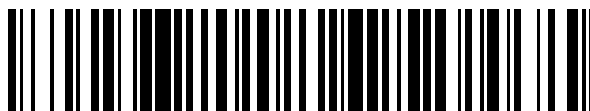


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 324**

51 Int. Cl.:

G01N 33/00 (2006.01)

B05B 17/06 (2006.01)

B05D 1/02 (2006.01)

G01N 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2006 E 06724515 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.10.2014 EP 1877773**

54 Título: **Nuevo aparato y procedimiento de recubrimiento de sustratos portadores para la detección de analitos mediante un procedimiento de detección por afinidad**

30 Prioridad:

26.04.2005 CH 7352005

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

22.12.2014

73 Titular/es:

**BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH
(100.0%)
Alfred-Nobel-Strasse 10
40789 Monheim , DE**

72 Inventor/es:

**SCHICK, EGINHARD;
UTINGER, DOMINIC y
CALONDER, CLAUDIO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 525 324 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

Nuevo aparato y procedimiento de recubrimiento de sustratos portadores para la detección de analitos mediante un procedimiento de detección por afinidad

Antecedentes técnicos de la invención

- 5 Para numerosos sectores de aplicación es necesario determinar una multiplicidad de analitos en una muestra de composición y naturaleza eventualmente complejas, por ejemplo en procedimientos de diagnóstico para determinar el estado de salud de un individuo o en la investigación y el desarrollo en el sector farmacéutico para determinar la influencia de un organismo y el modo de acción complejo del mismo mediante el suministro de compuestos biológicamente activos.
- 10 Mientras que los procedimientos de separación analíticos conocidos están, en general, optimizados para separar dentro de un periodo de tiempo lo más corto posible un número lo más elevado posible de compuestos presentes en una muestra dada según un parámetro físico-químico predefinido, tal como, por ejemplo el peso molecular o el cociente entre carga molecular y masa, los procedimientos de detección por bioafinidad se basan en, en cada caso, un elemento de reconocimiento biológico o bioquímico o sintético con la especificidad más elevada posible, en adelante denominado también "asociado de unión" o "asociado de unión específico", para reconocer el analito correspondiente (individual) y unirse al mismo en una muestra de composición compleja de un modo altamente selectivo. La detección de una multiplicidad de compuestos diferentes requiere, por lo tanto, del uso de un número correspondiente de diferentes elementos de reconocimiento específicos.
- 15 Un procedimiento de detección basado en reacciones de bioafinidad puede realizarse tanto en una solución homogénea como también en la superficie de un soporte sólido ("sustrato portador"). Según el diseño específico del procedimiento, después de la unión del analito al elemento de reconocimiento correspondiente y, dado el caso, otras sustancias de detección, así como, dado el caso, entre distintas etapas del procedimiento, es necesaria en cada caso una etapa de lavado, para separar los complejos formados de los elementos de reconocimiento y los analitos que se van a detectar, así como dado el caso otras sustancias de detección del resto de la muestra y de los reactivos adicionales dado el caso usados.
- 20 Para determinar una multiplicidad de analitos o analizar una pluralidad de muestras se han extendido, sobre todo en laboratorios analíticos industriales, procedimientos en los que se realiza en las denominadas microplacas de valoración la detección de distintos analitos en recipientes de muestra discretos o "pocillos" de estas placas. A este respecto, las más extendidas son placas con un patrón de 8 x 12 pocillos sobre una superficie básica de, típicamente, aproximadamente 8 cm x 12 cm, siendo necesario para el llenado de un pocillo individual un volumen de algunos cientos de microlitros. Para numerosas aplicaciones sería deseable, no obstante, determinar simultáneamente varios analitos en un único recipiente de muestra usando un volumen de muestra lo más reducido posible.
- 25 En los documentos WO 84/01031, US-P 5807755, US-P5837.551 y US-P 5432.099 se propone la inmovilización de elementos de reconocimiento específicos de los analitos en forma de "puntos de detección" pequeños como zonas de medición discretas con superficies que parcialmente son claramente inferiores a 1 mm² sobre un sustrato portador conjunto, para poder realizar, mediante la unión de solo una pequeña porción de moléculas de analito presentes, una determinación de la concentración del analito que es dependiente solo del tiempo de incubación, pero que es, en ausencia de un flujo continuo, esencialmente independiente del volumen de muestra absoluto. Una multiplicidad de dichos "puntos de detección" como zonas de medición representa en una disposición bidimensional sobre un sustrato portador conjunto una denominada "microserie".
- 30 Mientras tanto, los procedimientos para detectar simultáneamente una multiplicidad de ácidos nucleicos diferentes en una muestra usando ácidos nucleicos correspondientes complementarios inmovilizados sobre un sustrato portador en zonas de medición discretas separadas espacialmente como elementos de reconocimiento, están extendidos de forma relativamente amplia. Por ejemplo, se conocen disposiciones de oligonucleótidos como elementos de reconocimiento, basados en placas sencillas de vidrio o de microscopio como sustratos portadores, con una densidad característica muy alta (densidad de zonas de medición sobre un soporte sólido conjunto). Por ejemplo, en el documento de patente de Estados Unidos N° 5.445.934 (Affymax Technologies) se describen y se reivindican oligonucleótidos con una densidad superior a 1000 características por centímetro cuadrado.
- 35 Desde hace poco tiempo se han vuelto también más frecuentes descripciones de disposiciones y procedimientos de detección llevados a cabo con las mismas de un tipo similar para la determinación simultánea de una multiplicidad de proteínas, por ejemplo en el documento de patente de Estados Unidos N° 6.365.418 B1.
- 40 La forma más sencilla de inmovilización del asociado de unión para la detección de analitos consiste en la adsorción física, por ejemplo debido a interacciones hidrófobas entre el asociado de unión y el sustrato portador. La magnitud de estas interacciones, sin embargo, puede alterarse intensamente debido a la composición del medio y a sus propiedades físico-químicas, por ejemplo la polaridad y la fuerza iónica. En particular en el caso de la adición secuencial de distintos reactivos en un ensayo de varias etapas, la capacidad adhesiva del asociado de unión después de una inmovilización puramente por adsorción sobre la superficie es a menudo insuficiente.
- 45
- 50
- 55

Por lo tanto, a menudo es preferente inmovilizar el asociado de unión a una capa promotora de la adhesión aplicada al sustrato portador. Se sabe que son adecuados para la producción de la capa promotora de la adhesión una multiplicidad de materiales, por ejemplo silanos no funcionalizados o funcionalizados, epóxidos, polímeros funcionalizados, cargados o polares y "monocapas o capas múltiples autoorganizadas, pasivas o funcionalizadas", fosfatos y fosfonatos de alquilo, copolímeros de bloque multifuncionales, tales como, por ejemplo, poli(L)lisina/polietilenglicoles.

Por ejemplo, en el documento WO 00/65352 se describen recubrimientos de plataformas sensoras bioanalíticas o implantes para aplicaciones médicas como sustratos portadores con copolímeros de injerto como capas promotoras de la adhesión, con una cadena principal poliiónica, por ejemplo unida a un sustrato portador (electrostáticamente) y cadenas laterales "no interactivas" (resistentes a la adsorción).

Para minimizar la unión no específica de analitos o sus sustancias de detección u otros asociados de unión, en particular en las zonas (no cubiertas) entre las zonas de medición (puntos de detección (*spots*)) generadas mediante la aplicación dirigida de forma local para la detección de analitos, es muchas veces preferente pasivar estas zonas. Para ello se aplican entre las zonas de medición separadas espacialmente sobre los sustratos de soporte compuestos que son "químicamente neutros" con respecto a los analitos o a sus sustancias de detección o a otros asociados de unión, es decir, que no se unen a los mismos.

Dichos componentes que son "químicamente neutros" con respecto a los analitos o sus sustancias de detección u otros asociados de unión, es decir, que no se unen a los mismos, (en adelante denominados también "compuestos de pasivación") pueden seleccionarse de un modo conocido de los grupos formados por albúminas, en particular albúminas de suero bovino o albúmina de suero humano, caseína, anticuerpos no específicos, policlonales o monoclonales, heterólogos o empíricamente no específicos para el o los analitos que se van a detectar (en particular para inmunoensayos), detergentes, tales como, por ejemplo, Tween 20, ADN fragmentado natural o sintético que no se hibrida con los polinucleótidos que se van a analizar, tal como, por ejemplo, un extracto de espermatozoides de arenque o de salmón (en particular para ensayos de hibridación de polinucleótidos), o también polímeros no cargados, pero hidrófilos, tales como, por ejemplo, polietilenglicoles o dextranos.

Para posibilitar la generación de datos cuantificables de una forma fiable a partir de las señales de unión, por ejemplo usando detección de fluorescencia, de distintas zonas de medición (puntos de detección) de una microserie, es necesario garantizar una densidad superficial uniforme y una actividad de unión del asociado de unión inmovilizado en zonas de medición que se van a comparar entre sí. Para cumplir estas exigencias es una premisa esencial una homogeneidad espacial alta de la capa de adhesión sobre la que se generan las zonas de medición (puntos de detección) discretas. Exigencias similares sobre la homogeneidad espacial existen también para la capa de pasivación aplicada, para garantizar un fondo de señal uniforme lo más reducido posible entre las zonas de medición (puntos de detección) establecidas.

En función de la naturaleza molecular de los componentes de la capa promotora de la adhesión que se va a generar, así como, por supuesto, de la estabilidad térmica y química del sustrato portador que se va a recubrir, se pueden usar distintos procedimientos para la aplicación de la capa promotora de la adhesión al sustrato portador. Pueden llevarse a cabo silanizaciones, por ejemplo, tanto en fase gaseosa como en fase líquida, por ejemplo usando procedimientos de inmersión. Mientras que los procedimientos de recubrimiento en fase gaseosa, para recipientes de reacción con dimensiones lo suficientemente grandes (en comparación con las dimensiones del sustrato portador que se va a recubrir), generalmente dan como resultado una buena homogeneidad de la capa depositada, las capas que se depositan a partir de una fase líquida presentan a menudo una falta de homogeneidad espacial fuerte, por ejemplo señales de corrimiento después del uso de procedimientos de inmersión.

Debido a que la deposición a partir de la fase gaseosa generalmente precisa temperaturas de proceso aumentadas, la etapa de aplicación de las capas de pasivación se realiza generalmente en fase líquida, después de aplicar los elementos de reconocimiento para la detección de analito, en la mayor parte de los casos no resistentes al calor. Para la etapa de pasivación se usa típicamente un procedimiento de inmersión. A este respecto, el sustrato portador se sumerge en un recipiente que está lleno con una solución de compuestos ("solución de pasivación") "químicamente neutros" con respecto a los analitos o sus sustancias de detección u otros asociados de unión, es decir, que no se une a los mismos, para humectar la totalidad de la superficie del sustrato portador lo más rápida y simultáneamente posible con la solución de pasivación. A continuación, el sustrato portador se deja durante un periodo de tiempo predeterminado en la solución de pasivación ("se incuba"), para que pueda adsorberse el compuesto usado para la pasivación de la superficie en la superficie del sustrato.

Una ventaja de este procedimiento convencional consiste en que se puede llevar a cabo sin ningún coadyuvante adicional ni requiere ninguna exigencia especial con respecto a la preparación del personal de laboratorio.

Una propiedad desventajosa de este procedimiento es, sin embargo, un riesgo relativamente alto de "ensuciamiento" de los puntos de detección durante el momento de la inmersión del sustrato portador por medio de la solución de pasivación que fluye a lo largo de la superficie del sustrato. A este respecto, se desorbe material de las zonas de medición discretas (asociado de unión específico inmovilizado) y se elimina por arrastre y puede adsorberse de

nuevo en el entorno en la dirección de la dirección de corriente relativa de la solución de pasivación (con respecto a la superficie del sustrato) en zonas aún no totalmente cubiertas con compuestos de pasivación.

La magnitud del "ensuciamiento" del punto de detección es, entre otras cosas, dependiente de la densidad superficial del asociado de unión específico inmovilizado en las zonas de medición discretas y de la composición de la solución de pasivación, en particular de la solubilidad del asociado de unión específico en esta solución de pasivación. El efecto del "ensuciamiento" puede perjudicar mucho o incluso hacer que se excluya, en caso de una densidad característica alta, es decir, en caso de una distancia reducida entre puntos de detección adyacentes, el análisis cuantitativo de las señales de ensayo a partir de una serie de zonas de medición, debido a la distribución no homogénea resultante de las señales de fondo de las zonas entre las zonas de medición discretas. En particular, cuando el material inmovilizado incluso se transporta de un punto de detección hasta un punto de detección adyacente, este efecto no deseado puede tener como consecuencia que ya no sea posible un análisis relevante de las señales de ensayo.

Otra desventaja de este procedimiento consiste en la necesidad inherente de unos volúmenes relativamente grandes de solución de pasivación y, con ello, unos costes asociados relativamente altos.

Para evitar el efecto descrito del "ensuciamiento" se conoce el uso de procedimientos de pulverización, por ejemplo usando pulverizadores. A este respecto, la solución de pasivación se aplica en forma de pequeñas gotitas de líquido sobre la superficie del sustrato, hasta que se forme sobre dicha superficie una película de líquido continua. A continuación, la superficie del sustrato se incuba en una atmósfera saturada del vapor del líquido (es decir, al 100 % de humedad en caso de una solución de pasivación acuosa) durante un periodo de tiempo predeterminado, de nuevo para que puedan adsorberse los compuestos usados para la pasivación de la superficie en la superficie del sustrato. Para evitar señales de corrimiento, se mantienen los sustratos portadores durante la realización de este procedimiento de pasivación de forma horizontal (con respecto a la superficie del sustrato que se va a recubrir).

Si se realiza apropiadamente este procedimiento, puede evitarse ampliamente un "ensuciamiento" del punto de detección. También es ventajoso que se necesite una cantidad de solución de pasivación reducida típicamente en un factor de 10 en comparación con el procedimiento de inmersión descrito anteriormente.

