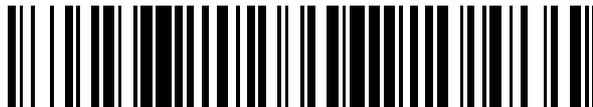


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 438**

51 Int. Cl.:

**B82B 3/00** (2006.01)

**G01N 27/447** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2012 PCT/EP2012/004035**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013 WO13071994**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2012 E 12775135 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2780279**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo para la inmovilización dirigida de nano- y microobjetos sobre una superficie de sustrato y sistemas inmovilizados obtenidos de este modo**

30 Prioridad:

**15.11.2011 DE 102011118600**

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

**03.11.2017**

73 Titular/es:

**FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR  
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN  
FORSCHUNG E.V. (100.0%)  
Hansastraße 27c  
80686 München, DE**

72 Inventor/es:

**BIER, FRANK y  
HÖLZEL, RALPH**

74 Agente/Representante:

**ESPIELL VOLART, Eduardo María**

ES 2 640 438 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

**Procedimiento y dispositivo para la inmovilización dirigida de nano- y microobjetos sobre una superficie de sustrato y sistemas inmovilizados obtenidos de este modo.**

5

La inmovilización de micro- y nanoobjetos tales como, por ejemplo, moléculas, en particular biomoléculas y moléculas biomiméticas, así como su acoplamiento a superficies de una manera ordenada y dirigida, representa un problema frecuente en los campos de la biotecnología, la química o la bioquímica. Las moléculas inmovilizadas se emplean para la construcción de revestimientos de todo tipo. En particular, en la biotecnología y en la bioanalítica se utilizan catalizadores inmovilizados o moléculas de enlace.

10

Sin embargo, los procedimientos que en la actualidad se emplean frecuentemente con este fin normalmente resultan en acoplamientos de la molécula a la respectiva superficie de una manera estática, es decir, no presentan ninguna orientación o sólo una orientación parcial y muchas de las moléculas inmovilizadas ya no son aptas para el procedimiento propiamente dicho de medición, en enlace o catálisis debido a su desfavorable orientación. Por ejemplo, si el centro activo de una enzima está orientado hacia la superficie de inmovilización, el sustrato correspondiente no podrá llegar allí, o sólo de manera muy limitada, y en consecuencia prácticamente no podrá transformarse.

15

Para aumentar la eficiencia de la partición activa (es decir, por ejemplo, del centro activo de una enzima o del lugar de enlace de un anticuerpo) en los sistemas inmovilizados, se requiere una inmovilización dirigida que mantenga a las particiones activas alejadas del lugar de acoplamiento y las mantenga activas a lo largo del procedimiento de inmovilización.

20

La ineficiencia de los métodos de inmovilización convencionales conduce, por una parte, a mayores costes, ya que se tienen que emplear más biomoléculas para la inmovilización de las que al final llegan a utilizarse efectivamente. Por otra parte, también existe un límite en la miniaturización, debido a que la proporción de moléculas activas sobre pequeñas superficies puede ser demasiado pequeña para una aplicación razonable, o bien porque las señales generadas son demasiado reducidas. Si todas o la gran mayoría de las moléculas inmovilizadas estuviesen disponibles en forma activa, también se podría obtener suficiente señal de superficies muy pequeñas.

25

Ante este trasfondo, el objetivo principal de la presente invención consistió en proveer un procedimiento nuevo y mejorado para la inmovilización dirigida de nano- y microobjetos sobre una superficie de sustrato, con el que se puedan prevenir o disminuir las desventajas descritas del estado de la técnica. Otros objetivos relacionados consistieron en proveer dispositivos apropiados para realizar el procedimiento, así como proveer los sistemas inmovilizados orientados propiamente dichos.

30

Estos objetivos se logran de acuerdo con la presente invención con el procedimiento según con la reivindicación 1, el dispositivo de acuerdo con la reivindicación 12 y el sistema inmovilizado según con la reivindicación 15. Otros aspectos adicionales y formas de realización preferentes de la presente invención son el objeto de las demás reivindicaciones.

