



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 797**

51 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06851430 .6**

96 Fecha de presentación : **18.08.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1931989**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.06.2008**

54 Título: **Nanoarreglos de partículas biológicas, métodos para la fabricación de los mismos.**

30 Prioridad: **31.08.2005 US 712432 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.07.2011

73 Titular/es: **Northwestern University
1880 Oak Avenue Suite 100
Evanston, Illinois 60201, US**

72 Inventor/es: **Mirkin, Chad, A.;
Vega, Rafael, A.;
MasPOCH, Daniel y
Salaita, Khalid**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 362 797 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nanoarreglos de partículas biológicas, métodos para la fabricación de los mismos

5 Antecedentes

La tecnología de nanoarreglos ha conducido a significativos avances en muchas áreas de investigación médica y biológica, [1] abriendo avenidas para la selección combinatoria e identificación de polimorfismos de nucleótidos individuales (los SNP), [2] perfilando la expresión de alta sensibilidad de proteínas, [3, 4] y el análisis de alto rendimiento de la función de la proteína. [5] Sin embargo, las tecnologías actuales de microarreglos, tales como formación de puntos con arreglos de clavijas, impresión por inyección de tinta o métodos derivados de fotolitografía, están limitadas en su resolución práctica - desde cientos hasta decenas de micras, dependiendo de la técnica. La densidad de los arreglos fabricados y por lo tanto el número de entidades biológicas distintas depositadas (que incluyen pero no se limitan a proteínas, así nucleico, carbohidratos, lípidos, y especialmente complejos o montajes de los mismos, tales como virus o componentes celulares) están por consiguiente limitadas. Existe por lo tanto la necesidad de un método capaz de formar arreglos a escala de unas pocas micras y por debajo de las micras de dichas entidades biológicas.

Además, las dimensiones de cada sitio en los microarreglos actualmente fabricados son típicamente mucho mayores que el tamaño de las moléculas biológicas individuales o los montajes que están siendo depositados. Por lo tanto, grandes cantidades de dichas entidades están presentes en cada sitio y únicamente se puede estudiar el comportamiento estadístico colectivo de estos conjuntos. Se han depositado partículas biológicas aisladas, por ejemplo, poniendo en contacto una solución muy diluida de dichas partículas biológicas con un sustrato sólido con una química superficial cuidadosamente seleccionada durante un período de tiempo cuidadosamente seleccionado, seguido opcionalmente por etapas de lavado. Éste método ofrece poco o ningún control sobre la densidad y la ubicación de dichas partículas. Existe por lo tanto la necesidad de un método de miniaturización - por debajo de la escala de longitud de los nanómetros - con el potencial para el "aislamiento en el sitio" de entidades biológicas a escala micro y nano a nivel de partículas individuales con un posicionamiento preciso. Con tal método, estarán disponibles nuevas oportunidades para las comunidades que hacen investigaciones en el campo bioquímico y biomédico para empezar a estudiar tales entidades en forma individual en vez de colectivamente. El aislamiento en el sitio es de interés comercial, por ejemplo en R&D farmacéutico durante el descubrimiento de fármacos - especialmente para elucidar rápidamente el mecanismo fundamental de interacción entre un candidato a fármaco y su objetivo - sin necesidad de utilizar técnicas difíciles y que consumen mucho tiempo como la cristalización y los análisis de rayos X. Otros experimentos biológicos comercialmente relevantes de partículas individuales incluyen, por ejemplo, el estudio de (a) el efecto de la orientación relativa entre entidades biológicas sobre sus interacciones; (b) el comportamiento cooperativo de un número seleccionado de patógenos que infectan simultáneamente por ejemplo una célula; (c) el enlazamiento de un anticuerpo individual con un antígeno o a la inversa, el comportamiento cooperativo de anticuerpos múltiples hacia un antígeno; (d) variaciones en la interacción de un fármaco objetivo con formas individuales de una proteína polimórfica o aquella de diferentes miembros de la misma familia de proteínas; y (e) el efecto de variaciones genéticas en relación con su interacción con otro producto biológico.

Antes de esta invención, se habían hecho avances en la inmovilización de partículas virales sobre plantillas creadas por medio de DPN e impresión por microcontacto. [11, 12] Sin embargo, existe la necesidad de permitir la posibilidad de controlar químicamente la posición de las estructuras de virus inmovilizados a nivel de partículas individuales. Esto es en parte debido a una resolución limitada (véase más arriba), al tamaño de las partículas interrogadas, y especialmente a la química utilizada para inmovilizarlas. De hecho, los esfuerzos previos se han enfocado sobre la modificación genética de una partícula viral para que presente una funcionalidad de enlazamiento superficial no natural con la interfaz modelada. [11, 12] Por razones de costo y de escalabilidad, es preferible evitar la manipulación de tales virus. Existe por lo tanto la necesidad por un método para controlar químicamente la posición de las estructuras de los virus inmovilizados a nivel de partículas individuales sin la necesidad de modificar química o genéticamente dichos virus.

Vega et al. "Nanoarrays of single virus particles", *Angewandte Chemie. International Edition*, VCH Verlag, Weinheim, DE, vol. 44, no.37, 22 de agosto de 2005, páginas 6013 - 6015, describe una aproximación para la inmovilización de partículas del virus TMV sobre superficies. A través del uso de DPN y de rasgos pequeños, se pueden aislar partículas virales y se puede controlar la orientación de las mismas.

5 US 2003/0068446 A1 describe el uso de DPN para construir nanoarreglos de péptido y de proteína de alta densidad. El método puede ser llevado a cabo con una variedad de estructuras de péptido y de proteína, incluyendo enzimas y anticuerpos.

10 Rozhok et al. "Methods for Fabricating Microarrays of Motile Bacteria", *small*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim, DE, Abril de 2005, páginas 445 - 451 describe la fabricación de microarreglos de células individuales en donde las células individuales están unidas a una línea prediseñada o rasgos puntuales.

No se reconoce que alguna de las referencias citadas en esta sección de Antecedentes o a partir de entonces haga parte del estado del arte.

15 Resúmen de la invención

La invención se relaciona en general con arreglos de entidades biológicas y en particular con arreglos de entidades biológicas aisladas en el sitio. Se relaciona además con (a) el uso de impresión nanolitográfica de escritura directa para la fabricación de los mismos; y (b) métodos para el uso de estos arreglos.

20 La presente invención proporciona en algunas modalidades arreglos de partículas biológicas, en las cuales al menos una de las dimensiones laterales de los sitios está en el rango de unas pocas micras o por debajo del rango de las micras (incluidos los nanoarreglos). La invención también divulga arreglos diseñados organizados de partículas biológicas aisladas en el sitio y especialmente arreglos de partículas virales aisladas en el sitio.

La invención divulga arreglos y métodos para la fabricación de dichos arreglos.

30 Se describe un enfoque químico con base en iones metálicos de coordinación versátil, para la inmovilización de partículas virales del TMV sobre superficies y se demuestra que a través del uso de DNP y de rasgos pequeños, es posible aislar y controlar la orientación de estas partículas virales. Muchas partículas virales tienen Zn^{2+} y otros grupos para enlazamiento de metales en sus recubrimientos de proteína. [18] Por lo tanto, se pueden generalizar este enfoque para manipular muchas clases de estructuras virales a nivel de partículas individuales. Tales posibilidades expandirán el alcance de la solicitud para estructuras virales en campos que van desde la biología hasta la electrónica molecular, [19] donde tal control abre nuevas oportunidades para la investigación que no puede ser abordada con microarreglos o sistemas a granel.

Breve descripción de los dibujos

40 Figura 1. Diagrama esquemático que describe la inmovilización selectiva de partículas virales individuales sobre nanoplantillas de MHA generadas por DPN con una solución de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$. El diagrama no está a escala.

45 Figura 2. Diagrama esquemático que describe (a) la superficie externa del Virus del Mosaico del Tabaco (TMV), que presenta un alto número de grupos carboxílicos/carboxilato de los aminoácidos glutamato y aspartato. Se desprotona el TMV a pH 3,5; (b) el sándwich formado por los grupos carboxilato del patrón monocapa autoensamblado del ácido mercaptohexadecanoico, por un lado, los cationes Zinc y los grupos carboxilato presentes sobre el virus TMV, por el otro. Sin querer estar limitado por la teoría, se cree que el puente electrostático formado por los iones zinc cargados positivamente y los carboxilatos cargados negativamente es responsable por la inmovilización de dicho virus TMV sobre dicho patrón de MHA. El diagrama no está a escala.

50 Figura 3. Imágenes en modo de repiqueteo del AFM (utilizando un voladizo de silicio, constante de elasticidad = - 40 N/m) y perfiles de altura de nanoarreglos del TMV. (a) Imágenes topográficas tridimensionales de pares de partículas virales dentro de arreglos mayores: (izquierda) un arreglo paralelo, (mitad) un arreglo perpendicular, y (derecha) arreglos de puntos. (b) Imágenes topográficas y perfiles de altura de un arreglo perpendicular de

partículas de virus individuales (40 x 40 µm). (c) Imagen topográfica y perfiles de altura de un nanoarreglo del TMV (20 x 20 µm) formado sobre un arreglo de rasgos de puntos de MHA de 350 nm pretratado con Zn(NO₃)₂·6H₂O. Todas las imágenes fueron tomadas con una velocidad de barrido de 0,5 Hz.

5 Figura 4. (a) Espectros de PM-IRRAS de una monocapa de MHA sobre Au (espectro inferior), después de tratamiento con Zn(NO₃)₂·6H₂O (espectro del medio), y luego incubación con el TMV (espectro superior). (b) Imagen topográfica y perfiles de altura de un arreglo de MHA tratado con el antisuero contra el TMV. Los anticuerpos están unidos electrostáticamente a los rasgos del MHA. Imágenes topográficas y perfiles de altura de un par de partículas de virus individuales paralelos antes (c) y después (d) del tratamiento con una solución de PBS que contiene al antisuero contra el TMV. Todas las imágenes del AFM fueron tomadas con una velocidad de barrido de 0,5 Hz en modo de repiqueteo.