La humectación uniforme requerida y la dosificación bastante exacta de la cantidad de líquido aplicada que es necesaria para la formación de una película homogénea de líquido sobre la superficie del sustrato representan, no obstante, una dificultad inherente del procedimiento con un aumento de las exigencias asociadas a las mismas sobre el personal operador. En caso de un exceso de solución de pasivación aplicada puede aparecer de nuevo, por ejemplo, un "ensuciamiento" de los puntos de detección. Un sistema modular, basado en este procedimiento de recubrimiento, para la preparación de microdisposiciones con ácidos nucleicos, proteínas u otros compuestos químicos o biológicos como asociados de unión específicos inmovilizados en zonas de medición discretas se ha descrito, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO 01/57254.

A pesar de las claras en comparación con el procedimiento de inmersión, los resultados del procedimiento de pulverización tampoco son óptimos. Debido a que las gotitas se expulsan a través de una boquilla o un pulverizador, las gotitas poseen en el momento del impacto con la superficie que se va a recubrir un impulso dirigido contra esta superficie más o menos fuerte. Este está asociado con el riesgo de dispersión en gotitas aún más pequeñas al impactar con la superficie, de modo que los bordes de las zonas de medición (puntos de detección) que se van generar no se producen, generalmente, de modo bien definido. Además, mediante el procedimiento de pulverización se generan generalmente gotitas relativamente grandes con una gran variación en el tamaño de gotita.

El documento JP-A-59055367 da a conocer un aparato con todas las características del concepto general de la reivindicación 1.

Planteamiento del objetivo

Existe la necesidad de desarrollar un procedimiento de recubrimiento a partir de una fase líquida, así como un aparato para realizar este procedimiento de recubrimiento, con el que pueda lograrse una homogeneidad igual de alta de las capas generadas que con una deposición a partir de una fase gaseosa y para el que se requiera el uso de una cantidad de líquido lo más pequeña posible. Además, es deseable que un procedimiento de recubrimiento nuevo correspondiente y un aparato de recubrimiento que se va a usar para ello sean adecuados tanto para la aplicación de una capa promotora de la adhesión como también de una capa de pasivación. En el aspecto económico, a este respecto, la solución debería ser lo más económica posible, es decir, los costes instrumentales deben mantenerse lo más reducidos posible. Un aparato de recubrimiento nuevo correspondiente debería ser sencillo de manejar y un procedimiento de recubrimiento que se fuera a realizar con el mismo debería poder automatizarse fácilmente.

Breve descripción de la invención

Se ha descubierto ahora, sorprendentemente, que las exigencias mencionadas con respecto al procedimiento según la invención que se describe a continuación, basado en una nebulización de la solución que contiene los compuestos que se van a aplicar sobre los sustratos portadores y en el que no es necesario ningún impulso esencial

sobre las gotas que se van a depositar sobre los sustratos portadores a partir de la niebla en dirección a los sustratos portadores, pueden cumplirse. El aparato de recubrimiento según la invención desarrollado para la realización de este procedimiento se caracteriza por una construcción muy sencilla, pudiendo usarse con componentes comercialmente disponibles económicos, y puede operarse también de un modo sencillo.

- 5 El procedimiento según la invención, para llevarlo a cabo con un aparato de recubrimiento según la invención que corresponde a una forma de realización que se describen más adelante, es adecuado para aplicar capas tanto promotoras de la adhesión como también de pasivación sobre sustratos portadores discrecionales, pero preferentemente planos, para detectar analitos en procedimientos de detección por afinidad.

- 10 El procedimiento según la invención representa un perfeccionamiento del procedimiento de pulverización descrito anteriormente, realizándose la generación de gotas de líquido finas para el procedimiento según la invención en una forma de realización preferente mediante un tratamiento de ultrasonidos. El aparato de recubrimiento usado en este procedimiento comprende, en una forma de realización preferente, un recipiente cerrado con un soporte para el mantenimiento horizontal del sustrato portador (con respecto a la superficie del líquido que se va a nebulizar) y un generador de ultrasonidos que se encuentra por debajo del mismo, que está sumergido en el líquido que se va a nebulizar. El procedimiento según la invención se caracteriza porque las gotitas generadas son esencialmente más pequeñas que en el caso del procedimiento de pulverización. En estado de funcionamiento se genera una niebla muy densa sobre el líquido que se va a nebulizar que, en una forma de realización preferente, se distribuye uniformemente mediante una corriente de nitrógeno débil que se usa adicionalmente en el recipiente, estando cerrado el recipiente preferentemente excepto en entradas de gases y en salidas de gases. Debido a que no hay ninguna corriente de la solución de recubrimiento con respecto a la superficie del sustrato portador que se va a recubrir, se impide un "ensuciamiento" de los puntos de detección, tal como se ha descrito para el procedimiento de inmersión, en el procedimiento según la invención. En consecuencia, existen también pocas limitaciones debidas al procedimiento con respecto a la elección de la composición tanto de la solución de pasivación como también de una "solución de generación de puntos de detección" que se usa en una etapa de operación anterior para la inmovilización del asociado de unión específico en zonas de medición discretas, así como a la concentración de esta solución en asociados de unión específicos y, con ello, a la densidad de superficie resultante de asociados de unión específicos en las zonas de medición. Debido a la ausencia de corrientes que discurren a lo largo de la superficie de los sustratos portadores durante la etapa de pasivación de la superficie no existe, en particular, ningún riesgo de "ensuciamiento" entre puntos de detección adyacentes, de modo que la densidad de las mismas que puede generarse en una serie de zonas de medición solo está limitada por la exactitud de la dosificación y del posicionamiento del aparato que se usa para generar las zonas de medición discretas ("generador de puntos de detección").

- 20 El procedimiento según la invención se caracteriza además por la posibilidad de recubrir simultáneamente una gran cantidad de sustratos portadores en un recipiente conjunto con las dimensiones correspondientes y la posibilidad de una automatización sencilla y es también fácil de realizar por un personal sin formación. Los volúmenes de líquido que se vayan a utilizar necesariamente para el recubrimiento de los sustratos portadores son del orden de magnitud similar al caso del procedimiento de pulverización.

Breve descripción de las figuras

La fig. 1 muestra esquemáticamente un aparato de recubrimiento según la invención.

- 40 La fig. 2 muestra la geometría de una disposición de zonas de medición con 12 muestras diferentes aplicadas en una serie ("microserie") bidimensional y una disposición lineal de 6 disposiciones sobre un sustrato portador conjunto.

- 45 Las fig. 3A - fig. 3C muestran las señales de fluorescencia de microdisposiciones, habiéndose sometido a pasivación las superficies libres de los sustratos portadores correspondientes usando distintos procedimientos de recubrimiento, en cada caso con ampliaciones que se encuentran por debajo de las secciones de la figura marcadas (A: procedimiento de inmersión, B: procedimiento de pulverización, C: procedimiento de nebulización según la invención).

- 50 La fig. 4A muestra los valores medios y las desviaciones típicas de las intensidades de la señal de fondo, que en cada caso se determinaron entre todos los puntos de detección de las microdisposiciones, habiéndose sometido a pasivación las superficies libres de los sustratos portadores correspondientes usando distintos procedimientos de recubrimiento (A: procedimiento de inmersión, B: procedimiento de pulverización, C: procedimiento de nebulización según la invención).

- 55 La fig. 4B muestra los valores medios y las desviaciones típicas de intensidades de fluorescencia de todos los puntos de detección de referencia (para la aclaración de la expresión véase el ejemplo de realización) de las microdisposiciones, habiéndose sometido a pasivación las superficies libres de los sustratos portadores correspondientes usando distintos procedimientos de recubrimiento (A: procedimiento de inmersión, B: procedimiento de pulverización, C: procedimiento de nebulización según la invención).

La fig. 5A muestra las intensidades promedio y las desviaciones típicas de señales de fluorescencia a partir de las zonas de medición de las microdisposiciones previstas para la detección del analito, habiéndose sometido a pasivación las superficies libres de los sustratos portadores correspondientes usando distintos procedimientos de recubrimiento (A: procedimiento de inmersión, B: procedimiento de pulverización, C: procedimiento de nebulización según la invención) y las microdisposiciones, después, se incubaron con soluciones de anticuerpo A1 (anti-p53) y, a continuación, para la detección mediante detección por fluorescencia con fragmentos Fag anti-conejo Alexa 647 Fluor.

La fig. 5B muestra las intensidades promedio y las desviaciones típicas de señales de fluorescencia a partir de las zonas de medición de las microdisposiciones previstas para la detección del analito, habiéndose sometido a pasivación las superficies libres de los sustratos portadores correspondientes usando distintos procedimientos de recubrimiento (A: procedimiento de inmersión, B: procedimiento de pulverización, C: procedimiento de nebulización según la invención) y las microdisposiciones, después, se incubaron con soluciones de anticuerpo A2 (anti-fosfo-p53) y, a continuación, para la detección mediante detección por fluorescencia con fragmentos Fag anti-conejo Alexa 647 Fluor.

Descripción precisa de la invención

El primer objeto de la presente invención es un aparato para recubrir sustratos portadores para la detección de uno o varios analitos en un procedimiento de detección por afinidad que comprende:

- un recipiente para alojar líquido que se va a nebulizar ("recipiente para líquidos") con sustancias (compuestos) presentes en el mismo, que se van a depositar sobre al menos una superficie de dicho sustrato portador, así como con un volumen de niebla generado en estado de funcionamiento sobre el líquido,
- un actuador para originar el proceso de nebulización y
- un soporte para alojar y mantener los sustratos portadores durante el proceso de recubrimiento, caracterizado porque,

los sustratos portadores no se encuentran en contacto con la superficie del líquido que se va a nebulizar.

Por la expresión "líquido que se va a nebulizar" debe entenderse, a este respecto, la cantidad total de líquido dentro del aparato de recubrimiento según la invención sobre el que los impulsos del actuador provocan la nebulización del líquido, con la consecuencia de la transformación de una parte del líquido en niebla.

Preferentemente, la generación de la niebla sobre el líquido que se va a nebulizar se produce mediante la acción de ultrasonidos dentro de este líquido. Es preferente, correspondientemente, que dicho actuador sirva para la generación de ultrasonidos.

Se conocen distintos procedimientos técnicos para la generación de ultrasonidos, por ejemplo usando cristales piezoeléctricos, membranas oscilantes, etc. Es preferente que dicho actuador comprenda la membrana de un generador de ultrasonidos.

También es preferente que dicho actuador en estado de funcionamiento esté sumergido en el líquido que se va a nebulizar. Preferentemente, el actuador se encuentra totalmente dentro del líquido que se va a nebulizar.

Además, es ventajoso que la intensidad y la frecuencia del ultrasonido que actúa sobre el líquido que se va a nebulizar puedan regularse y/o puedan medirse por medio de medios adecuados.

Como se ha mencionado en los requerimientos sobre un nuevo procedimiento de recubrimiento, tienen una gran importancia la uniformidad y una alta homogeneidad de la capa que se va a generar. Para poder garantizarlas, es deseable una distribución de tamaños lo más estrecha posible de gotitas lo más pequeñas posible de la niebla que se va a depositar. En caso de nebulizadores comerciales sencillos, como los que pueden usarse, sobre todo, en terrarios, también debe contarse, no obstante, con la aparición de gotas grandes o incluso de salpicaduras del líquido que se va a nebulizar.

Por lo tanto, es preferente que el aparato de recubrimiento según la invención comprenda un separador de gotas. Este separador de gotas está dispuesto en el volumen espacial entre la superficie del líquido que se va a nebulizar y el soporte sobre el que se mantienen los sustratos portadores que se van a recubrir durante el proceso de recubrimiento.

Son adecuadas diferentes formas de realización del separador de gotas. Básicamente, el separador de gotas que se va a usar puede ser impermeable al vapor y a la niebla (cuando el separador de gotas es, por ejemplo, un cuerpo sólido cerrado). Puede ser una ventaja que el separador de gotas tenga la forma geométrica de un espejo cóncavo. Por ejemplo, puede usarse como separador de gotas un vidrio de reloj (con una superficie cóncava).

El separador de gotas que se va a usar también puede permitir el paso de gotas de hasta un tamaño definido, por ejemplo con un diámetro inferior a 200 μm . Esto puede realizarse técnicamente, por ejemplo, mediante un separador

de gotas que comprenda una red de malla fina, con cuya distancia de malla se determina el tamaño máximo de gota al que se permite el paso.

Es preferente que los sustratos portadores, en el mantenimiento en el soporte durante el proceso de recubrimiento, se recubran en su cara/superficie opuesta a la superficie del líquido que se va a nebulizar, no debiendo excluirse un recubrimiento sobre otras superficies.

Usando máscaras que se van a aplicar a los sustratos portadores que se van a recubrir también es posible, con un aparato de recubrimiento según la invención en un procedimiento de recubrimiento según la invención, generar recubrimientos geoméricamente estructurados mediante la nebulización dado el caso secuencial de uno o varios líquidos dado el caso diferentes. Una condición para la generación de zonas recubiertas sobre los sustratos portadores cuya geometría pueda reproducirse es, a este respecto, que en cada caso las zonas que no se van a recubrir del sustrato portador se cubran de un modo estanco a fluidos mediante una máscara correspondiente adecuada, de modo que no alcance ninguna gotita de niebla las zonas que no se van a recubrir.

Para poder lograr el objetivo prioritario de generar un recubrimiento lo más uniforme y homogéneo posible del sustrato portador es una ventaja, además, que el aparato de recubrimiento según la invención comprenda adicionalmente medios para generar una distribución uniforme de la niebla generada y que se va a depositar sobre los sustratos portadores en el entorno de dichos sustratos portadores.

Para ello puede ser útil, por ejemplo, que se permita la entrada de un gas en el recipiente del aparato (es decir, en el espacio del aire o del gas y en el de la niebla) que se mezcle con la niebla generada y/o forme torbellinos con la misma.

Por lo tanto, es una ventaja que el aparato de recubrimiento comprenda adicionalmente al menos una entrada de gases. El aparato puede comprender adicionalmente también una o varias salidas para descargar gas y/o niebla.