35

El procedimiento para la inmovilización dirigida de nano- o microobjetos sobre una superficie de sustrato de acuerdo con la reivindicación 1 comprende por lo menos las siguientes etapas:

40

a) Proveer una superficie de sustrato áspera, que comprende una capa conductiva, en la que la aspereza de la superficie de sustrato se predetermina por medio de unas estructuras elevadas a escala nanométrica, que están formadas por la aplicación de una pasta con un tamaño de granos en un margen nanométrico, o mediante una aplicación química o galvánica de nanoestructuras eléctricamente conductoras, de tal manera que la superficie del sustrato presente una pluralidad de elevaciones con radios de curvatura locales dentro de en la dimensión de los objetos que se van a inmovilizar;

45

b) proveer unos nano- o microobjetos polarizables que en un campo eléctrico alterno presentan un dipolo inducido, en o cerca de la superficie del sustrato;

50

c) aplicar una tensión eléctrica alterna entre la superficie del sustrato y por lo menos un electrodo contrario, por lo que se crea un campo eléctrico alterno con gradientes de campo locales y los nano- o microobjetos polarizados preferentemente son atraídos por las elevaciones de la superficie del sustrato y son orientados con su eje de dipolo de manera paralela a las líneas del campo eléctrico.

50

El procedimiento de acuerdo con la presente invención prevé la inmovilización de moléculas en las superficies de diferentes texturas bajo el efecto de un campo eléctrico alterno. En un campo eléctrico alterno, en cada materia (este efecto también se puede escalar a lo largo de numerosas magnitudes de tamaño), por ejemplo también en macromoléculas, se inducen dipolos, con los que una molécula se puede influenciar directamente. Por medio del dipolo inducido, la molécula es orientada de manera paralela a las líneas del campo eléctrico; esto también rige para moléculas polares per se. En campos no homogéneos, sobre los dipolos actúa una fuerza que normalmente los mueve hacia la zona que posee la mayor intensidad de campo.

55

Si se emplea una superficie nano-áspera como un electrodo, en las nano-puntas de la superficie se forman fuertes gradientes de campo, en los que se atraen moléculas individuales. Solamente para los objetos tanto en lo referente a su distribución de carga como también a su geometría son esféricamente simétricos, no produciéndose ninguna orientación del objeto. Todos los objetos no esféricamente simétricos se someten a un momento de torsión que los

60

orienta con su eje de dipolo de manera paralela a las líneas de campo.

De este modo se logran, al mismo tiempo, dos efectos ventajosos:

(1) Bajo el efecto de un campo eléctrico alterno se fuerza una densificación o adsorción acelerada de las moléculas en la superficie, y

(2) todas las moléculas son orientadas en gran parte y en el caso ideal presentan sus lugares de enlace o centros activos de una manera óptima.

El efecto dielectroforético en sí ya es conocido desde hace mucho tiempo para objetos de la microscopía, tales como, por ejemplo, las partículas coloidales o las células vivas (Pohl, H. A., J. Appl. Phys. 22, 869 (1951); Pohl, H. A., Dielectrophoresis, 1978, Cambridge University Press). El requisito previo es un dipolo inducido que se induce en el objeto mismo o en el sistema general formado por el objeto y su entorno inmediato. Esto último incluye la nube de iones contrarios que se forma en agentes disolventes polares, que igualmente se polariza y es orientado. Hölzel et al. (Physical Review Letters, 128102-1 (2005)) demostraron que este efecto también es aplicable a temperatura ambiente a moléculas individuales (Hölzel et al. 2005). Yamamoto y Fujii (Nanotechnology 18, 495503 (2007)) describen la posible inmovilización de biomoléculas individuales en 7 ó 9 nanoelectrodos con forma de aguja que sobresalen de la superficie del sustrato. Debido a esto, la superficie del sustrato comprende elevaciones con radios de curvatura locales en la dimensión de los objetos que se van a inmovilizar. En ninguno de los dos estudios se ha descrito o propuesto la inmovilización dirigida de una pluralidad de moléculas funcionales sobre una superficie de sustrato completa o ampliamente áspera para optimizar su eficacia.

Como sustrato, de acuerdo con la presente invención, en principio, se puede utilizar cualquier sustrato que comprenda una capa superficial conductiva y que presente la aspereza requerida o que se pueda dotar de la misma. Algunos materiales de sustrato apropiados y preferentes son metales, por ejemplo, oro, silicio, óxidos de metal, por ejemplo, óxido de indio-estaño.