15 Figura 5. Imagen 2D y 3D en modo de repiqueteo del AFM (voladizo de silicio, constante de elasticidad = aproximadamente 40 N/m) de un nanoarreglo del TMV formado sobre una plantilla del MHA que consiste de rasgos rectangulares de 600 nm x 200 nm. Se observa más de un virus orientado sobre cada rasgo. La imagen fue tomada con una velocidad de barrido de 0,5 Hz.

20 Figura 6. Imagen en modo de repiqueteo del AFM (voladizo de silicio, constante de elasticidad = aproximadamente 40 N/m) y perfil de altura de una muestra a granel de película delgada de oro (7,5 cm x 2,5 cm) que contiene una monocapa del TMV sobre una superficie modificada de MHA de Zn²⁺. Esta imagen fue tomada con una velocidad de barrido de 0,5 Hz.

25 Figura 7. Imágenes topográficas de un AFM en modo de repiqueteo (Veeco) del TMV aislado en el sitio antes y después de incubación (a, b respectivamente) con una solución de antisuero durante 30 min a 37°C. El incremento observado en altura demuestra que los anticuerpos se han enlazado al TMV y por lo tanto que ellos son biológicamente activos después de inmovilización.

Descripciones detalladas de las modalidades preferidas

30 Introducción

Se harán referencias detalladas a las modalidades preferidas de la invención, cuyos ejemplos están ilustrados en los dibujos acompañantes. Aunque la invención será descrita junto con las modalidades preferidas, se entenderá que no se pretende limitar la invención a esas modalidades.

35 Se cita la solicitud provisional de prioridad serial no. 60/712.432 presentada el 31 de agosto de 2005 por Mirkin et al.

Se hace la siguiente referencia: "Nanoarrays of Single Virus Particles", Rafael A. Vega, Daniel Maspocho, Khalid Salaita, y Chad A. Mirkin, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 2 - 4, 6013 - 6015.

40 Arreglos

45 La presente invención divulga arreglos de partículas biológicas (tales como células y componentes celulares, elementos bacterianos, esporas, virus y otros montajes y complejos de proteína, incluye los anticuerpos, ácidos nucleico, lípidos y carbohidratos), en los cuales al menos una de las dimensiones laterales de los sitios está en el rango de unas pocas micras o por debajo del rango de las micras (incluyendo nanoarreglos). En una modalidad preferida, la invención divulga arreglos diseñados organizados de partículas biológicas aisladas en el sitio y especialmente arreglos de partículas virales aisladas en el sitio. Los arreglos pueden contener 100 o más, o preferiblemente 1000 o más o preferiblemente 10.000 o más entidades biológicas o preferiblemente 100.000 o más entidades biológicas. Dichas entidades biológicas pueden ser idénticas o no.

Virus

Los arreglos virales son una modalidad preferida y después de eso se muestran ejemplos de trabajo que demuestran los arreglos del TMV. Sin embargo, la invención no está limitada a este o a ningún otro virus vegetal. Se pueden utilizar también virus de humanos y animales, incluido el VIH, virus del tracto respiratorio y de gripe.

- 5 Se pueden utilizar virus que son generalmente conocidos por aquellos ordinariamente capacitados en el arte, ver por ejemplo Cann, A. J., Principles of Modern Virology, Academic Press, 1993; Chiu, W., Burnett, R. M., y Garcea, R. L. (Eds), Structural Biology of Viruses, Oxford University Press, 1997. Ver también R. C. Bohinski, Modern Concepts in BioChemistry, 4th Ed., 1983.
- 10 Por ejemplo, un virus utilizado aquí puede ser una partícula que puede infectar una célula de un organismo biológico. Un virus individual, o una partícula viral, también puede ser llamada un virión, puede incluir una o más moléculas de ácido nucleico, llamadas genoma viral, rodeadas por un recubrimiento protector de proteína conocido como cápside. A diferencia de organismos celulares, en los cuales las moléculas de ácido nucleico están hechas generalmente de ADN, la molécula viral de ácido nucleico puede contener ya sea ADN o ARN. En algunos casos,
- 15 las moléculas de ácido nuclear viral contienen tanto ADN como ARN. El ADN viral es usualmente bicatenario, ya sea con una estructura circular o lineal, mientras que el ARN viral es usualmente monocatenario. Sin embargo, también se conocen ejemplos de ADN viral monocatenario y de ARN viral bicatenario. El ARN viral puede ser o bien segmentado (con genes diferentes sobre diferentes moléculas de ARN) o no segmentado (con todos los genes sobre una solo pedazo de ARN). El tamaño del genoma viral puede variar significativamente. Tanto los virus de ADN
- 20 como de ARN pueden ser utilizados aquí.

- En los virus utilizados aquí, la cápside viral puede contener unidades de repetición de una o de unas pocas proteínas diferentes codificadas por el genoma viral. Estas unidades son llamadas protómeros o capsómeros. Estas proteínas que conforman la partícula viral pueden ser llamadas proteínas estructurales. Una cantidad de proteínas
- 25 estructurales en la partícula viral pueden variar desde una (por ejemplo Virus Satélite de la Necrosis del tabaco) hasta 377 (virus del Paramecium bursaria Chlorella).

- Los virus utilizados aquí pueden tener una variedad de formas. Por ejemplo, la cápside viral puede ser helicoidal (en forma de espiral) o icosaédrica. Un ejemplo de un virus con una cápside viral helicoidal es el virus del mosaico del
- 30 tomate, mientras que los ejemplos de virus de cápsides virales icosaédricas incluyen al Virus del Enanismo Ramificado del Tomate y al Virus del Simio 40. Algunos virus más complejos pueden tener una cápside que no es completamente helicoidal o solamente icosaédrica. Algunos virus más complejos pueden poseer estructuras extra tales como colas de proteína o una pared externa compleja. Por ejemplo, algunos bacteriófagos, es decir virus que
- 35 pueden infectar células bacterianas, pueden tener una cápside que contiene una cabeza icosaédrica enlazada a una cola helicoidal, que puede tener también una placa base hexagonal con muchas fibras sobresalientes de proteína.

- La cápside viral y el genoma viral contenidos allí pueden ser denominados juntos como una nucleocápside. Algunas partículas virales contienen nucleocápsides, mientras que otras contienen estructuras adicionales. Por ejemplo,
- 40 algunos virus pueden estar encerrados en una envoltura lipídica adquirida cuando el virus brota a través de las membranas de las células huésped. Se pueden insertar una o más glicoproteínas que enlazan partículas virales a células huésped susceptibles en esta envoltura. Las glicoproteínas pueden ser codificadas tanto por el genoma viral como por el genoma de la célula huésped, mientras que los lípidos de la envoltura y cualquiera de los carbohidratos presentes son totalmente codificados por el genoma de la célula huésped.

- Los virus pueden variar en tamaño, como se los utiliza aquí. Por ejemplo, un diámetro de la cápside viral puede ser de aproximadamente 10 nm hasta aproximadamente 400 nm, usualmente aproximadamente desde
- 45 aproximadamente 10 nm hasta aproximadamente 300 nm. Algunas cápsides virales pueden tener una relación significativa de longitud con respecto al diámetro. Por ejemplo, las cápsides de algunos filovirus pueden tener una longitud hasta de 1400 nm y un diámetro únicamente de 80 nm.

- 50 Los virus pueden ser clasificados de acuerdo a su tipo de material genético, su estrategia de replicación, y su estructura. De acuerdo con su genoma y estrategia de replicación, los virus pueden ser clasificados de la siguiente manera:

A) Virus de ADN:

Grupo I: virus que contienen ADN bicatenario. Los ejemplos incluyen familias de virus tales como *Herpesviridae* (virus del herpes) y *Poxviridae* (varicela y viruela), muchos bacteriófagos con cola, y un virus con el genoma viral más largo conocido, mimivirus.

Grupo II: virus que contienen ADN monocatenario. Los ejemplos incluyen familias de virus tales como *Parvoviridae* y el bacteriófago M13.

B) Virus de ARN:

Grupo III: virus que contienen genomas de ARN bicatenario. Estos genomas están segmentados.

Grupo IV: virus que contienen genomas de ARN monocatenario sentido positivo. Los ejemplos incluyen virus del SARS, virus de hepatitis C, virus de fiebre amarilla y virus de rubeola virus.

Grupo V: virus que contienen genomas de ARN monocatenario sentido negativo. Los ejemplos incluyen familias de filovirus tales como virus de Ebola y Marburg junto con sarampión, paperas y rabia.

C) Virus de transcripción inversa:

Grupo VI: virus que contienen genomas de ARN monocatenario y que se replican utilizando transcriptasa inversa. Los ejemplos incluyen retrovirus tales como el virus del VIH.

Grupo VII: virus que contienen genomas de ADN bicatenario y que se replican utilizando transcriptasa inversa. Los ejemplos incluyen al virus de la hepatitis B.

El virus puede tener por ejemplo una forma anisotrópica. Por ejemplo, el virus puede tener una forma tubular.

El virus puede incluir una estructura funcional adicional enlazada al virus.

Se pueden utilizar virus modificados por ingeniería genética y modificados sintéticamente. Ver por ejemplo Genetically Engineered Viruses, Ed. CJA Ring, E.D. Blair; 2001.

En muchos casos, el virus puede ser utilizado tal cual o como un tipo silvestre sin modificación.

Además de los virus, son posibles otros patógenos incluidos parásitos celulares como malaria. También son posibles organelos celulares (incluyendo pero sin limitarse a ribosomas, núcleos celulares y otras vesículas y aparatos celulares).

Superficie del sustrato

La superficie del sustrato no está particularmente limitada pero puede ser por ejemplo sustancialmente plana. Se pueden utilizar sustratos tales como vidrio o metales. Se pueden utilizar métodos de microfabricación para preparar sustratos y construir capas y superficies apropiadas. Los sitios de enlazamiento del virus y los sitios que no enlazan virus pueden incluir por ejemplo una monocapa. Una capa delgada de compuesto orgánico puede formar una monocapa sobre un sustrato inorgánico.