También puede ser ventajoso que dichos medios para generar una distribución uniforme de la niebla generada y que se va a depositar sobre el sustrato portador comprendan en el entorno de dicho sustrato portador un ventilador, con el que la niebla generada y, dado el caso, adicionalmente, los gases introducidos en el recipiente del aparato, formen turbulencias, para lograr un mejor mezclado y, con ello, eliminar faltas de homogeneidad de la distribución de la niebla.

Para garantizar condiciones constantes y bien definidas durante el proceso de recubrimiento puede ser ventajoso, además, que el aparato de recubrimiento según la invención comprenda adicionalmente medios para controlar y/o regular la temperatura del líquido que se va a nebulizar y/o de algunas o todas las paredes del recipiente del líquido.

También es preferente que el soporte del aparato de recubrimiento para recoger y/o mantener los sustratos portadores durante el proceso de recubrimiento pueda termostatzarse.

Por el mismo motivo también puede ser una ventaja que el aparato de recubrimiento comprenda adicionalmente medios para controlar y/o regular la presión en el interior del recipiente para líquidos durante el proceso de recubrimiento.

Para garantizar la uniformidad y la homogeneidad del recubrimiento del sustrato portador, en particular para eliminar la influencia, posiblemente a pesar de los medios correspondientes, de fallos de homogeneidad aún presentes de la niebla que se va a generar en el recipiente del aparato según la invención, puede ser una ventaja también que el aparato de recubrimiento comprenda adicionalmente medios para hacer girar el sustrato portador alrededor de un eje perpendicular al plano del soporte.

Debido una propiedad inherente del procedimiento según la invención, a saber, la deposición esencialmente no dirigida espacialmente, la formación de gotas y, con ello, la aplicación de los compuestos presentes para el recubrimiento de la superficie no tiene lugar solo sobre las superficies libres del sustrato portador, sino también, por ejemplo, sobre las paredes del recipiente del líquido del aparato de recubrimiento según la invención. Debido a que los compuestos que se van a aplicar sobre los sustratos portadores pueden ser sustancias muy especiales en una forma muy pura, que pueden ser además relativamente caras, es preferente que el aparato de recubrimiento según la invención comprenda adicionalmente medios para recoger y reciclar/recuperar el líquido nebulizado depositado en las paredes del recipiente para líquidos.

Además, es ventajoso que el aparato de recubrimiento según la invención comprenda adicionalmente medios para facilitar la limpieza del recipiente para líquidos. Por ejemplo, los medios pueden comprender un recubrimiento hidrófobo de la superficie de dichas paredes del recipiente, tanto para reciclar líquido que se va a recircular a las paredes interiores del recipiente para líquidos y al líquido que se va a nebulizar como también para facilitar la limpieza. Los medios de este tipo también pueden referirse a la conformación geométrica, por ejemplo evitando esquinas en las que pueda acumularse líquido y que sea difícil de retirar de nuevo, o que al menos estén redondeadas.

Preferentemente, los sustratos portadores que se van a recubrir se mantienen en el soporte del aparato de recubrimiento de forma esencialmente horizontal. En la expresión "en forma esencialmente horizontal" deben incluirse, a este respecto, desviaciones de hasta $\pm 10^\circ$ de un mantenimiento horizontal.

- 5 También es ventajoso que el aparato de recubrimiento comprenda adicionalmente medios para el ajuste y/o la variación controlados de la distancia entre la superficie del líquido que se va a nebulizar y las superficies de los sustratos portadores que se van a recubrir.

Preferentemente, el recipiente para líquidos, excepto entradas opcionales para gases y salidas adicionales opcionales para gases y/o niebla, está cerrado.

- 10 Preferentemente, el líquido que se va a nebulizar es un líquido de baja viscosidad con una viscosidad inferior a 3 cP. En particular se trata a este respecto de soluciones acuosas. Los líquidos que se van a nebulizar también pueden ser, no obstante, soluciones orgánicas, en particular alcohólicas.

- 15 También es preferente que los sustratos portadores que se van a recubrir sean esencialmente planos. A este respecto, por la expresión "esencialmente plano" debe entenderse que dichos sustratos portadores comprenden un plano en el que se encuentra la superficie que se va a recubrir, con excepción de una estructura tridimensional posiblemente presente (tal como, por ejemplo, paredes laterales de recipientes de muestra que se proporcionan en las superficie del sustrato portador), y un segundo plano esencialmente paralelo al anterior en el que se encuentra la superficie opuesta de los sustratos portadores, incluyéndose en la expresión "esencialmente paralelo" desviaciones de hasta $\pm 10^\circ$ de paralelismo. Por "esencialmente planos" debe entenderse sustratos portadores con superficies que se van a recubrir tanto lisas como también rugosas.

- 20 Los sustratos portadores que se van a recubrir pueden estar constituidos por una única capa (autoportante), tal como, por ejemplo, plaquitas de vidrio, o también por varias capas.

Es preferente que al menos una capa de los sustratos portadores que se van a recubrir sea esencialmente ópticamente transparente en la dirección de propagación de una luz de excitación o de una luz de medición incidentes.

- 25 A este respecto, por "transparencia óptica" de un material o de un sustrato portador debe entenderse que la longitud de trayecto de una luz que se propaga en dicho material o en dicho sustrato portador o una luz que se mueve en la película que guía la onda (muy refractiva) de un sustrato portador diseñado como guía de ondas óptico (véase más adelante) es, al menos en una zona parcial del espectro visible (entre 400 nm y 750 nm), superior a 2 mm, siempre que esta longitud de trayecto no esté limitada por estructuras para cambiar la dirección de propagación de dicha luz.
- 30 Por ejemplo, la longitud de trayecto de luz ópticamente visible, es decir, la distancia en la trayectoria de la luz en el material correspondiente, hasta una reducción de la intensidad de la luz a un valor de $1/e$ de la intensidad inicial en el momento de la entrada de la luz a este material, puede encontrarse en un orden de magnitud de algunos centímetros (por ejemplo en guías de onda de capa fina, véase más adelante) hasta de metros o kilómetros (en el caso de guías de luz para la transmisión de señales ópticas). En caso de una estructura de guía de ondas de rejilla, basada en una guía de ondas de capa fina, puede limitarse la longitud de propagación de una luz que se mueve en el interior de una capa guía de ondas mediante una rejilla difractiva acoplada en el exterior (diseñada en la capa guía de ondas) a pocos micrómetros. Esta limitación de la longitud de trayecto es debida, no obstante, a la estructuración y no a las propiedades materiales de la estructura. En el sentido de la presente invención, una estructura de guía de ondas de rejilla se designará como "ópticamente transparente". Como "esencialmente ópticamente transparente" se denominarán en el marco de la presente invención también los sustratos portadores o capas que reduzcan la
- 40 intensidad de una luz que atraviesa estos sustratos portadores o estas capas en menos del 50 %.

- 45 La al menos una capa esencialmente ópticamente transparente en la dirección de propagación de una luz de excitación o una luz de medición irradiadas de sustratos portadores que se van a recubrir puede comprender, por ejemplo, un material que está seleccionado del grupo que comprende silicatos, por ejemplo vidrio o cuarzo, plásticos transparentes termoplásticos que pueden moldearse, tratarse por proyección o fresarse, por ejemplo policarbonatos, poliimidas, acrilatos, en particular poli((met)acrilatos de metilo), poliestirenos, polímeros de ciclo-olefinas y copolímeros de ciclo-olefinas.

- 50 En una forma de realización especial de un aparato de recubrimiento según la invención los sustratos portadores que se van a recubrir comprenden una capa metálica fina, preferentemente de oro o plata, dado el caso sobre una capa intermedia que se encuentra por debajo con un índice de refracción preferentemente $< 1,5$, seleccionándose el espesor de la capa metálica y la eventual capa intermedia de modo que pueda excitarse un plasmón de superficie a la longitud de onda de una luz de excitación incidente y/o a la longitud de onda de una luminiscencia generada. El espesor de la capa metálica se encuentra preferentemente entre 10 nm y 1000 nm, de modo particularmente preferente entre 30 nm y 200 nm.

- 55 Las condiciones para la generación de una resonancia de plasmón de superficie, así como para la combinación con mediciones de luminiscencia, así como con estructuras guías de ondas se han descrito en la literatura muchas veces.

Con el término "luminiscencia" se denomina en la presente solicitud la emisión espontánea de fotones en el intervalo de ultravioleta a infrarrojo después de una excitación óptica o no óptica, tal como por ejemplo eléctrica o química o bioquímica o térmica. Por ejemplo, se incluyen quimioluminiscencia, bioluminiscencia, electroluminiscencia y, en particular, fluorescencia y fosforescencia en el término "luminiscencia". A este respecto, la fluorescencia y la fosforescencia son formas particularmente preferentes de luminiscencia.

Es preferente que los sustratos portadores que se van a recubrir comprendan guías de ondas ópticos que comprendan una o varias capas. A este respecto, los sustratos portadores pueden diseñarse en continuo como guías de ondas ópticos o comprender zonas guías de ondas discretas.

Como "zonas guías de ondas continuas" se entenderá zonas guías de ondas correspondientes que se extienden esencialmente a lo largo de la totalidad de la región de la porción de la superficie del sustrato portador usada para la detección del analito sin interrupción de la capa muy refractiva guía de ondas.

Las guías de ondas ópticas son particularmente muy adecuadas como sustrato portador para la detección de analitos en un procedimiento de detección por afinidad, debido a que al guiar las ondas, el diseño de un campo denominado "evanescente" en la superficie límite de la capa guía de ondas muy refractiva con las capas adyacentes (entre las cuales también puede incluirse el aire) está asociado a un índice de refracción reducido. La profundidad de penetración de este campo evanescente en el entorno está limitada a dimensiones inferiores a la longitud de onda de la luz guiada (por ejemplo, de 200 nm a 400 nm) de modo que las interacciones de moléculas de analito o de moléculas de detección o de restos de moléculas de detección (tales como, por ejemplo, marcadores de fluorescencia) pueden excitarse y observarse con este campo evanescente de un modo espacialmente muy selectivo en una superficie de la guía de ondas y pueden eliminarse ampliamente señales de interferencia del campo lejano, por ejemplo, de la profundidad de un medio de muestra.

Por lo tanto, generalmente es preferente que las zonas guías de ondas continuas o discretas de sustratos portadores que se van a recubrir comprendan una superficie de los sustratos portadores que se va a recubrir.

Es particularmente preferente que los sustratos portadores que se van a recubrir comprendan guías de ondas de capa fina ópticos planos con una capa (a) guía de ondas esencialmente transparente sobre una segunda capa (b) también esencialmente ópticamente transparente con un índice de refracción inferior al de la capa (a) y dado el caso una capa intermedia (b') también esencialmente ópticamente transparente entre la capa (a) y la capa (b) con un índice de refracción también inferior al de la capa (a).

Para un material dado de la capa (a) y un índice de refracción dado, cuanto mayor sea la sensibilidad hasta un valor límite inferior del espesor de capa, menor será el espesor de capa. El valor límite inferior se determina mediante la interrupción de la conducción de luz cuando disminuye por debajo de una longitud de onda del valor dependiente de la luz que se va a guiar, así como mediante un aumento observado de pérdidas de propagación en caso de unas capas muy finas con una reducción del espesor de capa adicional. Es preferente que el producto de espesor de capa (a) y su índice de refracción sea de diez décimos hasta uno, preferentemente de un tercio a dos tercios, de la longitud de onda de una luz de excitación o luz de medición que se va a acoplar a la capa (a).

Para el acoplamiento de luz de excitación o luz de medición en una guía de ondas óptica se conocen una multiplicidad de procedimientos. En el caso de una capa guía de ondas relativamente espesa hasta una guía de ondas autoportante es posible enfocar la luz usando lentes de apertura numérica adecuada de modo que se guíe a la superficie frontal de la guía de ondas mediante reflexión total interna. En caso de guías de ondas con anchura frontal más elevada que el espesor de la capa guía de ondas se usan para ello preferentemente lentes cilíndricas. A este respecto, las lentes están dispuestas tanto espacialmente alejadas de la guía de ondas como también unidas directamente a las mismas. En caso de un espesor de capa guía de ondas reducido, esta forma de acoplamiento de superficie frontal es menos adecuada. Puede usarse mejor, entonces, el acoplamiento mediante prismas, que preferentemente están unidos a la guía de ondas de forma exenta de huecos, o mediante un líquido de ajuste del índice de refracción con el que están unidas las guías de ondas. También es posible suministrar la luz de excitación mediante una fibra óptica a la guía de ondas óptica y acoplarla mediante una superficie frontal o sobreacoplar la luz acoplada a otra guía de ondas a la guía de ondas, disponiendo ambas guías de ondas tan cerca entre sí que sus campos evanescentes se solapen y, con ello, tenga lugar una transferencia de energía.

Por lo tanto, es preferente que las zonas guías de ondas discretas o continuas de los sustratos portadores que se van a recubrir se puedan hacer interactuar ópticamente durante la etapa de detección del procedimiento de detección por afinidad con dichos sustratos portadores con uno o varios elementos de acoplamiento óptico para acoplar la luz de excitación o de medición de una o varias fuentes de luz, eligiéndose dichos elementos de acoplamiento óptico del grupo que comprende acopladores de prisma, acopladores evanescentes con guías de ondas ópticas en contacto entre sí con campos evanescentes solapados, acopladores de superficie frontal con lentes de enfoque, preferentemente lentes cilíndricas, dispuestas frente a una cara frontal de una capa guía de ondas de los sustratos portadores y acopladores de rejilla.

Es particularmente preferente que las zonas guías de ondas discretas o continuas de los sustratos portadores que se van a recubrir estén en contacto con una o varias estructuras de rejilla (c), que posibiliten el acoplamiento de luz

de excitación o luz de medición en capas guías de ondas de dichos sustratos portadores, y/o con una o varias estructuras de rejilla (c'), que posibiliten el desacoplamiento de luz de excitación o luz de medición de capas guías de ondas de dichos sustratos portadores, pudiendo tener estas, en caso de estructuras de rejilla (c) y (c') presentes simultáneamente en un sustrato portador, periodos de rejilla iguales o diferentes.