Debido a que se trata de un efecto de campo, que no presupone ningún flujo de corriente en el espacio entre la superficie y el electrodo contrario, la capa superficial conductiva con las elevaciones también puede estar revestida con una delgada capa de aislamiento de unos pocos nm de espesor. Preferentemente, el espesor de la capa de aislamiento se ubica dentro del margen de 1-10 nm.

Los espesores que excedieran sustancialmente de las dimensiones de los radios de curvatura de las asperezas superficiales, reducirían de una manera notable los efectos de campo, debido a que así no serían accesibles las zonas espaciales de la inhomogeneidad de campo más intensa para los objetos que se van a inmovilizar. Aunque tales espesores no anulan la efectividad del campo, si la reducen considerablemente.

De acuerdo con la presente invención, la aspereza de la superficie del sustrato se determina por medio de estructuras elevadas a escala nanométrica, en particular dentro de un margen de 1-100 nm, preferentemente de 1-50 nm.

De acuerdo con la presente invención, este tipo de estructuras a escala nanométrica de la superficie del sustrato se forman mediante la aplicación de una pasta con un tamaño de granos ubicado en el margen nanométrico, o bien mediante la aplicación química o galvánica de nanoestructuras eléctricamente conductivas, preferentemente de nanoestructuras autoensamblantes. Las estructuras apropiadas pueden ser ordenadas o desordenadas.

Estas estructuras pueden generarse mediante el crecimiento a partir del material o por acumulación a partir de un sol o solución (coloidal). Procedimientos apropiados ya son conocidos en el estado de la técnica (por ejemplo, Garner, D. M. y Zamin, N. Z. Mohd., Tech. Digest 17th Int. Vacuum Nanoelectronics Conf., 270 (2004)). Las estructuras resultantes, por ejemplo, nanotúbulos, nanobastoncitos o nanoesferas, resultan entonces en una inhomogeneidad de campo en la que se presenta un efecto dieléctrico (DEP). La generación de una capa de este tipo ya podría lograrse con el DEP, si se efectúa una separación de, por ejemplo, nanotúbulos preformados bajo influencia del campo.

El número de elevaciones sobre la superficie del sustrato áspero de acuerdo con la presente invención normalmente es de por lo menos 100, preferentemente de por lo menos 1000, por lo menos 10.000 o más.

Normalmente, las elevaciones de la superficie del sustrato presentan una distancia media ubicada en el margen de 1-2000 nm, preferentemente 1-200 nm, por ejemplo, 1-50 nm.

En una forma de realización preferente de la presente invención, la aspereza deseada se logra mediante el uso de nanopartículas de metal, en particular nanopartículas de oro, preferentemente del tamaño de 1-50 nm. Estas partículas se fijan sobre una base conductiva de cualquier naturaleza deseada, preferentemente de un material de sustrato como se ha mencionado más arriba, en forma de monocapa. De esta manera, la superficie se vuelve "nanoáspera" en el sentido previamente descrito y localmente presenta numerosos lugares con un radio de curvatura estrecho, a los que se atraen las moléculas. La capa también puede estar formada por varias monocapas, si se asegura que la aspereza no se elimina debido a la condensación de las partículas.

En otra disposición particular de la presente invención, las elevaciones de la superficie del sustrato, que sirven como puntos de inmovilización, se proveen mediante una disposición (array) con una pluralidad de nanoelectrodos.

Una disposición o patrón definido de este tipo de tales puntas de electrodos nanométricos pueden producirse, por ejemplo, por medio de técnicas conocidas de la microelectrónica.

Debido a que se trata de un efecto de campo, que no presupone ningún flujo de corriente en el espacio entre la disposición de electrodos y el electrodo contrario, los electrodos también pueden estar revestidos por una delgada capa de aislamiento con un espesor de pocos nm.

Este tipo de disposiciones de nanoelectrodos pueden producirse con distancias entre electrodos que sean

suficientemente grandes como para permitir, bajo observación, una discriminación inequívoca entre casos en diferentes electrodos de la disposición. Si se emplean moléculas fluorescentes o moléculas (o nanopartículas) con fluorocromos adheridos (etiquetas), se obtiene una visibilidad directa. Por lo tanto, los nanoelectrodos empleados de acuerdo con la presente invención podrían ser la base para el estudio de moléculas individuales y de pequeños conjuntos estadísticos.