Sitios de enlazamiento

Los sitios de enlazamiento pueden contener regiones con una pluralidad de sitios de enlazamiento molecular. Los sitios de enlazamiento del virus pueden contener sitios de enlazamiento iónico. Los sitios de enlazamiento del virus pueden incluir sitios de enlazamiento iónico. Éstos pueden ser por ejemplo sitios de enlazamiento iónico metálico multivalente que incluyen sitios de enlazamiento di, tri o tetravalentes. Los metales, iones metálicos y el enlazamiento del ion metálico están descritos en general por ejemplo en Advanced Inorganic Chemistry, 4th Ed., Cotton and Wilkinson, 1980.

Un ejemplo de un enfoque utilizado aquí se basa en la habilidad de los iones, tal como los iones metálicos y los cationes metálicos divalentes (por ejemplo, Zn^{2+} que es el preferido; otros iones son posibles) para unir una superficie moldeada con rasgos que trasporten una carga opuesta, por ejemplo los grupos terminales de una monocapa autoensamblada (por ejemplo, el ácido 16-mercaptohexadecanóico, MHA) o la superficie externa de una entidad biológica cargada, tal como una envoltura viral rica en carboxilato. Son posibles otras moléculas que se enlazan a dicho sustrato y presentan un grupo funcional adecuado (por ejemplo, alcanotioles u organosilanos que añaden grupos funcionales en posición omega).

El enlazamiento del ion metálico se puede llevar a cabo con metales que incluyen por ejemplo Zn(II), Cu(II), Ni(II), y Co(II). El ion metálico no está particularmente limitado pero puede basarse por ejemplo en formas iónicas de rutenio, cobalto, rodio, rubidio, vanadio, cesio, magnesio, calcio, cromo, molibdeno, aluminio, iridio, níquel, paladio, platino, hierro, cobre, titanio, tungsteno, plata, oro, zinc, zirconio, cadmio, indio, y estaño. Los cationes metálicos divalentes incluyen Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , y Ni^{2+} .

Los nanoarreglos de péptido y proteína y los sitios de enlazamiento están también descritos por ejemplo en la Publicación de la Patente Estadounidense 2003/0068446 de Mirkin et al., que se incorpora aquí como referencia.

En el diseño de sitios de enlazamiento con base metálica, se pueden utilizar los principios de IMAC (Cromatografía de Afinidad sobre Metal Inmovilizado). Ver por ejemplo las Patentes Estadounidenses Nos. 5.932.102 y 6.942.802.

En algunas modalidades, se adaptan los sitios de enlazamiento de manera que el virus mantenga su forma a pesar del enlazamiento y no se deforme sustancialmente.

Sitios que no enlazan virus

Partes adicionales de la superficie pueden ser pasivadas para evitar y sustancialmente prevenir el enlazamiento de virus. Como resultado, los sitios que no enlazan virus pueden estar sustancialmente libres de virus. La pasivación es generalmente conocida como se describe por ejemplo en la Publicación de la Patente Estadounidense 2003/0068446 de Mirkin et al. Se puede recubrir una monocapa sobre el sustrato para conferir pasivación tal como por ejemplo un alcano tiol o un alcano tiol lineal, o un alcano tiol que contiene un grupo terminal, así como alcano tioles que incluyen un poli u oligo-alkuilenoglicol tiol.

Tamaño y forma de los sitios de enlazamiento para enlazamiento en un sitio único

El sitio de enlazamiento del sustrato y los sitios pueden ser adaptados de tal manera que únicamente se dispone de una partícula viral sobre cada sitio de enlazamiento. En un arreglo, un sitio de enlazamiento ocasional puede tener más de una partícula viral para que por ejemplo al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 90% de los sitios de enlazamiento tengan una partícula viral. La invención proporciona además un método para diseñar en posiciones conocidas sitios a escala micro hasta nanométrica, cuya geometría y dimensiones se aproximan a aquellas de las partículas biológicas objetivo, de tal manera que un número seleccionado de partículas puede ser depositado sobre cada sitio. Preferiblemente, únicamente aproximadamente una partícula puede ser absorbida sobre cada sitio. Además, muchos de tales sitios pueden ser producidos en paralelo con gran rapidez y se puede garantizar un posicionamiento, orientación y espaciado preciso entre las partículas.

Por ejemplo, la mayor dimensión lateral de cada sitio puede estar entre 5 micrones y $1\ \mu m$ o entre $1\ \mu m$ y 500 nm o entre 500 nm y 300 nm o entre 300 nm y 100 nm o inferior a 100 nm o menor a 50 nm.

El sitio puede ser, por ejemplo, sustancialmente un círculo, una forma lineal, una forma curvilínea, un cuadrado, o un rectángulo. Puede ser por ejemplo rectangular, cuadrada o tipo disco.

Los sitios rectangulares pueden estar entre 600 nm x 200 nm y 500 nm x 180 nm, o entre 500 nm x 180 nm y 400 nm x 150 nm, o entre 400 nm x 150 nm y 350 nm x 110 nm, en longitud y ancho. La forma puede ser por ejemplo un rectángulo que tiene una longitud de aproximadamente 300 nm hasta aproximadamente 600 nm, y un ancho de aproximadamente 100 nm hasta aproximadamente 200 nm.

Los sitios con forma de punto pueden estar entre 1000nm y 500 nm de diámetro o preferiblemente entre 500 nm y 350 nm de diámetro, o preferiblemente entre 350 nm y 100 nm de diámetro o preferiblemente menor a 100 nm de diámetro.

- 5 La separación entre sitios puede estar entre 15 μm y 5 μm , o entre 5 μm y 1 μm o entre 1 μm y 500 nm o entre 500 nm y 100 nm o inferior a 100 nm o menor a 50 nm.

El tamaño promedio de los sitios de enlazamiento del virus puede proporcionar por ejemplo un área superficial aproximadamente menor a 100.000 nm cuadrados, o aproximadamente menor a 50.000 nm cuadrados, o aproximadamente 30.000 nm cuadrados hasta aproximadamente 100.000 nm cuadrados, para cada sitio.

- 10

Litografía

- 15 Los métodos de modelamiento, impresión, dibujo, escritura, microlitografía, y nanolitografía son conocidos en el arte e incluyen litografía de escritura directa y nanolitografía de escritura directa. Ver por ejemplo Direct-Write Technologies for Rapid Prototyping Applications, (Ed. Alberto Pique y D. B. Chrisey), Academic, 2002.

- 20 Los ejemplos de litografía y de litografía de escritura directa con respecto a los bioarreglos incluyen por ejemplo litografía con base en una punta del AFM, impresión por DPN, impresión por microcontacto, formación robótica de puntos, y similares.

- 25 En una modalidad, la invención mejora los métodos litográficos de escritura directa de alta resolución tales como la Nanolitografía de Pluma de Inmersión (DPN) [6] para la miniaturización de estructuras de entidad biológica hasta escala de longitud nanométrica [7 - 9] (DPNTM, Dip Pen NanolithographyTM, NanoInkTM, DPNWriteTM, NScriptorTM son marcas de fábrica o marcas de fábrica registradas de NanoInk, Inc., Chicago, IL). Ver también por ejemplo Ginger et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2004, 43, 30 - 45 así como las Patentes Estadounidenses Nos. 6.635.311 de Mirkin et al.; 6.827.979 de Mirkin et al, y 6.887.443 de Liu et al. para modalidades adicionales para nanolitografía con base en una punta incluida la instrumentación, software, tintas, y procesos, que se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Tal miniaturización masiva proporciona las ventajas de bibliotecas más densas y más grandes para
30 selección de sistemas químicos y biológicos complejos.

En una modalidad preferida, se pueden fabricar sitios para atrapamiento de iones utilizando impresión nanolitográfica de escritura directa tal como impresión por DPN.

- 35 Si se desea, se pueden utilizar mezclas de tinta que contienen múltiples tintas o sistemas de tinta en dos fases como se describe por ejemplo en la solicitud estadounidense no. 11/480.557 presentada el 5 de julio de 2006 por Mirkin et al.

Método de fabricación y uso

- 40 Adicionalmente, la invención describe una nueva tecnología que utiliza impresión por DPN en combinación con iones metálicos o química de combinación para inmovilizar y ubicar en forma precisa partículas biológicas en el contexto de grandes arreglos. En una segunda modalidad, el método para inmovilizar en forma precisa al menos una
45 partícula biológica sobre un sustrato sin una modificación química o genética no natural de dicha partícula biológica antes de la inmovilización comprende las etapas de (a) moldear un sustrato, formar un arreglo de sitios capaz de atrapar iones, por ejemplo cationes metálicos tales como aquellos de Zinc (por ejemplo, Zn^{2+}) o cobre²⁺ o níquel²⁺; (b) opcionalmente la pasivación de las áreas del sustrato que no fueron moldeadas con al menos un compuesto que evita la absorción de un ión y de una entidad biológica, (c) atrapar selectivamente dichos iones sobre la parte superior de dichos sitios, por ejemplo, por inmersión de dicho sustrato en una solución de dicho ion; (d) inmovilizar
50 selectivamente dicha partícula biológica sobre dichos sitios, por ejemplo por inmersión de dicho sustrato en una solución de dicha partícula biológica.

En otra modalidad, la invención provee un método para inmovilizar aproximadamente una única partícula biológica por sitio del arreglo a escala nanométrica, resultando en la producción de entidades biológicas aisladas en el sitio en

ubicaciones conocidas, en donde dicho aislamiento de entidades biológicas no es el resultado de adsorción aleatoria a partir de una solución muy diluida.

5 En otra modalidad, la invención provee un método para la fabricación de arreglos de partículas biológicas, en donde la mayoría de las partículas biológicas asumen una orientación o forma específica. Preferiblemente, dicha orientación o conformación es suministrada por un medio químico en vez de un medio físico, por ejemplo por medio de la interacción de la geometría y química de superficie de dicho sitio y aquellas de la superficie externa de dicha entidad biológica, en vez de por medio de la aplicación de un campo eléctrico y magnético o el uso de flujo de fluido.

