 denen Polymerisatschichten schwer steuerbar.

Eine ähnliche Methode wird in US 5080924 beschrieben. Auch hier kommt es einer sehr niedrigen Immobilisierungsdichte des hydrophilen Polymers auf der zugrun-
25 deliegenden Haftvermittlerschicht. Grund hierfür ist die niedrige Konzentration des Polysaccharids, welche dazu führt, daß sich die Polymerketten parallel zur Substratoberfläche ausrichten und somit nur eine ge-
ringe Schichtdicke erzielt wird.

30 Weiterhin werden beispielsweise in DE 40 26 978 A1 mehrlagige selbstorganisierte Polyelektrolytschichten beschrieben, die alternierend auf ein Substrat aufgebracht sind. Die Polymerketten liegen hierbei in
35 Train-Konfiguration (parallel zur Oberfläche) bzw. Train-Loop-Konfiguration (teilweise flach auf der

Oberfläche, teilweise schleifenartig abstehend) vor. Diese Techniken der alternierenden Polyelektrolytadsorption sowie deren Varianten bewirken nur ein geringes Schichtdickenwachstum pro Schritt (wenige
5 nm). Die Anordnung der Polymerketten parallel zur Oberfläche führt zu zweidimensionalen Strukturen mit geringer Immobilisierungskapazität. Darüber hinaus können Biomoleküle, die größer als wenige kDa sind, nicht oder nur sehr schwer durch diese Schichten hin-
10 durchdiffundieren (Siebeffekt).

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Beschichtung für verschiedenartige Substrate zur Verfügung zu stellen, mit der unspezifische Adsorptionen
15 vermieden und gleichzeitig eine einstellbare Immobilisierungskapazität erzielt werden kann.

Diese Aufgabe wird durch die Beschichtung nach Anspruch 1 sowie durch das Verfahren zur Herstellung der Beschichtungen auf Substraten nach Anspruch 21
20 sowie den Verwendungen nach den Ansprüchen 32 bis 40 gelöst. Vorteilhafte Weiterbildungen der erfindungsgemäßen Beschichtung, des erfindungsgemäßen Verfahrens und der erfindungsgemäßen Verwendungen werden in
25 den abhängigen Ansprüchen gegeben.

Die erfindungsgemäße Beschichtung mit den beschriebenen Eigenschaften läßt sich dadurch erzeugen, dass das gereinigte Substrat zunächst mit einer dünnen polymeren Haftvermittlerschicht überzogen wird, an die
30 eine weitere hydrophile Polymerschicht aus mindestens einem Polymer gekoppelt wird, deren Polymerketten zumindest teilweise senkrecht zur Substratoberfläche, also bürstenartig, ausgerichtet sind. Anhand des Anteils der bürstenartig ausgerichteten Polymerketten
35 kann die Immobilisierungskapazität dieser Schicht ge-

genüber z.B. Biomolekülen eingestellt werden.

5 Dabei kann sich die hydrophile Polymerschicht aus unterschiedlichen Polymeren zusammensetzen. Dies hat den Vorteil, dass die Permeabilität der hydrophilen Polymerschicht für Biomoleküle mit unterschiedlichem Molekulargewicht gesteuert werden kann. Dies erfolgt, indem das Konzentrationsverhältnis zwischen nieder- und hochmolekularen Polymeren, welche die hydrophile Polymerschicht ausbilden, den zu untersuchenden Molekülen entsprechend eingestellt wird.

10 Vorzugsweise kann auf der hydrophilen Polymerschicht mindestens eine weitere Polymer- und/oder Partikelschicht aufgetragen sein. Diese legt sich dabei wie ein poröser Film über die bürstenartige Struktur.

20 Als hydrophile Polymere können bevorzugt Polysaccharide, Polyalkohole, Polyether, Polyamiden, Polycarbonsäuren, Polysulfaten/-sulfonaten, Polyphosphaten/-phosphonaten und/oder Kombinationen dieser eingesetzt werden, die zusätzlich noch durch weitere Reaktionsschritte chemisch funktionalisiert werden können. Hierzu zählen z.B. mit Isothiocyanat-, Isocyanat-, Carbonsäureazid-, N-Hydroxysuccinimidester-, N-Acylimidazol-, Sulfonylchloridderivat-, Aldehyd-, Keto-, Glyoxal-, Oxiran-, Carbonat-, Arylhalogenid-, Imidoester-, Anhydrid-, Halogenalkyl-, Halogenacyl-, Maleimid-, Aziridin-, Acryloyl-, Sulhydryl-, Disulfid-, Diazoalkan-, Diazoacetyl-, Imidazolylcarbamat-, Hydrazid-, Diazonium-, Arylazid-, Benzophenon-, Diazopyruvat- oder Diaziringruppen. Eine vorteilhafte Weiterbildung stellt eine Funktionalisierung z.B. mit Nitrilotriessigsäurederivaten dar, wodurch Liganden über ein Metallchelat immobilisiert werden können. Die Ankopplung von Molekülen, die anhand einer biospezi-

fische Erkennungsreaktion Liganden immobilisieren können, ist gleichfalls möglich. Ebenso können biologische Effektormoleküle, wie z.B. Wachstums- oder Adhäsionsfaktoren respektive blutgerinnungshemmende Substanzen, wie z.B. Heparin immobilisiert werden. Hierdurch erhält man biologisch aktive Beschichtungen, die in vivo gezielt bestimmte Reaktionen der Gewebsumgebung hervorrufen können.

Durch vorteilhafte Weiterbildung der erfindungsgemäßen Beschichtung ist die polymere Haftvermittlerschicht parallel zur Substratoberfläche angeordnet, was eine gute Haftung der Polymerketten auf dem Substrat sowie eine hohe Dichte kupplungsfähiger funktioneller Gruppen bewirkt.

Struktur und Immobilisierungskapazität der erfindungsgemäßen Hydrogelstrukturen lassen sich durch Veränderung der Adsorptions- und Kupplungsbedingungen steuern. Neben Verringerung der Konzentration des zweiten Polymers, welche zu Schleifen- und Trainstrukturen führt, läßt sich durch Veränderungen von pH und Salzgehalt bei der Adsorption des Haftvermittlerpolymers ein nanorauher Untergrund erzeugen, auf den, wie oben beschrieben, die zweite Polymerschicht in Brushkonformation aufgebracht werden kann. Durch ihre erhöhte Oberfläche besitzen sie eine höhere Immobilisierungskapazität als planare Strukturen, ohne dabei die für dickere Hydrogele charakteristische Diffusionslimitierung aufzuweisen.

Eine weitere Möglichkeit, zu nanorauen Oberflächen zu gelangen, stellt der Einsatz von Partikeln und/oder globulären Proteinen als Haftvermittler dar.

In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung können

als polymere Haftvermittlerschicht auch amphiphile Polymere oder Polyamine eingesetzt werden. Diese können dabei Disulfid-, Sulfid-, Diselenid-, Selenid-, Thiol-, Isonitril-, Nitro-, Selenol-, P(III)-, Isothiocyanat-, Xanthat-, Thiocarbamat-, Phosphin-Thioacetat- oder Dithioacetatgruppen tragen.

Die erfindungsgemäßen Beschichtungen können mit unterschiedlichen Substraten kombiniert werden. Für den elektrochemischen Einsatz stellt der Einsatz leitfähiger Substratmaterialien eine vorteilhafte Weiterbildung dar. Die Schichten sind zudem elektrochemisch und für Ionen begrenzt permeabel. Dies führt dazu, daß Biomoleküle durch Anlegen eines Potentials an ein darunterliegendes Metallsubstrat unter bestimmten Bedingungen selektiv und reversibel in der büstenartigen Polymerschicht angereichert werden können. Immobilisiert man Enzyme in der Polymerschicht, erhält man bei Anlegen eines geeigneten Potentials einen extrem schnell ansprechenden Enzymsensor.

Ebenso kann als Substrat ein Glas- und/oder anderes oxidisches Material eingesetzt werden, wobei dieses durch einen zusätzlichen Reaktionsschritt silanisiert werden kann.

Bei der Verwendung von Edelmetallen, wie z.B. Ag, Au, Pt oder Pd ist eine Substratbeschichtung ebenso möglich. Die Haftvermittlerschicht läßt sich hierbei sowohl direkt auf die Substratoberfläche aufbringen, als auch über ein bifunktionelles Alkylmercaptan koppeln.

Die Beschichtung von auf Kunststoffmaterialien basierenden Substraten läßt sich erfindungsgemäß umsetzen, wobei die Kunststoffsubstrate vor der Beschichtung

- durch die Behandlung mit Oxidationsmitteln, durch den Einsatz von oberflächenmodifizierenden Plasmamethoden oder ionisierende Strahlung zusätzlich funktionalisiert werden können. In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung können hydrophobe Oberflächen mit einer hinreichend niedrigen Oberflächenenergie mit einer Haftvermittlerschicht aus amphiphilen Polymeren beschichtet werden.
- Eine zusätzliche Alternative des zu verwendenden Substrates für die erfindungsgemäße Beschichtung stellen Natur- oder Kunstfasern oder eine Kombination von beiden dar.
- Die Adsorption des Haftvermittlerpolymers sowie die kovalente Anbindung der büstenartig angeordneten zweiten Polymerschicht können hierbei einfach aus wässrigen Lösungen erfolgen. Da der Aufbau dieses Schichtelements durch Selbstorganisation resp. unter vollständiger Umsetzung der funktionellen Gruppen erfolgt, besitzt das erfindungsgemäße Herstellungsverfahren eine systemimmanent hohe Fehlertoleranz, die zu konstanten Schichtqualitäten führt.
- Bevorzugt weist die Beschichtung eine Schichtdicke zwischen 10 und 500 nm und besonders bevorzugt zwischen 10 und 100 nm auf.
- Für die Verwendung der Beschichtung gemäß den Ansprüchen 32 bis 40 bieten sich vielfältige Möglichkeiten.
- Hierzu zählt die Immobilisierung von Liganden in einem Affinitätssensor ebenso wie die Immobilisierung von Enzymen in amperometrischen Enzymsensoren. Aber auch eine Selektivitätssteigerung von Sensoren wird ermöglicht, indem Moleküle oberhalb eines bestimmten

Molekulargewichts ausgeschlossen werden können, wobei die Grenze durch die Struktur der Beschichtung eingestellt werden kann.

5 Die erfindungsgemäßen Schichten lassen sich besonders vorteilhaft zur Beschichtung von Biochips, hier besonders von Proteinchips anwenden, da sie zum einen unspezifische Anbindungen an die Chipoberfläche unterdrücken und auf der anderen Seite eine hohe Immo-
10 bilisierungskapazität gewährleisten.

In der Massenspektrometrie, insbesondere für MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) können die erfindungsgemäßen Hydrogelschichten nicht nur
15 eingesetzt werden, um die zu analysierenden Biomoleküle auf der Targetoberfläche durch elektrostatische Adsorption aufzukonzentrieren, sondern auch, um an kovalent immobilisierten Liganden biospezifische Erkennungsreaktionen durchzuführen. Konventionell be-
20 schichtete MALDI Targets, wie sie beispielsweise in WO 98/59360 beschrieben werden, eignen sich wegen der geringen Immobilisierungskapazität der planar beschichteten Oberflächen hierfür schlecht, da das resultierende Signal-/ Rausch Verhältnis der hiermit
25 vorgenommenen Messungen zu gering ist. Dasselbe trifft auf Hydrogeloberflächen zu, die gemäß der in US Patent 5,436,161 beschriebenen Methode hergestellt werden, da diese neben anderen, bereits weiter oben beschriebenen Nachteilen, Hydrogele mit einer viel zu
30 kleinen Immobilisierungskapazität liefert. Im Gegensatz hierzu können mit dem erfindungsgemäßen Verfahren Hydrogelschichten mit einer vielfach höheren Immobilisierungskapazität hergestellt werden. Die an diese Schichten adsorbierten Biomoleküle liefern in
35 der nachfolgenden MALDI Analyse eine sehr gute Signalqualität.