- 5 Dichas estructuras de rejilla son preferentemente rejillas en relieve con perfiles discrecionales, por ejemplo con perfiles de rectángulo, de triángulo, de diente de sierra, de semicírculo o con forma sinusoidal, o de rejillas de fase o de volumen con una modulación periódica del índice de refracción en la capa (a) esencialmente plana. Son preferentes estructuras de rejilla (c) diseñadas como rejilla en relieve de superficie.

- 10 Las estructuras de rejilla (c) y/o (c') pueden ser monodifractivas o multidifractivas y tener una profundidad de 2 nm - 100 nm, preferentemente de 10 nm - 30 nm, así como periodos de 200 nm - 1000 nm, preferentemente de 300 nm - 700 nm. La relación de la anchura del alma de las líneas de rejilla con respecto al periodo de rejilla puede encontrarse entre 0,01 y 0,99, siendo preferente una relación entre 0,2 y 0,8.

- 15 Es preferente que el índice de refracción de esta primera capa (a) ópticamente transparente sea superior a 1,8. También es preferente que la primera capa (a) ópticamente transparente comprenda un material del grupo que comprende nitrato de silicio, TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 y ZrO_2 , de modo particularmente preferente TiO_2 , Ta_2O_5 o Nb_2O_5 .

- 20 Además es preferente que la segunda capa (b) ópticamente transparente de los sustratos portadores que se van a recubrir comprenda un material del grupo que comprende silicatos, por ejemplo vidrio o cuarzo, plásticos transparentes termoplásticos que pueden moldearse, tratarse por proyección o fresarse, por ejemplo policarbonatos, poliimidas, acrilatos, en particular poli((met)acrilatos de metilo), poliestirenos, polímeros de ciclo-olefinas y copolímeros de ciclo-olefinas.

- 25 Diferentes formas de realización de guías de ondas de capa fina planas ópticas que son adecuadas como sustratos portadores se describen, por ejemplo, en los documentos WO 95/33197, WO95/33198, WO 96/35940, WO 98/09156, WO 01/79821, WO 01/88511, WO 01/55691 y WO 02/79765. Las formas de realización descritas en estas solicitudes de patente de sustratos portadores especiales, denominadas en dichos documentos habitualmente plataformas sensoras, y, con ello, los procedimientos que se llevan a cabo con las mismas para la detección de analitos y también el contenido de estos documentos de solicitud se incorporan al presente documento en su totalidad como parte constituyente de la presente invención.

- 30 Un grupo de formas de realización de los aparatos de recubrimiento según la invención se caracteriza porque los sustratos portadores que se van a recubrir posibilitan la detección de uno o varios analitos en un procedimiento de detección por afinidad mediante detección de una o varias luminiscencias activadas.

- 35 Otro grupo de formas de realización se caracteriza porque los sustratos portadores que se van a recubrir posibilitan la detección de uno o varios analitos en un procedimiento de detección por afinidad mediante la detección de modificaciones del índice de refracción efectivo en el campo cercano (campo evanescente) en una superficie de dichos sustratos portadores.

Otro objeto de la presente invención es un procedimiento para recubrir sustratos portadores para la detección de uno o varias analitos en un procedimiento de detección por afinidad caracterizado porque

- dichos sustratos portadores que se van a recubrir se disponen en un soporte de un aparato de recubrimiento según la invención según una de las formas de realización descritas,
- 40 - el líquido contenido en el recipiente para líquidos de dicho aparato de recubrimiento se nebuliza y
- se realiza una deposición de las sustancias (compuestos) contenidas en el líquido nebulizado a partir de la niebla generada sobre los sustratos portadores que se van a recubrir,

no encontrándose los sustratos portadores en contacto con la superficie del líquido que se va a nebulizar.

- 45 Preferentemente, la generación de la niebla sobre el líquido que se va a nebulizar se induce mediante la acción de ultrasonidos dentro de este líquido. Es preferente correspondientemente que dicho actuador sirva para la generación de ultrasonidos.

- 50 Se conocen distintos procedimientos técnicos para la generación de ultrasonidos, por ejemplo usando cristales piezoeléctricos, membranas oscilantes, etc. Es preferente que dicho actuador comprenda la membrana de un generador de ultrasonidos y la nebulización de líquido se produzca mediante las ondas de ultrasonido generadas en el mismo.

También es preferente que dicho actuador en estado de funcionamiento esté sumergido en el líquido que se va a nebulizar. Preferentemente, el actuador se encuentra totalmente dentro del líquido que se va a nebulizar.

Además, es ventajoso que la intensidad y la frecuencia del ultrasonido que actúa sobre el líquido que se va nebulizar puedan regularse y/o puedan medirse por medio de medios adecuados.

También es preferente que los aparatos de recubrimiento comprendan un separador de gotas que impida el contacto de salpicaduras y gotas grandes del líquido que se va a nebulizar con los sustratos portadores que se van a recubrir. Por una gota "grande" se entenderá una gota con un diámetro de más de 200 μm . A este respecto, el separador de gotas puede ser impermeable a gases y nieblas. Por ejemplo, el separador de gotas puede ser un cuerpo sólido cerrado. Puede ser ventajoso que el separador de gotas tenga la forma geométrica de un espejo cóncavo. Por ejemplo, puede usarse un vidrio de reloj (con una superficie cóncava) como separador de gotas.

El separador de gotas que vaya a usarse también puede ser permeable a gotas hasta un tamaño definido. Esto puede realizarse técnicamente, por ejemplo, mediante un separador de gotas que comprenda una red de malla fina, con cuya distancia de malla se determina el tamaño máximo de gota al que se permite el paso.

Para poder lograr el objetivo prioritario de generar un recubrimiento lo más uniforme y homogéneo posible del sustrato portador es una ventaja, además, que el aparato de recubrimiento según la invención comprenda medios para generar una distribución uniforme de la niebla generada y que se va a depositar sobre los sustratos portadores en el entorno de dicho sustrato portador.

Para ello puede ser útil, por ejemplo, que el aparato de recubrimiento comprenda adicionalmente al menos una entrada de gases, a través de la que penetra un gas en el recipiente para líquidos, mezclándose el gas con la niebla generada. El aparato puede comprender adicionalmente también una o varias salidas para expulsar gas y/o niebla.

También puede ser ventajoso para la uniformidad y la homogeneidad del recubrimiento que se genere usando un ventilador una distribución uniforme de la niebla generada y que se va a depositar sobre los sustratos portadores en el entorno de dichos sustratos portadores.

Para garantizar condiciones constantes y bien definidas durante el proceso de recubrimiento puede ser también ventajoso que el aparato de recubrimiento según la invención comprenda adicionalmente medios para controlar y/o regular la temperatura del líquido que se va a nebulizar y/o una o todas las paredes del recipiente para líquidos y que la temperatura del líquido que se va a nebulizar y/o una o todas las paredes del recipiente para líquidos durante el proceso de recubrimiento se controle o se haga variar. También es preferente que el soporte del aparato de recubrimiento para alojar y/o mantener los sustratos portadores durante el proceso de recubrimiento esté termostatzado.

Por el mismo motivo también puede ser una ventaja que el aparato de recubrimiento comprenda adicionalmente medios para controlar y/o regular la presión en el interior del recipiente para líquidos durante el proceso de recubrimiento y que la presión puede controlarse y/o hacerse variar durante el proceso de recubrimiento.

Para garantizar la uniformidad y la homogeneidad del recubrimiento del sustrato portador, en particular para eliminar la influencia, posiblemente a pesar de los medios correspondientes, de fallos de homogeneidad aún presentes en la niebla que se va a generar en el recipiente del aparato según la invención, puede ser una ventaja también que los sustratos portadores durante el proceso de recubrimiento se hagan girar alrededor de un eje perpendicular al plano del soporte.

Es preferente que los sustratos portadores, en el mantenimiento en el soporte durante el proceso de recubrimiento se recubran en su cara/superficie opuesta a la superficie del líquido que se va a nebulizar, no debiendo excluirse un recubrimiento sobre otras superficies.

Una variante particular el procedimiento según la invención está caracterizada porque usando máscaras que se van a aplicar a los sustratos portadores que se van a recubrir con un aparato de recubrimiento según la invención en un procedimiento de recubrimiento según la invención se generan recubrimientos geoméricamente estructurados mediante la nebulización dado el caso secuencial de uno o varios líquidos dado el caso diferentes. Una condición para la generación de zonas recubiertas sobre los sustratos portadores cuya geometría pueda reproducirse es, a este respecto, que en cada caso las zonas que no se van a recubrir del sustrato portador se cubran de un modo estanco a fluidos mediante una máscara correspondiente adecuada, de modo que no alcance ninguna gota de niebla las zonas que no se van a recubrir.

Preferentemente, los sustratos portadores que se van a recubrir durante el proceso de recubrimiento se mantienen de forma esencialmente horizontal en el soporte del aparato de recubrimiento.

También es ventajoso que el aparato de recubrimiento comprenda adicionalmente medios para el ajuste y/o la variación controlados de la distancia entre la superficie del líquido que se va a nebulizar y las superficies de los sustratos portadores que se van a recubrir y, con ello, se ajuste una distancia bien definida entre dicho líquido y las superficies del líquido que se va a recubrir durante la duración del proceso de recubrimiento.

Para reducir el consumo de líquido que se va a nebulizar es preferente, además, que se recoja el líquido depositado en las paredes del recipiente para líquidos y se recicle al líquido que se va a nebulizar.

Preferentemente, el recipiente para líquidos del aparato de recubrimiento, a excepción de las opcionales entradas para gases y las opcionales salidas para gases y/o niebla, está cerrado.

Preferentemente, el líquido que se va a nebulizar es un líquido de baja viscosidad con una viscosidad inferior a 3 cP. En particular se trata a este respecto de soluciones acuosas. Los líquidos que se van a nebulizar también pueden ser, no obstante, soluciones orgánicas, en particular alcohólicas.

También es preferente que los sustratos portadores que se van a recubrir sean esencialmente planos.

Los sustratos portadores que se van a recubrir pueden estar constituidos por una única capa (autoportante), tal como, por ejemplo, plaquitas de vidrio, o también por varias capas.

Es preferente que al menos una capa de los sustratos portadores que se van a recubrir esencialmente ópticamente transparente en la dirección de propagación de una luz de excitación o de una luz de medición incidentes.

La al menos una capa esencialmente ópticamente transparente en la dirección de propagación de una luz de excitación o una luz de medición irradiadas de sustratos portadores que se van a recubrir puede comprender, por ejemplo, un material que está seleccionado del grupo que comprende silicatos, por ejemplo vidrio o cuarzo, plásticos transparentes termoplásticos que pueden moldearse, tratarse por proyección o fresarse, por ejemplo policarbonatos, poliimidas, acrilatos, en particular poli((met)acrilatos de metilo), poliestireno, polímeros de ciclo-olefinas y copolímeros de ciclo-olefinas.

En una forma de realización especial de un aparato de recubrimiento según la invención, los sustratos portadores que se van a recubrir comprenden una capa metálica fina, preferentemente de oro o plata, dado el caso sobre una capa intermedia que se encuentra por debajo con un índice de refracción preferentemente $< 1,5$, seleccionándose el espesor de la capa metálica y la eventual capa intermedia de modo que un plasmón de superficie pueda ser excitado a la longitud de onda de una luz de excitación incidente y/o a la longitud de onda de una luminiscencia generada.

Es preferente que los sustratos portadores que se van a recubrir comprendan guías de ondas ópticos que comprendan una o varias capas. A este respecto, los sustratos portadores pueden diseñarse como guías de ondas ópticos o comprenden zonas guías de ondas discretas.

A este respecto, generalmente es preferente que las zonas guías de ondas continuas o discretas de sustratos portadores que se van a recubrir comprendan una superficie de los sustratos portadores que se va a recubrir.

Es particularmente preferente que los sustratos portadores que se van a recubrir comprendan guías de ondas de capa fina ópticos planos con una capa (a) guía de ondas esencialmente transparente sobre una segunda capa (b) también esencialmente ópticamente transparente con un índice de refracción inferior al de la capa (a) y dado el caso una capa intermedia (b') también esencialmente ópticamente transparente entre la capa (a) y la capa (b) con un índice de refracción también inferior al de la capa (a).

A este respecto, es preferente que las zonas guías de ondas discretas o continuas de los sustratos portadores que se van a recubrir se puedan hacer interactuar ópticamente durante la etapa de detección del procedimiento de detección por afinidad con dichos sustratos portadores con uno o varios elementos de acoplamiento óptico para acoplar la luz de excitación o de medición de una o varias fuentes de luz, eligiéndose dichos elementos de acoplamiento óptico del grupo que comprende acopladores de prisma, acopladores evanescentes con guías de ondas ópticas en contacto entre sí con campos evanescentes solapados, acopladores de superficie frontal con lentes de enfoque, preferentemente lentes cilíndricas, dispuestas frente a una cara frontal de una capa guía de ondas de los sustratos portadores y acopladores de rejilla.

Es particularmente preferente que las zonas guías de ondas discretas o continuas de los sustratos portadores que se van a recubrir estén en contacto con una o varias estructuras de rejilla (c), que posibiliten el acoplamiento de luz de excitación o luz de medición en capas guías de ondas de dichos sustratos portadores, y/o con una o varias estructuras de rejilla (c'), que posibiliten el desacoplamiento de luz de excitación o luz de medición de capas guías de ondas de dichos sustratos portadores, pudiendo tener estas, en caso de estructuras de rejilla (c) y (c') presentes simultáneamente en un sustrato portador, periodos de rejilla iguales o diferentes.

Es preferente que el índice de refracción de esta primera capa (a) ópticamente transparente sea superior a 1,8. También es preferente que la primera capa (a) ópticamente transparente comprenda un material del grupo que comprende nitruro de silicio, TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 y ZrO_2 , de modo particularmente preferente TiO_2 , Ta_2O_5 o Nb_2O_5 .