Una realización práctica con anticuerpos marcados con fluorescencia como nanoobjetos se representa en el ejemplo 1 y en la Fig. 1.

Sin embargo, estas y otras aplicaciones no se limitan a disposiciones de nanoelectrodos en particular, sino que pueden realizarse con cada superficie nanoáspera según se define en este documento.

De acuerdo con lo descrito más arriba y en el siguiente ejemplo 1, las intensidades de campo locales del campo eléctrico alterno dependen fundamentalmente de la geometría y de la topología de la superficie del sustrato. En el procedimiento de acuerdo con la presente invención, las intensidades de campo más elevadas del campo eléctrico alterno normalmente se ubican en el margen de 0,5 MV/m a 10 MV/m.

Normalmente, la aplicación del campo eléctrico alterno se produce con una tensión alterna dispuesta dentro del margen de 5 a 100 V y una frecuencia ubicada en el margen de 1 kHz a 20 MHz, preferentemente entre 100 kHz y 2 MHz.

Los objetos que se van a inmovilizar de acuerdo con la presente invención se seleccionan preferentemente del grupo formado por moléculas, en particular biomoléculas, acumulaciones de moléculas, nanoagregados, nano- y micropartículas.

Las biomoléculas pueden comprender, por ejemplo, proteínas, complejos de proteínas y péptidos, en particular anticuerpos o enzimas, ácidos nucleicos, lípidos o sacáridos.

En una forma particular de realización, los objetos que se van a inmovilizar son macromoléculas funcionales o agregados de moléculas, por ejemplo enzimas, anticuerpos u otras moléculas de enlace específico, o catalizadores, por ejemplo, biocatalizadores.

En este caso es preferente que la orientación de las macromoléculas o los agregados de moléculas en el campo eléctrico se efectúe de tal manera, que los centros activos o los lugares de enlace funcionales se mantengan accesibles después de la inmovilización.

Para asegurar esto, las moléculas funcionales después de la inmovilización pueden someterse a una prueba de función o de actividad y los candidatos no apropiados pueden ser o bien separados o modificados mediante ingeniería molecular. A este respecto, la polarización y/o la orientación de aquellas macromoléculas o agregados de moléculas que no alcancen un valor de referencia predeterminado en la prueba de función o actividad, pueden modificarse cambiando la distribución de carga y/o la geometría molecular, por ejemplo, mediante la introducción o la remoción de un sustituyente que no lleve ninguna carga, hasta que se haya alcanzado la polarización y/o la orientación deseada.

Así, por ejemplo, mediante la introducción o la remoción apropiada de un aminoácido cargado en una proteína que se va a orientar, o mediante la modificación de la geometría molecular, se puede invertir u orientar la polarización.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un dispositivo para realizar el procedimiento de acuerdo con la presente invención.

Un dispositivo de acuerdo con la presente invención para la inmovilización dirigida de nano- o microobjetos sobre una superficie de sustrato comprende por lo menos:

a) una superficie de sustrato áspera, que comprende una capa conductiva, en la que la aspereza de la superficie del sustrato es predeterminada por medio de estructuras elevadas a escala nanométrica, formadas mediante la aplicación de una pasta con un tamaño de granos ubicado en el margen nanométrico, o bien mediante la aplicación química o galvánica de nanoestructuras eléctricamente conductivas, de tal manera que la superficie del sustrato presenta una pluralidad de elevaciones, es decir, por lo menos 100, preferentemente por lo menos 1000 o por lo menos 10.000 o más, con radios de curvatura locales ubicados dentro de la dimensión de los objetos que se van a inmovilizar;

b) por lo menos un electrodo contrario en la proximidad de la superficie del sustrato; y

c) medios para aplicar una tensión eléctrica alterna entre la superficie del sustrato y el por lo menos un electrodo contrario.

La capa conductiva puede estar libremente expuesta o revestida con una delgada película aislante, preferentemente con un espesor de 1-10 nm.