Da die bereits erwähnte elektrostatische Aufkonzentrierung in der geladenen Hydrogelmatrix nur dann stattfinden kann, wenn die aufzukonzentrierenden Biomoleküle eine dem Hydrogel entgegengesetzte Ladung tragen, und die Ladung der Biomoleküle wiederum von deren pI (isoelektrischen Punkt) und dem pH der Probenlösung abhängt, können die erfindungsgemäßen Schichten genutzt werden, um den pI von unbekannten Biomolekülen ggf. auch in Mischungen zu bestimmen. Hierzu löst man die unbekannte Probe in Puffern mit verschiedenen pH Werten und läßt diese Lösungen auf diskrete hydrogelbeschichtete Substrate einwirken. Da sich z.B. in einer negativ geladenen Hydrogelmatrix nur die Moleküle anreichern werden, deren pI oberhalb des eingestellten pHs liegt, kann man bei geeigneter Abstufung des pH Gradienten durch eine nachfolgende MALDI Analyse oder andere Methode zur Quantifizierung der adsorbierten Biomoleküle den pI der Einzelkomponenten einer Mischung recht genau eingrenzen. In einer weiteren Ausführung können die Hydrogelschichten zur Sequenzanalyse von Biomolekülen, insbesondere von Proteinen genutzt werden. Hierzu immobilisiert man zunächst ein geeignetes, z.B. proteolytisch wirkendes Enzym in der Hydrogelmatrix und läßt dieses auf in einem späteren Schritt adsorbierte Biomoleküle einwirken. Die Massen der resultierenden Abbauprodukte können dann mittels MALDI bestimmt werden.

Durch die Verwendung eines geeigneten polymeren Haftvermittlers besteht in einer weiteren Ausführungsform die Möglichkeit, für MALDI Messungen üblicherweise unmittelbar vor der Messung aufgetropfte UV absorbierende Substanzen, wie z.B. 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure durch kovalente Kopplung in den

Haftvermittler zu integrieren. Hierdurch wird die energieadsorbierende Wirkung des UV Absorbers nicht nur gleichmäßiger über die Targetfläche verteilt, sondern es wird auch eine eventuelle Denaturierung der untersuchten Biomoleküle verhindert, da diese mit dem UV Adsorber nicht in Kontakt kommen. Eine größere Menge UV absorbierenden Materials läßt sich auf die Oberfläche aufbringen, indem man diese Substanzen in Partikel, Vesikel oder Liposomen einschließt und diese als Haftvermittler verwendet.

Bei der Verwendung leitfähiger Substrate besteht die Möglichkeit, die Beschichtungen durch Anlegen eines Potentials für die Immobilisierung von Biomolekülen, in einer weiterführenden Variante auch für die stationäre Chromatographie einzusetzen. Hierbei kann durch Änderung des angelegten Potentials eine stationäre Phase mit variablen Adsorptionseigenschaften realisiert werden.

Auf der anderen Seite ist es möglich, die erfindungsgemäßen Schichten zur Optimierung chromatografischer Prozesse oder zur Charakterisierung unbekannter Substanzgemische einzusetzen. Hierfür immobilisiert man auf einem Träger nebeneinander mehrere Schichten mit unterschiedlichen Adsorptionseigenschaften. Dies können zum Beispiel unterschiedlich geladene, hydrophob, mit Metallionen oder mit chelatisierenden Gruppen derivatisierte Hydrogelschichten sein. Gibt man nun die Lösung einer zu untersuchenden Substanz auf einen derartigen Träger und analysiert mit einer geeigneten Analysenmethode, wie z.B. MALDI oder SPR die an die unterschiedlichen Schichten adsorbierte Menge, so können sehr schnell substanzspezifische Adsorptionsprofile erstellt werden. Diese können dann beispielsweise verwendet werden, um chromatografische Reini-

gungsprozesse zu entwickeln bzw. zu optimieren.
Beaufschlagt man einen derartigen Träger mit einem unbekannten Probengemisch, so werden die Einzelbestandteile je nach Affinität in unterschiedlichem Maß an die verschiedenen Schichten adsorbiert. Durch nachfolgende MALDI Analyse können die sich hierdurch ergebenden spezifischen Adsorptionsmuster dann ermittelt werden.

Weitergehende Verwendungsmöglichkeiten bestehen auch im Einsatz als schmutzabweisende Beschichtungen oder Antihaftbeschichtungen in wäßrigen Medien. Dazu zählt auch die Beschichtung von Füllkörpern von Bioreaktoren, ebenso wie die bioinerte Beschichtung von medizinischen Geräten oder auch Implantaten, die in Kontakt mit Körperflüssigkeiten und/oder Gewebe stehen. Besonders interessant ist für letztere Anwendung die Möglichkeit, die Beschichtungen mit anderen Biomolekülen zu derivatisieren. So können beispielsweise gewebespezifische Adhäsions- oder Wachstumsfaktoren in die Beschichtungen immobilisiert werden. Dies kann z.B. das gewünschte Einwachsen von Implantaten erheblich beschleunigen oder gar erst ermöglichen. Immobilisiert man blutgerinnungshemmende Biomoleküle, wie z.B. Heparin an die Beschichtungen, so wird die Hämostabilität erheblich verbessert. Gegenüber konventionellen Verfahren zur Heparinimmobilisierung hat diese Methode den Vorteil, daß bei geringerem Heparinverbrauch dickere und stabilere Schichten realisiert werden können.

Eine weitere Variante stellt die Kopplung von pharmazeutisch aktiven Wirkstoffen an Haftvermittler- oder Hydrogelschicht dar. Werden diese beispielsweise über hydrolysierbare Bindungen, wie z.B. Estergruppen angebunden, werden sie durch allmähliche Hydrolyse

langsam in die Umgebung abgegeben. Hieraus ergibt sich eine vorteilhafte Möglichkeit zur kontrollierten Wirkstofffreisetzung.

5 Eine weitere Anwendung besteht in der Beschichtung von Nano- und Mikropartikeln. Diese lassen sich durch die erfindungsgemäßen Beschichtungen sehr gut gegen Adsorption und Flokkulation stabilisieren sowie bioinertisieren. Außerdem stellt die Beschichtung ei-
10 ne ausgezeichnete Matrix für die Immobilisierung von Bio- und anderen Molekülen dar. Biofunktionalisierte Partikel dieser Art lassen sich sowohl für analytische und präparative Zwecke einsetzen, als auch - im Sinne des vorigen Absatzes - als gewebspezifische
15 Wirkstoffcarrier, die sich beispielsweise über spezifisch bindende Antikörper an erkrankte Gewebe binden und dort langsam pharmazeutische Wirkstoffe freisetzen.

20 Für optische Elemente kann die Beschichtung als Anti-beschlagsbeschichtung ebenso wie für die Retention von Flüssigkeiten eingesetzt werden. Letzteres ist eine hochoberwünschte Eigenschaft für die Oberfläche von Kontaktlinsen. Da die Hydrogelschichten in wässrigen
25 Medien außerdem eine schmierende Wirkung zeigen, wird der Tragekomfort von derart beschichteten Kontaktlinsen signifikant erhöht.

Im folgenden werden verschiedene Ausführungen und
30 Verwendungsmöglichkeiten der erfindungsgemäßen Beschichtung anhand der folgenden schematischen Figuren und weiterer Anwendungsbeispiele näher dargestellt.

Fig. 1 zeigt schematisch den Aufbau einer erfindungsgemäßen Beschichtung. Das hier bezeichnete Substrat
35 (3) ist mit einer polymeren Haftvermittlerschicht (2)

überzogen, wobei deren Polymerketten parallel zur Substratoberfläche angeordnet sind, so dass eine hohe Dichte funktioneller Gruppen vorliegt, die für die weitere Ankopplung des hydrophilen Polymers (1) geeignet ist. Das hydrophile Polymer (1) ist dabei senkrecht zur Substratoberfläche angeordnet, so dass eine Vielzahl funktioneller Gruppen (4) für die Immobilisierung von Biomolekülen zur Verfügung steht.

Fig. 2 zeigt schematisch den Aufbau einer erfindungsgemäßen Beschichtung auf einer im Nanomaßstab und/oder Mikromaßstab aufgerauhten Oberfläche. Diese fraktalen Strukturen bilden sich, wenn die Konzentration des Haftvermittlers vergrößert wird, so dass sich die Haftvermittlerschicht nicht vollständig parallel zur Substratoberfläche ausrichtet, sondern auch teilweise schleifenartig vom Substrat absteht. Aufgrund der erhöhten Oberfläche kann so eine erhöhte Immobilisierungskapazität gegenüber der in Fig. 1 dargestellten planaren Struktur erreicht werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass die bei Verwendung von hydrophilen Polymeren höheren Molekulargewichts charakteristische Diffusionslimitierung vermieden werden kann.

In Fig. 3 ist die gemischte Belegung des Substrats mit hydrophilen Polymeren unterschiedlichen Molekulargewichts und Ladungsdichten schematisch dargestellt. (1a) ist ein Polymer mit einem höheren Molekulargewicht und einer höheren Dichte negativ geladener funktioneller Gruppen (4), als Polymer (1b). Beide Polymere können in einem Arbeitsgang via einen Haftvermittler (2) auf ein beliebiges Substrat (3) gebracht werden. Vorteile derartiger Strukturen liegen in einem über das Mischungsverhältnis (1a) zu (1b) einstellbaren räumlichen Abstand zwischen den

den höhermolekularen Ketten, wodurch ein Hydrogel mit einstellbarer Porengröße entsteht. Diese läßt sich vorteilhaft zur Steigerung der Selektivität in Sensoren verwenden. Werden Polymere unterschiedlicher Ladungsdichte gemischt und Liganden in einem zweiten Arbeitsgang bevorzugt an die höhergeladenen Ketten gekoppelt, so kann die herabgesetzte Ladung der dazwischenliegenden Bereiche zu deutlich reduzierten unspezifischen Wechselwirkungen führen.

Fig. 4 zeigt schematisch ein Fig. 1 ähnliches Schichtelement, in dem über der hydrophilen Polymerschicht in Bürstenkonformation (4) noch eine weitere vorzugsweise ungeladene in Train Konfiguration vorliegende indifferente Polymerschicht (5) gelegt wurde. Solche Architekturen stellen nach Immobilisierung eines Liganden innerhalb Schicht (4) eine diffusionslimitierte Beschichtung dar, die sich besonders vorteilhaft zur Konzentrationsbestimmung von Analyten in Affinitätssensoren eignet. Des weiteren schirmt Schicht (5) die eigentliche sensitive Schicht (4) gegen unspezifische Wechselwirkungen aus der Probenmatrix ab und kann ebenfalls als molekularer Filter genutzt werden.

Beispiel 1:

Carboxymethyl (CM) Dextran mit reduziertem Carboxymethylierungsgrad

Zu einer Lösung von 0,5 g Dextran MW 60 kDa (Sigma) in 10 ml 3 M NaOH werden unter ständigem Rühren 0,74 g Iodessigsäure gegeben. Nach 70 min bei Raumtemperatur neutralisiert man mit Phosphorsäure und dialysiert gegen dest. Wasser. Die Carboxymethyldextranlösung wird anschließend auf 1-2 ml eingengt, mit 5 ml

Methanol versetzt und anschließend mit 25 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation, zweimaligem Waschen mit Ethanol und Trocknung im Vakuum erhält man 410 mg weißes Pulver. Der Carboxymethylierungsgrad, der sich beispielsweise durch Rücktitration eines mittels sauren Ionenaustauschern in die freie Säure überführten Aliquots ermitteln läßt, beträgt 1 COOH Gruppe pro sechs Anhydroglucoseeinheiten.

Beispiel 2:

CM Dextran Monoschichten auf carboxylfunktionalisierten Oberflächen

1 mm dicke einseitig mit Gold bedampfte Glasplättchen werden gereinigt, mit einer Lösung aus 0,1 % Poly (ethylen-co-maleinsäure-co-maleinsäuremono (carboxymethylethylsulfid) ester) in Wasser überschichtet und 1 h lang geschwenkt. Die derart carboxylfunktionalisierten Glasplättchen werden durch einstündige Beaufschlagung mit 20 mM N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid (Fluka) und 10 mM N-Hydroxysuccinimid (Merck) in 0,1 M Natrium 2-Morpholino-ethansulfonatpuffer, pH 6,0 (Fluka) in die aktiven NHS Ester überführt. Man überschichtet die getrockneten Substrate mit wenigen µl einer Lösung aus 20% 1/6 CM Dextran MW 60 kDa (aus Beispiel 1), 2% Glucuronsäure und 1% Dimethylaminopyridin (Merck), zieht das Lösungsmittel im Vakuum ab und inkubiert 10 min bei 50 °C. Abschließend wird nicht gebundenes Dextran durch 5 minütige Behandlung mit 0,1 M HCl abgelöst.