10 Propiedades del arreglo

Preferiblemente, el método permite la deposición de dichas partículas biológicas de tal forma que permanezcan biológicamente activas. La actividad biológica puede ser verificada, por ejemplo, por medio del enlazamiento de anticuerpos específicos para dichas partículas biológicas sobre dichas partículas o por medio de la formación de pares de Watson-Crick con cadenas complementarias de ácido nucleico presentes en solución. Se pueden examinar las propiedades por medio de métodos de sonda de barrido.

Modalidades adicionales

20 Esta invención divulga además métodos, kits e instrumentos para la fabricación y uso de dichos arreglos.

25 La invención también provee un kit para la fabricación de arreglos de entidades biológicas aisladas en el sitio que incluyen un sustrato, al menos una sonda, una composición química, una solución de pasivación, una, y una solución de una entidad biológica, en donde se adapta la composición química para recubrir al menos una sonda y se deposita sobre el sustrato para formar al menos patrón, en donde la solución de pasivación puede pasivar áreas no moldeadas del sustrato, en donde sumergiendo el sustrato moldeado y pasivado en la solución iónica produce iones selectivamente enlazados a regiones moldeadas, en donde las entidades biológicas pueden adsorberse a regiones moldeadas tratadas con iones.

30 La invención también provee un instrumento capaz de la fabricación de arreglos de entidades biológicas aisladas en el sitio, conteniendo el instrumento al menos una sonda y un medio de dispersión de fluido para suministrar las soluciones del kit anteriormente mencionado en secuencia. Se pueden utilizar métodos litográficos con base en el AFM de múltiples sondas. Se pueden utilizar sondas activadas. El instrumento puede ser por ejemplo un microscopio de fuerza atómica capaz de impresión nanolitográfica de escritura directa y la sonda puede ser un voladizo del AFM con o sin una punta o una sonda de SPM.

La invención también provee un instrumento y un método para la observación y caracterización de la interacción de una partícula biológica aislada con al menos una segunda entidad biológica de al menos tipo.

40 Ejemplos del trabajo

Se proporcionan ejemplos del trabajo no limitantes

Ejemplos de trabajo: arreglos del TMV aislados en el sitio:

45 En este ejemplo, se aislaron en el sitio partículas virales, posicionadas y orientadas sobre nanomoldes de MHA de Zn^{2+} generados por medio de nanolitografía de pluma de inmersión. Se caracterizó la inmovilización viral utilizando reconocimiento anticuerpo - virus así como espectroscopia infrarroja.

50 El enfoque utilizado en este ejemplo de trabajo se basó en la habilidad de los iones metálicos (Zn^{2+}) para unir una superficie moldeada con rasgos hechos de ácido 16-mercaptohexadecanoico (MHA) y el TMV con su superficie rica en carboxilato.

Se escogió el Virus del Mosaico del Tabaco (TMV) debido a su estructura tubular anisotrópica (aproximadamente 300 nm de largo, 18 nm de diámetro), tamaño, estabilidad, y superficie rica en carboxilato bien caracterizada. [10] Este sirve como un excelente sistema demostrativo para evaluar cómo se puede utilizar DPN para controlar el posicionamiento y la orientación de partículas virales a escala nano dentro de un arreglo extendido.

5 Se fabricaron los nanoarreglos virales generando inicialmente plantillas químicas de MHA sobre una película delgada de oro utilizando DPN (Figura 1). Las regiones que rodean estos rasgos fueron pasivadas con una monocapa de 11-mercaptoundecil-penta(etilenglicol) (PEG-SH) sumergiendo el sustrato en una solución de alcanotiol (5 mM en etanol) durante 30 minutos seguido por un generoso enjuague con etanol. La capa de pasivación minimiza el enlazamiento no específico de las partículas virales congeladas áreas no moldeadas. Los grupos de ácido carboxílico del MHA se coordinaron con iones de Zn^{2+} por medio de la exposición del sustrato a una solución en etanol de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (5 mM) durante una hora seguido por enjuague con etanol para remover cualquier ión metálico no enlazado de la superficie (ver también, la Figura 2). Se expuso luego el sustrato metalizado a una solución de amortiguador de fosfato (PBS) 10 mM pH7, NaCl 0,15 M que contenía TMV (de la American Type Culture Collection) (100 μ g/mL) durante 24 horas a temperatura ambiente en una cámara de humedad hermética. Se removió el exceso de partículas virales lavando los sustratos con agua NANOpure. Se secaron luego los sustratos limpios bajo una corriente de N_2 . Se caracterizaron todos los arreglos virales por medio de un AFM en modo de repiqueteo (TMAFFM), y se confirmó la identidad química de las partículas virales inmovilizadas en la superficie por tratamiento con un antisuero altamente específico (de la American Type Culture Collection) contra el TMV, que después del enlazamiento, incrementa la lectura de cada partícula viral (ver más abajo).

25 Se estudiaron sistemáticamente una serie de nanoestructuras lineales moldeadas por DPN de MHA, que varían en dimensiones (longitud y ancho: 600 nm x 200 nm, 500 nm x 180 nm, 400 nm x 150 nm y 350 nm x 110 nm) para determinar el tamaño óptimo del rasgo para la unión de partículas virales individuales. Bajo las condiciones estudiadas, las plantillas de MHA con dimensiones de los rasgos de 350 nm x 110 nm, espaciados un micrómetro, probaron ser ilegales para el montaje de partículas individuales. La tendencia de cada virus a ocupar el mayor número de sitios de coordinación resulta en una alineación casi perfecta de todas las partículas virales a lo largo del eje largo de cada plantilla rectangular (Figura 3a y 3b). La altura promedio de cada rasgo sobre la plantilla era de 16 ± 1 nm. Además, cada partícula viral sobre las líneas era de 45 ± 2 nm de ancho y 320 ± 40 nm de largo, parámetros consistentes con la presencia de únicamente una partícula del TMV sobre cada rasgo del MHA. [13]

35 Las dimensiones de los rasgos dentro del arreglo son críticas para el aislamiento en el sitio de la partícula viral. Por ejemplo, las plantillas rectangulares mayores a 500 nm de largo o 200 nm de ancho produjeron múltiples virus todavía orientados en cada sitio, previniendo así la formación de un arreglo de partículas virales individuales (ver la Figura 5). Los rasgos significativamente más pequeños (menores a 300 nm x 100 nm) no resultan en un montaje uniforme de las partículas virales quedando numerosos sitios sin ocupar.

40 Las plantillas químicas también pueden ser utilizadas para controlar el montaje del virus flexible dentro de conformaciones no naturales tales como círculos y otras arquitecturas curvadas. Por ejemplo, las plantillas de puntos de 350 nm de diámetro pueden capturar múltiples partículas virales, muchas de las cuales se adhieren al borde del punto y adoptan una arquitectura curvada (Figura 3c). Las estructuras curvadas del TMV han sido elaboradas antes pero a través de manipulación mecánica del virus. [14] Este enfoque para flexión del virus contrasta con el enfoque de la plantilla descrito en estos estudios.

45 Para demostrar que la orientación del virus no es el resultado de variables externas tales como el lavado, secado a través del flujo de N_2 o efectos capilares, se analizó la organización independiente de cada partícula viral por medio de inmovilización a lo largo de dos direcciones diferentes dentro de un arreglo. De hecho, cuando se utilizó una plantilla de MHA que consiste de rasgos de 350 nm x 110 nm perpendiculares entre sí, se obtuvo un arreglo de virus TMV individuales aislados en el sitio perpendiculares entre sí (Figura 3b).

50 Se utilizó espectroscopia de polarización de adsorción - reflexión de modulación infrarroja (PM-IRRAS) para caracterizar sustratos a granel de película delgada de oro modificados con TMV utilizando el mismo ion metálico o enfoque químico de coordinación utilizado para generar los arreglos de TMV (Figura 4a y Figura 6). La monocapa de MHA exhibe dos bandas principales en la región de estiramiento de $-CH_2-$ de alta frecuencia a 2856 y 2930 cm^{-1} y

dos en la región de estiramiento de C=O a 1741 y 1718 cm^{-1} , que se atribuyen a la presencia de grupos carboxílicos libres y enlazados con hidrógeno, [15] respectivamente. Después de sumergir el sustrato en una solución etanólica de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5mM) durante 1 h, se confirmó la coordinación de grupos carboxílicos del MHA con iones metálicos de Zn^{2+} por medio de los desplazamientos de la banda de ACO a una energía menor (1602/1556 y 1453 cm^{-1}). La región de estiramiento de C=O cambia nuevamente después de la exposición de la superficie de MHA de Zn a la solución de TMV. Se detectan tres bandas principales en esta región espectral que pueden ser identificadas como la banda de la amida I centrada en 1661 cm^{-1} , que es característica de proteínas sobre TMV,[16] las bandas asimétricas de COO⁻ y de la amida II centradas en 1546 cm^{-1} , y la banda simétrica de COO⁻ en 1458 cm^{-1} . También se confirma la presencia de grupos CH_3 , atribuida a proteínas con grupos metilo por medio del crecimiento de una nueva banda en 2967 cm^{-1} después de incubación con TMV.

En este ejemplo de trabajo, se cree que la química de coordinación que incluye la química de coordinación de Zn^{2+} es importante para el proceso de montaje de la partícula viral. Consistente con esta conclusión, en los experimentos de control, el TMV no se ensamblará sobre sustratos moldeados o recubiertos con MHA (diámetro de punto de 1 μm), incluso después de exposición de la plantilla a una solución de PBS del virus durante 48 horas.

Para proveer evidencia adicional para la identidad química de las estructuras tubulares del virus de la imagen obtenida por el AFM, tratamos los arreglos individuales del virus con una solución de PBS de un antisuero contra TMV (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH 7) a 37°C durante 30 minutos, se enjuagan los sustratos con solución PSB 10 mM y luego se los seca bajo una corriente de N_2 . Una comparación de las imágenes del AFM del sustrato antes y después de la incubación con anticuerpo que muestra un gran incremento de aproximadamente 9 nm (Figura 4c y 4d; ver también la Figura 7). Este incremento es consistente con la altura del anticuerpo (Figura 4b) y por lo tanto, la presencia de partículas del TMV sobre los arreglos. Se generaron arreglos de anticuerpo utilizando primero DPN para moldear líneas rectangulares de MHA con dimensiones de la función de 350 nm x 110 nm. El área alrededor de estos rasgos fue pasivada con PEGSH durante 30 minutos, seguido por un copioso enjuague con etanol para inhibir enlazamiento no específico. Finalmente se incubó el antisuero con TMV con el sustrato pasivado de MHA a 4°C durante 24 horas. Para más detalles ver la referencia [8].