En una forma particular de realización de este dispositivo, la aspereza de la superficie del sustrato se crea mediante la aplicación de nanopartículas de metal.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una disposición inmovilizada de nano- o microobjetos polarizados sobre una superficie de sustrato áspera, obtenida por medio del procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-14, que se caracteriza adicionalmente porque una pluralidad de nano- o microobjetos, es decir, por lo menos 100, preferentemente por lo menos 1000, o por lo menos 10.000 o más, se encuentran en forma orientada sobre la superficie del sustrato.

En una forma de realización aún más particular de la presente invención, la disposición inmovilizada de nano- o microobjetos se caracteriza porque la disposición se encuentra en un campo eléctrico alterno.

Sin embargo, también es posible que mediante una selección apropiada de la intensidad del campo eléctrico alterno se logre una inmovilización permanente de los nano- y microobjetos sobre la superficie del sustrato, de tal manera

que la disposición y orientación también se mantenga después de que se desconecte el campo eléctrico.

Como ya se ha mencionado más arriba, la inmovilización dirigida de nano- y microobjetos, en particular biomoléculas, tiene una importancia sobresaliente en la analítica, en particular en la bioanalítica, el diagnóstico, el análisis biosensorio y en la aplicación de catalizadores moleculares, por ejemplo, en biocélulas de combustible. De manera correspondiente, un aspecto importante de la presente invención se refiere a la aplicación de los procedimientos, dispositivos y sistemas inmovilizados de acuerdo con la presente invención en todos estos campos. Mediante la orientación controlada de las moléculas se aumenta en gran medida la eficiencia de los procedimientos mencionados. En la bioanalítica, esto resulta en una mayor sensibilidad, o también en un mayor potencial de miniaturización, por ejemplo, para microdisposiciones, submicroelectrodos o biosensores autónomos altamente integrados. En la catálisis, en particular también en la catálisis bioquímica, se pueden transitar nuevos caminos en el campo de la electrónica molecular, mediante la orientación dirigida de los centros activos.

### **DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La **Fig. 1** muestra la concentración e inmovilización de moléculas de anticuerpos marcadas con fluorescencia en el campo eléctrico alterno en una disposición de nanoelectrodos. a) Antes de la aplicación del campo, b) después de 45 s de aplicación del campo. Distancia entre electrodos 1,8  $\mu\text{m}$ .

La **Fig. 2** muestra la distribución espacial del gradiente de campo eléctrico  $|\mathbf{E}^2|$ . a) Desarrollo del campo dentro del plano xy directamente por encima de electrodos de aguja cilíndricos, como se usaron en el experimento correspondiente a la Fig. 1. b) Desarrollo del campo dentro del plano xz de manera central a través de un electrodo de aguja. En la representación en escala de grises, el color negro representa el gradiente de campo más pequeño, mientras que el color blanco representa el más grande.

### **EJEMPLO 1**

#### *Inmovilización dirigida en una disposición de nanoelectrodos sobre una superficie de sustrato*

Los anticuerpos anti-ratón (IgE, Dy634-marcado) fue disuelto en agua purificada y aplicados sobre una disposición de electrodos metálicos cilíndricos embutidos en dióxido de silicio, cuyos bordes superiores estaban alineados con la superficie del dióxido de silicio y que se encontraban todos en el mismo potencial eléctrico. El electrodo contrario transparente se encontraba aproximadamente a 100  $\mu\text{m}$  por encima de la superficie de los electrodos. Se aplicó una tensión alterna de 35 V a la frecuencia de 100 kHz. La Fig. 1 demuestra los resultados obtenidos. Mientras que la imagen de la izquierda, antes de la aplicación del campo, muestra casi exclusivamente sólo una baja fluorescencia de fondo, en la imagen de la derecha, después de 45 s de actividad del campo, la concentración de las moléculas de anticuerpo en los electrodos se puede reconocer fácilmente.

Con una aplicación más prolongada del campo, aumenta la intensidad de la fluorescencia en los electrodos. Esto sucede mientras sea mayor la cantidad de fluoróforos atraídos sobre los electrodos que la de los que se vuelven invisibles por blanqueo. Finalmente, el volumen se reduce en tal medida que mediante el blanqueo de los fluoróforos inmovilizados, ligados a los anticuerpos, se reduce la intensidad de la fluorescencia.