Beispiel 3:

CM Dextran Mono- und Multischichten auf aminofunktionalisierten Oberflächen

5

1 mm dicke einseitig mit Gold bedampfte Glasplättchen werden gereinigt und mit einer Lösung aus 5% Polyethylenimin MW 600 - 1000 kDa (Fluka) in Wasser 15 min lang geschwenkt. Nach Spülen mit dest. Wasser werden die aminofunktionalisierten getrockneten Substrate mit einer Lösung aus 15% 1/6 CM Dextran MW 60.000 (aus Beispiel 1) in je 0,1 M N-(3-Dimethylamino-propyl)-N'-ethylcarbodiimid (Fluka), N-Hydroxysuccinimid (Merck) und Natriumphosphat, pH 6,0, (Fluka) beaufschlagt und eine Stunde stehengelassen. Das zu einer gelartigen Masse erstarrte CM Dextran behandelt man 10 bis 20 Stunden mit 0,1 M Na-Carbonatpuffer pH 9,4, worauf sich nicht kovalent gebundenes CM Dextran ablöst. Die verbleibende Monoschicht weist einen Kontaktwinkel von unter 5° auf.

Beispiel 4:

25 Stabilisierung gegen unspezifische Proteinadsorptionen durch CM Dextran Beschichtungen

Das goldbeschichtete, CM Dextran modifizierte Glassubstrat aus Beispiel 2 wird in einen Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) Biosensor (IBIS, XanTec) montiert und durch Beaufschlagung mit verschiedenen proteinhaltigen Lösungen auf unspezifische Wechselwirkungen geprüft (s. Fig. 5). An eine unbeschichtete Vergleichsfläche werden bereits aus einer Lösung von 1 mg Rinderserumalbumin (BSA) / ml physiologischer Kochsalzpuffer (PBS), pH 7,4 innerhalb kurzer Zeit

35

ca. 5 ng Protein / mm² irreversibel adsorbiert, was einer nahezu vollständigen Belegung entspricht. An die mit Carboxymethyldextran beschichtete Oberfläche findet dagegen selbst bei Beaufschlagung mit unverdünntem foetalen Kälberserum keine Adsorption statt.

Beispiel 5:

Erhöhung der Immobilisierungskapazität durch dreidimensionale Hydrogelstrukturen

Ein analog zu Beispiel 3 mit Carboxymethyldextran MW 500 kDa beschichtetes goldbedampftes Glassubstrat wird in einen Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) Biosensor (IBIS, XanTec) montiert und die Immobilisierungskapazität der Sensoroberfläche gemessen (s. Fig. 6). Bei Beaufschlagung mit einer Lösung von 50 µg BSA / ml 10 mM Natriumacetatpuffer pH 5,0 findet eine ca. fünffach höhere elektrostatische Adsorption statt, als an eine vergleichbare carboxylierte planare Oberfläche. Im vorliegenden Beispiel wird das angereicherte BSA durch Elutionspuffer (2 M NaCl, pH 13) wieder quantitativ desorbiert. Überführt man vor der Proteinanreicherung einen Teil der Carboxylgruppen mittels 20 mM N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid (Fluka) und 10 mM N-Hydroxysuccinimid (Merck) in 0,1 M Natrium 2-Morpholino-ethansulfonatpuffer, pH 6,0 (Fluka) in die aktiven NHS Ester, werden die zunächst elektrostatisch angereicherten Proteine kovalent gebunden und lassen sich folglich nicht mehr eluieren.

Beispiel 6:

Dreidimensional - fraktale Hydrogelstrukturen

5 Die Goldsensordiscs werden gemäß Beispiel 3 mit Carboxymethyldextran beschichtet. Statt Polyethylenimin wird hierbei Polyallylamin (Aldrich Nr. 28,322-3) hohes Molekulargewicht und statt 1/6 CM Dextran MW60 kDa wird diesmal vollständig carboxyliertes CM Extran
10 MW 5 kDa verwendet. Dieses spült man einmal mit 2 M NaCl, 10 mM NaOH und eine andere Charge mit 2 M NaCl, 10 mM HCl. Im Fall der sauren Spülung beträgt die Immobilisierungskapazität ca. 8,5 ng BSA/mm², bei der alkalischen Elution hingegen nur 5,3 ng BSA/mm². Zu-
15 rückgeführt werden kann diese Beobachtung auf eine lockere, teilabgelöste Struktur der Polyallylaminketten nach der sauren Elution, die letztlich eine höhere Oberfläche und damit auch eine höhere Immobilisierungskapazität zur Folge hat.

20

Beispiel 7:

Gemischte Hydrogelschichten

25

Die Goldsensordiscs werden gemäß Beispiel 3 mit Carboxymethyldextran beschichtet, wobei man statt 1/6 CM Dextran MW 60.000 diesmal jedoch eine Mischung aus 7,5 % 1/6 CM Dextran MW 5.000 und 7,5 % vollständig carboxyliertes Dextran MW 60.000 verwendet. Die resultierenden Beschichtungen zeigen eine deutlich geringere Diffusionslimitierung bei der Anbindung von Biomolekülen an immobilisierte Liganden sowie verbesserte Stabilisierung gegen unspezifische Wechselwirkungen.
35

Beispiel 8:

Diffusionslimitierte Hydrogelstrukturen

5 Die Goldsensordiscs werden gemäß Beispiel 3 mit Carboxymethyldextran beschichtet. Anschließend aktiviert man die Carboxylgruppen erneut mit jeweils 0,2 M N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid und N-Hydroxysuccinimid und beaufschlagt die Chips mit einer Lösung von 10% Dextran MW 500.000 in 0,1 M PBS Puffer pH 7,5. Nach einer Reaktionszeit von 2 bis 4 Stunden wäscht man ungebundenes Dextran mit 0,1 M Natriumcarbonatpuffer pH 9,4 über 4 Stunden ab. Die resultierenden Doppelschichten zeigen eine deutlich höhere Diffusionslimitierung bei der Anbindung von Biomolekülen an immobilisierte Liganden als die in Beispiel 3 beschriebenen Monoschichten. Sie eignen sich deshalb vorzugsweise zur Durchführung von Konzentrationsbestimmungen. Fig. 11 zeigt die elektrostatische Adsorption von BSA in diese Doppelschichtstruktur. Der lineare, diffusionskontrollierte Bereich ist mit Pfeilen gekennzeichnet.

25 Beispiel 9:

Reversible Antikörperanbindungen an immobilisierte Haptene

30 Um die Eignung der in den obigen Beispielen beschriebenen Hydrogelstrukturen als Immobilisierungsmatrix zur Durchführung von Immunassays zu testen, wurde 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure-3-Aminopropylamid kovalent an einen mit CM Dextran derivatisierten SPR Sensorchip gekoppelt. Die derart mit Haptenen versehene Oberfläche beaufschlagte man anschließend mit Anti

2,4 Dichlorphenoxyessigsäure Antikörpern in den Konzentrationen 1 µg/ml (1), 16 µg/ml (2), 2 µg/ml (3), 1,5 µg/ml (4) und 3 µg/ml (5) (Fig. 7). Die Antikörper waren jeweils in PBS Puffer, pH 7,4 gelöst; nach der Antikörperbeaufschlagung wurde zunächst jeweils mit einer Lösung von 100 µg 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure-3-Aminopropylamid/ml PBS Puffer die Dissoziation gemessen und die Chipoberfläche anschließend mit 0,5 M NaOH vollständig regeneriert. Vor dem nächsten Assay stellte man mit PBS Puffer jeweils wieder das Grundsignal ein. Nach jedem Assay wurden die gebundenen Antikörper mit denaturierender Regenerationslösung nahezu quantitativ wieder abgelöst.

15

Beispiel 10:

Elektrodeposition in Carboxymethyldextranhydrogelschichten

20

Fig. 8 zeigt die irreversible Anbindung von Avidin an dextranbeschichtete Sensoroberflächen durch Anlegen eines ausreichend negativen Potentials unter Bedingungen, bei denen ohne Potential keine Adsorption erfolgen würde. Zunächst wird die Oberfläche durch Behandlung mit 1 M NaCl regeneriert (100 sec). Zur Kontrolle legt man anschließend in Abwesenheit von Avidin eine negatives Potential von - 0.4 und - 0.6 V an (bei ca. 300 sec), wobei sich keine Veränderung des SPR Signals zeigt. Nach 400 sec. werden zunächst 500 µg Avidin / ml 2 mM Natriumacetatpuffer pH 4,7 zugegeben, worauf ca. 8 ng/mm² adsorbiert werden. Durch Anlegen verschiedener negativer Potentiale wird zusätzlich Avidin abgeschieden (bei 600 sec). Wie ein Elutionsversuch durch Behandlung mit 1 M NaCl zeigt (bei 800 sec), verbleibt das Protein irreversibel in

35

der Matrix. Avidin ist biologisch voll aktiv, was durch Bindung von biotinylierter Glucoseoxidase belegt wird (bei 900 sec). Die Bindung widersteht einer Elution von 10 mM NaOH in 2 M NaCl.

5

Beispiel 11:

Herstellung von ultradünnen Enzymschichten sowie Verwendung in einem Enzymsensor

10

In Fig. 9 wird beispielhaft die Bestimmung von Glukose mit GOD-Pt-Elektroden auf der Basis von Carboxymethyl-dextranmonolagen gezeigt. Die Pt-Elektroden, Maße 800 x 800 µm werden zunächst gemäß Beispiel 3 mit einer Monoschicht 1/6 CM-Dextran 60 kDa auf PEI Haftvermittler versehen.

15

Avidin wird aus einer Lösung von 500 µg/ml Avidin in 2 mM Natriumacetat, pH 4.7 gemäß Beispiel 8 bei einem Potential von - 0.8 V (1 h) auf der Elektrodenoberfläche abgeschieden. Anschließend inkubiert man mit biotinylierter Glukoseoxidase (50 µg/ml) in PBS Puffer, pH 7,4 über 1 Stunde. Die so derivatisierten Elektroden werden mit verschiedenen konzentrierten Glucoselösungen (100, 250, 500, 1000 u. 2000 µmol/l Glc) in PBS Puffer, pH 7.4 kalibriert (s. Fig. 10). Gemessen wird dabei das enzymatisch gebildete H₂O₂ bei + 700 mV gegen eine Ag/AgCl-Referenzelektrode (3 M KCl).

20

25

30

Beispiel 12:

Verbesserung der Signalqualität von MALDI Messungen
durch Aufkonzentration der Analytmoleküle in Hydro-
gelschichten

Herstellung des Referenztargets: Ein goldbedampftes
MALDI Target (Micromass Ltd., Manchester, GB) wird
gereinigt und 2 h mit einer 0,5% Lösung von 1-
Dodecanthiol in Ethanol beaufschlagt. Anschließend
wäscht man mit Ethanol und Wasser. Die hydrophobe
Oberfläche beaufschlagt man anschließend mit einer
Lösung von 1 mg BSA / ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0.
Nach 2 h ist auf der hydrophoben Oberfläche eine Mo-
nolage BSA adsorbiert worden. Es wird gespült und ge-
trocknet.

Herstellung des hydrogelbeschichteten Targets: Ein
goldbedampftes MALDI Target (Micromass Ltd., Manche-
ster, GB) wird gereinigt und gemäß Beispiel 3 mit
Carboxymethyldextran MW 2 Mio. Da beschichtet. Die so
derivatisierte Oberfläche wird 1 h mit einer Lösung
von 0,1 mg BSA / ml 10 mM Natriumacetatpuffer pH 5,0
beaufschlagt. Anschließend spült man mit gleichem Na-
triumacetatpuffer oder Wasser und trocknet.

Auf beide Targets wird je Meßpunkt 0,5 µl 10 mg/ml
Sinapinsäurelösung getropft, getrocknet und die Tar-
gets anschließend einer MALDI ToF Analyse unterzogen.
Fig. 12 zeigt das Signal der hydrophoben Ver-
gleichsoberfläche, Fig. 13 das hydrogelbeschichtete
Target. Das Signal/Rauschverhältnis des hydrogelbe-
schichteten Targets ist ca. sechsmal besser als das
des Vergleichstargets.