Obsérvese que el incremento esperado de altura por enlazamiento del anticuerpo fue modelado independientemente y medido utilizando adsorción directa del anticuerpo sobre un arreglo de MHA (Figura 4b). Este enfoque ha sido utilizado para estudiar eventos de enlazamiento de proteína en el contexto de otros experimentos de inmovilización de proteína. [8]

En algunos casos, no todos los sitios de enlazamiento tendrán un único virus, pero sustancialmente todos los sitios de enlazamiento tendrán un único virus. En algunos casos, al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 90% de los sitios de enlazamiento tendrán un único virus. Los sitios restantes pueden tener más de una partícula viral o en algunos casos sin partícula viral.

Sección experimental:

Todo el moldeamiento con DPN se hizo con un AFM CP de ThermoMicroscopes interconectado con un software litográfico comercial (DPNwrite™, NanoInk Inc., Chicago, IL) y voladizos convencionales de Si_3N_4 (Microvoladizo A afilado de Thermo Microscopes, fuerza constante de 0,05 N/m). Se tomaron imágenes en modo de repiqueteo con un Nanoscope IIIa y un microscopio MultiMode de Digital Instruments. A menos que se indique otra cosa, todos los experimentos de modelamiento con DPN fueron realizados con una humedad relativa del 35% y 24°C con una fuerza de contacto del sustrato con la punta de 0,5 nN. Se utilizó DPN para moldear MHA sobre sustrato de oro (50 nm de Au y 10 nm de Cr sobre una oblea de silicio, Silicon Sense, Inc.). Se obtuvieron los espectros de PM-IRRAS de 2048 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} con un Thermo Nicolet, Nexus 870 con un módulo óptico Tabletop (TOM). Los valores de reflectancia diferencial de PM-IRRAS (% $\Delta R/R$) fueron convertidos a unidades de absorbancia para comparación con los datos convencionales de IRRAS.

Las siguientes referencias son útiles para la realización de la invención:

[1] U. R. Miller, D. V. Nicolau, *Microarray Technology and Its Applications*, Springer, New York, 2005.

- [2] K. Lindroos, S. Sigurdsson, K. Johansson, L. Ronnblom, A. C. Syvanen, *Nucleic Acid Res.* 2002, 30, e70 - e78.
- [3] M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, P. O. Brown, *Science* 1995, 270, 467 - 470.
- [4] R. A. Heller, M. Schena, A. Chai, D. Shalon, T. Bedilion, J. Gilmore, D. E. Woolley, R. W. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 2150 - 2155.
- 5 [5] G. MacBeath, S. L. Schreiber, *Science* 2000, 289, 1760 - 1763.
- [6] D. S. Ginger, H. Zhang, C. A. Mirkin, *Angew Chem. Int. Ed.* 2004, 43, 30 - 45.
- [7] Para un ejemplo de nanoarreglos de ADN ver: L. M. Demers, D. S. Ginger, S.-J. Park, Z. Li, S.-W. Chung, C. A. Mirkin, *Science* 2002, 296, 1836 - 1838.
- [8] Para un ejemplo de nanoarreglos de proteína ver: K.-B. Lee, S.-J. Park, C. A. Mirkin, J. C. Smith, M. Mrksich, *Science* 2002, 295, 1702 - 1705.
- 10 [9] Para un ejemplo de nanoarreglos de péptidos ver: J. Hyun, W. K. Lee, N. Nath, A. Chilkoti, S. Zauscher, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 7330 - 7335.
- [10] a) T. M. A. Wilson, R. N. Perham, *Virology* 1985, 140, 21 - 27; b) L. King, R. Leberman, *Biochim. Biophys. Acta* 1973, 322, 279 - 293.
- 15 [11] C. L. Cheung, J. A. Carnarero, B. W. Woods, T. Lin, J. E. Johnson, J. J. Yorero, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 6848 - 6849.
- [12] J. C. Smith, K.-B. Lee, Q. Wang, M. G. Finn, J. E. Johnson, M. Mrksich, C. A. Mirkin, *Nano Lett.* 2003, 3, 883 - 886.
- [13] a) M. Knez, M. P. Sumser, A. M. Bittner, C. Wege, H. Jeske, D. M. P. Hoffmann, D. M. P. Kuhnke, K. Kern, *Langmuir* 2004, 20, 441 - 447; b) H. Maeda, *Langmuir* 1997, 13, 4150 - 4161; y las referencia citadas allí.
- 20 [14] M. Guthold, M. Falvo, W. G. Matthews, S. Paulson, J. Mullin, S. Lord, D. Erie, S. Washburn, R. Superfine, F. P. Brooks Jr., R. M. Taylor II, *J. Mol. Graphics Mod.* 1999, 17, 187 - 197.
- [15] B. L. Frey, R. M. Corn, *Anal. Chem.* 1996, 68, 3187 - 3193.
- [16] R. D. B. Fraser, *Nature* 1952, 20, 491.
- 25 [18] G. Basu, M. Allen, D. Willits, M. Young, T. Douglas, *J. Biol. Inorg. Chem.* 2003, 8, 721 - 725.
- [19] a) W. Shenton, T. Douglas, M. Young, G. Stubbs, S. Mann, *Adv. Mater.* 1999, 11, 253-256; b) E. Dujardin, C. Peet, G. Stubbs, J. M. Culver, S. Mann, *Nano Lett.* 2003,3,413-417; c) M. Knez, A. M. Bittner, F. Boes, C. Wege, H. Jeske, E. Mai, K. Kern, *Nano Lett.* 2003, 3, 1079 - 1082.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un arreglo que comprende: una superficie de sustrato, en donde la superficie del sustrato incluye sitios de enlazamiento para una partícula biológica y también sitios que no enlazan la partícula biológica, caracterizado porque dichos sitios de enlazamiento incluyen sitios de enlazamiento de iones metálicos, o sitios de enlazamiento para el metal catiónico divalente, en donde los sitios de enlazamiento sobre la superficie de sustrato tienen cada uno una forma y un tamaño; y una partícula biológica dispuesta sobre cada uno de los sitios de enlazamiento, caracterizada porque la partícula biológica es una proteína, un anticuerpo, o una célula.
- 10 2. El arreglo de acuerdo a la reivindicación 1, en donde la partícula biológica asume una orientación específica.
- 15 3. Un método para elaborar un arreglo que comprende la combinación de etapas: proveer una superficie de un sustrato, modificar la superficie del sustrato para proveer sitios de enlazamiento para la partícula biológica y también sitios que no enlazan ninguna partícula biológica, en donde dichos sitios de enlazamiento incluyen sitios de enlazamiento de iones metálicos, o sitios de enlazamiento de metales catiónicos divalentes, enlazándose la partícula biológica a los sitios de enlazamiento para la partícula biológica de tal manera que sustancialmente únicamente una partícula biológica se enlaza a cada sitio, caracterizado porque la partícula biológica es una proteína, un anticuerpo, o una célula.
- 20 4. El método de acuerdo a la reivindicación 3, en donde los sitios de enlazamiento para la partícula biológica tienen una dimensión lateral entre 5 μm y 1 μm , o entre 1 μm y 500 nm, o entre 500 nm y 300 nm, o entre 300 nm y 100 nm, o inferior a 100 nm, preferiblemente menor a 50 nm, o aproximadamente menor a un μm , o proporcionan un área superficial aproximadamente menor a 100.000 nm cuadrados para cada sitio.
- 25 5. El método de acuerdo a la reivindicación 4, en donde los sitios de enlazamiento para la partícula biológica tiene la forma de un círculo, un cuadrado, o un rectángulo, o en donde los sitios de enlazamiento tiene una forma lineal o una curvilínea.
- 30 6. El método de acuerdo a la reivindicación 5, en donde los sitios rectangulares están entre 600 nm x 200 nm y 500 nm x 180 nm, o entre 500 nm x 180 nm y 400 nm x 150 nm, o entre 400 nm x 150 nm y 350 nm x 110 nm en longitud y ancho.
- 35 7. El método de acuerdo a la reivindicación 5, en donde los sitios con forma de punto están entre 1000 nm y 500 nm de diámetro, preferiblemente entre 500 nm y 350 nm o entre 350 nm y 100 nm de diámetro, más preferiblemente menor a 100 nm de diámetro.