Además es preferente que la segunda capa (b) ópticamente transparente de los sustratos portadores que se van a recubrir comprenda un material del grupo que comprende silicatos, por ejemplo vidrio o cuarzo, plásticos transparentes termoplásticos que pueden moldearse, tratarse por proyección o fresarse, por ejemplo policarbonatos, poliimidas, acrilatos, en particular poli((met)acrilatos de metilo), poliestirenos, polímeros de ciclo-olefinas y copolímeros de ciclo-olefinas.

Un grupo preferido de formas de realización del procedimiento de recubrimiento según la invención se caracteriza porque los sustratos portadores que se van a recubrir posibilitan la detección de uno o varios analitos en un procedimiento de detección por afinidad mediante detección de una o varias luminiscencias activadas.

- 5 Otro grupo de formas de realización se caracteriza porque los sustratos portadores que se van a recubrir posibilitan la detección de uno o varias analitos en un procedimiento de detección por afinidad mediante la detección de modificaciones del índice de refracción efectivo en el campo cercano (campo evanescente) en una superficie de dichos sustratos portadores.

Un grupo de formas de realización del procedimiento según la invención está caracterizado porque la capa que se va a depositar sobre los sustratos portadores es una capa promotora de la adhesión.

- 10 A este respecto, es preferente que dicha capa promotora de la adhesión tenga un espesor inferior 200 nm, de modo particularmente preferente inferior a 20 nm.

- 15 Para la producción de la capa promotora de la adhesión en un procedimiento de recubrimiento según la invención son adecuados una multiplicidad de compuestos. Por ejemplo, la capa promotora de la adhesión puede comprender un compuesto químico del grupo que comprende silanos, silanos funcionalizados, epóxidos, polímeros funcionalizados, cargados o polares y "monocapas o capas múltiples autoorganizadas, pasivas o funcionalizadas", tioles, fosfatos y fosfonatos de alquilo, copolímeros de bloque multifuncionales, tales como, por ejemplo, poli(L)lisina/polietilenglicoles.

- 20 El procedimiento según la invención está caracterizado porque uno o varios asociados de unión específicos para la detección de uno o varios analitos en un procedimiento de detección por afinidad (con la unión del asociado de unión de una solución suministrada al asociado de unión inmovilizado) están inmovilizados en la superficie de los sustratos portadores.

- 25 Estos asociados de unión específicos pueden aplicarse a una capa promotora de la adhesión aplicada mediante el procedimiento de recubrimiento según la invención o directamente a la superficie no recubierta de los sustratos portadores, proveyendo preferentemente en una etapa de recubrimiento subsiguiente según el procedimiento según la invención a zonas de la superficie exentas de asociados de unión específicos remanentes de una etapa de pasivación (véase más adelante).

- 30 En una forma de realización ampliamente aplicable del procedimiento según la invención ambos asociados de unión específicos inmovilizados en la superficie de dichos sustratos portadores son elementos de reconocimiento biológicos o bioquímicos o sintéticos para el reconocimiento específico de uno o varios analitos que se encuentran en una muestra suministrada.

A este respecto, distintos elementos de reconocimiento específicos de este tipo están presentes en cada caso en una forma lo más pura posible en general en distintas zonas de medición discretas de modo que analitos en general diferentes de la muestra se unen en zonas de medición con elementos de reconocimiento diferentes. Dichas disposiciones de zonas de medición también se denominan "disposiciones de captura".

- 35 Debido a que las propiedades físico-químicas (por ejemplo, la polaridad) de diferentes elementos de reconocimiento difieren de un modo más o menos fuerte, existen también diferencias correspondientes en las condiciones para una inmovilización óptima de estos elementos de reconocimiento, por ejemplo mediante adsorción o enlace covalente, en zonas de medición discretas sobre un soporte sólido conjunto, dado el caso sobre una capa promotora de la adhesión aplicada al mismo. En consecuencia, las condiciones de inmovilización elegidas para inmovilizar una multiplicidad de diferentes elementos de reconocimiento (tales como, por ejemplo, del tipo de capa promotora de la adhesión) simultáneamente para todos los elementos de reconocimiento, no representan apenas un óptimo, sino únicamente un compromiso entre las propiedades de inmovilización de los distintos elementos de reconocimiento.

- 40 En este tipo de ensayos es desventajoso, también, que para la detección de analitos en una pluralidad de diferentes muestras, en general, sea necesario proporcionar un número correspondiente de series discretas de elementos de reconocimiento, a los que se suministran las distintas muestras, sobre soportes conjuntos o discretos. Esto significa la necesidad de un número elevado de series discretas, cuya producción es relativamente cara, para analizar una pluralidad de muestras diferentes.

- 45 En las solicitudes de patente internacionales PCT/EP 03/09561 y PCT/EP 03/09562, cuyo contenido se incorpora al presente documento en su totalidad como parte constituyente de la presente invención, se propone un diseño de ensayo novedoso que posibilita analizar una pluralidad de muestras en una serie de analitos presentes en las muestras en un soporte conjunto simultáneamente. Para ello no se aplican los elementos de reconocimiento específicos diferentes, sino las muestras que se van a analizar mismas no tratadas o después de cuantas menos etapas de procesamiento sean posibles, en zonas de medición discretas en una serie sobre un sustrato portador. Un diseño de ensayo de este tipo se denomina en los dos documentos de solicitud mencionados anteriormente una "arquitectura de ensayo invertida".
- 50
- 55

Otra forma de realización que se usa ampliamente del procedimiento según la invención está caracterizada, por lo tanto, porque el asociado de unión específico inmovilizado en la superficie de dichos sustratos portadores es el uno o los varios analitos mismos que están embebidos en una matriz de muestra nativa o están inmovilizados en una forma de la matriz de muestra modificada con una o varias etapas de procesamiento.

5 Dichos asociados de unión, es decir, los analitos que se van a detectar inmovilizados por sí mismos o los analitos que se van a detectar en una muestra suministrada y/o sus elementos de reconocimiento biológicos o químicos o sintéticos inmovilizados o suministrados en un reactivo de detección suministrado pueden elegirse del grupo que comprenden proteínas, por ejemplo anticuerpos y fragmentos de anticuerpos monoclonales o policlonales, péptidos, enzimas, glicopéptidos, oligosacáridos, lectinas, antígenos para anticuerpos, con proteínas funcionalizadas en el
10 sitio de unión adicionales ("proteína con marca (*tag*)", tal como, por ejemplo, proteínas con marca de histidina (*his-tag*), así como ácidos nucleicos (por ejemplo ADN, ARN, oligonucleótidos) y análogos de ácidos nucleicos (por ejemplo, APN), aptámeros, receptores unidos a membrana o aislados y sus ligandos, cavidades generadas mediante síntesis química para recoger impresiones moleculares, polímeros naturales y sintéticos, etc.

15 A este respecto dichos asociados de unión específicos aplicados sobre la superficie de los sustratos portadores pueden estar inmovilizados en zonas de medición discretas (puntos de detección), que pueden tener una geometría discrecional, por ejemplo en forma circular, ovalada, triangular, rectangular, poligonal, etc., pudiendo contener una zona de medición asociados de unión específicos idénticos o diferentes.

Es preferente que las zonas de medición discretas se generen mediante aplicación espacialmente selectiva de asociados de unión específicos sobre dichos sustratos portadores, preferentemente usando uno o varios
20 procedimientos del grupo de procedimientos que comprende "generación de puntos de detección por chorro de tinta", generación de puntos de detección mecánica, "impresión por microcontacto", puesta en contacto en forma fluida de las zonas para las zonas de medición que se van a obtener con los compuestos que se van a inmovilizar mediante su suministro en microcanales paralelos o cruzados, con la aplicación de diferencias de presión o de potenciales eléctricos o electromagnéticos, así como procedimientos de inmovilización fotoquímicos y
25 fotolitográficos.

Tal como se ha mencionado ya anteriormente, es preferente para fines de minimización de la unión no específica de moléculas de analito o de sus reactivos de detección en zonas exentas de asociados de unión específicos inmovilizados de la superficie del sustrato portador, que entre las zonas de medición separadas espacialmente o en zonas parciales no ocupadas dentro de estas zonas de medición se apliquen compuestos "químicamente neutros"
30 con respecto a los analitos y/o con respecto a sus asociados de unión. Preferentemente estos compuestos "químicamente neutros" con respecto a los analitos y/o con respecto a sus asociados de unión se eligen, por ejemplo, de los grupos que comprenden albúminas, en particular albúmina de suero bovino o albúmina de suero humano, caseína, anticuerpos no específicos, policlonales o monoclonales, heterólogos o anticuerpos empíricamente no específicos para el o los analitos que se van a detectar y sus asociados de unión (en particular para inmunoensayos), detergentes, tales como, por ejemplo, Tween 20, ADN fragmentado natural o sintético no
35 hibridado con los polinucleótidos que se van a analizar, tal como, por ejemplo, extractos de esperma de arenque o salmón (en particular para ensayos de hibridación de polinucleótidos), o también polímeros no cargados, pero hidrófilos, tales como, por ejemplo, polietilenglicol o dextranos.

Un objeto de la presente invención es, por lo tanto, un procedimiento según la invención según una de las formas de realización mencionadas que está caracterizado porque la capa depositada sobre los sustratos portadores es una
40 capa de pasivación, que se aplica a compuestos "químicamente neutros" con respecto a los analitos y/o con respecto a sus asociados de unión entre las zonas de medición separadas espacialmente o en zonas parciales no ocupadas dentro de estas zonas de medición después de generar estas zonas de medición y que preferentemente comprende, por ejemplo, compuestos comprendidos en los grupos que comprenden albúminas, en particular
45 albúmina de suero de bovino o albúmina de suero humano, caseína, anticuerpos no específicos, policlonales o monoclonales, heterólogos o anticuerpos empíricamente no específicos para el o los analitos que se van a detectar y sus asociados de unión (en particular para inmunoensayos), detergentes, tales como, por ejemplo, Tween 20, ADN fragmentado natural o sintético no hibridado con los polinucleótidos que se van a analizar, tal como, por ejemplo, extractos de esperma de arenque o salmón (en particular para ensayos de hibridación de polinucleótidos), o también
50 polímeros no cargados, pero hidrófilos, tales como, por ejemplo, polietilenglicol o dextranos.

Otro objeto de la presente invención es un sustrato portador para la detección de uno o varios analitos en una procedimiento de detección por afinidad que comprende una capa promotora de la adhesión, caracterizado porque dicha capa promotora de la adhesión se genera con un procedimiento de recubrimiento según la invención según una de las formas de realización mencionadas.

55 También es un objeto de la presente invención un sustrato portador para detectar uno o varios analitos en una procedimiento de detección por afinidad que comprende una capa de pasivación que recubre el sustrato portador al menos en zonas parciales, caracterizado porque dicha capa de pasivación se genera con un procedimiento de recubrimiento según la invención según una de las formas de realización mencionadas.

Otro objeto de la presente invención es un sustrato portador según una de las formas de realización mencionadas para usar en diagnóstico de seres humanos y/o animales.

La presente invención se explicará a continuación con más detalle, a modo de ejemplo, en un ejemplo de realización.

5 Ejemplos:

1. Aparato de recubrimiento y procedimiento de recubrimiento según la invención

En la fig. 1 está representada una representación esquemática de un aparato de recubrimiento según la invención. En el presente ejemplo se "pasivarán" con el aparato según la invención zonas no recubiertas de asociados de unión específicas de sustratos portadores preparados para un procedimiento de detección por afinidad, es decir, en estas zonas se aplica una "capa de pasivación". El aparato según la invención comprende en esta forma de realización según la invención un desecador (1) con un volumen de aproximadamente 2 l como recipiente para el líquido que se va a nebulizar y del volumen de niebla que se va a generar mediante el líquido, un soporte (2) para alojar los sustratos portadores que se van a recubrir, un pulverizador de ultrasonidos ("Lucky Reptile Mini-Nebler", Reptilica, D-90431 Núremberg, Alemania) como actuador (3) para la nebulización del líquido, un vidrio de reloj como separador de gotas (4) así como una entrada de gases (5) y una salida (6) para gases y/o niebla generada.

En estado de funcionamiento el generador de ultrasonidos está sumergido en el líquido que se va a nebulizar (7). Para minimizar el volumen de líquido necesario, en la forma de realización del presente ejemplo el generador de ultrasonidos se dispuso en el suelo del desecador, allí se introdujo hasta justo por debajo de la membrana oscilante generadora de sonido en polidimetilsiloxano (PDMS), de modo que solo fuera necesaria la aplicación de una capa fina de líquido que se va a nebulizar.

Las gotitas más finas generadas por el efecto del ultrasonido y que se elevan sobre el nivel de líquido se someten adicionalmente a turbulencia usando una corriente débil de nitrógeno, que se introduce a través de la entrada (5) en el recipiente, para generar en la totalidad del recipiente una distribución lo más homogénea posible de la niebla resultante.

Las guías de ondas de capa fina planas ópticas que se van a recubrir como sustratos portadores, con las medidas exteriores de 14 mm de anchura x 57 mm de longitud x 0,7 mm de espesor (para detalles adicionales véase más adelante), se mantienen en un soporte (2) durante el proceso de recubrimiento con una distancia de aproximadamente 8 cm sobre la horizontal de la superficie del líquido (con respecto a la superficie del líquido). El soporte está diseñado en el presente ejemplo como un soporte de plástico provisto de agujeros, de modo que a través de estos agujeros pueda descargarse el exceso de líquido depositado desde la niebla. En la forma de realización del presente ejemplo, el soporte puede recoger diez guías de ondas de capa fina como sustratos portadores con las medidas mencionadas.

El vidrio de reloj como separador de gotas está unido, en el presente ejemplo, a la cara inferior del soporte (2) y protege el sustrato portador que se va a recubrir contra salpicaduras de la solución de nebulización (solución de recubrimiento).