Beispiel 13:

Separation von Proteinen unterschiedlichen pIs aus
Zelllysaten und nachfolgende MALDI Analyse

5

Herstellung des hydrogelbeschichteten Targets: Ein
goldbedampftes MALDI Target (Micromass Ltd., Manche-
ster, GB) wird gereinigt und gemäß Beispiel 3 mit
Carboxymethyldextran MW 20 Mio. Da beschichtet. Ein
10 Teil der so derivatisierten Oberfläche wird 1 h mit
einer auf pH 4,8 gepufferten Lösung eines vorher ent-
salzten Monocytenlysats beaufschlagt. Der andere Teil
wird 1 h mit einem analog hergestellten Monocytenly-
sat pH 7,3 inkubiert. Beide Oberflächen werden mit
15 Wasser gespült, kurz getrocknet und gemäß Beispiel 13
einer MALDI Analyse unterworfen. Fig. 14 zeigt das
Spektrum des pH 4,8 Lysats, Fig. 15 das des pH 7,3
Lysats. Die Pfeile in Fig. 14 kennzeichnen einige Pe-
aks, die bei pH 7,3 nicht mehr erscheinen. Hieraus
20 kann geschlossen werden, daß die zugehörigen Moleküle
einen pI zwischen 4,8 und 7,3 haben.

Patentansprüche

1. Beschichtung auf einem Substrat,
5 enthaltend eine polymere Haftvermittlerschicht
 und eine weitere, mindestens einen Polymer ent-
 haltende, hydrophile Polymerschicht, deren Poly-
 merkettens zumindest teilweise büstenartig aus-
 gerichtet sind.
2. Beschichtung nach Anspruch 1, dadurch gekenn-
10 zeichnet, dass auf der hydrophilen Polymer-
 schicht mindestens eine weitere Polymer-
 und/oder Partikelschicht aufgetragen ist.
3. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1 oder 2,
15 dadurch gekennzeichnet, dass die hydrophile Po-
 lymerschicht aus mindestens zwei unterschiedli-
 chen Polymeren besteht, die sich in der chemi-
 schen Zusammensetzung, der Ladung und/oder ihrem
 Molekulargewicht unterscheiden.
4. Beschichtung nach mindestens einem der Ansprüche
20 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die hydro-
 phile Schicht ausgewählt ist aus Polysacchari-
 den, Polyalkoholen, Polyethern, Polyamiden, Po-
 lycarbonsäuren, Polysulfaten/-sulfonaten, Poly-
 phosphaten/-phosphonaten und/oder Kombinationen
25 dieser.
5. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
 dadurch gekennzeichnet, dass die hydrophile Po-
 lymerschicht zur kovalenten Immobilisierung ei-
 nes Liganden zusätzlich funktionalisiert ist.
6. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
30 dadurch gekennzeichnet, dass die hydrophile Po-
 lymerschicht mit Isothiocyanat-, Isocyanat-,

- Carbonsäureazid-, N-Hydroxysuccinimidester-, N-Acylimidazol-, Sulfonylchloridderivat-, Aldehyd-, Keto-, Glyoxal-, Oxiran-, Carbonat-, Arylhalogenid-, Imidoester-, Anhydrid-, Halogenalkyl-, Halogenacyl-, Maleimid-, Aziridin-, Acryloyl-, Sulfhydryl-, Disulfid-, Diazoalkan-, Diazoacetyl-, Imidazolylcarbamat-, Hydrazid-, Diazonium-, Arylazid-, Benzophenon-, Diazopyruvat- oder Diaziringruppen funktionalisiert ist.
- 5
- 10 7. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die hydrophile Polymerschicht für die Immobilisierung eines Liganden über ein Metallchelat zusätzlich funktionalisiert ist, wie z.B. durch die Reaktion mit
- 15 Nitrilotriessigsäurederivate.
8. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass an die hydrophile Polymerschicht zusätzlich Moleküle für die Immobilisierung eines Liganden über eine biospezifische Erkennungsreaktion gebunden sind.
- 20
9. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass an die hydrophile Polymerschicht Biomoleküle, Proteine, Nukleinsäuren, (Poly-)saccharide, Antikörper, Adhäsionsfaktoren, Wachstumsfaktoren, gerinnungshemmende Faktoren, wie z.B. Heparin und/oder andere biologische Effektormoleküle gebunden sind.
- 25
10. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Haftvermittlerschicht aus mindestens einem Polymer, dessen Polymerketten parallel zur Substratoberfläche angeordnet sind, oder mindestens einem globulären Polymer besteht.
- 30

11. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Haftvermittlerschicht aus Partikeln, Vesikeln oder Liposomen besteht.
- 5 12. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Haftvermittlerschicht eine im Nanomaßstab und/oder Mikromaßstab aufgerauhte Oberfläche bildet.
- 10 13. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Haftvermittlerschicht aus einem amphiphilen Polymer, z.B. einem Polyamin besteht, das Disulfid-, Sulfid-, Diselenid-, Selenid-, Thiol-, Isonitril-, Nitro-, Selenol-, P(III)-, Isothiocyanat-, Xanthat-, 15 Thiocarbamat-, Phosphin-, Thioacetat-, Silanol-, Silylether-, Silylester-, Silylthioester-, Silylthioether-, oder Dithioacetatgruppen tragen kann.
- 20 14. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, bei der der polymere oder partikelförmige Haftvermittler energieabsorbierende, bevorzugt UV absorbierende Gruppen trägt.
- 25 15. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass der polymere Haftvermittler Sinapinsäure-, Sinapinsäureamid-, Dimethoxyhydroxysinapinsäure, Sinapinsäurebromid-, Dihydroxybenzoesäure- oder Cyanohydroxysinapinsäuregruppen trägt oder diese Substanzen in einem partikel-, vesikel- oder liposomenartigen 30 Haftvermittler eingeschlossen sind.
16. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass der polymere und/oder partikelförmige Haftvermittler pharma-

zeutisch aktive Wirkstoffe, in kovalent und/oder nichtkovalent gebundener Form enthält.

- 5 17. Beschichtung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Haftvermittlerschicht aus alternierenden Polymer- und/oder Partikelschichten besteht.
- 10 18. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat aus einem leitfähigen Material, einem Glasmaterial oder anderem oxidischem Material, das zusätzlich silanisiert sein kann, einem Edelmetall, das zusätzlich mit einem Alkylmercaptan funktionalisiert sein kann, einem Kunststoffmaterial, aus Naturfasern und/oder Kunstfasern besteht.
- 15 19. Beschichtung nach Anspruch 18, bei der das Substrat durch Behandlung mit Oxidationsmitteln, mit Plasma und/oder ionisierender Strahlung funktionalisiert und/oder gesäubert ist.
- 20 20. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 19, bei der das Substrat aus Nano- und/oder Mikropartikeln besteht.
- 25 21. Verfahren zur Herstellung einer Beschichtung auf einem Substrat, bestehend aus einer Haftvermittlerschicht und einer weiteren hydrophilen Polymerschicht aus mindestens einem weiteren Polymer,
- 30 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
- dass über die Molekularmasse und/oder die Konzentration des hydrophilen Polymers die Ausrichtung der Polymerketten gesteuert und dadurch die Immobilisierungskapazität der Beschichtung ein-

gestellt wird.

- 5 22. Verfahren zur Herstellung einer Beschichtung auf einem Substrat nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die hydrophile Polymerschicht ausgewählt ist aus Polysacchariden, Polyalkoholen, Polyethern, Polyamiden, Polycarbonsäuren, Polysulfaten/-sulfonaten, Polyphosphaten/-phosphonaten und/oder Kombinationen dieser, wobei eine zusätzliche Funktionalisierung der hydrophilen Polymerschicht erfolgen kann.
- 10 23. Verfahren zur Herstellung einer Beschichtung auf einem Substrat nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Permeabilität der hydrophilen Polymerschicht für Substanzen mit unterschiedlichem Molekulargewicht durch das Konzentrationsverhältnis mindestens jeweils eines hoch- und eines niedermolekularen Polymers gesteuert wird.
- 15 24. Verfahren zur Herstellung einer Beschichtung auf einem Substrat nach einem der Ansprüche 21 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Haftvermittlerschicht vor und/oder während der Kopplung der hydrophilen Polymerschicht und/oder der Aufbringung auf die Haftvermittlerschicht mit kuppelungsfähigen Gruppen aktiviert wird und das hydrophile Polymer durch diese Gruppen kovalent gekoppelt wird.
- 20 25. Verfahren zur Herstellung einer Beschichtung auf einem Substrat nach Anspruch 21 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Haftvermittlerschicht und/oder das hydrophile Polymer vor, während und/oder nach der Kopplung mit Isothiocyanat-, Isocyanat-, Carbonsäureazid-, N-Hydroxy-
- 25 30

- succinimidester-, N-Acylimidazol-, Sulfonylchloridderivat-, Aldehyd-, Keto-, Glyoxal-, Oxiran-, Carbonat-, Arylhalogenid-, Imidoester-, Anhydrid-, Halogenalkyl-, Halogenacyl-, Maleimid-, Aziridin-, Acryloyl-, Sulhydryl-, Disulfid-, Diazoalkan-, Diazoacetyl-, Imidazolylcarbamat-, Hydrazid-, Diazonium-, Arylazid-, Benzophenon-, Diazopyruvat- oder Diazirینگruppen funktionalisiert werden.
- 10 26. Verfahren zur Herstellung einer Beschichtung auf einem Substrat nach Anspruch 21 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass das hydrophile Polymer während der Beaufschlagung auf das haftvermittlerbeschichtete Substrat mit einer Mischung aus 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid und
- 15 N-Hydroxysuccinimid aktiviert wird.
27. Verfahren zur Herstellung einer Beschichtung auf einem Substrat nach einem der Ansprüche 21 bis 26 dadurch gekennzeichnet, dass der pH und die
- 20 Salzkonzentration bei der Adsorption der Haftvermittlerschicht an das Substrat so gewählt wird, dass sich eine im Nanomaßstab angerauhte Oberfläche bildet.
28. Verfahren zur Herstellung einer Beschichtung auf einem Substrat nach einem der Ansprüche 21 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass die Haftvermittlerschicht aus einem amphiphilen Polymer, z.B. einem Polyamin, das Disulfid-, Sulfid-, Diselenid-, Selenid-, Thiol-, Isonitril-, Nitro-,
- 25 Selenol-, P(III)-, Isothiocyanat-, Xanthat-, Thiocarbamat-, Phosphin- Thioacetat- oder Dithioacetatgruppen tragen kann, gebildet wird.
- 30 29. Verfahren zur Herstellung einer Beschichtung auf

- 5 einem Substrat nach einem der Ansprüche 21 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass als Substrat ein leitfähiges Material, ein Glasmaterial oder anderes oxidisches Material, das zusätzlich silanisiert werden kann, ein Edelmetall, das mit einem Alkylmercaptan funktionalisiert werden kann, ein Kunststoff, eine Naturfaser und/oder Kunstfaser eingesetzt wird.
- 10 30. Verfahren zur Herstellung einer Beschichtung auf einem Substrat nach Anspruch 21 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat durch Behandlung mit Oxidationsmitteln, mit Plasma und/oder ionisierender Strahlung funktionalisiert und/oder gesäubert wird.
- 15 31. Verfahren zur Herstellung einer Beschichtung auf einem Substrat nach einem der Ansprüche 21 bis 30, dadurch gekennzeichnet, dass die Adsorption der Haftvermittlerschicht und/oder die Kopplung der hydrophilen Polymerschicht an die Haftvermittlerschicht in wässriger Lösung stattfindet.
- 20 32. Verwendung der Beschichtung auf einem Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 20 in sensorischen Systemen, z.B. Affinitätssensoren, amperometrischen Sensoren oder Biochips.
- 25 33. Verwendung der Beschichtung auf einem Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 20 auf einem Probenträger zur massenspektrometrischen, bevorzugt MALDI, Analyse von chemischen und/oder biologischen Verbindungen.
- 30 34. Verwendung einer mit geladenen Gruppen versehenen Beschichtung nach Anspruch 1 bis 20 zur Ermittlung des isoelektrischen Punkts von Molekülen, dadurch gekennzeichnet, daß die Beschich-

tung mit Lösungen unterschiedlichen pHs der betreffenden Moleküle beaufschlagt wird und die Adsorption der Moleküle an die Beschichtung bestimmt wird.