40

45

50

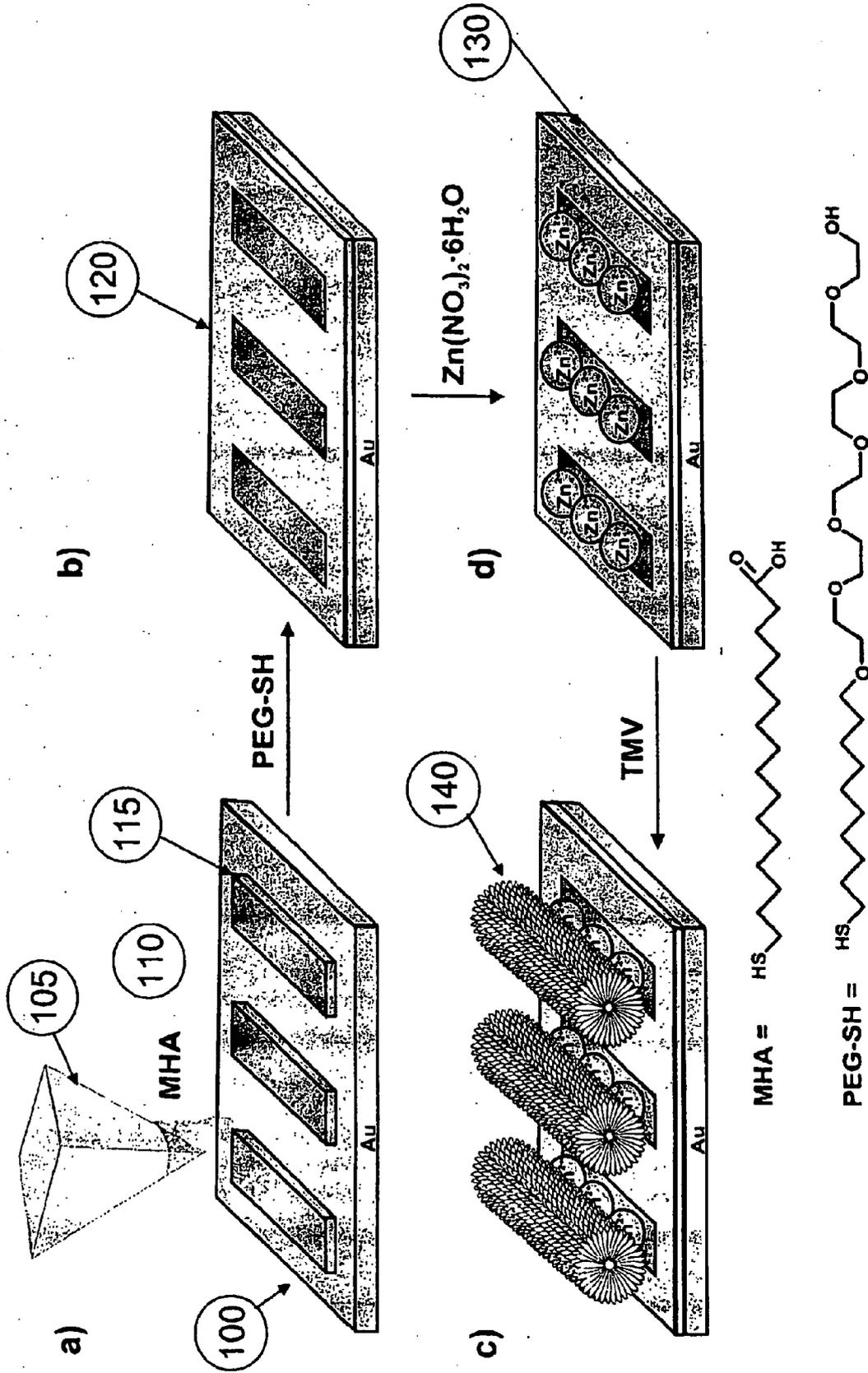


Figura 1

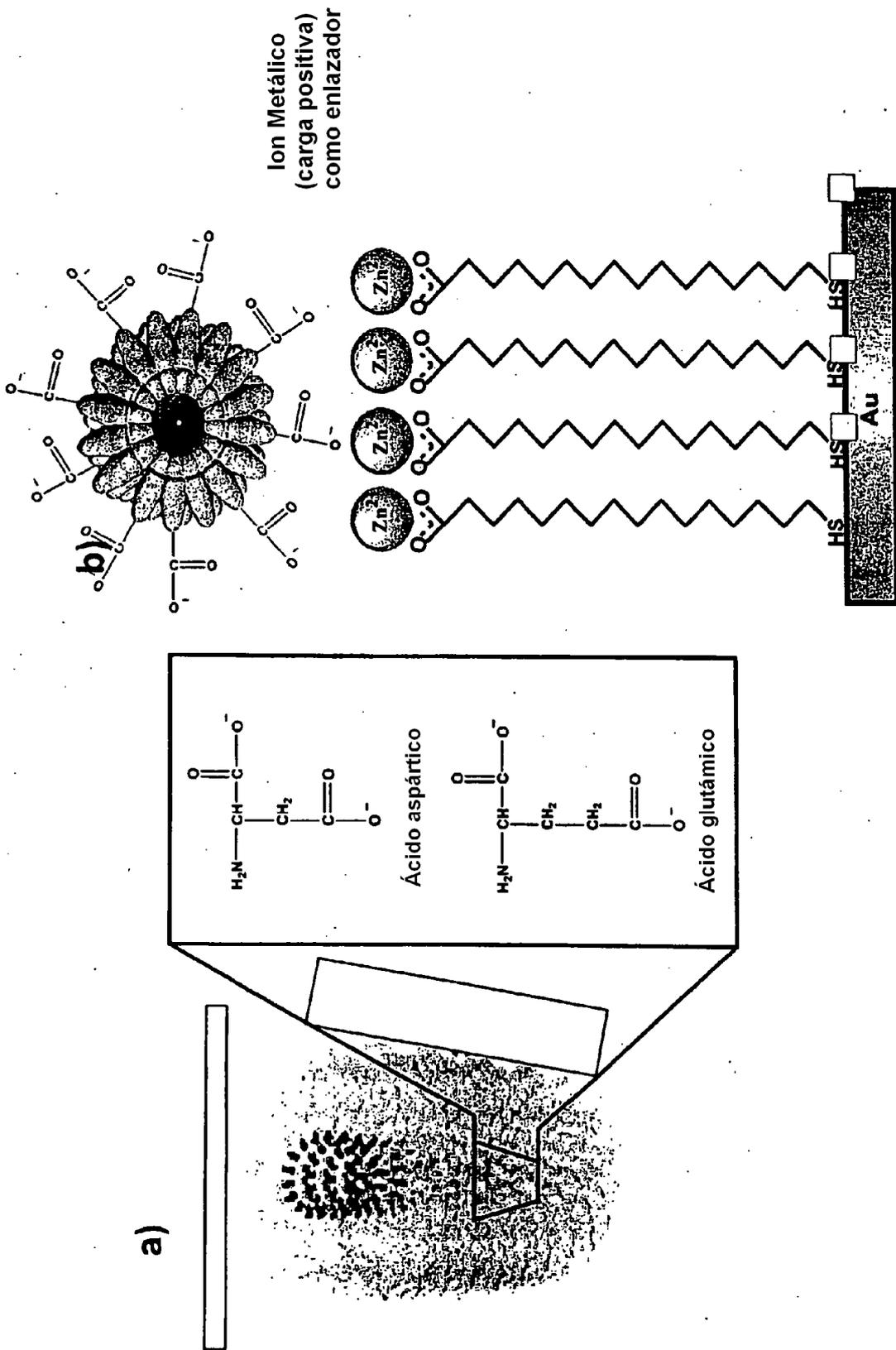


Figura 2

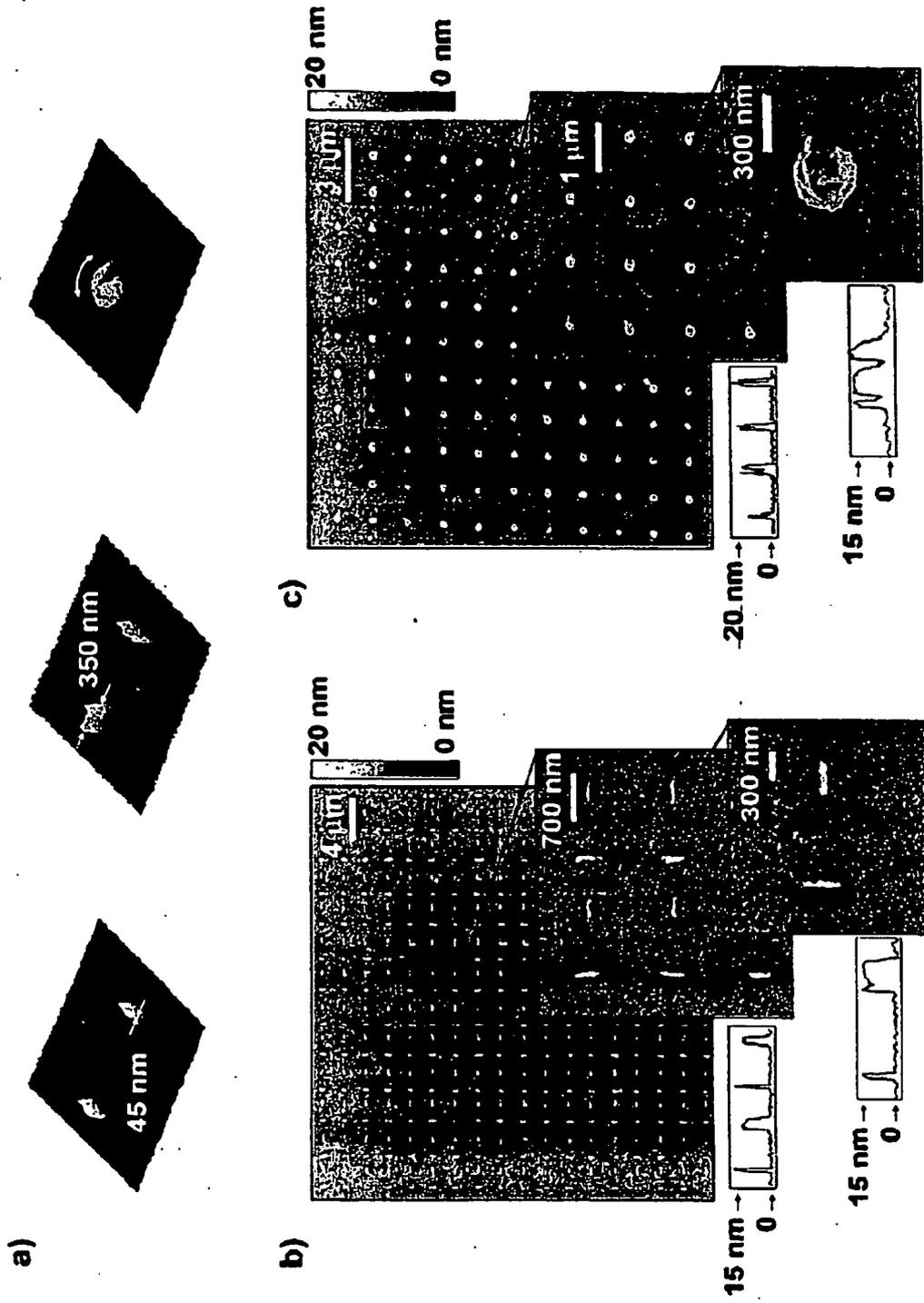
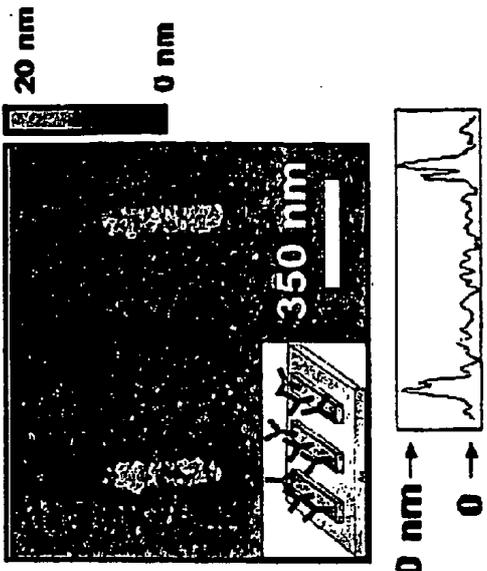
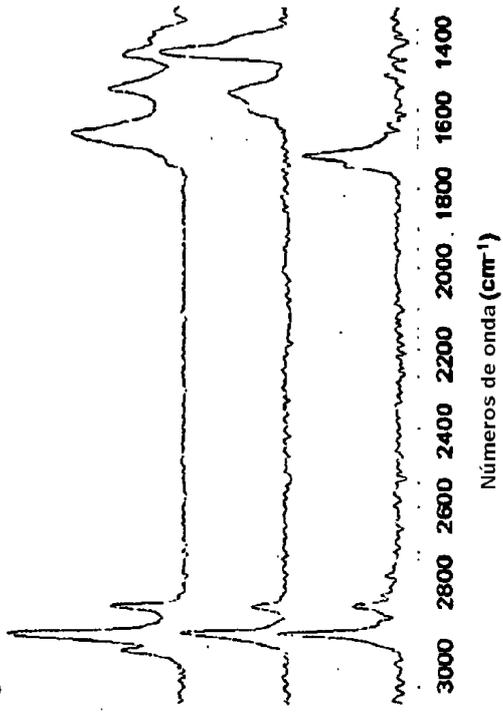


Figura 3

a) b) c) d)



a) b) c) d)

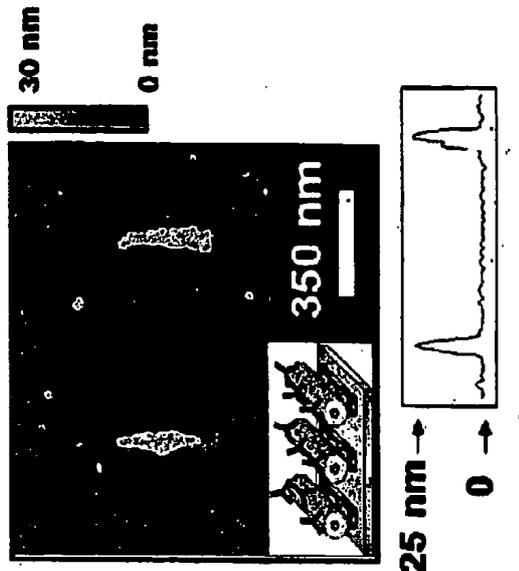
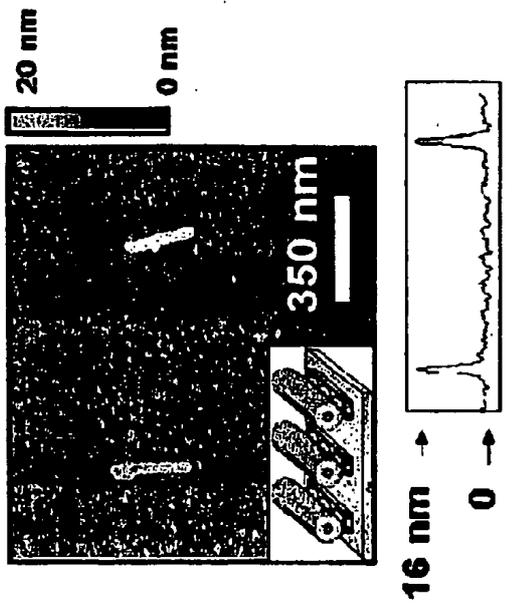


Figura 4

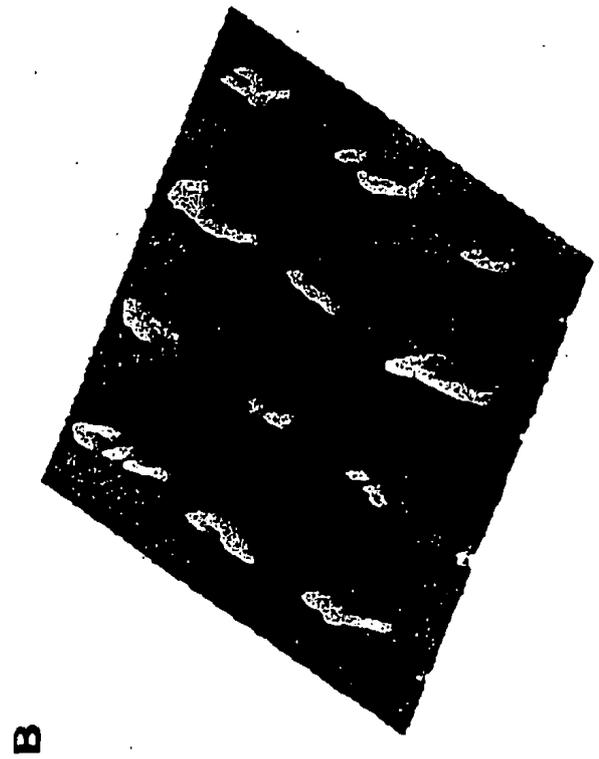
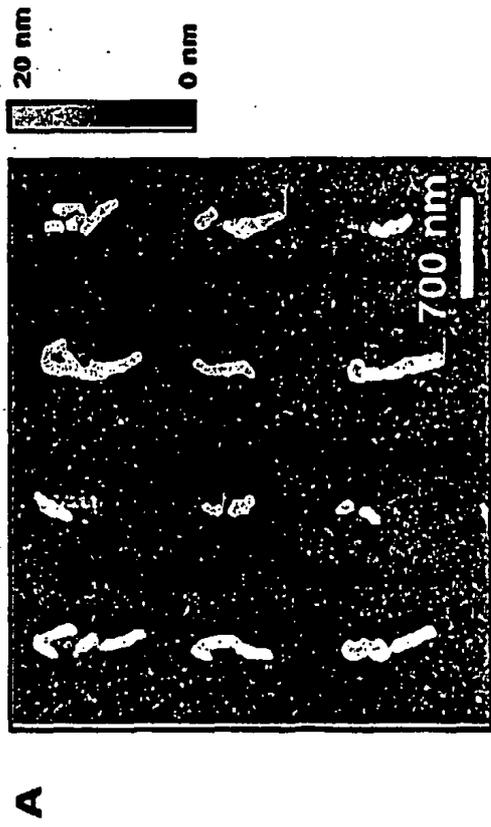


Figura 5

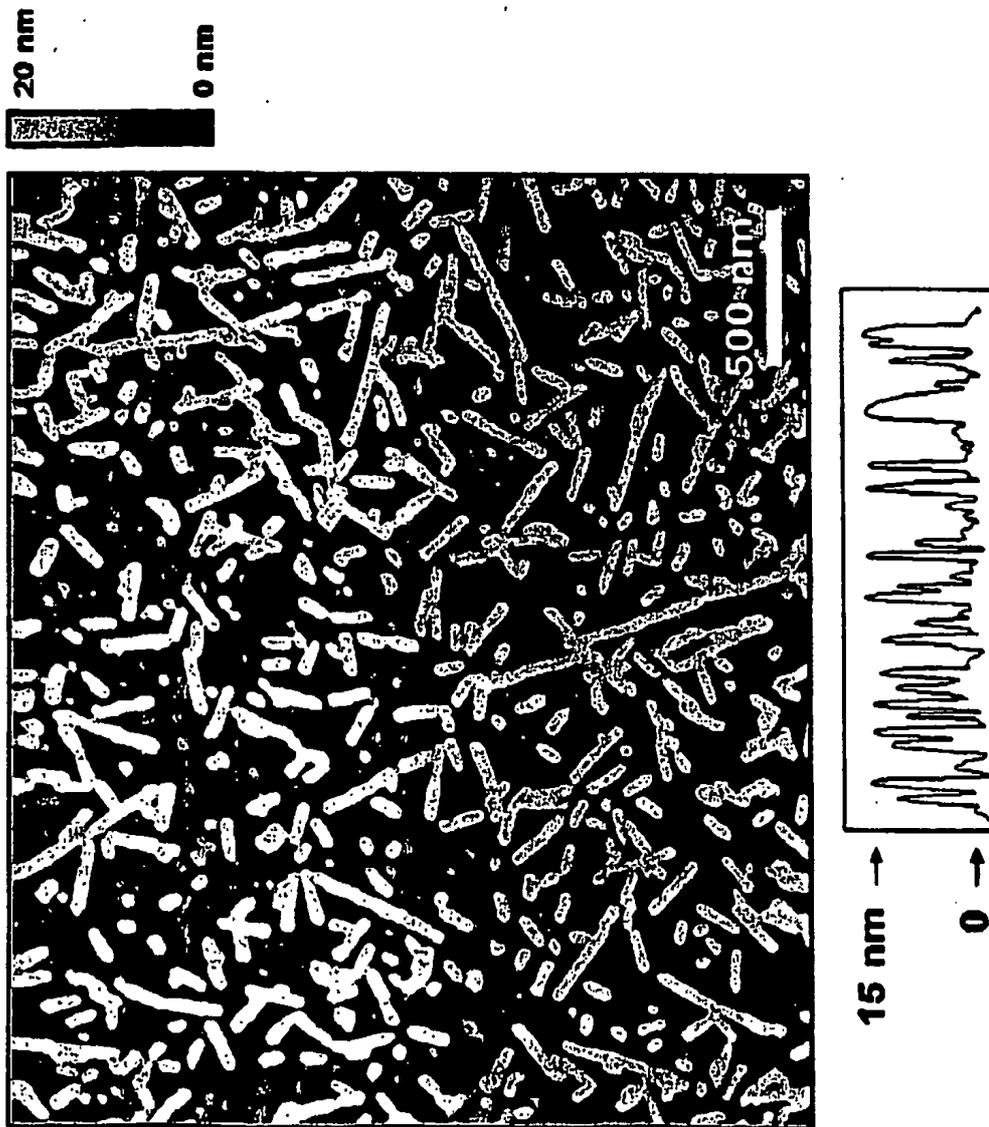


Figura 6

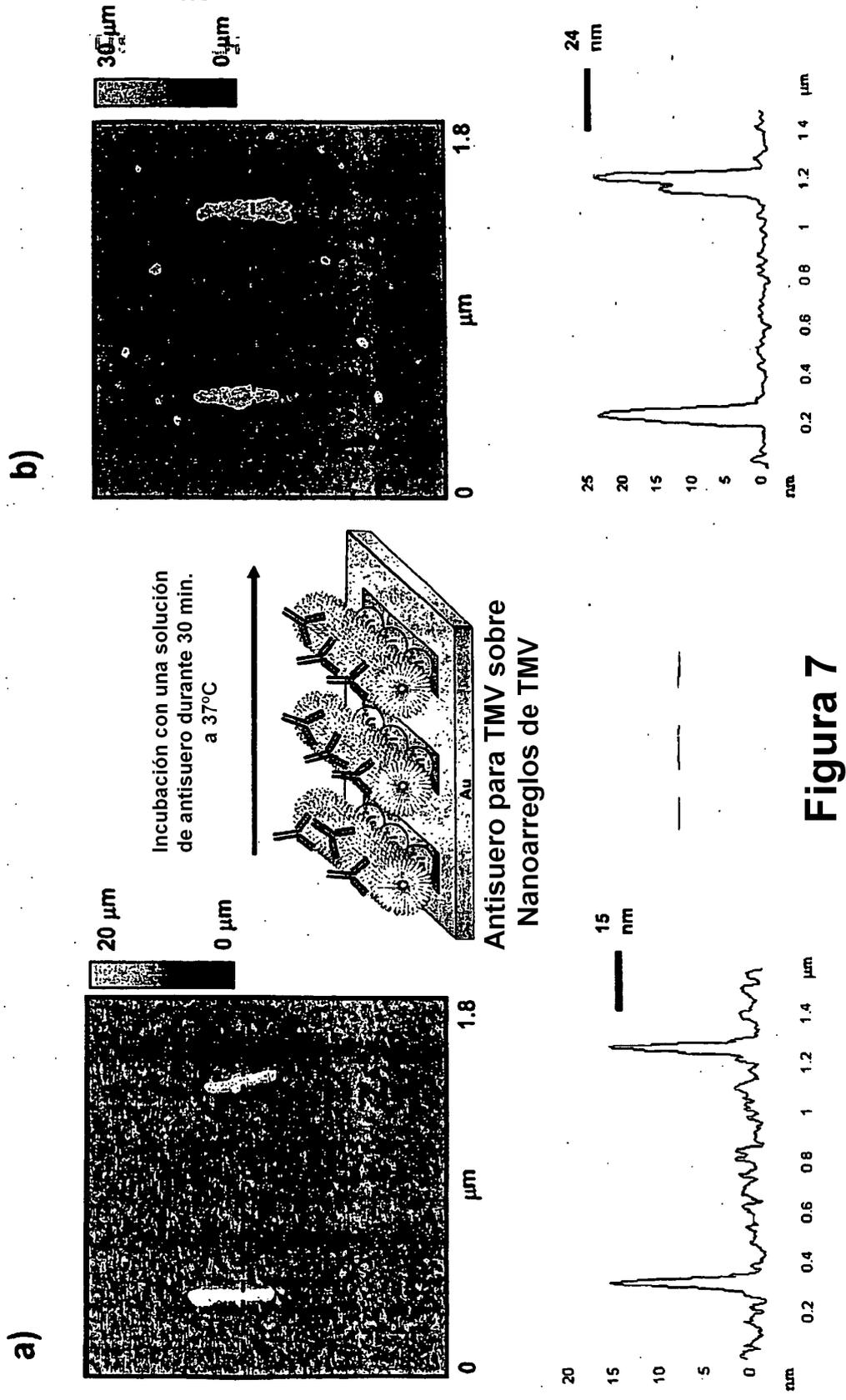


Figura 7

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 20030068446 A1 [0005]
- US 60712432 B, Mirkin [0014]
- US 20030068446 A, Mirkin [0034] [0037]
- US 5932102 A [0035]
- US 6942802 A [0035]
- US 6635311 B, Mirkin [0047]
- US 6827979 B, Mirkin [0047]
- US 6887443 B, Liu [0047]
- US 11480557 B, Mirkin [0049]

Literatura citada en la descripción que no es de patente:

- Nanoarrays of single virus particles. **Vega et al.** Angewandte Chemie. International Edition. VCH Verlag, 22 August 2005, vol. 44, 6013 - 6015 [0004]
- **Rozhok et al.** Methods for Fabricating Microarrays of Motile Bacteria. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, April 2005, 445 - 451 [0006]
- **Rafael A. Vega ; Daniel Maspoch ; Khalid Salaita ; Chad A. Mirkin.** Nanoarrays of Single Virus Particles. Angew. Chem. Int. Ed., 2005, vol. 44 (2 - 4), 6013 - 6015 [0015]
- **Cann, A. J.** Principles of Modern Virology. Academic Press, 1993 [0018]
- Structural Biology of Viruses. Oxford University Press, 1997 [0018]
- **R. C. Bohinski.** Modern Concepts in BioChemistry. 1983 [0018]
- Genetically Engineered Viruses. 2001 [0027]
- **Cotton ; Wilkinson.** Advanced Inorganic Chemistry. 1980 [0031]
- Direct-Write Technologies for Rapid Prototyping Applications. Academic, 2002 [0045]
- **Ginger et al.** Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2004, vol. 43, 30 - 45 [0047]
- **U. R. Miller ; D. V. Nicolau.** Microarray Technology and Its Applications. Springer, 2005 [0073]
- **K. Lindroos ; S. Sigurdsson ; K. Johansson ; L. Ronnblom ; A. C. Syvanen.** Nucleic Acid Res., 2002, vol. 30, e70 - e78 [0073]
- **M. Schena ; D. Shalon ; R. W. Davis ; P. O. Brown.** Science, 1995, vol. 270, 467 - 470 [0073]
- **R. A. Heller ; M. Schena ; A. Chai ; D. Shalon ; T. Bedilion ; J. Gilmore ; D. E. Woolley ; R. W. Davis.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, vol. 94, 2150 - 2155 [0073]
- **G. MacBeath ; S. L. Schreiber.** Science, 2000, vol. 289, 1760 - 1763 [0073]
- **D. S. Ginger ; H. Zhang ; C. A. Mirkin.** Angew Chem. Int. Ed., 2004, vol. 43, 30 - 45 [0073]
- **L. M. Demers ; D. S. Ginger ; S.-J. Park ; Z. Li ; S.-W. Chung ; C. A. Mirkin.** Science, 2002, vol. 296, 1836 - 1838 [0073]
- **K.-B. Lee ; S.-J. Park ; C. A. Mirkin ; J. C. Smith ; M. Mrksich.** Science, 2002, vol. 295, 1702 - 1705 [0073]
- **J. Hyun ; W. K. Lee ; N. Nath ; A. Chilkoti ; S. Zauscher.** J. Am. Chem. Soc., 2004, vol. 126, 7330 - 7335 [0073]
- **T. M. A. Wilson ; R. N. Perham.** Virology, 1985, vol. 140, 21 - 27 [0073]
- **L. King ; R. Leberman.** Biochim. Biophys. Acta, 1973, vol. 322, 279 - 293 [0073]
- **C. L. Cheung ; J. A. Carnarero ; B. W. Woods ; T. Lin ; J. E. Johnson ; J. J. Yorero.** J. Am. Chem. Soc., 2003, vol. 125, 6848 - 6849 [0073]
- **J. C. Smith ; K.-B. Lee ; Q. Wang ; M. G. Finn ; J. E. Johnson ; M. Mrksich ; C. A. Mirkin.** Nano Lett., 2003, vol. 3, 883 - 886 [0073]
- **M. Knez ; M. P. Sumser ; A. M. Bittner ; C. Wege ; H. Jeske ; D. M. P. Hoffmann ; D. M. P. Kuhnke ; K. Kern.** Langmuir, 2004, vol. 20, 441 - 447 [0073]
- **H. Maeda.** Langmuir, 1997, vol. 13, 4150 - 4161 [0073]
- **M. Guthold ; M. Falvo ; W. G. Matthews ; S. Paulson ; J. Mullin ; S. Lord ; D. Erie ; S. Washburn ; R. Superfine ; F. P. Brooks Jr.** J. Mol. Graphics Mod., 1999, vol. 17, 187 - 197 [0073]
- **B. L. Frey ; R. M. Corn.** Anal. Chem., 1996, vol. 68, 3187 - 3193 [0073]
- **R. D. B. Fraser.** Nature, 1952, vol. 20, 491 [0073]

- **G. Basu ; M. Allen ; D. Willits ; M. Young ; T. Douglas.** J. Biol. Inorg. Chem., 2003, vol. 8, 721 - 725 **[0073]**
- **W. Shenton ; T. Douglas ; M. Young ; G. Stubbs ; S. Mann.** Adv. Mater., 1999, vol. 11, 253 - 256 **[0073]**
- **E. Dujardin ; C. Peet ; G. Stubbs ; J. M. Culver ; S. Mann.** Nano Lett., 2003, vol. 3, 413 - 417 **[0073]**
- **M. Knez; A. M. Bittner ; F. Boes ; C. Wege ; H. Jeske ; E. Mai ; K. Kern.** Nano Lett., 2003, vol. 3, 1079 - 1082 **[0073]**

5