El efecto electroforético es proporcional al gradiente del cuadrado de la intensidad de campo eléctrico  $|\mathbf{E}^2|$  (Pohl, H. A., Dielectrophoresis, 1978, Cambridge University Press). Éste a su vez es proporcional a la diferencia de potencial llevada al cuadrado entre la disposición de nanoelectrodos y el electrodo contrario, así como inversamente proporcional a la distancia llevada al cuadrado entre estos electrodos. Adicionalmente, es fuertemente dependiente de la geometría de los nanoelectrodos. En una simulación de campo, se puede calcular la electricidad del campo eléctrico  $\mathbf{E}$  como también el gradiente  $|\mathbf{E}^2|$ . A este respecto, se demuestra (Fig. 2) que el efecto de campo alcanza su mayor intensidad en la proximidad inmediata del borde superior de los nanoelectrodos cilíndricos empleados en la Fig. 1.

De la geometría empleada para estos experimentos, bajo la simple suposición de un campo homogéneo, de la tensión aplicada de 35 V y una distancia entre electrodos de 100  $\mu\text{m}$  resultaría una intensidad de campo eléctrico de 0,35 MV/m. Sin embargo, la simulación de campo demuestra que cerca de los nanoelectrodos la intensidad de campo eléctrico alcanza un valor aproximadamente 15 veces mayor, es decir, aproximadamente 5 MV/m. Los valores para el gradiente de campo se ubican allí entre aproximadamente  $10^{17}$  y  $10^{20}$   $\text{V}^2\text{m}^{-3}$  con un radio de curvatura en los bordes de 50 nm. Para una proteína con una constante de difusión en el orden de magnitud de  $50 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  y un tiempo de acción experimental de aproximadamente 1 s, se puede calcular para la inmovilización un valor de umbral del gradiente de campo de aproximadamente  $10^{18}$   $\text{V}^2\text{m}^{-3}$ . Esto significa que se inmovilizan aquellas moléculas que se encuentran dentro del margen espacial alrededor de los nanoelectrodos, en el que se sobrepasa este valor.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la inmovilización dirigida de nano- o microobjetos sobre una superficie de sustrato, que comprende:
- 10 a) Proveer una superficie de sustrato áspera, que comprende una capa conductiva, en la que la aspereza de la superficie del sustrato se predetermina por medio de unas estructuras elevadas a escala nanométrica, que están formadas por la aplicación de una pasta con un tamaño de granos ubicado en un margen nanométrico o mediante una aplicación química o galvánica de nanoestructuras eléctricamente conductoras, de tal manera que la superficie del sustrato presente una pluralidad de elevaciones con radios de curvatura locales dentro de la dimensión de los objetos que se van a inmovilizar,
- 15 b) proveer unos nano- o microobjetos polarizables, que en un campo eléctrico alterno presentan un dipolo inducido, en o cerca de la superficie del sustrato,
- c) aplicar una tensión eléctrica alterna entre la superficie del sustrato y por lo menos un electrodo contrario, por lo que se crea un campo eléctrico alterno con gradientes de campo locales y los nano- o microobjetos polarizados son atraídos de manera preferente por las elevaciones de la superficie del sustrato y son orientados con su eje de dipolo de manera paralela a las líneas del campo eléctrico.
- 20 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** las mayores intensidades de campo del campo eléctrico alterno se ubican en el margen de 0,5 MV/m a 10 MV/m, y/o porque la aplicación del campo eléctrico alterno se efectúa con una tensión alterna en el margen de 5 a 100 V y una frecuencia ubicada en el margen de 1 kHz a 20 MHz.
- 25 3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** el número de elevaciones es de por lo menos 100, preferentemente de por lo menos 1000, por lo menos 10.000 o más.
4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** la superficie del sustrato se provee por medio de una o varias capas de nanopartículas de metal, en particular nanopartículas de oro.
- 30 5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-4, **caracterizado porque** la superficie del sustrato presenta una pluralidad de nanoelectrodos puntuales en una disposición predeterminada.
6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-5, **caracterizado porque** las elevaciones de la superficie del sustrato presentan una distancia media ubicada en el margen de 1-2000 nm, preferentemente de 1-200 nm, más preferentemente de 1-50 nm.
- 35 7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-6, **caracterizado porque** los objetos que se van a inmovilizar son seleccionados entre el grupo compuesto de moléculas, en particular biomoléculas, acumulaciones de moléculas, nanoagregados, nano- y micropartículas.
- 40 8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado porque** las biomoléculas comprenden proteínas, complejos de proteínas y péptidos, en las que las proteínas o los péptidos son en particular anticuerpos o enzimas, así como ácidos nucleicos, lípidos o sacáridos.
- 45 9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-8, **caracterizado porque** los nano- o microobjetos inmovilizados son macromoléculas funcionales o agregados moleculares y la orientación de estas macromoléculas o agregados moleculares en el campo eléctrico se efectúa de tal manera que los centros activos o los lugares de enlace funcionales permanecen accesibles después de la inmovilización.
- 50 10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado porque** las macromoléculas funcionales o los agregados moleculares después de la inmovilización se someten a una prueba de función o de actividad, para determinar si los centros activos o los lugares de enlace funcionales siguen estando accesibles después de la inmovilización, y en el que la polarización y/u orientación de aquellas macromoléculas o agregados moleculares que no alcanzan un valor de referencia predeterminado en la prueba de función o de actividad se modifican mediante el cambio de la distribución de carga y/o de la geometría molecular, por ejemplo, mediante la introducción o la remoción de un sustituyente, que lleva una carga, hasta que se haya alcanzado la polarización y/u orientación deseada.
- 55 11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10, **caracterizado porque** las macromoléculas funcionales son enzimas, anticuerpos u otras moléculas de enlace específico, o catalizadores.
- 60 12. Dispositivo para la inmovilización dirigida de nano- o microobjetos sobre una superficie de sustrato, que comprende:

- 5 a) Una superficie de sustrato áspera, que comprende una capa conductiva, en la que la aspereza de la superficie de sustrato es predeterminada por medio de estructuras elevadas a escala nanométrica, formadas mediante la aplicación de una pasta con un tamaño de granos ubicado en el margen nanométrico o bien mediante la aplicación química o galvánica de nanoestructuras eléctricamente conductivas, de tal manera que la superficie del sustrato presenta una pluralidad de elevaciones, es decir, por lo menos 100, preferentemente por lo menos 1000 o por lo menos 10.000 o más, con radios de curvatura locales ubicados dentro de la dimensión de los objetos que se van a inmovilizar,
- 10 b) por lo menos un electrodo contrario en la proximidad de la superficie del sustrato, y  
c) medios para aplicar una tensión eléctrica alterna entre la superficie del sustrato y el por lo menos un electrodo contrario.
13. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizado porque** la aspereza de la superficie del sustrato se crea mediante la aplicación de nanopartículas de metal.
- 15 14. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 12 ó 13, o procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, **caracterizado porque** la capa conductiva está expuesta o está revestida con una capa aislante con un espesor de 1-10 nm.
- 20 15. Superficie de sustrato áspera con una disposición inmovilizada de nano- o microobjetos polarizados en un campo eléctrico alterno, obtenido mediante el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, y adicionalmente **caracterizado porque** una pluralidad de nano- o microobjetos, es decir, por lo menos 100, preferentemente por lo menos 1000 o por lo menos 10.000 o más, se encuentran dispuestos en forma orientada sobre la superficie del sustrato.



Fig. 1a

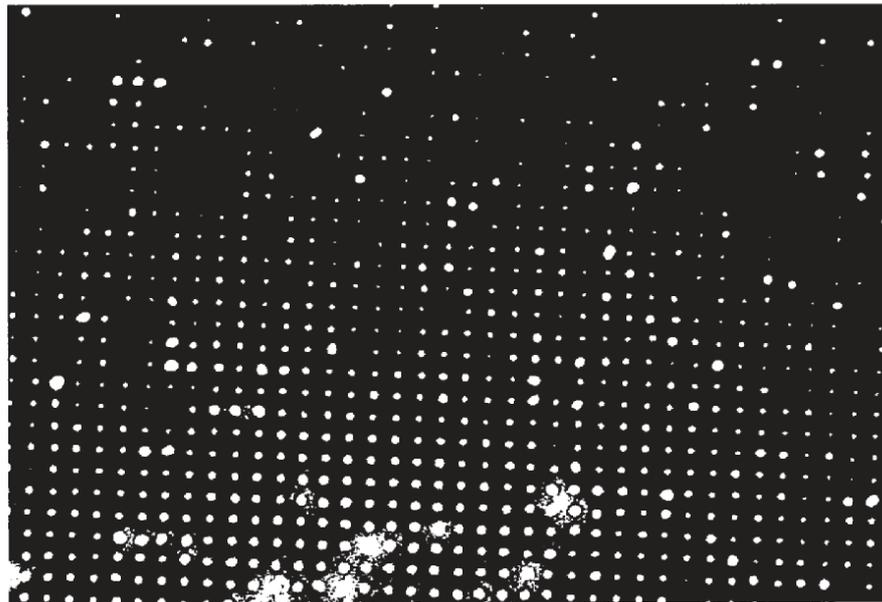


Fig. 1b

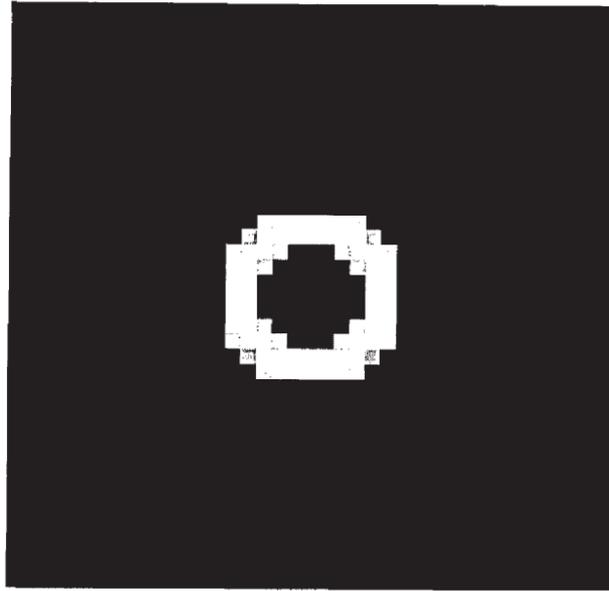


Fig. 2a

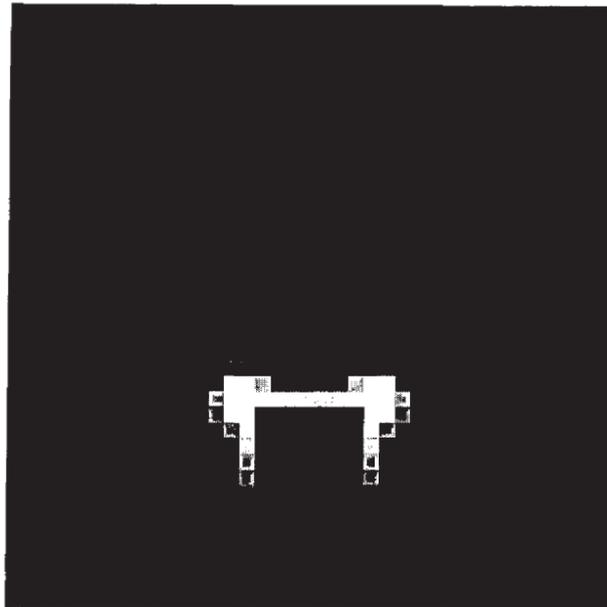


Fig. 2b

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

*Este listado de referencias citadas por el solicitante tiene como único fin la conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la EPO rechaza cualquier responsabilidad en este sentido.*

**Bibliografía no especificada en la descripción de la patente**

- **POHL, H. A.** *J. Appl. Phys.*, 1951, vol. 22, 869 [0009]
- **POHL, H. A.** *Dielectrophoresis*. Cambridge University Press, 1978 [0009] [0046]
- **DURCH HÖLZEL et al.** *Physical Review Letters*. 2005 [0009]
- **YAMAMOTO ; FUJII.** *Nanotechnology*, 2007, vol. 18 [0009]
- **GARNER, D. M. ; ZAMIN, N. Z. MOHD.** *Tech. Digest 17th Int. Vacuum Nanoelectronics Conf.*, 2004, vol. 270 [0016]