- 5 35. Verwendung der Beschichtung nach Anspruch 1 bis 20 zur Optimierung chromatographischer Prozesse.
- 10 36. Verwendung der Beschichtung nach Anspruch 1 bis 20 zur Aufkonzentration von Biomolekülen und/oder die Immobilisierung von Biomolekülen, z.B. als Beschichtungsmaterial für stationäre chromatographische Phasen, wobei das Substrat leitfähig sein kann und hieran zusätzlich ein Potential angelegt werden kann.
- 15 37. Verwendung der Beschichtung auf einem Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 20 zur Beschichtung von Nano-, Mikropartikeln, intrakorporalen Wirkstoffdepots und/oder Füllkörper von Bioreaktoren.
- 20 38. Verwendung der Beschichtung auf einem Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 20 als schmutzabweisende Beschichtung oder als Antihaftbeschichtung in wäßrigen Medien.
- 25 39. Verwendung der Beschichtung auf einem Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 20 als bioinerte und/oder bioaktive Beschichtung für mit biologischen Medien in Kontakt stehende medizinische Geräte und/oder Implantate .
- 30 40. Verwendung der Beschichtung auf einem Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 20 als Antibeschlagsbeschichtung für optische Elemente, z.B. Gläser, oder für die Retention von Flüssigkeiten auf optischen Geräten in der Ophthalmiatrie.

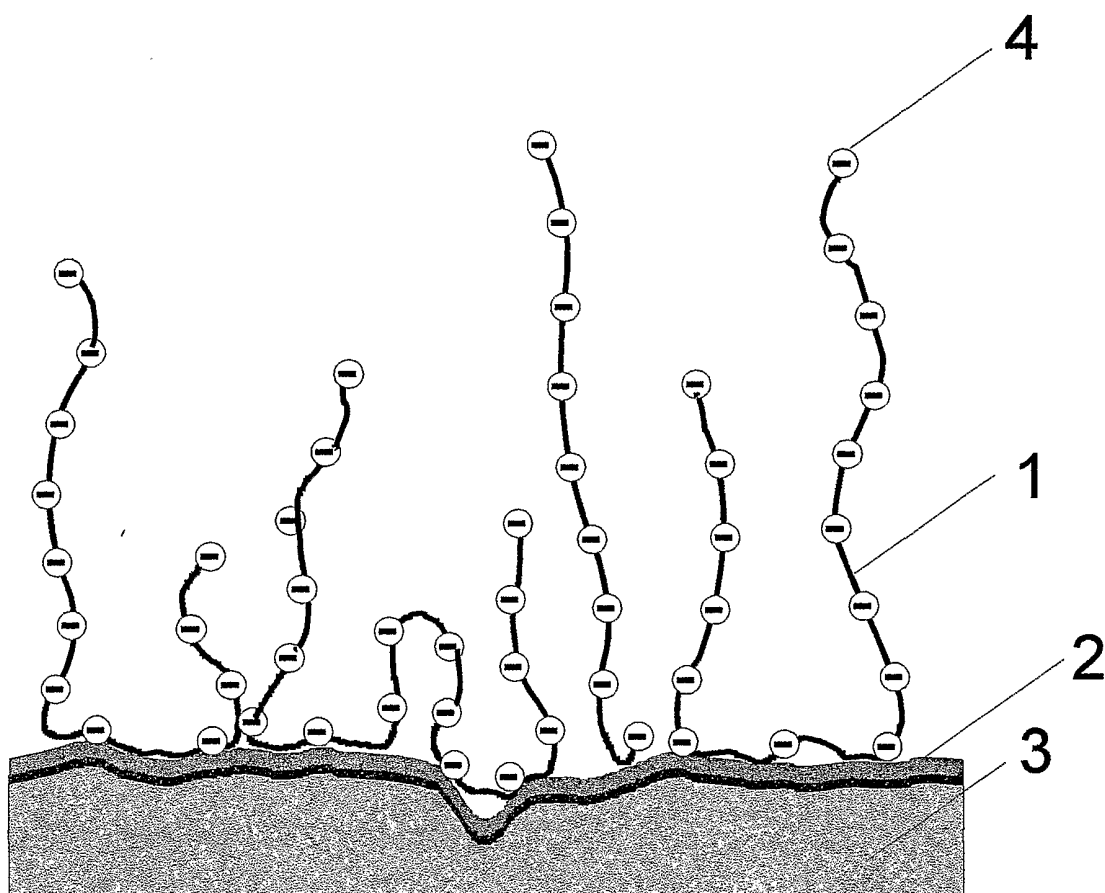
Zusammenfassung

Die Erfindung bezieht sich auf Beschichtungen von verschiedenartigen Substraten, wobei eine hydrophile Polymerschicht über eine polymere Haftvermittler-
5 schicht an ein Substrat gebunden wird. Ebenso wird ein Verfahren zur Herstellung dieser Schichtsysteme vorgestellt.

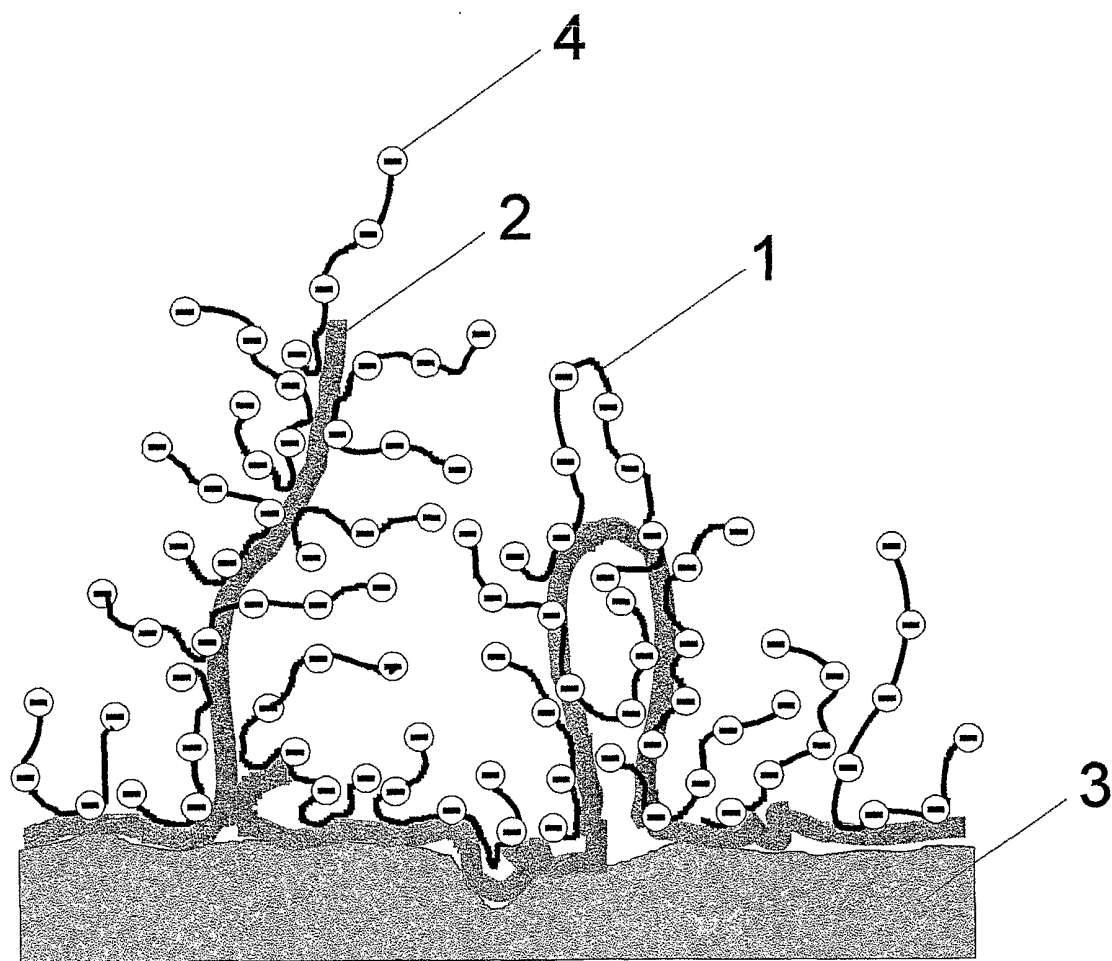
10 Als Anwendung dieser erfindungsgemäßen Schichten bietet sich der Einsatz z.B. als Immobilisierungsmatrix und zur Unterdrückung unspezifischer Proteinadsorption in Biosensoren, MALDI Targets und anderen bioanalytischen Geräten an. Weiterhin können sie zur Bio-
15 kompatibilisierung von Implantaten und zur Beschichtung von Kontaktlinsen verwendet werden. Optische Elemente, die mit derartigen Beschichtungen versehen sind, beschlagen nicht mehr. Darüber hinaus sind die Schichten schmutzabweisend bzw. selbstreinigend.

20

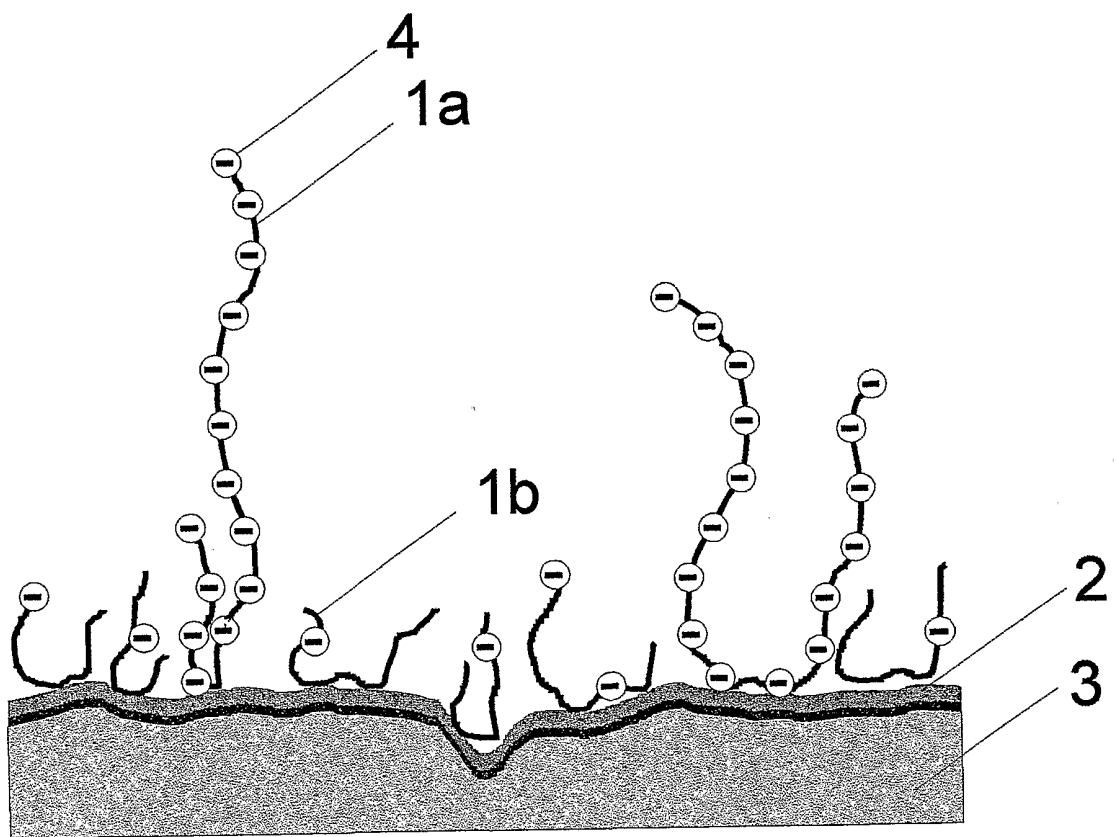
Figur 1



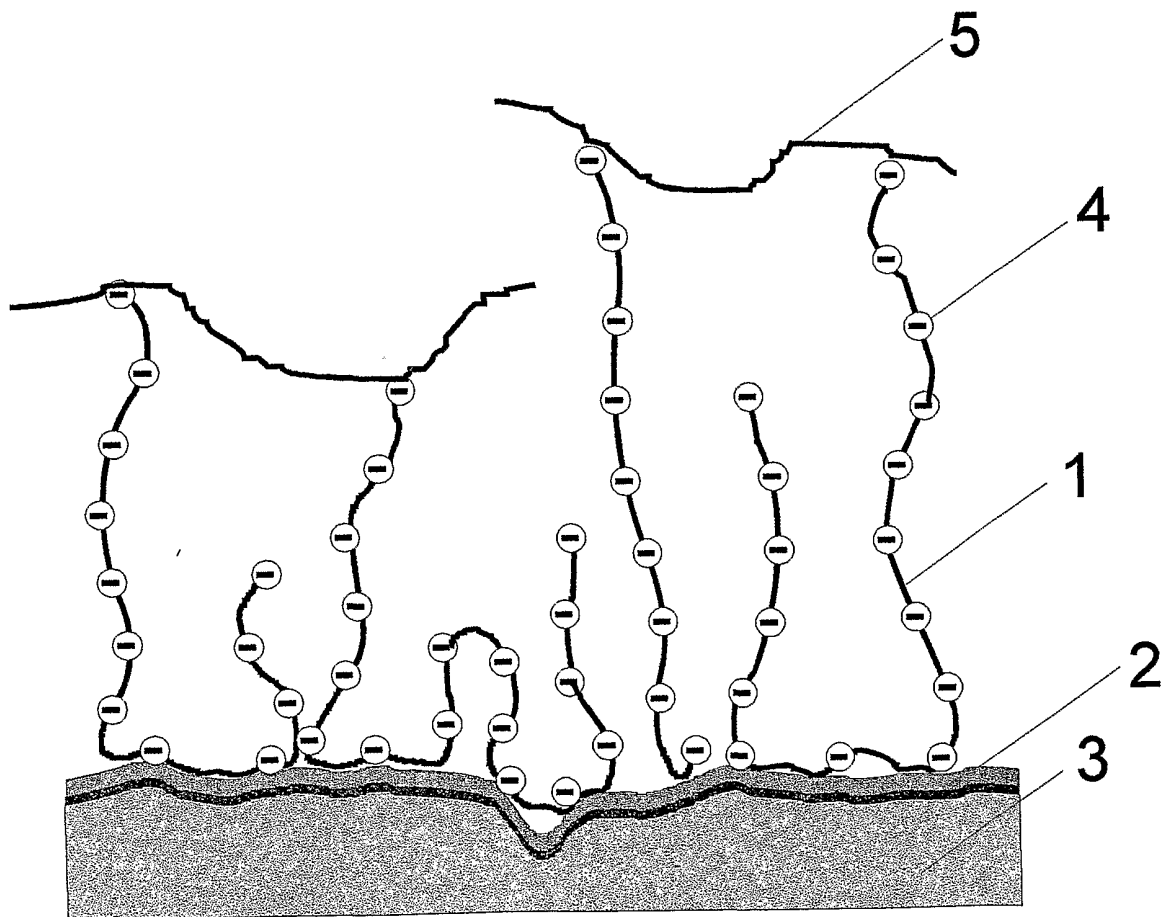
Figur 2



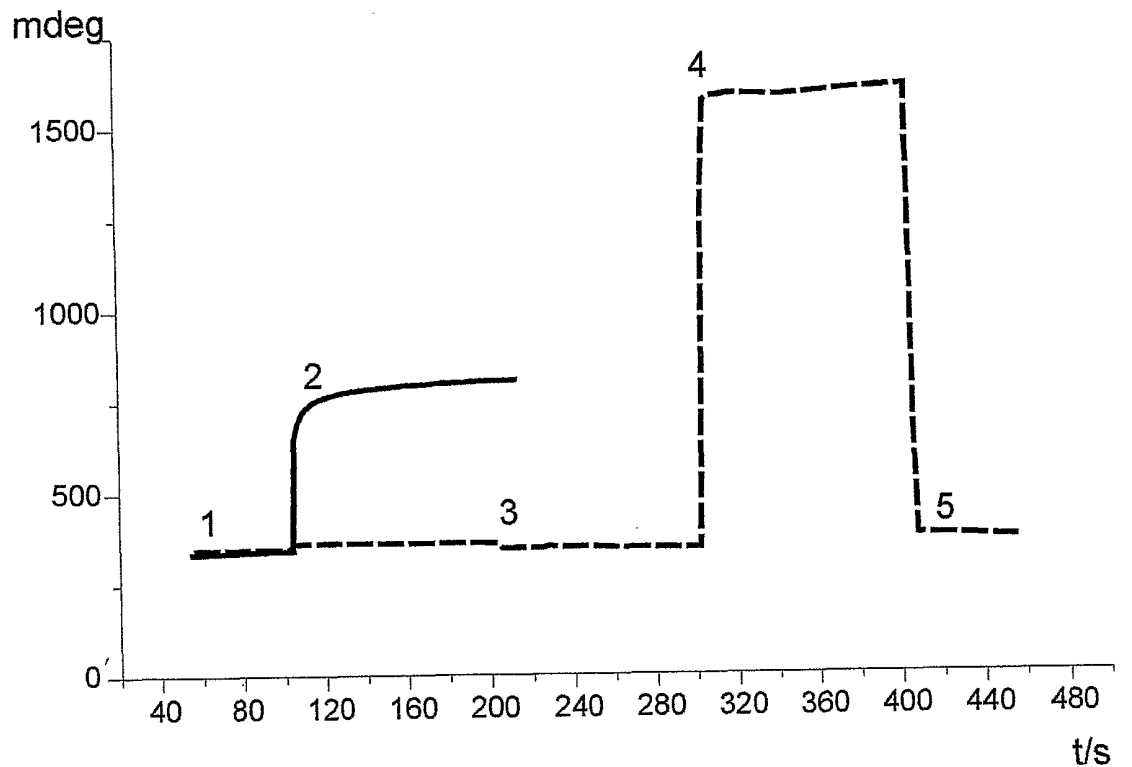
Figur 3



Figur 4



Figur 5



—— Unbeschichtete Goldoberfläche

----- Carboxymethyldextran 20 kDa, Bürstenkonformation

1: PBS buffer, pH 7.4

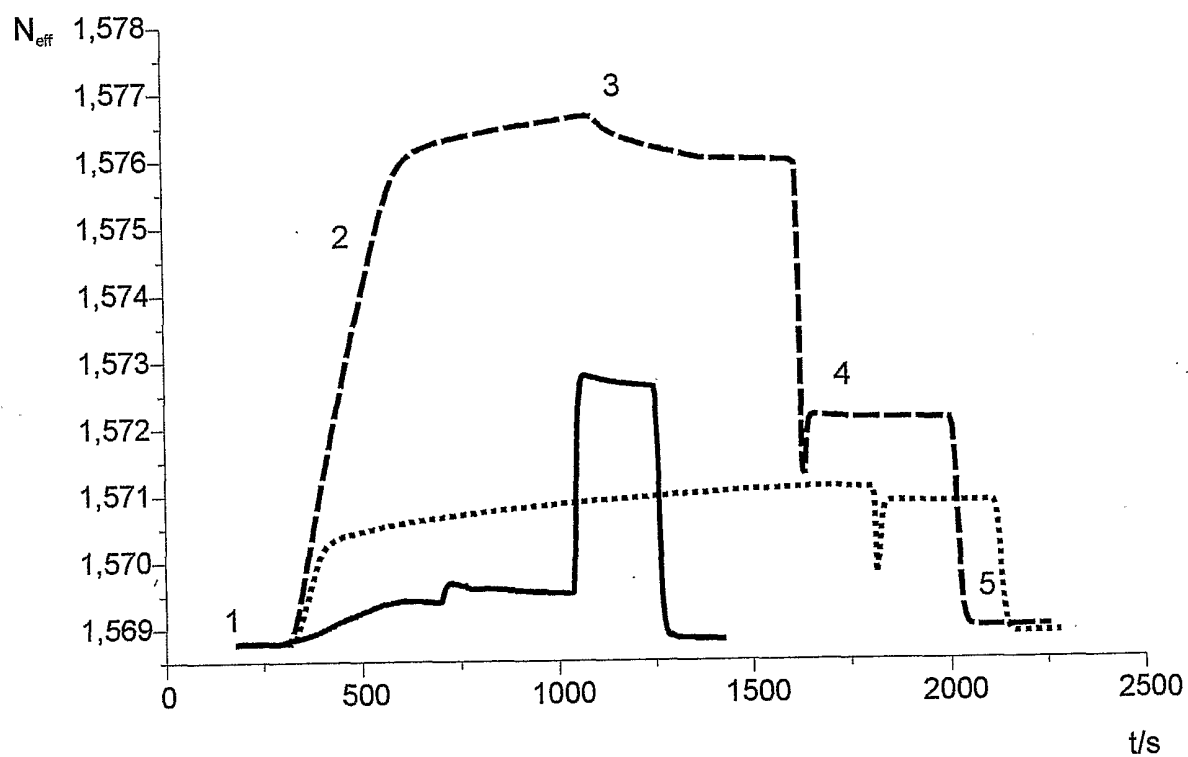
2: 1 mg BSA / ml PBS buffer

3: PBS buffer, pH 7.4

4: Foetal calf serum, undiluted

5: PBS buffer, pH 7.4

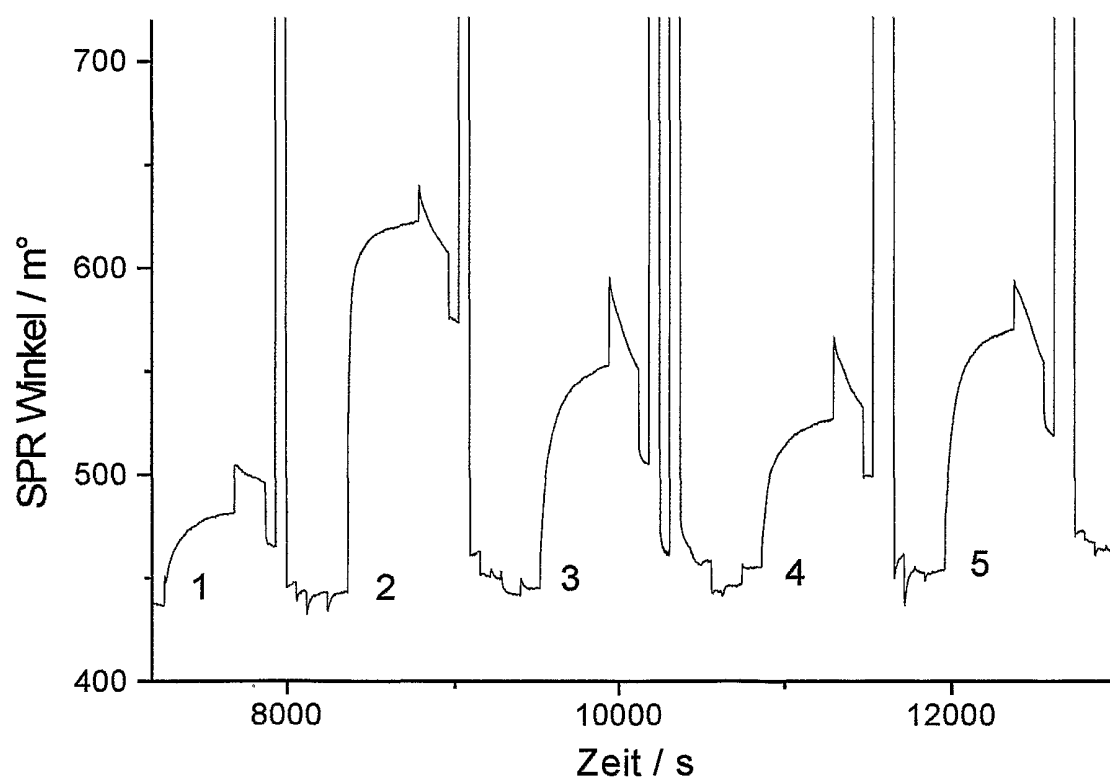
Figur 6



- Carboxymethyldextran MW 500 kDa
- Carboxymethyldextran MW 20 kDa
- Carboxymethylxylitol (planar)

- 1: 10 mM Natriumacetatpuffer pH 5,0
- 2: 50 μ g BSA / ml 10 mM Natriumacetatpuffer pH 5,0
- 3: 10 mM Natriumacetatpuffer pH 5,0
- 4: 2 M NaCl, 10 mM NaOH
- 5: Natriumacetatpuffer pH 5,0

Figur 7



8/15

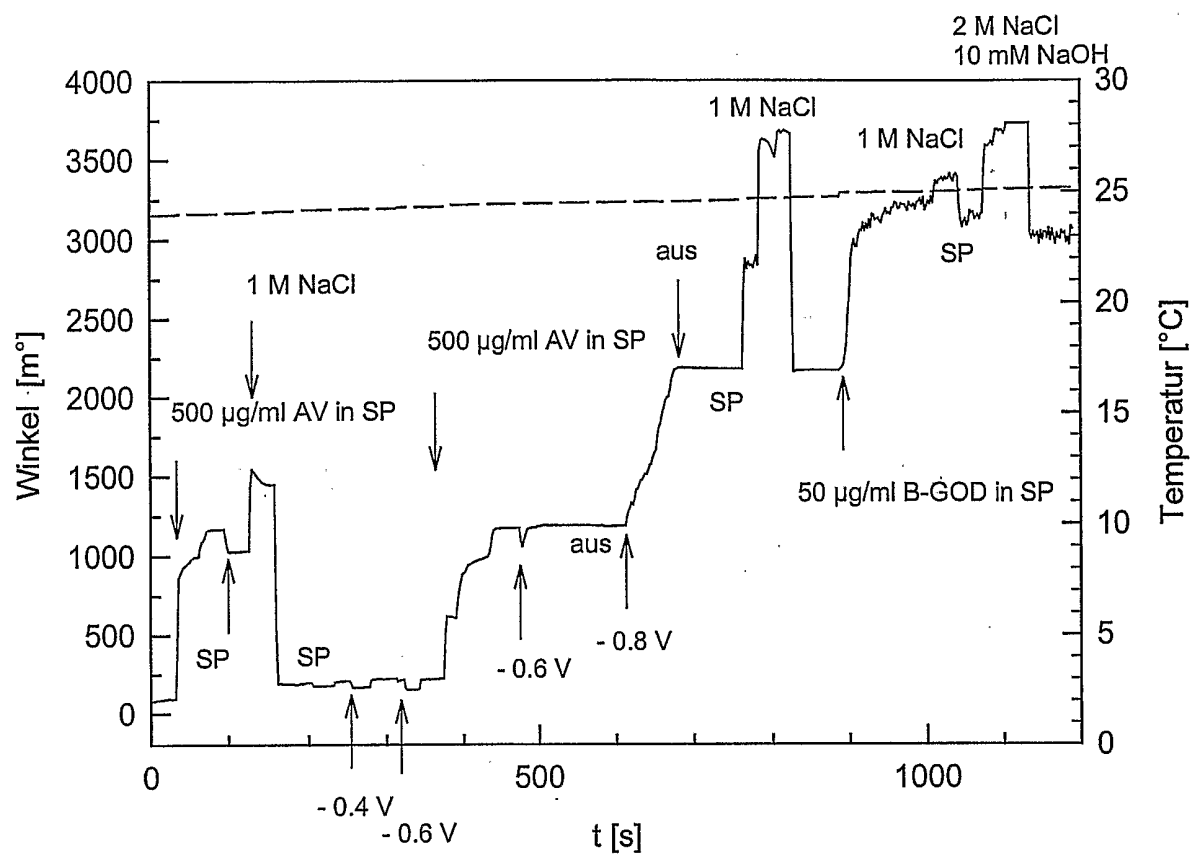
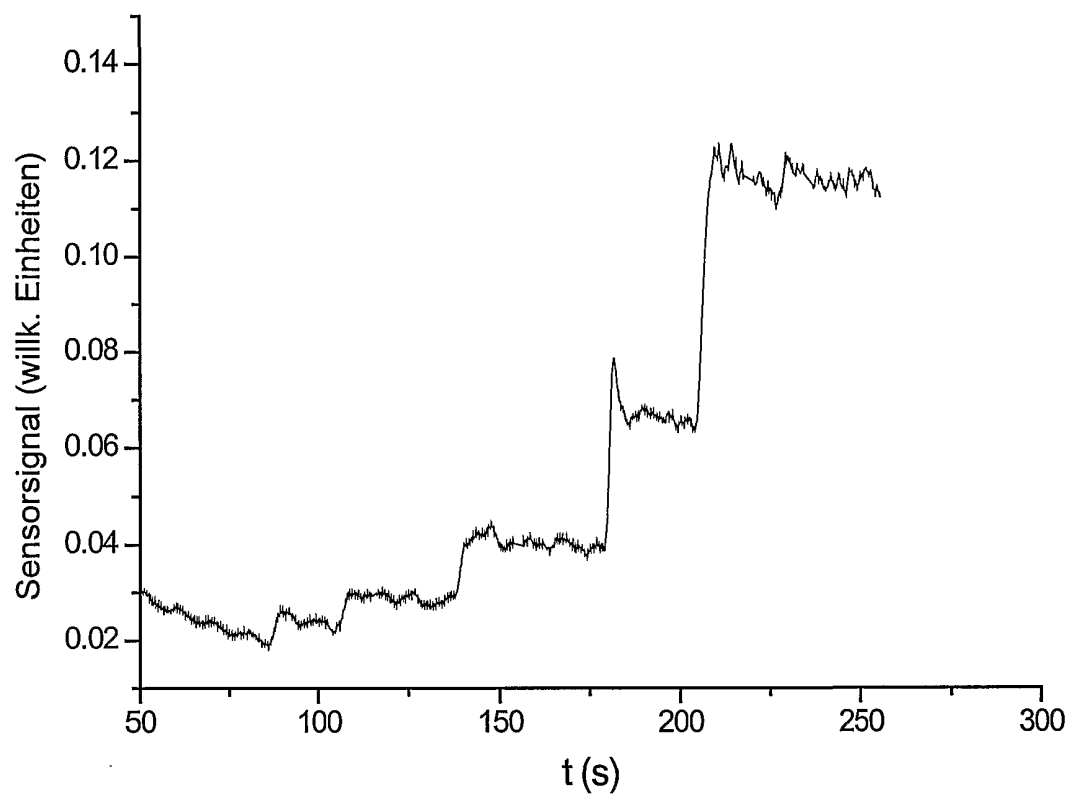


Fig. 8

9/15

*Fig. 9*

10/15

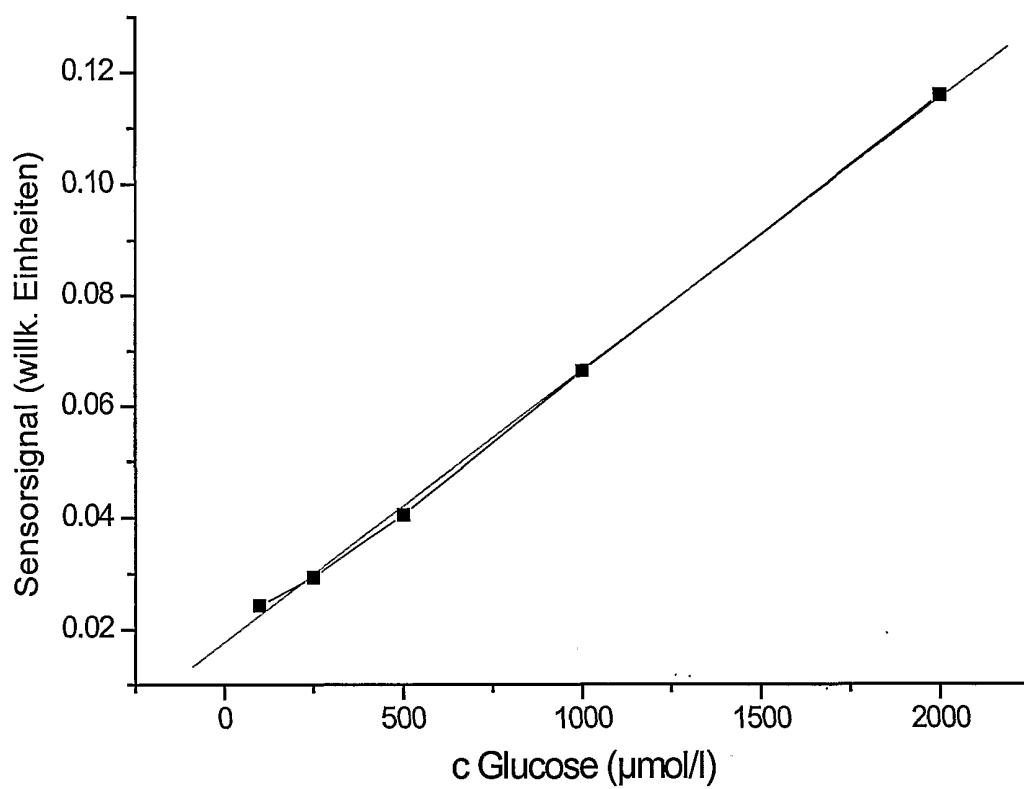
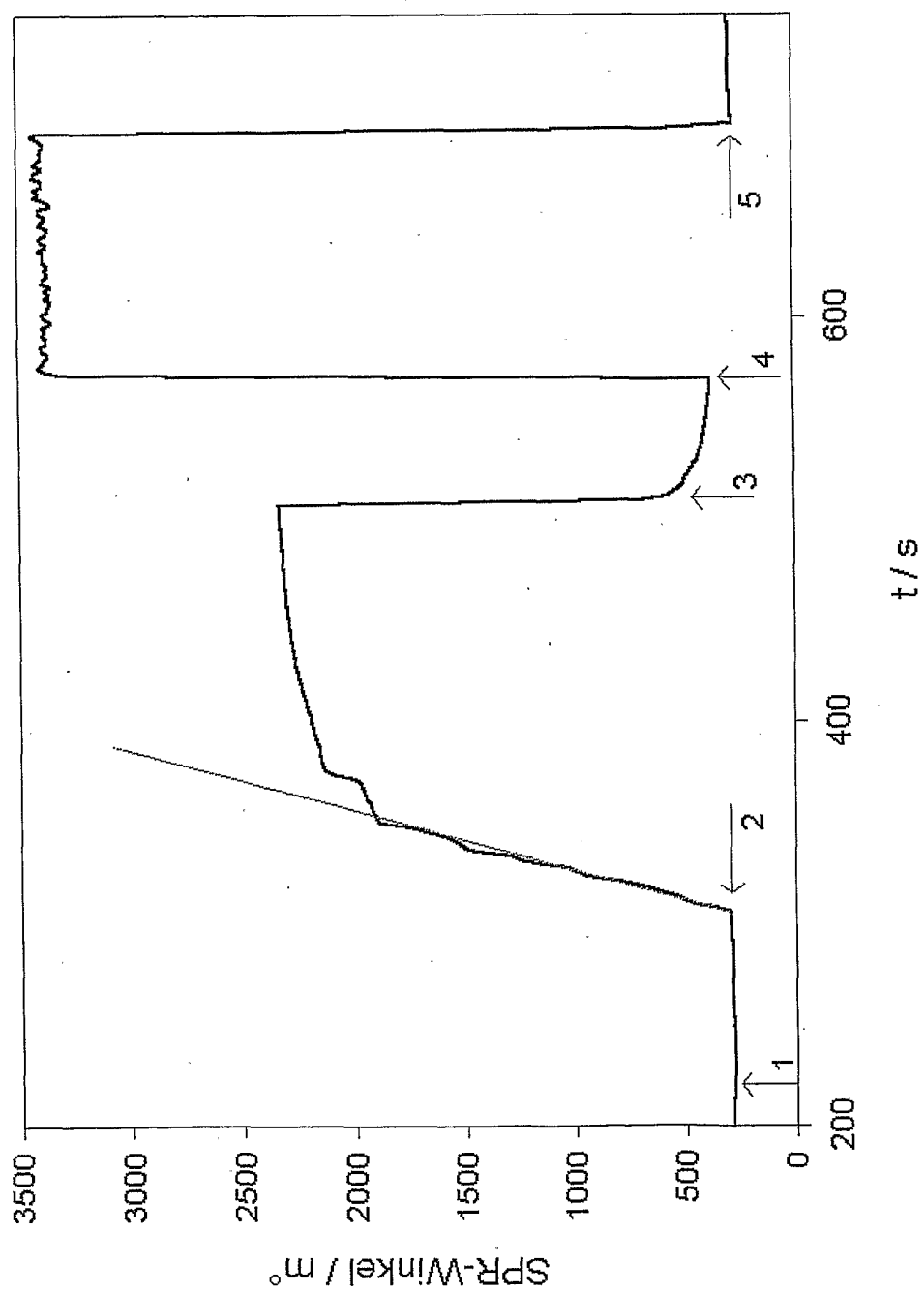


Fig. 10

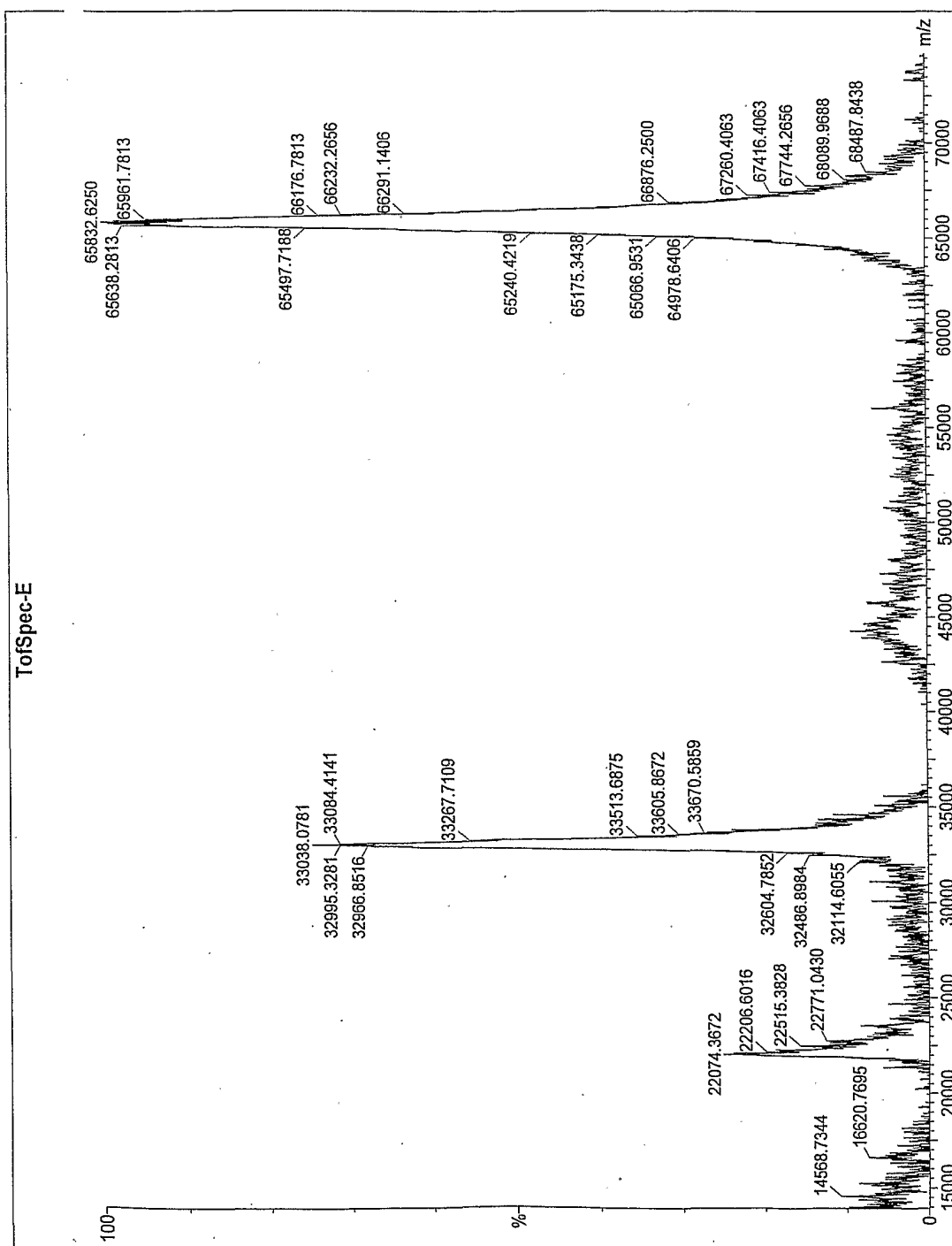
11/15

Fig. 11



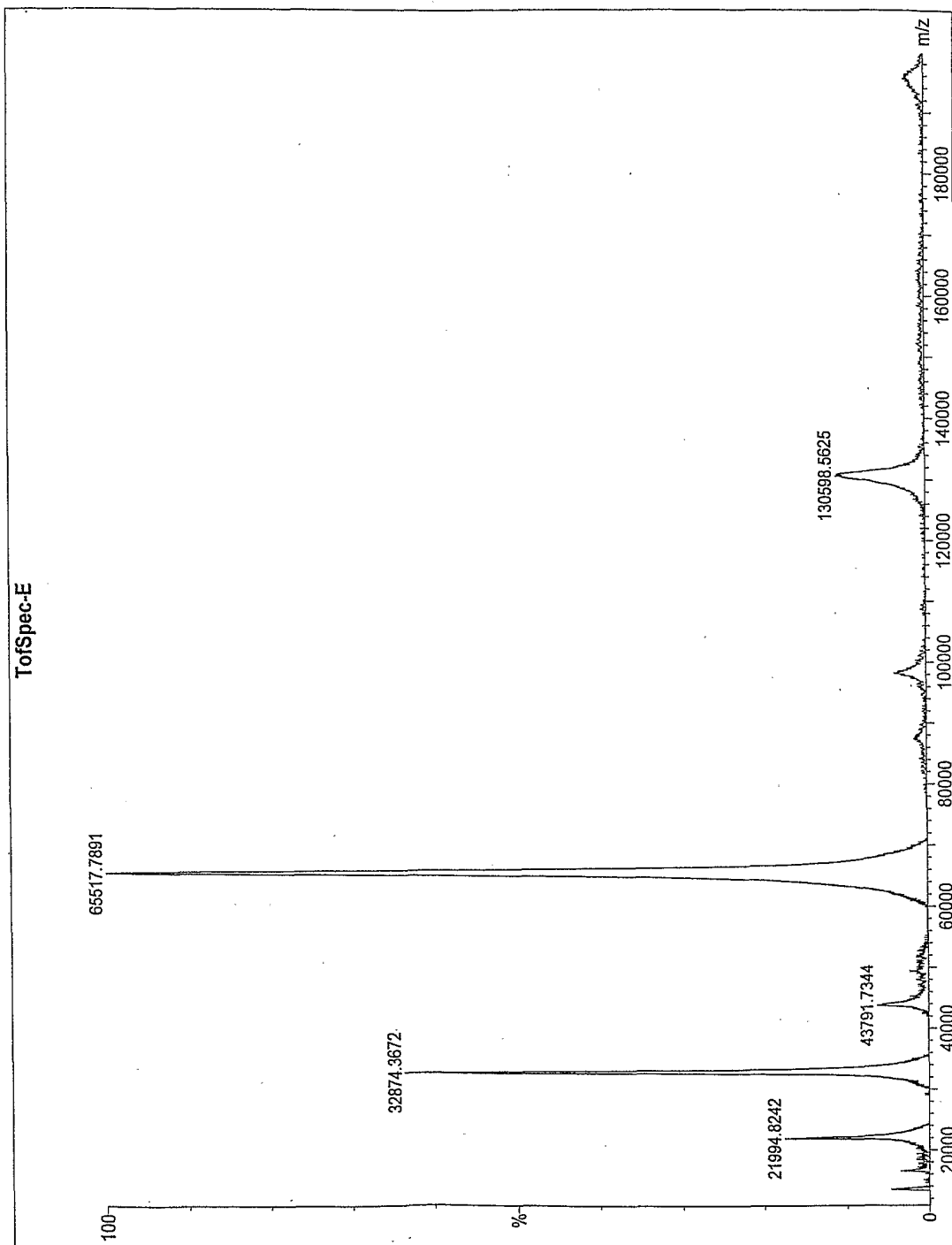
12/15

Fig. 12



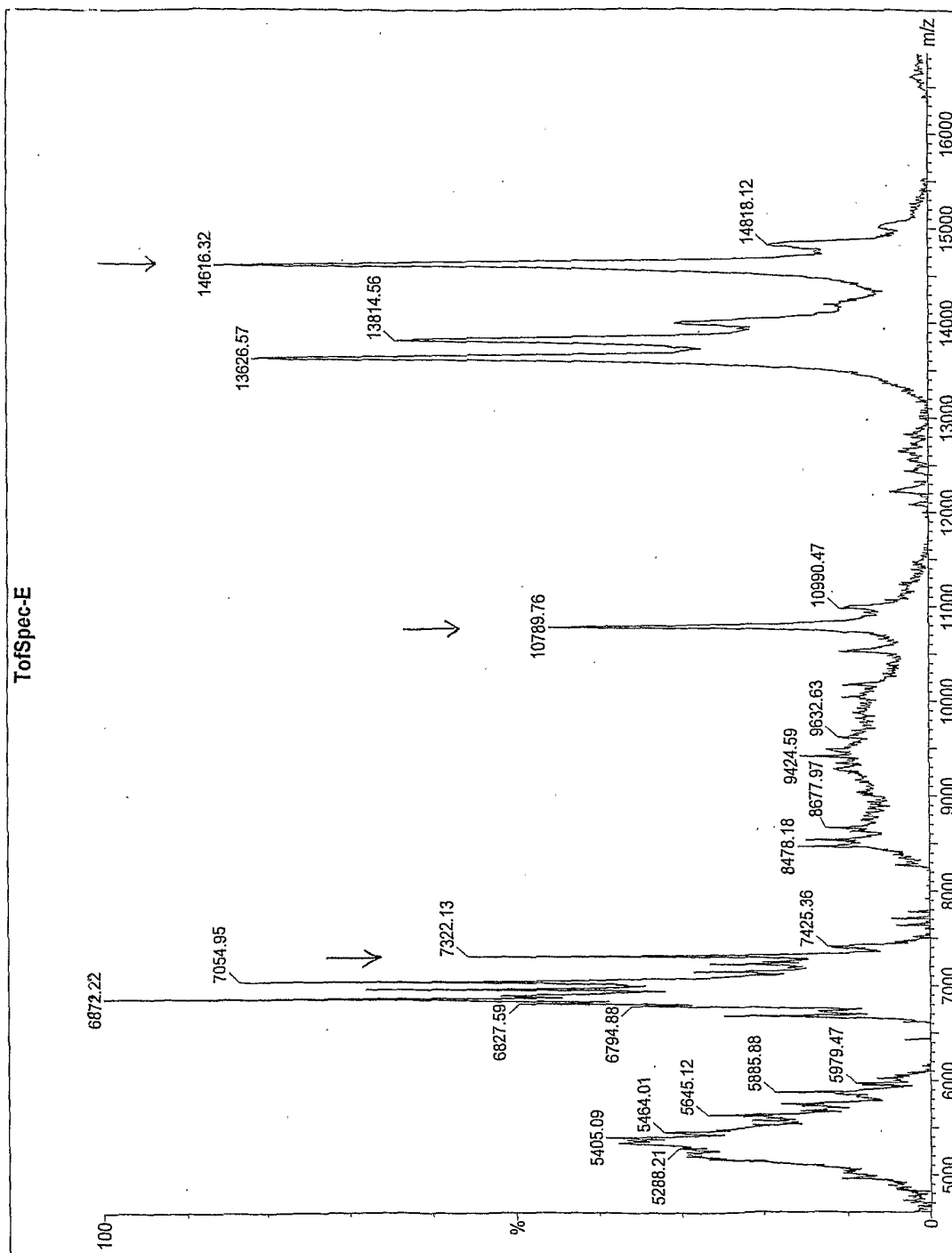
13/15

Fig. 13



14/15

Fig. 14



15/15

Fig. 15