La niebla distribuida de forma muy homogénea generada se deposita sobre los sustratos portadores con la capa (a) guía de ondas muy difractiva dispuesta en el ejemplo presente en la cara superior (con respecto a la disposición en el aparato de recubrimiento), en forma de gotas muy pequeñas, y forma ya películas de líquido finas continuas dentro de un periodo de 5 minutos a 10 minutos sobre las caras superiores de estos sustratos portadores. Después de un periodo de incubación total de 30 minutos, los sustratos portadores se extraen del aparato de recubrimiento, se enjuagan cuidadosamente con agua corriente de pureza superior (Millipore) y subsiguientemente se secan en nitrógeno.

En el ejemplo presente es necesario para una guía de ondas de capa fina de las medidas mencionadas como sustrato portador un volumen de aproximadamente 2 ml de solución de pasivación (líquido que se va a nebulizar).

45 2. Realización del procedimiento de recubrimiento convencional

2.1. Sustratos portadores

Como sustrato portador para realizar con el mismo más tarde un procedimiento de detección por afinidad sirven las guías de ondas de los ejemplos anteriores (tal como se han indicado también en 1.) planas ópticas, en cada caso con unas medidas exteriores de 14 mm de anchura x 57 mm de longitud x 0,7 mm de espesor. Estos sustratos portadores comprenden en cada caso un sustrato de vidrio (AF 45) y una capa fina muy refractiva aplicada sobre el mismo de 150 nm de pentóxido de tántalo. En el sustrato de vidrio están moduladas, de forma paralela a la longitud, dos rejillas de relieve de superficie (periodo de rejilla: 318 nm, profundidad de rejilla: (12 +/- 2) nm) a una distancia de 9 mm, que servirán como rejillas difractivas del acoplamiento de luz en la capa muy refractiva.

Sobre la superficie de la capa de óxido metálico de este sustrato portador se aplica una monocapa de monofosfato de dodecilo (DDP) formada mediante autoorganización ("autoensamblaje") como capa promotora de la adhesión. La superficie de los sustratos portadores provista de esta capa promotora de la adhesión se caracteriza por una gran hidrofobicidad. Sobre los sustratos portadores provistos de la capa hidrófoba promotora de la adhesión se aplican en cada caso 6 microdisposiciones idénticas de cada una 144 zonas de medición discretas (puntos de detección), a su vez en una disposición de en cada caso 16 líneas y 9 columnas, con un aplicador de inyección de tinta (modelo NP1.2, GeSiM, Grosserkmannsdorf, Alemania). Cada punto de detección se genera mediante la aplicación de una única gota de aproximadamente 350 pl de volumen sobre la superficie del chip.

2.2. Reactivos y generación de series de zonas de medición sobre los sustratos portadores

En el ejemplo presente se inmovilizarán en un procedimiento de detección por afinidad posterior en los sustratos portadores preparados los propios analitos que se van a detectar, embebidos en una matriz de muestra nativa o en una forma de la matriz de muestra preparada en unas pocas etapas de preparación de muestras (lisado de células). Estas formas de las muestras se denominarán a continuación también "muestras idénticas en naturaleza". La etapa de detección se realizará después mediante el suministro de reactivos de detección adicionales.

Para la detección de analitos de proteínas biológicamente relevantes en las muestras "idénticas en naturaleza" se usa una línea celular de cáncer de intestino humano (HT29). Estas células adherentes se cultivan en un medio de McCoy 5A a 37 °C en un matraz de cultivo hecho de plástico convencional (Greiner Bio-One, St. Gallen, Suiza, N° de catálogo 658170). Los cultivos celulares del mismo tipo en diferentes matraces de cultivo o bien se irradian después durante 10 minutos con luz UV o bien se tratan con doxorubicina 10 µM. Como muestra comparativa para estos cultivos celulares tratados se usa un cultivo celular de otro modo idéntico que permanece sin tratar y sirve en el procedimiento de detección analítico como control negativo.

Después del tratamiento los distintos cultivos celulares se lavan cada uno con 10 ml de PBS (solución de cloruro de sodio tamponada con fosfato, enfriada a 4 °C).

Después, las células, por medio de la adición de tampón de lisis, que contiene urea 7 M, tiourea 2 M y Complete (inhibidor de proteasa, Roche AG, 1 comprimido/50 ml), se sueltan del suelo del matraz de cultivo y simultáneamente se lisan totalmente, desnaturalizando espontáneamente y solubilizando todos los componentes celulares que contienen proteínas. El lisado celular obtenido de este modo se centrifuga para la separación de componentes insolubles (por ejemplo, fragmentos de ADN y de membranas celulares) durante 5 minutos a 13.000 x g en una centrifugadora de mesa (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). El sobrenadante se retira y se usa para las mediciones siguientes, encontrándose la concentración de proteínas total típicamente entre 5 mg/ml y 10 mg/ml.

Los tratamientos descritos de los cultivos de células HT29 provocan daños en el ADN, y concretamente en caso de radiación UV, entre otras cosas mediante la rotura de cadenas o mediante la formación de dímeros de timina y en caso de adición de doxorubicina mediante su intercalación entre bases de ADN adyacentes. Esto tiene como consecuencia que dentro de las células dañadas se activan o se desactivan determinadas rutas de señalización, lo que, por ejemplo, puede tener como consecuencia la muerte celular programada (apoptosis). Son responsables de la activación o la desactivación de rutas de señalización determinadas proteínas clave (denominadas "proteínas marcadoras") que regulan una o varias rutas de señalización mediante la fosforilación en uno o varios sitios diferentes.

Un ejemplo de regulación de una ruta de señalización mediante una proteína marcadora es la proteína supresora de tumores p53, que, mediante su grado de fosforilación, controla la división celular, la apoptosis y determinados mecanismos de reparación para el ADN dañado. La regulación de estas rutas señalizadoras está alterada en células cancerosas a menudo en un determinado o en varios sitios mediante mutaciones o la ausencia de una o varias proteínas marcadoras, pudiendo ser finalmente responsable de un crecimiento incontrolado.

La detección y la determinación de contenidos relativos de p53 y P-p53 (forma fosforilada de p53) se realiza usando anticuerpos muy específicos que se unen a estas proteínas, que se inmovilizarán como analitos en los lisados celulares obtenidos y tratados posteriormente directamente sobre los sustratos portadores (preferentemente después de la aplicación de una capa promotora de la adhesión tal como se ha descrito anteriormente).

Los lisados celulares obtenidos se diluyen en un factor de 10 - 20 a una concentración de proteínas totales de 0,4 mg/ml y a continuación se aplican a zonas de medición discretas para generar una serie de zonas de medición sobre la superficie de óxidos metálicos provistas de la capa promotora de la adhesión de guías de ondas de capa fina como sustratos portadores. Adicionalmente a las zonas de medición con lisados celulares aplicados a las mismas, cada microserie contiene otras zonas de medición con albúmina de suero bovino marcado de forma fluorescente con Cy5 (Cy5-BSA), que se usan para la referencia de diferencias locales y/o variaciones temporales de la intensidad de la luz de excitación en la medición ("puntos de detección de referencia"). El Cy5-BSA se aplica en una concentración de 0,5 nM en urea 7 M, tiourea 2 M (tasa de marcado: aproximadamente 3 moléculas de Cy5 por molécula de BSA).

La geometría de la disposición de las zonas de medición en una serie bidimensional y una disposición lineal de seis series (idénticas) sobre un sustrato portador se representan en la fig. 2. El diámetro de los puntos de detección, con una distancia (de centro a centro) de 300 µm, es de aproximadamente 120 µm. Una serie de zonas de medición

comprende para este ejemplo, en cada caso, una disposición de zonas de medición con 12 muestras diferentes aplicadas en 4 replicados, estando dispuestas las 4 zonas de medición idénticas, en cada caso, en una columna conjunta perpendicularmente a la dirección de propagación de la luz guiada en la capa guía de ondas de dichos sustratos portadores durante la etapa de detección. Usando las 4 zonas de medición idénticas correspondientes se determinará la reproducibilidad de las señales de medición dentro de la serie de zonas de medición. Entre las columnas de zonas de medición y junto a las mismas con muestras que se van a analizar aplicadas a las mismas están dispuestas en cada caso columnas de zonas de medición con Cy5-BSA aplicado a las mismas (con fines de referencia). La plataforma analítica según la invención comprende en este ejemplo 6 series de este tipo idénticas de zonas de medición, tal como se representa en la fig. 2.

2.3. Pasivación de las zonas libres entre zonas de medición y dentro de las mismas

Después de aplicar la muestra "idéntica en naturaleza" y Cy5-BSA, los sustratos portadores se secan en aire ambiente exento de polvo, antes de saturar (pasivar) con albúmina de suero bovino (BSA) las zonas superficiales hidrófobas no recubiertas de los sustratos portadores en otra etapa de operación para minimizar la unión específica no deseada de reactivos de detección, en este caso de anticuerpos y/o moléculas marcadas fluorescentemente.

Con el procedimiento según la invención ya descrito en el punto 1. de pasivación de superficies se comparan otros dos procedimientos (punto 2.3.1. procedimiento de inmersión y punto 2.3.2. procedimiento de pulverización), usando en todos los casos solución de pasivación filtrada (imidazol 50 mM, NaCl 100 mM, 3 % de BSA (p/v), pH 7,4). Después de realizar la pasivación de la superficie libre mediante los procedimientos descritos en el punto 1. o que se describen a continuación, los sustratos portadores se mantienen a 4 °C en tubos de poliestireno cerrados hasta la medición en el marco del procedimiento de detección por afinidad que se va a llevar a cabo a continuación.

2.3.1. Procedimiento de inmersión

Las guías de ondas de capa fina planas ópticas como sustratos portadores se sumergen verticalmente en un recipiente (tubo de poliestireno) llenado con solución de pasivación, de modo que se humecte la superficie total de los sustratos portadores lo más rápida y simultáneamente posible. Después de una incubación de una hora a temperatura ambiente, los sustratos portadores se enjuagan cuidadosamente con agua corriente de la mayor pureza (Millipore) y a continuación se secan en una corriente de nitrógeno (de calidad 50). Por cada guía de ondas de capa fina de las dimensiones mencionadas como sustrato portador es necesario un volumen de aproximadamente 25 ml de solución de pasivación.

2.3.2. Procedimiento de pulverización

La solución de pasivación se pulveriza, a este respecto, mediante un pulverizador de cromatografía (GlasKeller N° de catálogo 12.159.603, Basilea, Suiza) y una presión de aproximadamente 350 kPa sobre los sustratos portadores, hasta que sobre la superficie de los mismos que se va a recubrir se haya formado una película de líquido continua. La distancia entre la boquilla de salida del pulverizador y la superficie del sustrato portador es, a este respecto, de aproximadamente 30 cm. A continuación, los sustratos portadores tratados de este modo se incuban en un recipiente cerrado al 100 % de humedad del aire y durante una hora a temperatura ambiente, después se enjuagan cuidadosamente con agua corriente de la mayor pureza (Millipore) y a finalmente se secan en una corriente de nitrógeno (de calidad 50). Por cada sustrato portador de la forma de realización mencionada en estos ejemplos es necesario un volumen de aproximadamente 3 ml de solución de pasivación.

3. Procedimiento de detección por afinidad

3.1. Arquitectura de ensayo

La detección de determinadas proteínas en general (es decir, por ejemplo con o sin fosforilación) o determinadas proteínas especialmente en forma activada (por ejemplo, fosforilada) en los lisados celulares inmovilizados aplicados a zonas de medición discretas se realiza mediante la adición secuencial de reactivos de detección correspondientes antes de la medición las señales de fluorescencia resultantes: en la preparación de una primera etapa de ensayo se diluyen anticuerpos de conejo específicos del analito policlonales (anticuerpo A1 (No de ref: 9282): anti-p53; anticuerpo A2 (N° de ref: 9284): anti-fosfo-p53 (Ser15); ambos anticuerpos obtenidos de Cell Signaling Technology, INC., Beverly, MA, Estados Unidos) a una relación 1:500 en tampón de ensayo (imidazol 50 mM, NaCl 100 mM, 5 % de BSA, 0,1 % de Tween 20, pH 7,4). De estas diferentes soluciones de anticuerpos se aplican en cada caso 30 µl a, en cada caso, una de las 6 series idénticas de zonas de medición, aplicación seguida de una incubación a temperatura ambiente durante la noche (primera etapa de ensayo). Los anticuerpos en exceso unidos no específicamente se eliminan mediante lavado de una cada una de las series con tampón de ensayo (2 x 200 µl).

Para la detección de anticuerpos específicos del analito unidos a zonas de medición discretas presentes allí en los lisados inmovilizados se realiza una segunda etapa de ensayo usando un fragmento Fab anti-conejo marcado con Alexa Fluor 647 (Molecular Probes, N° de catálogo Z-25308, Leiden, Países Bajos), que se une a los anticuerpos A1 y A2 mencionados anteriormente. Este fragmento Fab marcado fluorescentemente, se aplica sobre las series partiendo de la solución madre obtenida comercialmente con una dilución 1:500 en tampón de ensayo (cada vez 30 µl) y a continuación se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. A continuación se lavan las

series con tampón de ensayo (en cada caso dos veces con 200 μ l) para eliminar fragmentos Fab marcados fluorescentemente unidos de forma no específica. Después las plataformas analíticas preparadas de este modo se mantienen hasta la etapa de detección mediante excitación y detección de la señal de fluorescencia resultante en un lector ZeptoREADER™ (véase más adelante).

5 3.2. Determinación de las señales de fluorescencia a partir de series de zonas de medición

Las señales de fluorescencia a partir de distintas series de zonas de medición se miden automáticamente de forma secuencial con un lector ZeptoREADER™ (Zeptosens AG, CH-4108 Witterswil, Suiza). Para cada serie de zonas de medición se ajusta la guía de ondas de capa fina plana óptica como sustrato portador (según 2.1) para que cumpla la condición de resonancia para el acoplamiento de la luz mediante una estructura de rejilla (c) en la capa de pentóxido de tántalo guía de ondas y para maximizar la luz de excitación disponible en las zonas de medición. A continuación, de cada serie se genera un número, que puede elegirse por parte del usuario, de imágenes de las señales de fluorescencia procedentes de la serie en cuestión, pudiendo elegirse tiempos de exposición diferentes. La longitud de la ondad de excitación es en las mediciones para el ejemplo presente de 635 nm, la detección de la luz de fluorescencia se realiza con una cámara enfriada a la longitud de fluorescencia de Cy5, usando un filtro de interferencia (transmisión (675 ± 20) nm) para suprimir la luz dispersa a la longitud de onda de excitación, que está ubicado en frente del objetivo de la cámara. Las imágenes de fluorescencia generadas se almacenan automáticamente en discos de almacenamiento del ordenador de control. Se describen más detalles del sistema óptico (lector ZeptoREADER™) en la solicitud de patente internacional PCT/EP 01/10012, que se incorpora al presente documento en su totalidad como parte constituyente de la presente solicitud.

20 3.3. Evaluación y referenciación

La intensidad de señal promedio de las zonas de medición (puntos de detección) se determina usando un programa informático de análisis de imágenes ZeptoVIEW™, Zeptosens AG, CH-4108 Witterswil), que posibilita evaluar las imágenes de fluorescencia de una pluralidad de series de zonas de medición de forma semiautomática.

Los datos brutos de los píxeles individuales de la cámara representan una matriz bidimensional de valores de medición digitalizados, correspondiendo la intensidad medida como valor de medición de un píxel individual al área de la plataforma sensora proyectada sobre el mismo. Para la evaluación de los datos se dispone en primer lugar manualmente una red bidimensional (coordinada) sobre los puntos de imagen (valores de píxeles) de modo que la imagen parcial de cada punto de detección se encuentre en un elemento de red individual bidimensional. Dentro de este elemento de red se asocia a cada punto de detección una "zona de evaluación" (*area of interest*, AOI) circular que se adapte lo mejor posible, con un radio definido por el usuario (típicamente de 120 μ m). Por medio del programa informático de análisis de imágenes se determina el sitio de cada AOI individualmente como función de la intensidad de señal de cada píxel individual. A este respecto, el radio definido por el usuario al principio de las AOI se conserva. Como intensidad de la señal bruta promedio de cada punto de detección se determina la media aritmética de los valores de píxeles (intensidad de la señal) dentro de una zona de evaluación elegida.

Las señales de fondo se determinan a partir de las intensidades de señal medidas entre los puntos de detección. Para ello se definen por punto de detección otras cuatro áreas circulares (con típicamente un radio combinado similar al de las zonas de evaluación de los puntos de detección) como zonas de evaluación para la determinación de la señal de fondo que preferentemente están dispuestas en el medio entre puntos de detección adyacentes. A partir de estas cuatro áreas circulares se determina la intensidad de señal de fondo promedio, por ejemplo como la media aritmética de los valores de píxeles (intensidades de señal) dentro de una AOI elegida para ello. La intensidad de señal neta promedio de las zonas de medición (puntos de detección) se calcula después como diferencia entre la intensidad de señal bruta promedio total y la intensidad de fondo promedio local de la punto de detección correspondiente.

La referenciación de la intensidad de señal neta de todos los puntos de detección se realiza en cada caso usando puntos de detección de referencia (Cy5-BSA) de cada una de las series de zonas de medición. Para ello se divide la intensidad de señal neta de cada uno de los puntos de detección mediante el valor medio de las intensidades de señal netas del punto de detección de referencia adyacente de la misma serie (dispuesta de forma paralela a la dirección de propagación de la luz guiada en la plataforma sensora de campo evanescente). Mediante esta referenciación se compensa las diferencias locales de la intensidad de la luz de excitación disponible ortogonalmente a la dirección de propagación de la luz tanto dentro de cada una de las microseries como también entre distintas microseries.

3.4. Resultados

La fig. 3A muestra una imagen típica de la señal de fluorescencia de una microserie después de un ensayo de detección de p53, habiéndose pasivado superficies libres entre zonas de medición usando el procedimiento de inmersión (según el punto 2.3.1.). La intensidad de señal dentro de cada uno de los puntos de detección de referencia individuales y entre distintos puntos de detección de referencia (Cy5-BSA) está distribuida muy uniforme y homogéneamente y el borde de puntos de detección circulares casi ideales está delimitado de forma aguda frente al fondo (véase la imagen en detalle). Por el contrario, las zonas de medición de lisados celulares inmovilizados están

caracterizadas por "ensuciamientos" de tipo contorneado, lo que se puede reconocer de forma particularmente clara intensidades de señal altas. Estos "ensuciamientos" se causan, tal como se ha descrito anteriormente, durante el momento de la inmersión de los sustratos portadores provistos de puntos de detección en la solución de pasivación, y concretamente mediante partes de las muestras no adsorbidas de forma fija, que se han soltado de las zonas de medición, por la solución de pasivación, que se adsorben a lo largo de la corriente en dirección contraria a la inmersión en la proximidad inmediata de una de dichas zonas de medición sobre la superficie de un sustrato portador aún no pasivado libre, incluso antes de que estos puedan pasivarse con el BSA presente en la solución de pasivación. Debido a que estas partes de muestras que se han soltado de las zonas de medición y adsorbidas de nuevo en la vecindad también contienen siempre una cantidad determinada de analitos que se van a detectar, en la lectura en dichos sitios se hace visible una señal de fluorescencia correspondiente.

La fig. 3B muestra una imagen típica de la señal de fluorescencia de una microserie después de un ensayo de detección de p53, habiéndose pasivado superficies libres entre zonas de medición usando el procedimiento de pulverización (según el punto 2.3.2.). Las señales de los puntos de detección de referencia son comparables tanto con respecto a su forma y uniformidad u homogeneidad como también con respecto a su intensidad con las de microseries después de usar el procedimiento de inmersión. Las señales de las zonas de medición con lisados celulares inmovilizados son comparables con respecto a su intensidad también con las señales de medición correspondientes de las microseries que se han sometido al procedimiento de inmersión. Debido a que en el procedimiento de pulverización, al contrario que en el procedimiento de inmersión, las corrientes de solución de pasivación sobre la superficie del sustrato portador son despreciables, los puntos de detección de lisado celular, sin embargo, no muestran los "ensuciamientos" descritos anteriormente, sino solamente pequeñas "protuberancias" con intensidad de fluorescencia más reducida, que están dispuestas de forma evidente de forma casi estadística alrededor de los puntos de detección previstos. Estas vienen causadas, muy probablemente, por el desprendimiento local y la descarga de lisado celular unido de forma no fija a los bordes de las zonas de medición, debido a que a este respecto las gotas de pulverización pequeñas incidentes de la solución de pasivación durante el impacto con la superficie presentan un impulso no despreciable perpendicular a la superficie que se va a recubrir, lo que puede generar salpicaduras.

La fig. 3C muestra una imagen típica de la señal de fluorescencia de una microserie después de un ensayo de detección de p53, habiéndose pasivado superficies libres entre zonas de medición por medio del procedimiento según la invención mediante la nebulización de la solución de pasivación, tal como se ha descrito en el punto 1. Es significativo, a este respecto, en comparación con las microseries pasivadas con los otros procedimientos descritos, la alta calidad con unas comparativamente buenas homogeneidad y forma de puntos de detección de referencia y puntos de detección de lisado celular. A este respecto se pueden evitar "ensuciamientos" o "protuberancias" de los puntos de detección de lisado celular debido a, aparte de influencias de la fuerza de gravedad, la aplicación esencialmente no dirigida y exenta de impulso de la solución de pasivación en forma de gotitas finas de niebla, cuyo tamaño es claramente inferior que cualquier gotita producida por pulverización.

La eficiencia de la pasivación de la superficie exenta de componentes de la muestra inmovilizada, es decir, la medida de la supresión de la unión no específica por medio del BSA presente en la solución de pasivación, puede determinarse semicuantitativamente a partir de la intensidad de señal medida en las zonas de medición exentas de puntos de detección (entre los puntos de detección, "señales de fondo"). Una superficie recubierta de forma incompleta con BSA daría, en consecuencia, debido a la unión no específica que tiene lugar al menos parcialmente de los reactivos de detección marcados fluorescentemente usados en el ensayo (Fab anti-conejo Alexa 647), sobre la superficie exenta de BSA, una señal más elevada que una superficie recubierta totalmente con BSA.

La fig. 4A muestra los valores medios y las desviaciones típicas de las intensidades de la señal de fondo, que se ha determinado entre todos los puntos de detección de superficies del sustrato portador libres pasivadas usando los tres distintos procedimientos con las microseries generadas en las mismas. Las designaciones A, B y C se refieren, al igual que en la fig. 4B, la fig. 5A y la fig. 5B a la pasivación mediante el procedimiento de inmersión (A), procedimiento de pulverización (B) o el procedimiento por medio de la nebulización de la solución de pasivación (C). Se muestra por medio de las intensidades de fondo medidas (reducidas), sorprendentemente, que la eficiencia de la pasivación después del tratamiento con el procedimiento de pulverización y del procedimiento de nebulización según la invención es claramente superior que después del uso del procedimiento de inmersión para la pasivación de la superficie. Además, la desviación típica de las intensidades de señales de fondo después de usar el procedimiento de pulverización o el de nebulización según la invención con el 11-12 % es en cada caso claramente inferior a la de después de usar el procedimiento de inmersión para la pasivación de superficies, que proporciona una desviación típica de las intensidades de señales de fondo del 34 %. A partir de ello se llega a la conclusión de que la uniformidad o la homogeneidad del recubrimiento después de usar el procedimiento de pulverización o el de nebulización es superior a la que se consigue usando el procedimiento de inmersión.

La fig. 4B muestra los valores medios de intensidades de fluorescencia de todos los puntos de detección de referencia de la microserie, habiéndose tratado las superficies libres de los sustratos portadores correspondientes de nuevo con los tres procedimientos de recubrimiento diferentes. Sorprendentemente, en la comparación se muestra que la intensidad de señal aumenta levemente después de usar el procedimiento de pulverización y claramente después de usar el procedimiento de nebulización (a saber, en aproximadamente el 60 %), en comparación con las señales después de usar el procedimiento de inmersión. Estas diferencias pueden atribuirse a la reducción del

volumen de la solución de pasivación aplicada, que probablemente pueda desprenderse parcialmente de los compuestos Cy5-BSA aplicados para la referenciación, así como a la aplicación exenta de impulso de la solución de pasivación en el caso del procedimiento de nebulización.

La fig. 5A muestra las intensidades medias y las desviaciones típicas de las señales de fluorescencia de las zonas de medición, previstas para la detección del analito, de las microseries, cuyas superficies de sustrato portador se han tratado en cada caso con los distintos procedimientos de pasivación y que después se han incubado con soluciones de anticuerpo A1 (anti-p53) (Fig. 5A, arriba) y A2 (anti-fosfo-p53) (Fig. 5A, abajo) y, a continuación, en cada caso, para la detección por medio de detección con fluorescencia, con fragmentos de F_{ab} anticonejo Alexa 647 Flour. Las intensidades de señales de fluorescencia medidas se correlacionan con el contenido relativo de analitos presentes, en cada caso, en el lisado celular (correspondiente a la concentración de lisado celular; una señal más elevada se corresponde a una concentración de analito más elevada, no siendo la correlación, obviamente, lineal.

En comparación con la muestra de control sin tratamiento (caracterizada en cada caso en las fig. 5A y fig. 5B como "Control") el lisado de cultivo de células HT29 tratadas con luz UV (en cada caso caracterizado en la fig. 5A y la fig. 5B con "+UV") y, en particular, con doxorubicina (en cada caso caracterizado en la fig. 5A y la fig. 5B con "+Dx") un contenido claramente aumentado de p53, provocado por un aumento de la expresión de esta proteína en las células en cuestión).

Por el contrario, la fig. 5B muestra que el contenido de fosfo-p53 en la muestra tratada con luz UV también está claramente aumentado en comparación con la muestra de control, mientras que el contenido de fosfo-p53 en la muestra tratada con doxorubicina, a pesar de una concentración total muy aumentada de p53 solo es ligeramente superior (en el caso de concentraciones en el lisado de 0,2 mg/ml a 0,4mg/ml) o incluso inferior (en el caso de concentraciones en el lisado de 0,1 mg/ml) que el de la muestra de control. Esto muestra que la ruta de señalización inducida por daños en el ADN, en la que la fosfo-p53 actúa como proteína clave para la regulación, en esta línea celular responde claramente al tratamiento con luz UV, pero, evidentemente, solo de forma débil al tratamiento con doxorubicina.

Es esencial, con respecto a la influencia de los distintos procedimientos usados para la pasivación de las superficies libres de sustratos portadores que las intensidades de señales medidas en las zonas de medición para la detección del analito, considerando las variaciones provocadas experimentalmente (barras de error), no sean estadísticamente significativamente diferentes, es decir, que sean independientes del procedimiento de recubrimiento para la pasivación de superficies realizado. Esto significa que, evidentemente al contrario que los efectos sobre los compuestos Cy5-BSA usados para la referenciación, los distintos procedimientos de pasivación no se diferencian en la influencia sobre el lisado celular adsorbido en los sustratos portadores.

En resumen, estos resultados muestran que el procedimiento según la invención para aplicar la solución de pasivación sobre la superficie de sustratos portadores mediante nebulización, al contrario que el procedimiento de inmersión convencional y también que el procedimiento de pulverización, ofrece claras ventajas y cumple totalmente los requerimientos establecidos. Para el experto es obvio que el procedimiento para el recubrimiento de sustratos portadores para la pasivación de superficies, representado en los ejemplos de realización anteriores, puede aplicarse directamente a recubrimientos con capas promotoras de la adhesión adecuadas y puede generalizarse de este modo.

REIVINDICACIONES

1. Aparato para el recubrimiento de sustratos portadores para la detección de uno o varios analitos en un procedimiento de detección por afinidad que comprende:
 - 5 - un recipiente cerrado (1) excepto por opcionales entradas de gas (5) y salidas de gas (6) para alojar un líquido (7) que se va a nebulizar que contiene sustancias que se van a depositar sobre al menos una superficie de dichos sustratos portadores así como un volumen de niebla generado sobre el líquido en estado de funcionamiento,
 - un actuador (3) para originar el proceso de nebulización sumergido en el líquido (7) que se va a nebulizar por debajo de un
 - 10 - soporte (2), estando el soporte en el volumen de niebla generado en el recipiente cerrado y no estando el sustrato portador en contacto con la superficie del líquido que se va a nebulizar, **caracterizado porque** el soporte sirve para alojar horizontalmente, con respecto a la superficie del líquido que se va a nebulizar, y mantener los sustratos portadores durante el proceso de recubrimiento.
2. Aparato según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el actuador mencionado en el estado de funcionamiento está sumergido en líquido que se va a nebulizar.
- 15 3. Aparato según una de las reivindicaciones 1 - 2, **caracterizado porque** este comprende adicionalmente un separador de gotas.
4. Aparato según la reivindicación 3, **caracterizado porque** el separador de gotas permite el paso de gotas hasta un tamaño definido y comprende una red de malla fina con cuyo tamaño de malla se determina el tamaño máximo de las gotas que pasan a su través.
- 20 5. Aparato según una de las reivindicaciones 1 - 4, **caracterizado porque** este adicionalmente comprende medios para generar una distribución uniforme de la niebla generada y que se va a depositar sobre los sustratos portadores en el entorno de dichos sustratos portadores.
6. Aparato según una de las reivindicaciones 1 - 5, **caracterizado porque** este adicionalmente comprende medios para controlar y/o regular la temperatura del líquido que se va a nebulizar y/o de algunas o de todas las paredes del recipiente del líquido.
- 25 7. Aparato según una de las reivindicaciones 1 - 6, **caracterizado porque** el soporte del aparato de recubrimiento para alojar y/o mantener el sustrato portador durante el proceso de recubrimiento puede termostatzarse.
8. Procedimiento de recubrimiento de sustratos portadores para la detección de uno o varios analitos en un procedimiento de detección por afinidad, **caracterizado porque**
 - 30 - dichos sustratos portadores que se van a recubrir están dispuestos en un soporte de un aparato de recubrimiento según una de las reivindicaciones 1 - 7,
 - el líquido contenido en el recipiente para líquidos de dicho aparato de recubrimiento se nebuliza y
 - se realiza una deposición de las sustancias contenidas en el líquido nebulizado a partir de la niebla generada sobre los sustratos portadores que se van a recubrir,
- 35 no encontrándose los sustratos portadores en contacto con la superficie del líquido que se va a nebulizar.
9. Sustrato portador para la detección de uno o varios analitos en un procedimiento de detección por afinidad, siendo el sustrato portador plano, que comprende zonas de medición separadas espacialmente aplicadas sobre el sustrato portador usando una capa promotora de la adhesión aplicada al sustrato portador o directamente, estando cubiertas las zonas libres entre las zonas de medición y dentro de las mismas con una capa de pasivación, **caracterizado**
40 **porque** dicha capa de pasivación se ha generado con un procedimiento de recubrimiento según la reivindicación 8.

Fig. 1:

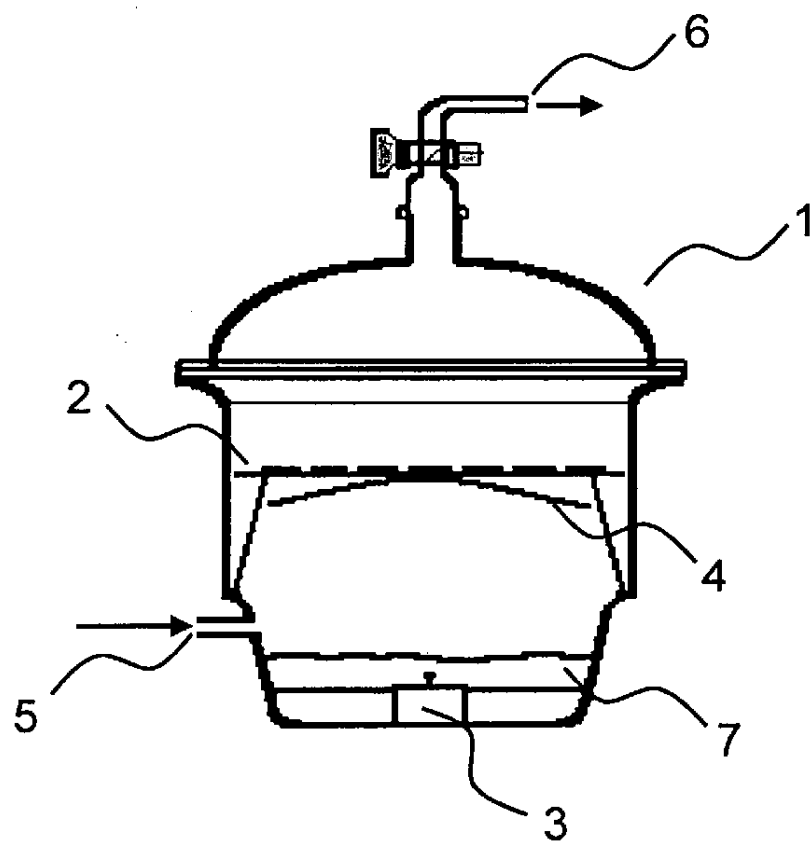


Fig. 2:

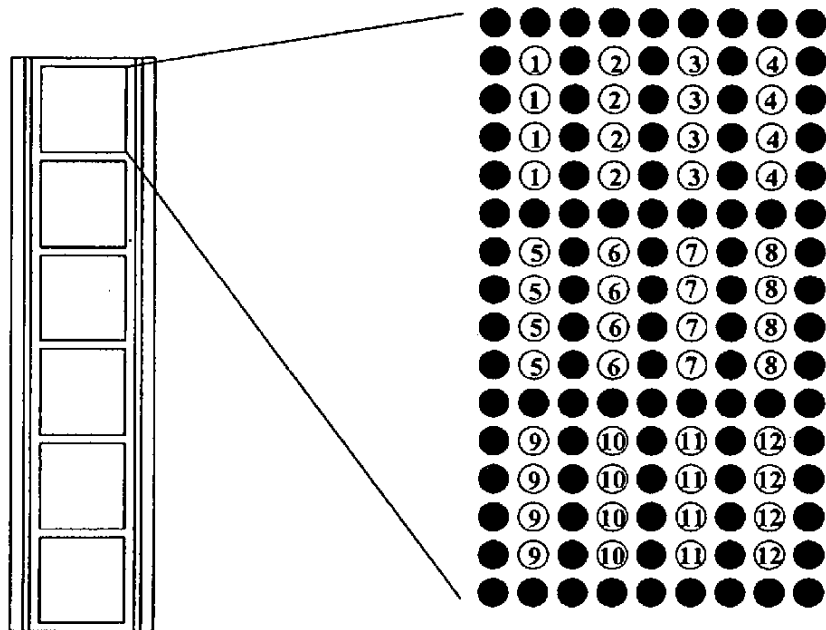


Fig. 3:

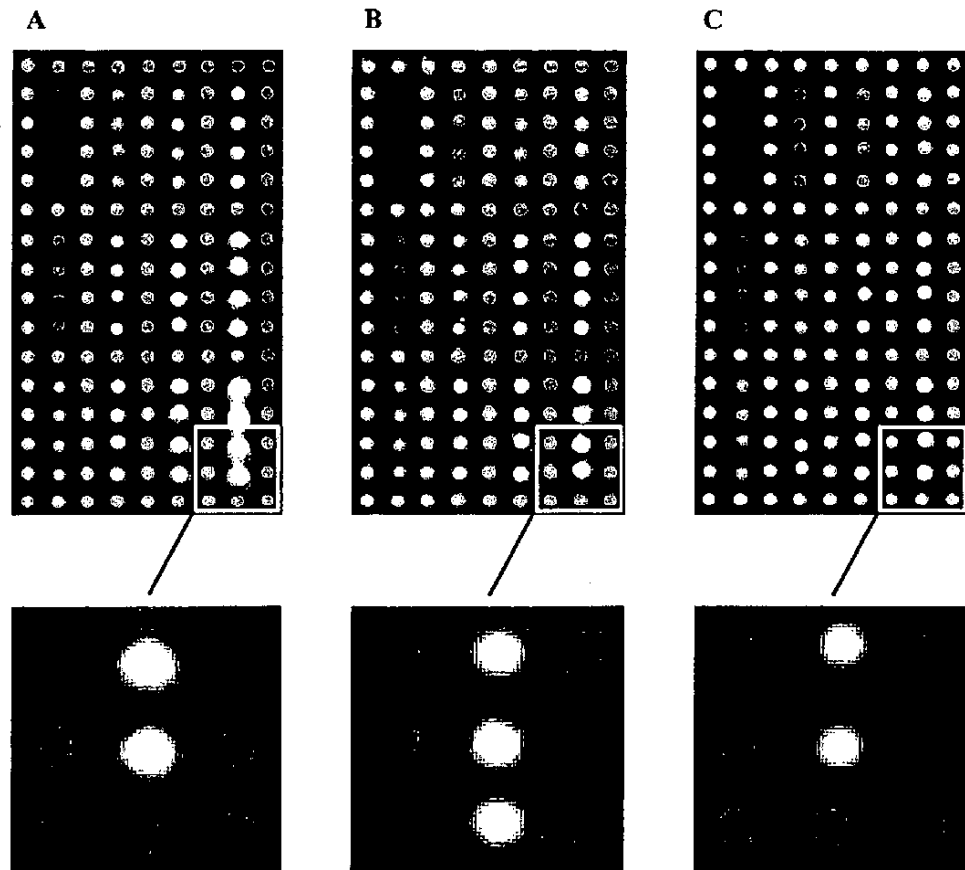


Fig. 4A:

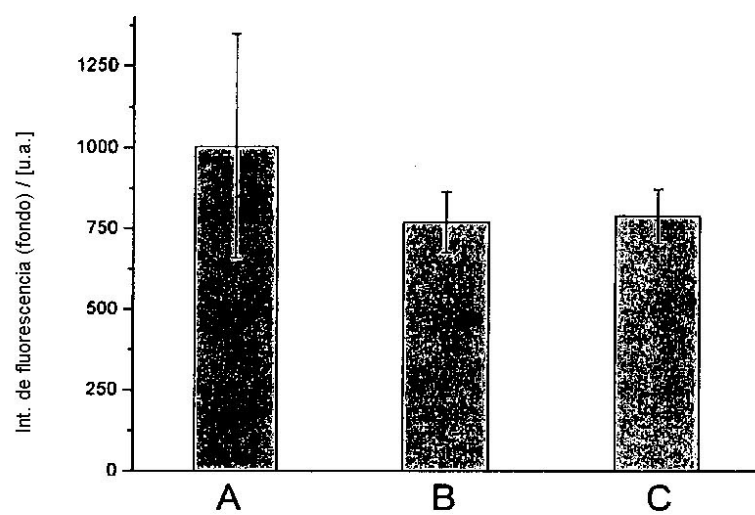


Fig. 4B:

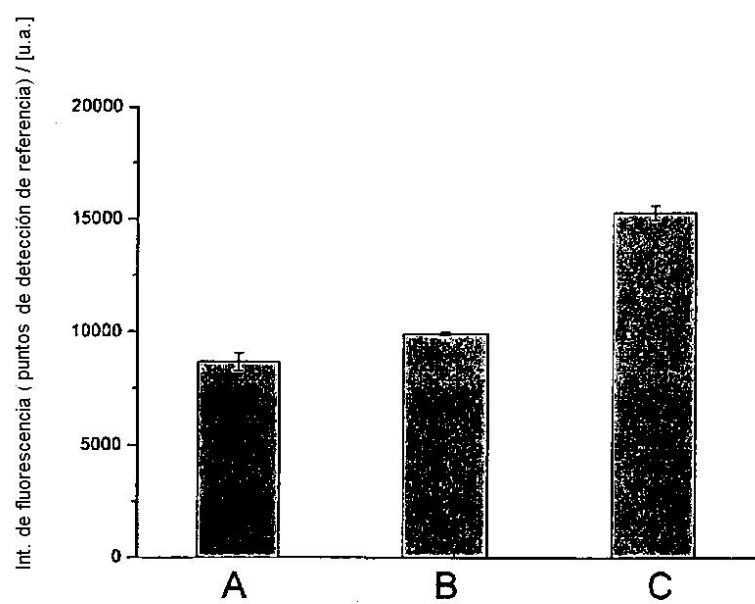


Fig. 5A:

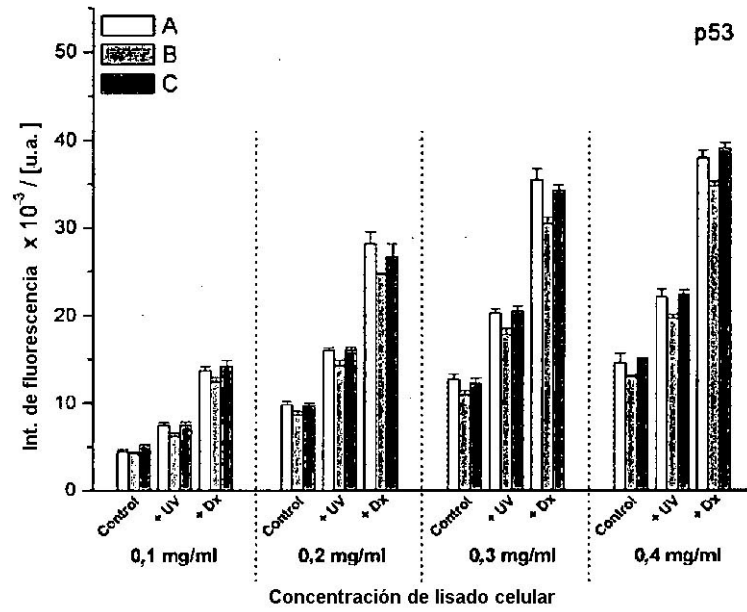


Fig. 5B:

