

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 494**

51 Int. Cl.:
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 21/77 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03793767 .9**
96 Fecha de presentación: **28.08.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1556695**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.07.2005**

54 Título: **PLATAFORMA ANALÍTICA Y PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN CON ANALITOS A
DETECTAR EN UNA MUESTRA EVENTUALMENTE DESPUÉS DEL FRACCIONAMIENTO
COMO ASOCIADOS DE UNIÓN ESPECÍFICOS INMOVILIZADOS.**

30 Prioridad:
03.09.2002 CH 150302
27.01.2003 CH 115002003

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2011

73 Titular/es:
Bayer Technology Services GmbH
51368 Leverkusen , DE

72 Inventor/es:
PAWLAK, Michael;
SCHICK, Eginhard y
OROSZLAN, Peter

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 369 494 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

Plataforma analítica y procedimiento de detección con analitos a detectar en una muestra eventualmente después de fraccionamiento como asociados de unión específicos inmovilizados

5 La presente invención se refiere a una plataforma analítica y a un procedimiento realizado con ésta para analizar una multiplicidad de muestras en lo relativo a los compuestos contenidos en las muestras, biológicamente relevantes como participantes en reacciones de unión específicas, como analitos, caracterizado porque

10 – dichas muestras o fracciones de dichas muestras con los analitos a detectar allí contenidos, como una primera multiplicidad de asociados de unión específicos se aplican directamente o después de diluciones adicionales de las muestras o de las fracciones en al menos una matriz unidimensional o bidimensional en áreas de medición diferenciadas en una plataforma sensora de campo evanescente como soporte sólido, en donde se disponen distintas muestras o fracciones o distintas diluciones de muestras o fracciones en distintos áreas de medición diferenciadas,

15 – una o varias sustancias de detección, como una segunda multiplicidad de asociados de unión específicos, para la detección específica de uno o varios analitos contenidos en las muestras, a partir de dicha primera multiplicidad de asociados de unión específicos, se ponen en contacto en una única o en varias etapas de una reacción de unión específica con las muestras o sus fracciones o sus diluciones aplicadas en dichas áreas de medición diferenciadas,

20 – modificaciones de señales optoelectrónicas como consecuencia de la unión de sustancias de detección con analitos contenidos en áreas de medición diferenciadas, se miden con resolución local en el campo evanescente de la plataforma sensora de campo evanescente y a partir del tamaño relativo de las modificaciones de dichas señales optoelectrónicas de los respectivos áreas de medición se determina cualitativa y/o cuantitativamente la presencia de los analitos.

25 Al mismo tiempo dichas modificaciones de señales optoelectrónicas, pueden ser determinadas como consecuencia de la unión de sustancias de detección a analitos contenidos en las muestras en áreas de medición diferenciadas, en el campo evanescente de la plataforma sensora de campo evanescente, por ejemplo, a partir de la comparación de las señales medidas simultáneamente de distintos rangos de medición, las que contienen analitos a detectar correspondientes (en concentración y/o cantidad conocida o desconocida) con las señales de áreas de medición, las que no contienen analitos a detectar correspondientes. Para la determinación de dichas modificaciones de señales también se pueden usar las señales de áreas de medición con concentración desconocida con aquellas áreas de medición con analitos allí contenidos en concentración conocida. Para el caso de la captación continua de señales y durante la adición de las sustancias de detección correspondientes y su unión a las áreas de medición que contienen analitos correspondientes se puede determinar una modificación correspondiente también a partir del transcurso temporal de las señales de las áreas de medición correspondientes.

35 A continuación la expresión "una muestra" o "una muestra de inmovilización" o "muestra inmovilizada" se refiere también a dos o más, es decir, a una multiplicidad de tales muestras o "muestras de inmovilización", en tanto no se indique expresamente de otro modo.

40 Para numerosos campos de aplicación es necesario determinar una multiplicidad de analitos biológicamente relevantes en una muestra compleja, por ejemplo en procedimientos de diagnóstico para la determinación del estado de salud de un individuo o en la investigación y el desarrollo de productos farmacéuticos para la determinación de la influencia que ejerce un organismo y su funcionamiento complejo por medio de la alimentación de compuestos biológicamente activos.

45 Mientras que procedimientos de separación analíticos conocidos están optimizados en general para separar, dentro de un tiempo en lo posible corto, una cantidad en lo posible grande, de compuestos contenidos en una muestra dada de acuerdo con un parámetro fisicoquímico predeterminado, como por ejemplo, del peso molecular o del cociente de carga molecular y masa, los procedimientos de detección por bioafinidad se basan en que, con un elemento de detección biológico o bioquímico o sintético, en lo posible de alta especificidad, se detecte y se una el analito correspondiente (único) en forma altamente selectiva en una muestra compuesta en forma compleja. La detección de una multiplicidad de compuestos diferentes requiere por lo tanto el uso de una cantidad correspondiente de diferentes elementos de reconocimiento específicos.

50 Un procedimiento de detección que se basa en reacciones de bioafinidad se puede realizar tanto en una solución homogénea como también en la superficie de un soporte sólido. Según la configuración específica del procedimiento, después de la unión de los analitos a los elementos de reconocimiento correspondientes y eventualmente otras sustancias de detección así como también eventualmente entre distintos pasos del procedimiento son necesarios pasos de lavado, para separar los complejos formados a partir de los elementos de reconocimiento y los analitos a detectar así como también eventualmente otras sustancias de detección del resto de la muestra y de los reactivos adicionales usados eventualmente.

55 Se han divulgado en forma relativamente amplia procedimientos para la detección simultánea de una multiplicidad de diferentes ácidos nucleicos en una muestra con ayuda de ácidos nucleicos inmovilizados complementarios

correspondientes, inmovilizados sobre un soporte sólido en áreas de medición diferenciadas, separados espacialmente, como elementos de reconocimiento. Por ejemplo, se conocen, en base a plaquetas de vidrio o de microscopio, matices de oligonucleótidos como elementos de reconocimiento con una densidad de "feature" muy alta (densidad de áreas de medición sobre un soporte sólido común). Por ejemplo, en la patente US No. 5.445.934 (Affymax Technologies) se describen y reivindican matrices de oligonucleótidos con una densidad de más de 1000 features por centímetro cuadrado.

Desde hace poco se acumulan también las descripciones de matrices y con ello los procedimientos de detección realizados de modo similar para la determinación simultánea de una multiplicidad de proteínas, por ejemplo, en la patente US N.º 6.365.418 B1.

En las patentes para las así llamadas "micromatrices" de este tipo, tanto para la detección de ácidos nucleicos como también para otros biopolímeros, como por ejemplo, proteínas, se describe en cada caso, que una multiplicidad de diferentes elementos de reconocimiento específicos en áreas de medición diferenciadas para la generación de una matriz para la detección de un analito son inmovilizados y a continuación se pone en contacto la muestra a ensayar con los analitos presentes allí en una mezcla (eventualmente compleja). De acuerdo con las descripciones conocidas, se encuentran diferentes elementos de reconocimiento específicos en cada caso en una forma en lo posible muy pura en diferentes áreas de medición diferenciadas, de modo que en las áreas de medición con diferentes elementos de reconocimiento se unen en general diferentes analitos de la muestra.

Este tipo de ensayos conocidos requiere que los elementos de reconocimiento específicos a inmovilizar en forma en lo posible muy pura sean enriquecidos por medio de pasos de procesamiento en parte muy costosos y complicados. Como los distintos elementos de captación se diferencian más o menos fuertemente en sus propiedades fisicoquímicas (por ejemplo, en su polaridad), existen también diferencias correspondientes en las condiciones para una inmovilización óptima de estos elementos de reconocimiento, por ejemplo por adsorción o unión covalente, en áreas de medición diferenciadas sobre un soporte sólido común, eventualmente sobre una capa que brinda adhesividad aplicada encima. Por consiguiente, las condiciones de inmovilización (como por ejemplo, tipo de la capa de que brinda adhesividad) elegidas para la inmovilización de una multiplicidad de diferentes elementos de reconocimiento, difícilmente puedan representar simultáneamente un óptimo para todos los elementos de reconocimiento, sino simplemente un compromiso entre las propiedades de inmovilización de los diferentes elementos de reconocimiento.

En este tipo de matrices es además desventajoso que para la detección de analitos en una multiplicidad de diferentes muestras, en general es necesaria la puesta a disposición de una cantidad correspondiente de matrices discretas de elementos de reconocimiento, a las cuales se alimentan las diferentes muestras, sobre portadores comunes o discretos. Para el ensayo de una multiplicidad de diferentes muestras esto significa el requerimiento de una gran cantidad de matrices discretas, cuya elaboración es relativamente costosa y complicada.

Si bien se ha descrito que, por ejemplo, los híbridos formados por oligonucleótidos inmovilizados y contenidos en una muestra alimentada, complementarios a los oligonucleótidos inmovilizados, pueden ser disociados nuevamente bajo condiciones de disociación adecuadas pueden ser disociadas nuevamente con alta eficacia y así se puede regenerar una superficie de reconocimiento, sin embargo, no se puede garantizar una capacidad de regeneración del 100%. En el caso de los complejos de bioafinidad con proteínas existe frecuentemente incluso no existe una reversibilidad del paso de unión, es decir, no hay una posibilidad de regeneración de la superficie de reconocimiento.

Existe por lo tanto la necesidad de una estructura de matrices modificada, que posibilite ensayar una multiplicidad de muestras en una matriz sobre un portador común simultáneamente con respecto a los analitos contenidos en las muestras. Para ello sería conveniente aplicar, no los diferentes elementos de reconocimiento específicos, sino las muestras a ensayar directamente, es decir, no tratadas, o después de en lo posible pocos pasos de preparación en áreas de medición diferenciadas en una matriz sobre un portador. Una estructura de matriz como ésta se denominará a continuación "arquitectura de matriz invertida".

En la patente US N.º 6.316.267, se describe un procedimiento en el cual se aplican poliaminoácidos en una mezcla de muestras (en donde también se puede tratar evidentemente de una muestra compuesta compleja) por ejemplo, sobre una matriz de muestras sólida o casi sólida ("semisólida"). El paso de detección no se realiza sin embargo mediante un ensayo de bioafinidad, sino por coloración con una mezcla de reactivos, la que contiene determinados complejos metálicos mencionados en la patente. No se trata aquí de una detección específica de analitos.

En la patente US 6.287.768, se describe un procedimiento, de acuerdo con el cual se aíslan diferentes moléculas de ARN a detectar a partir de una muestra biológica, se separan según el tamaño, se aplican sobre un soporte sólido y a continuación se detectan allí, por ejemplo, en un ensayo de hibridación por medio de la hibridación de polinucleótidos complementarios conocidos. De acuerdo con la descripción, las moléculas de ARN a detectar, aisladas de un organismo, puede o bien ser sometidos directamente a un procedimiento de detección adicional, cuando se encuentran en una alta concentración, o tienen que multiplicarse antes del procedimiento de detección propiamente dicho aún con procedimientos de multiplicación conocidos (por ejemplo, por medio de PCR, "Polymerase Chain Reaction"). Esto significa que con el procedimiento allí descrito, sin procedimientos adicionales de multiplicación, no es posible un análisis completo de las diferentes fracciones generadas.

Aún cuando el procedimiento propuesto en la patente US 6.287.768 abre la posibilidad, de determinar el ARN a partir de diferentes muestras simultáneamente, requiere todavía una serie de pasos de procesamiento de muestras complicados y costosos, y especialmente el aislamiento de la matriz de muestras biológica y una separación subsiguiente según el tamaño de las moléculas. Por cuanto el procedimiento reivindicado, el cual sólo se describe por el ejemplo del ARN, presupone como mínimo el aislamiento de la matriz de muestras original y la subsiguiente separación de los biopolímeros a detectar según su tamaño, es evidente, que estos, después de este paso de separación, antes del paso de detección, se encuentran en un medio menos complejo, claramente diferente de la matriz de muestras original (como, por ejemplo, sangre o suero).

La sensibilidad de los procedimientos descritos previamente en el estado de la técnica evidentemente no es suficiente, para determinar una multiplicidad de analitos contenidos en una muestra con una "arquitectura de ensayo inversa" con un límite de detección suficiente.

La excitación de los "componentes de detección" usados para la detección de los analitos (como por ejemplo, isótopos radioactivos o cromóforos con una adsorción y/o luminiscencia o fluorescencia características) y la selección de las señales de matrices del tipo mencionado se basa en ordenamientos y métodos de detección clásicos, por ejemplo, ópticos. Los métodos de medición clásicos, como por ejemplo, las mediciones de absorción o fluorescencia, se basan en general en la iluminación directa de un volumen de muestra en un recipiente de muestras o un campo de medición sobre una pared interior de un recipiente de muestras de una muestra líquida. Estos ordenamientos tienen la desventaja, de que además del volumen de excitación o de la superficie de excitación, dentro de la cual se debe generar una señal para la detección de un analito, en general una gran parte de la luz de excitación es captada por el ambiente circundante, lo que puede llevar a la generación desventajosa de señales de fondo de ruidos.

Para alcanzar límites de detección más profundos se han desarrollado numerosos ordenamientos de medición, en los cuales la detección del analito se basa sobre su interrelación con el campo evanescente, el cual está conectado con la conducción de luz en un conductor óptico. Si se acopla una onda de luz en un conductor de ondas óptico, el cual está rodado de medios ópticamente más delgados, es decir, medios con un índice de refracción más bajo, entonces es conducida por reflexión total en las superficies límite de la capa conductora de ondas. En los medios ópticamente más delgados entra entonces una fracción de la luz conducida. Esta parte se denomina campo evanescente o campo amortiguado transversalmente. La intensidad del campo evanescente depende mucho del espesor de la capa conductora de ondas propiamente dicha así como de la relación de los índices de refracción de la capa conductora de ondas y de los medios que la rodean. En el caso de los conductores de ondas delgados, es decir, conductores de ondas con espesores de capas del mismo espesor o menor espesor que la longitud de onda a conducir, se pueden diferenciar modos discretos de la luz conducida. Los procedimientos de este tipo tienen la ventaja de que la interacción de la luz de excitación con el analito está limitada a la profundidad de penetración del campo evanescente en el medio adyacente, en el orden de magnitud de algunos cientos de nanómetros y se pueden evitar bastante las señales de ruido de la profundidad del medio. Las primeras disposiciones de medición de este tipo propuestas se basaban en conductores de ondas de una sola capa autoportantes, altamente multimodales, como por ejemplo fibras o plaquetas de plástico o vidrio transparente, con espesores de algunos cientos de micrómetros hasta varios milímetros.

Para mejorar la sensibilidad y al mismo tiempo poder simplificar la elaboración en la fabricación en masa se propusieron conductores de onda de capa delgada planares. Un conductor de onda de capa delgada planar está compuesto en el caso más sencillo por un sistema de tres capas: material portante, capa conductora de ondas, superstrat (o muestra a ensayar), en donde la capa conductora de ondas posee el índice de refracción más alto.

Se conocen diversos procedimientos para el acoplamiento de luz de excitación en un conductor de onda planar. Los procedimientos usados anteriormente se basaban en acoplamiento de superficie frontal o acoplamiento de prisma, en donde para la disminución de los reflejos como consecuencia de espacios de aire se aplica en general un líquido entre el prisma y el conductor de ondas. Estos dos métodos son adecuados sobre todo en conexión con conductores de ondas de espesor de capa relativamente grande, es decir, especialmente conductores de ondas autoportantes, así como con un índice de refracción del conductor de ondas de claramente menos de 2. Para el acoplamiento de la luz de excitación en capas conductoras de ondas muy delgadas, con alto índice de refracción, un método mucho más elegante en comparación es el uso de acoplamientos de rejilla.

Se pueden distinguir diversos métodos para la detección de analitos en el campo evanescente de ondas de luz conducidas en conductores de ondas en capas ópticas. En base al principio de medición usado se puede diferenciar por ejemplo, entre métodos de fluorescencia o luminiscencia general por un lado y métodos de refracción por el otro. Aquí se pueden incluir procedimientos para la generación de una resonancia de plasmón superficial en una capa metálica delgada sobre una capa dieléctrica con un índice de refracción más bajo en el grupo de los métodos de refracción, en tanto sirva como base para la determinación de la magnitud de medición el ángulo de resonancia de la luz de excitación irradiada para la generación de la resonancia de plasmón superficial. Pero la resonancia de plasmón superficial también e puede usar para intensificar una luminiscencia o para mejorar la relación entre señal y fondo en una medición de luminiscencia. Las condiciones para la generación de una resonancia de plasmón superficial así como también para la combinación con mediciones de luminiscencia y con estructuras conductoras de

ondas se describen varias veces en la literatura, por ejemplo en las patentes US-P 5.478.755, US-P 5.841.143, US-P 5.006.716 y US-P 4.649.280.

5 Con el término "luminiscencia" se denomina en esta solicitud la emisión espontánea de fotones en el rango ultravioleta a infrarrojo después de la excitación óptica o no óptica, como por ejemplo, eléctrica o química o bioquímica o térmica. Por ejemplo, la quimioluminiscencia, la bioluminiscencia, la electroluminiscencia y especialmente la fluorescencia y la fosforescencia están comprendidas en el concepto de "luminiscencia".

10 En los métodos de medición por refracción se usa la modificación del así llamado índice de refracción efectivo en base a la adsorción o desorción molecular sobre el conductor de ondas para la detección del analito. Esta modificación del índice de refracción efectivo se determina, en el caso de los sensores de acopladores de rejilla, a partir de la modificación del ángulo de acoplamiento para el acoplamiento o desacoplamiento de luz en o del sensor de acoplador de rejilla y en el caso de sensores interferométricos a partir de la modificación de la diferencia de fases entre la luz de medición conducida entre un brazo sensor y un brazo de referencia del interferómetro.

15 Los métodos de refracción mencionados tienen la ventaja de que se pueden emplear sin la utilización de moléculas de marcación adicionales, las así llamadas marcas moleculares. Las desventajas de estos métodos libres de marcas es sin embargo, que los límites de detección que se obtienen con estos, debido a la reducida selectividad del principio de medición, están limitados en función del peso molecular del analito a rangos de concentración pico-hasta nanomolares, lo que para muchas aplicaciones del análisis de trazas moderno, por ejemplo, para aplicaciones de diagnóstico, no es suficiente.

20 Para alcanzar límites de detección aún más profundos parecen más adecuados los métodos que se basan en luminiscencia debido a su mayor selectividad de la generación de señales. Para ello la excitación de luminiscencia está limitada a la profundidad de penetración del campo evanescente en el medio ópticamente más delgado, es decir, al medio circundante inmediato del área conductora de ondas con una profundidad de penetración en un orden de magnitud de algunos cientos de nanómetros en el medio. Este principio se denomina excitación de luminiscencia evanescente.

25 Por medio de conductores de ondas de capa delgada de alto índice de refracción, en combinación con la detección de luminiscencia, basada en una película conductora de ondas delgada de sólo algunos cientos de nanómetros sobre un material portante transparente, se pudo aumentar mucho en los últimos años la sensibilidad. Por ejemplo, en la WO 95/33197 se describe un método, en el cual la luz de excitación se acopla a través de una rejilla de relieve como elemento óptico difractivo en la película conductora de ondas. La luminiscencia irradiada en forma isotrópica en la profundidad de penetración de las sustancias capaces de luminiscencia que se encuentran en el campo evanescente se mide por medio de dispositivos de medición adecuados, como por ejemplo, fotodiodos, fotomultiplicadores o cámaras CCD. También es posible desacoplar y medir la parte reacomplada al conductor de ondas de la radiación excitada evanescente a través de un elemento óptico difractivo, por ejemplo, una rejilla. Este método se describe, por ejemplo, en la WO 95/33198.

35 En los últimos años se han conocido desarrollos posteriores de conductores de ondas de capa delgada planares como plataformas sensoras para "micromatrices", por ejemplo, en las solicitudes de patentes internacionales WO 01/13096, WO 01/43875, parcialmente en combinación con estructuras fluidicas adaptadas correspondientemente. Estas solicitudes de patentes se incorporan de este modo en su totalidad como parte integrante de la presente solicitud. En el documento WO 01/79821 se describe una estructura de conductor de ondas de capa delgada, que posibilita una excitación de dos fotones en la superficie del conductor de ondas. En el documento WO 01/88511 se describen una estructura de conductor de ondas de rejilla y un procedimiento de medición realizado con ésta, los que hacen posible un procedimiento que brinda imágenes para la determinación del analito con ayuda de un método de medición refractivo. Las dos solicitudes de patentes se incorporan a la presente igualmente como parte integrante de la presente solicitud.- Las dos configuraciones tienen en común que elementos de reconocimiento biológicos o bioquímicos o sintéticos conocidos son inmovilizados para la detección de una multiplicidad de analitos en áreas de medición diferenciadas de posición conocida sobre el sustrato portante, como componentes de una o varias matrices de áreas de medición.

50 Se halló sorprendentemente que con una selección adecuada de parámetros fisicoquímicos (como espesores de capa, índices de refracción de las capas integrantes) de una plataforma sensora del campo evanescente, como consecuencia de la alta intensidad de luz de excitación en la superficie y la limitación simultánea de este fuerte campo de excitación a la profundidad de penetración del campo evanescente en los medios adyacentes, la sensibilidad que se puede alcanzar para la detección de interacciones moleculares en la superficie de una plataforma sensora de campo evanescente es suficientemente alta para analizar una multiplicidad de muestras, eventualmente después de fraccionamiento y eventualmente diluciones adicionales de estas muestras o fracciones a los analitos allí contenidos, sin pasos de procedimiento adicionales para un aislamiento de la matriz de muestra restante o una multiplicación de los analitos a detectar (con respecto a su cantidad), después de la aplicación directa de estas fracciones o de diluciones de estas fracciones sobre dicha plataforma sensora de campo evanescente. De este modo se proporciona un procedimiento sencillo con una "arquitectura de matriz invertida que hace posible determinar una multiplicidad de analitos en una muestra, sin modificaciones posteriores de la composición molecular relativa de la muestra después de un paso de fraccionamiento o separación.

En las muestras a ensayar se puede tratar, por ejemplo (véase también más abajo) de una o varias células que fueron seleccionadas antes de una cantidad más grande de células, por ejemplo, por centrifugación, filtración o por "Laser Capture Microdissection".

5 A continuación la referencia a una (única) célula se refiere en los pasos de tratamiento de pruebas a realizar también a una multiplicidad de células, en tanto no se indique expresamente de otro modo. Asimismo la referencia a una "muestra" comprende también a sus fracciones preparadas con un procedimiento de separación adecuado.

10 En un primer paso de procesamiento, necesario en general para pasos de análisis ulteriores se puede lisar la célula. El lisado puede estar disuelto en un solvente adecuado, por ejemplo, una solución búfer, y puede contener mezclas de aditivos conocidos, por ejemplo, estabilizantes como inhibidores de enzimas, para evitar una degradación de biopolímeros allí contenidos. Una muestra también puede contener aditivos de compuestos del mismo tipo de concentraciones conocidas (como estándares) como el analito a detectar, comparable con una "spike" de muestras en la cromatografía. Tales aditivos pueden servir, por ejemplo, para fines de calibración. Las muestras pueden contener además aditivos de compuestos similares a la matriz de muestras, pero diferentes de los analitos a detectar, como por ejemplo, albúmina sérica bovina (BSA), los que pueden servir, por ejemplo, para el ajuste controlado del espesor de capa superficial de moléculas de analitos inmovilizadas en un rango de medición. Los analitos contenidos en las muestras o sus fracciones o las diluciones de dichas muestras o fracciones, es decir, especialmente biopolímeros, como por ejemplo, ácidos nucleicos o proteínas, pueden encontrarse en forma nativa o desnaturalizada, después de tratamiento, por ejemplo, con urea o tensioactivos (por ejemplo, SDS).

20 Preferentemente, los analitos contenidos en las muestras o sus fracciones o en las diluciones de dichas muestras o fracciones, es decir, especialmente biopolímeros, como por ejemplo, ácidos nucleicos o proteínas, se encuentran después del tratamiento con urea en forma desnaturalizada, en donde los epítomos de estos analitos se encuentran libremente accesibles para la unión de sus respectivas sustancias de detección, por ejemplo, de anticuerpos. Esto se logra por medio de la destrucción de la estructura terciaria o cuaternaria como consecuencia del tratamiento con urea.

25 Sorprendentemente, la sensibilidad del procedimiento de acuerdo con la invención es tan grande, que una muestra puede ser más diluida aún antes o después del fraccionamiento, y los compuestos contenidos en la mezcla, a pesar de una concentración en parte muy baja y una cantidad disponible correspondientemente más reducida, en un rango de medición individual, aún puede ser detectada con gran exactitud, lo que no es posible con los métodos usuales conocidos.

30 Como "analito" se denomina en el marco de la presente invención a una especie molecular tal que, con ayuda de una sustancia de detección usada para ello, se puede diferenciar de otros compuestos contenidos en la muestra a analizar, y unir. Si se realiza, por ejemplo, la unión de una sustancia a detectar correspondiente sólo a la forma fosforilada, pero no a la no fosforilada de un compuesto o especie a detectar, entonces de acuerdo con esta definición las dos formas de este compuesto o especie representan dos analitos diferentes. Si algunos compuestos o especies, cuando están fosforiladas son reconocidos o se unen a una sustancia de detección correspondiente, bajo esta condición, los compuestos o especies fosforilados correspondientes, representan conjuntamente un analito. Los asociados de unión específicos como sustancias de detección de un analito de acuerdo con esta definición, pueden ser elegidos, por ejemplo, de tal modo que reconozcan exclusivamente a la forma fosforilada o la forma glicosilada (o correspondientemente, la forma no fosforilada o no glicosilada) de un compuesto a detectar, y se unan a ésta. La actividad de un camino de señales biológico en una célula o un organismo puede correlacionarse con la parte de los compuestos fosforilados o glicosilados (dependiendo de la naturaleza del camino de señales), que dirigen este camino de señales. La parte relativa de la forma fosforilada o glicosilada en la cantidad total, es decir, el cociente de la cantidad de un compuesto en su forma fosforilada o glicosilada y del cantidad total de este compuesto en forma fosforilada y no fosforilada o en forma glicosilada y no glicosilada, en una muestra se denomina a continuación grado de fosforilación o grado de glicosilación de este compuesto en la muestra. El grado de fosforilación y el grado de glicosilación pueden ser resumidos bajo el concepto general del grado de activación de un compuesto, cuyo valor numérico, por ejemplo, corresponde al grado de fosforilación o al grado de glicosilación. El grado de activación de un compuesto puede indicar también otras formas químicamente modificadas de un compuesto.

50 Los asociados de unión específicos como sustancias de detección también pueden ser seleccionados de tal modo, que sólo se unan a un compuesto a detectar cuando éste se encuentre en una estructura tridimensional determinada. Por ejemplo, muchos anticuerpos reconocen y se unen sólo a sectores parciales especiales (epítomos) de una sustancia a detectar con una estructura tridimensional especial. Según el estado de conformación del compuesto a detectar correspondiente, estos sectores parciales (epítomos) pueden estar accesibles u ocultos para la unión de la sustancia a detectar correspondiente. Los asociados de unión específicos pueden ser elegidos, sin embargo, también de tal modo que se unen a sectores del compuesto a detectar, cuya accesibilidad es independiente de la estructura tridimensional de ese compuesto. Por medio del uso de sustancias de detección elegidas correspondientemente es posible, por lo tanto, determinar una parte relativa de la cantidad total en un compuesto a detectar en una muestra, el que presente un estado de conformación específico.

60

5 Como "biológicamente relevante" deben denominarse a aquellos compuestos que son conocidos como participantes en reacciones de unión específicas a moléculas o compuestos de origen biológico o a sus análogos obtenidos por síntesis. Ejemplos de compuestos "biológicamente relevantes" son por lo tanto no sólo proteínas naturales, como anticuerpos o receptores, o ácidos nucleicos, sino también sus asociados de unión, como por ejemplo, antígenos, los que pueden ser también compuestos sintéticos, también de peso molecular muy bajo.

En el sentido de la presente invención, las áreas de medición diferenciadas o separadas espacialmente deben ser definidas por la superficie cerrada, que ocupan los asociados de unión allí inmovilizados para la detección de uno o varios analitos en una o varias muestras en un ensayo de bioafinidad. Estas superficies pueden tener una geometría cualquiera, por ejemplo, la forma de círculos, cuadrados, triángulos, elipses, etc.

10 Diferentes áreas de medición de este tipo pueden comprender, por ejemplo, diferentes muestras o diferentes fracciones de una sola muestra separadas, o pueden ser fracciones de diferentes muestras o también una multiplicidad de diferentes diluciones de fracciones. La separación en fracciones se puede realizar con cualquier procedimiento de separación conocido, como por ejemplo, centrifugación, cromatografía líquida (LC), HPLC, cromatografía de capa fina, cromatografía en gel, electroforesis capilar, etc. o por combinación de estos procedimientos de separación. El material para las áreas de medición diferenciadas también puede ser puesto a disposición por micropreparados selectivos, como por ejemplo, la separación selectiva de células individuales de un conjunto de células por "Laser Capture Micro Dissection".

20 En general, la muestra original con los analitos a detectar contenidos en ésta, puede ser elegida entre el grupo de extractos de células sanas o enfermas (por ejemplo, de extractos celulares humanos, animales, bacterianos o vegetales), extractos de tejido animal o humano, como por ejemplo, tejido de órganos, de la piel, del cabello o de los huesos, o de tejido vegetal, así como también de líquidos corporales o sus componentes, como por ejemplo, sangre, suero o plasma, líquidos de las articulaciones, líquido de lágrimas, orina, saliva, líquido de los tejidos, linfa. Una muestra puede ser elegida especialmente también del grupo que comprende extractos de células estimuladas o no tratadas y extractos de tejido sano o enfermo.

25 Correspondientemente, aparte de por "Laser Capture Micro Dissection", una "muestra original" de este tipo también se puede extraer de un organismo o conjunto de tejidos o células por medio de un método del grupo de cortes de tejidos, biopsias.

30 En un área de medición se inmovilizan por lo tanto en general varios asociados de unión diferentes al mismo tiempo. Generalmente se encontrará una multiplicidad, es decir, varios cientos o incluso varios miles de analitos diferentes en un área de medición de analitos inmovilizados.

El primer objeto de la invención es un procedimiento para el análisis de una multiplicidad de muestras en lo relativo a los compuestos en las muestras, biológicamente relevantes como participantes en reacciones de unión específicas, como analitos, caracterizado porque

35 – dichas muestras o fracciones de dichas muestras con los analitos a detectar allí contenidos, como una primera multiplicidad de asociados de unión específicos se aplican directamente o después de diluciones adicionales de las muestras o de las fracciones en al menos una matriz unidimensional o bidimensional en áreas de medición diferenciadas en una plataforma sensora de campo evanescente como soporte sólido, en donde se disponen distintas muestras o fracciones o distintas diluciones de muestras o fracciones en distintos áreas de medición diferenciadas,

40 – una o varias sustancias de detección, como una segunda multiplicidad de asociados de unión específicos, para la detección específica de uno o varios analitos contenidos en las muestras, a partir de dicha primera multiplicidad de asociados de unión específicos, se ponen en contacto en una única o en varias etapas de una reacción de unión específica con las muestras o sus fracciones o sus diluciones aplicadas en dichas áreas de medición diferenciadas,

45 – modificaciones de señales optoelectrónicas como consecuencia de la unión de sustancias de detección con analitos contenidos en áreas de medición diferenciadas, se miden con resolución local en el campo evanescente de la plataforma sensora de campo evanescente y a partir del tamaño relativo de las modificaciones de dichas señales optoelectrónicas de los respectivos áreas de medición se determina cualitativa y/o cuantitativamente la presencia de los analitos.

50 El procedimiento de separación para la separación de una muestra en dichas fracciones puede ser elegido entre el grupo de procedimientos formado por centrifugación, HPLC y micro-HPLC ("High Pressure Liquid Chromatography") por medio del método de cromatografía de "Fase Normal", de "Fase Inversa", de intercambio de iones o de interacción hidrófoba (HIC), "Size Exclusion Chromatography", cromatografía en gel, electroforesis, electroforesis capilar, electrocromatografía, "Free-Flow Electrophoresis", etc.

55 El procedimiento de acuerdo con la invención se caracteriza por una sensibilidad tan grande que es posible que una muestra o una fracción de una muestra sea diluida antes de la aplicación sobre dicha plataforma sensora de campo evanescente como soporte sólido, por al menos un factor de 10. Incluso es posible diluir una muestra o una fracción de una muestra a ensayar por un factor de 30 o 100 y a pesar de esto, detectar en forma cuantitativa una

multiplicidad de analitos en un rango de medición que es generado por la aplicación de una muestra como ésta fuertemente diluida o su fracción.

A continuación se resumirán las muestras o sus fracciones a aplicar en áreas de medición diferenciadas y las diluciones a aplicar de muestras o fracciones de muestras, bajo el término "muestras de inmovilización".

5 Las muestras a analizar con los analitos a detectar contenidos en éstas, eventualmente después de un fraccionamiento pueden ser seleccionadas entre el grupo de extractos de células sanas o enfermas, (por ejemplo, de extractos celulares humanos, animales, bacterianos o vegetales), extractos de tejido animal o humano, como por ejemplo tejido de órganos, de la piel, del cabello o de los huesos, o de tejido vegetal, así como de líquidos corporales o sus componentes, como por ejemplo, sangre, suero o plasma, líquidos de las articulaciones, líquido de lágrimas, orina, saliva, líquido de tejidos, linfa.

10 A efectos de asegurar una óptima accesibilidad de los analitos inmovilizados en las áreas de medición como primera multiplicidad de asociados de unión para las sustancias de detección a ser puestos en contacto con los mismos, es ventajoso que el material de una de las "muestras de inmovilización" a ser aplicadas en un área de medición tenga una dimensión igual o menor de lo que se requiere para la configuración de una monocapa sobre la plataforma sensora del campo evanescente como soporte sólido. Es posible mejorar la accesibilidad en mayor grado aún, disponiendo que una capa de agente de adherencia, anteriormente aplicada (como se describe más adelante en la presente) conduzca a una inmovilización orientada, para lo cual por ejemplo se inmovilizan los anticuerpos contenidos en la muestra unida en su parte F_c , de manera tal que sus epítomos de unión específicos sean accesibles.

15 Debido a la elevada sensibilidad del procedimiento conforme a la invención es posible analizar también volúmenes y cantidades aplicadas reducidos, con una elevada exactitud. Al respecto, bajo el concepto "cantidad de muestra" debe entenderse la cantidad total, que se aplica en una área de medición discreta. A título de ejemplo una "muestra de inmovilización" puede abarcar el material de menos de 20.000 células. Una "muestra de inmovilización" puede aún abarcar el material de menos de 1.000 células. La cantidad requerida de muestra puede abarcar aún el material de menos de 100 células, o aún de solamente 1 a 10 células, a pesar de lo cual el análisis puede hacerse de manera fiable. El material que se corresponde al contenido de una célula, también ha ser designado como "equivalente de célula". La necesidad de una cantidad tan pequeña para un análisis de equivalente celular está dada cuando en el caso de los analitos a ser detectados se trata de materiales contenidos que se presentan en una concentración relativamente elevada. Por otra parte es posible que una "muestra de inmovilización" tenga un volumen de menos de 1 μ l. Una "muestra de inmovilización" hasta puede tener un volumen de menos de 10 nl o aún inferior, de 1 nl.

20 El procedimiento conforme a la invención permite que se determinen las cantidades totales contenidas en una "muestra de inmovilización" de uno o más compuestos en forma de analitos, como suma de su presencia en forma fosforilada o no fosforilada y/o en forma glicosilada y/o no glicosilada. Es preferible que se determinen las cantidades contenidas en una "muestra de inmovilización", de uno o varios compuestos como analitos, en cada caso antes de su presencia en forma fosforilada y/o no fosforilada y/o glicosilada y/o no glicosilada, para una o más formas mencionadas.

25 El procedimiento conforme a la invención permite determinar uno o más analitos contenidos en una "muestra de inmovilización" en función de la definición anteriormente dada, y del grado de activación. En especial, mediante el proceso mencionado anteriormente es posible determinar el grado de fosforilación y/o del grado de glicosilación de uno o varios analitos contenidos en una "muestra de inmovilización". Además, como característica el procedimiento conforme a la invención dispone debido a su elevada sensibilidad y elevada exactitud y reproducibilidad, y en especial gracias a una multiplicidad de métodos de referencia y de calibración, independientes entre sí, aplicables simultáneamente o a título de alternativa, se detectan diferencias de menos de 20 %, preferentemente de menos de 10 %, entre las cantidades relativas en una "muestra de inmovilización" y en una o más muestras de comparación, de uno o más compuestos en forma fosforilada y/o no fosforilada y/o glicosiladas y/o no glicosilada como analitos, para una o más formas mencionadas.

30 Una gran ventaja del procedimiento conforme a la invención debido a su elevada sensibilidad inherente, específica para el método, y las múltiples posibilidades de la referenciación y/o calibración bajo la utilización de una sola e idéntica plataforma analítica (o bien plataforma sensora de campo evanescente), es que la variación de los resultados de medición así obtenidos es muy bajo. Por ello el procedimiento conforme a la invención es también adecuado para la investigación del desarrollo temporal (es decir, de las modificaciones) de las cantidades o concentraciones relativas de sustancias biológicamente relevantes bajo la influencia del avance de la enfermedad de un organismo biológico o de un cultivo de células y/o de la influencia del entorno exterior de un organismo o de un cultivo de células.

35 Por ello, otra forma de realización del procedimiento conforme a la invención se caracteriza porque la mencionada muestra "idéntica a la natural" y una o más muestras de comparación del mismo lugar de origen han sido extraídas en diferentes momentos de tiempo y porque se determinan modificaciones temporales de las cantidades relativas contenidas en dichas muestras, de uno o más compuestos en forma fosforilada y/o no fosforilada y/o glicosilada y/o no glicosilada, como analitos. Al respecto, bajo la expresión "del mismo lugar de origen" debe entenderse el mismo

organismo o un organismo del mismo tipo o el mismo cultivo de células o bien cultivo de células similar (en cada caso después de una enfermedad o influencia del mismo tipo, de distinta duración). Es preferible que el procedimiento de acuerdo con la invención permita detectar modificaciones temporales de la concentración o bien cantidad, relativa, de los analitos mencionados, de menos del 20 %, preferentemente de menos del 10%.

- 5 Es posible extraer muestras distintas del mismo organismo o del mismo cultivo de células. De esta manera es posible obtener mediante el análisis en varios áreas de medición con el material contenido en las mismas procedente del mismo organismo (o de un organismo del mismo tipo) o bien del mismo cultivo de células (o bien de cultivos de células del mismo tipo), por ejemplo informaciones estadísticas acerca de la reproducibilidad de la composición molecular relativa, determinada en estas regiones de medición, de las muestras aplicadas.
- 10 Es posible extraer muestras diferentes en especial en distintas posiciones del mismo organismo. En este caso, a partir de los análisis en las correspondientes áreas de medición diferenciadas es posible obtener por ejemplo información sobre las faltas de homogeneidad de la composición molecular relativa de los analitos detectados en el organismo, a partir de las muestras mencionadas. Un procedimiento este tipo es de gran importancia, por ejemplo para la investigación de organismos afectados de cáncer.
- 15 Empero, también es posible extraer muestras diferentes a partir de distintos organismos o de distintos cultivos celulares. En este caso puede tratarse por ejemplo de muestras de organismos tratados y no tratados con un sustancia activa farmacéutica. De manera similar a un análisis de expresión en la analítica de ácidos nucleicos es entonces posible investigar la influencia de la correspondiente sustancia activa sobre la composición molecular relativa de las muestras.
- 20 La forma más sencilla de la inmovilización de asociados de unión específicos para la detección de analitos, de una reacción de unión específica consiste en la adsorción física, por ejemplo debido a interacciones hidrófobas entre los asociados de unión específicos inmovilizados y la plataforma sensora de campo evanescente como soporte sólido. Sin embargo, dichas interacciones pueden ser modificadas considerablemente en su extensión o amplitud por la composición del medio y sus propiedades fisicoquímicas, como por ejemplo la polaridad y la intensidad iónica.
- 25 En especial en el caso de un adición consecutiva o secuencial de diversos reactivos en un ensayo de múltiples etapas la capacidad de adherencia de los elementos de reconocimiento después de una inmovilización puramente por adsorción es frecuentemente insuficiente, porque la plataforma sensora de campo evanescente, para mejorar la capacidad de adherencia de la "muestra de inmovilización" a ser aplicada en áreas de medición diferenciadas, abarca una capa adhesiva, sobre la cual se aplican las fracciones mencionadas de muestras o diluciones de estas fracciones.
- 30

Al respecto, es preferible que el espesor de la capa adhesiva sea de menos de 200 nm, más preferentemente inferior a 20 nm.

- 35 Para la ejecución de la capa adhesiva son adecuados una multiplicidad de materiales. A título de ejemplo la capa adhesiva puede abarcar materiales del grupo de los silanos, silanos funcionalizados, epóxidos, polímeros funcionalizados, cargados o polares y "monocapas o multicapas pasivas o funcionalizadas autoorganizadas", tioles, fosfatos de alquilo y fosfonatos de alquilo, copolímeros de bloque funcionalizados como por ejemplo poli(L)lisina/polietilenglicoles.

También es posible que la mencionada capa adhesiva comprende compuestos del grupo de ácidos organofosfóricos de la fórmula general I (A)

- 40 $Y-B-OPO_3 H_2$ (IA) o de ácidos organofosfónicos de la fórmula general I (B)

- $Y-B-PO_3 H_2$ (IB) y sus sales, en las que B significa un radical alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, hetarilo o hetarilalquilo e Y hidrógeno o un grupo funcional de la serie hidroxilo, carboxi, amino, mono o dialquilamino eventualmente sustituido por alquilo inferior, tiol, alquilamino, o un grupo ácido negativo de la serie éster, fosfato, fosfonatos, sulfato, sulfonato, maleimida, succimidilo, epoxi o acrilato. Estos compuestos han sido descritos con más detenimiento en la Solicitud de Patente internacional PCT/EP 01/10077, incorporada en la presente en su totalidad como parte componente de esta solicitud.
- 45

- Una forma de realización especial del procedimiento conforme a la invención se caracteriza porque un o más "muestras de inmovilización", antes de su aplicación sobre la plataforma sensora de campo evanescente como soporte sólido (para mejorar la capacidad de adherencia sobre el soporte sólido mencionado y para elevar la uniformidad de la aplicación) son mezcladas con una solución de polímeros o de monómeros polimerizables, eventualmente en la presencia de de iniciadores, o de "reticulantes" químicos (por ejemplo, glutaraldehído). Esta variante del procedimiento puede contribuir por ejemplo a que evitar la configuración de faltas de homogeneidad de la distribución del material de la muestra dentro de un intervalo de medición durante el proceso de la evaporación del fluido de la muestra, lo que conduce a una mejor morfología "Spot" y con ello facilita la evaluación de los resultados.
- 50 Al respecto se prefiere que la solución mencionada de polímeros o monómeros polimerizables o de "reticulantes" químicos se seleccione del grupo que abarca soluciones de polisacáridos, como por ejemplo la agarosa, o de acrilamidas o de glutaraldehído, etc.
- 55

Esta variante especial del procedimiento conforme a la invención se caracteriza también porque la mezcla de una o más muestras con una solución de polímeros o de monómeros polimerizables, eventualmente en la presencia de iniciadores o de "reticulantes" químicos (por ejemplo, glutaraldehído) da lugar a la inmovilización de una estructura de red tridimensional con componentes de muestra accesibles para sustancias de detección en el paso siguiente de una reacción de bioafinidad, en la plataforma sensora de campo evanescente como soporte sólido. Con ello es posible lograr un grado más elevado del recubrimiento superficial de la plataforma sensora de campo evanescente como una monocapa, lo que puede conducir a otra elevación de las señales medibles durante el paso de la detección del analito. Al respecto es importante que la estructura de red de polímeros creada no se extienda sobre la profundidad de penetración del campo evanescente hacia dentro del medio, ya que no es posible la detección de un analito más allá de este alejamiento con respecto a la superficie de la plataforma sensora de campo evanescente.

Las "muestras de inmovilización" pueden aplicarse en áreas de medición diferenciadas sobre la plataforma sensora de campo evanescente directamente o sobre una capa adhesiva aplicado sobre el mismo espacialmente de manera selectiva con ayuda de un procedimiento, que se selecciona del grupo de procedimientos formados por "Inkjet spotting", spotting mecánico con varilla, resorte o capilares, "Micro contact printing", puesta en contacto fluida de la área de medición con las muestras mencionadas mediante el aporte de las mismas en microcanales paralelos y cruzados, bajo la acción de diferencias de impresión o potenciales eléctricos o electromagnéticos así como procedimientos de inmovilización fotoquímicos o fotolitográficos.

Es ventajoso que las regiones entre las áreas de medición diferenciadas "se pasiven" para minimizar la unión no específica de sustancias de detección, es decir, que entre las regiones de medición espacialmente separadas entre sí se apliquen componentes "químicamente neutros" frente a los analitos y otras sustancias contenidas de las muestras aplicadas así como con respecto a las sustancias de detección para los analitos mencionados, es decir que no unen los mismos.

Las "muestras de inmovilización" mencionadas con respecto a los analitos y otros materiales contenidos de las "muestras de inmovilización" así como con respecto a las sustancias de detección de las "muestras de inmovilización" así con respecto a las "químicamente neutros", es decir los componentes que no unen los mismos pueden elegirse de los grupos formados por albúminas, en especial albúmina de suero bovino o albúmina de suero humano, caseína, anticuerpos no específicos, policlonales o monoclonales, extraños o no específicos para los analitos a ser detectados (en especial para inmuno ensayos). Los detergentes – por ejemplo Tween 20 –, ADN natural o sintético, fragmentado, que hibridan con polinucleótidos a ser analizados, como por ejemplo un extracto de esperma de arenque o de salmón (en especial para ensayos de hibridación de polinucleótidos), o también polímeros no cargados, pero hidrófilos, como por ejemplo polietilenglicoles o dextranos.

Sin restricción en cuanto a la generalidad, en el caso de los analitos a ser detectados, contenidos en las "muestras de inmovilización" aplicadas en áreas de medición diferenciadas, puede tratarse por ejemplo de compuestos del grupo formado por proteínas, por ejemplo anticuerpos y fragmentos de anticuerpos mono y policlonales, péptidos, enzimas, glicopéptidos, oligosacáridos, lectinas, antígenos para anticuerpos, con lugares de unión adicionales de proteínas funcionalizadas (Proteínas "Tag" como por ejemplo proteínas "histidina-Tag") así como ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN). En cuanto a los analitos a ser detectados, contenidos en regiones de medición discretas, también puede tratarse de compuestos del grupo que abarca proteínas celulares citosólicas o unidas por membrana, en especial en los procesos de la transducción de señales en las células de proteínas intervinientes, como por ejemplo las quinasas. Los analitos también pueden ser grupos modificados mediante tecnología biológica, por ejemplo con luminescentes o bien fluorescentes, como por ejemplo con BFP ("blue fluorescent proteins", GFP ("green fluorescent proteins") o RFP ("red fluorescent proteins").

En función de la configuración física de la plataforma sensora de campo evanescente, para el tipo de tecnología de medición de la generación de señales existen diversas posibilidades. Una variante posible se caracteriza porque las señales optoelectrónicas accionadas localmente para las modificaciones a ser medidas, como consecuencia de la formación de sustancias de detección en los analitos contenidos en las "muestras de inmovilización", debido a las modificaciones locales de las condiciones de resonancia para la generación de un plasmón de superficie, son causados en una delgada capa de metal como parte de la mencionada plataforma sensora de campo evanescente.

Desde el punto de vista de la tecnología de la medición, para la determinación de modificaciones de las condiciones de resonancia son accesibles el ángulo de rayo incidente (en el caso de una variación del ángulo de rayo incidente, a longitud de onda constante de la luz incidente) y de la longitud de onda de resonancia (a ángulo de rayo incidente constante y variación de la longitud de onda de excitación incidente). De manera correspondiente puede la mencionada modificación de las condiciones de resonancia consistir en una modificación del ángulo de resonancia para el rayo incidente de una luz de excitación para generar un plasmón de superficie en una delgada capa de metal como parte de la mencionada plataforma sensora de campo evanescente. De manera correspondiente, puede también la mencionada modificación consistir en una modificación de la longitud de onda de resonancia de un rayo de luz de excitación ingresante para generar un plasmón de superficie en una delgada capa de metal como parte de la mencionada plataforma sensora de campo evanescente.

Las modificaciones resueltas localmente a ser medidas de las señales optoelectrónicas, como consecuencia de la unión de sustancias de detección en regiones de medición discretas en los analitos contenidos en las "muestras de

inmovilización", pueden ser causadas por modificaciones locales del índice de ruptura efectivo en dichas regiones en la mencionada plataforma sensora de campo evanescente.

5 Otra forma de realización importante del procedimiento de acuerdo con la invención se caracteriza porque las señales optoelectrónicas resueltas localmente de las modificaciones a ser medidas, como consecuencia de la unión de las sustancias de detección en las regiones de medición discretas, en los analitos contenidos en las "muestras de inmovilización", son causadas por modificaciones locales de una o varias luminiscencias de dentro de las moléculas capaces de luminiscencia situadas en el campo evanescente de la mencionada plataforma sensora de campo evanescente.

10 Se prefiere que dichas modificaciones de una o más luminiscencias provengan de moléculas capaces de luminiscencia o de nanopartículas capaces de luminiscencia, que en calidad de etiqueta de luminiscencia están unidas a una o más sustancias de detección para los analitos contenidos en las regiones de medición discretas.

15 Es especialmente ventajoso emplear para la detección del analito dos o más marcas de luminiscencia con diversas longitudes de onda y/o diversos espectros de excitación, preferentemente con diversas longitudes de onda e igual longitud de onda de excitación. Cuando haya varias marcas de luminiscencia con diversas propiedades espectrales, en especial diferentes longitudes de onda de emisión en diferentes sustancias de detección de la segunda multiplicidad de participantes específicos en la unión, que se llevan a contacto con las regiones de medición, es posible determinar por ejemplo diversos analitos en un solo paso de detección, es decir, mediante puesta en contacto de las regiones de medición con dichas sustancias de detección y detección, simultáneamente o subsiguiente, de las luminiscencias generadas.

20 A modo de ejemplo, tal variante del procedimiento según la invención es particularmente apropiada para, al mismo tiempo, detectar por ejemplo la forma fosforilada y no fosforilada de un compuesto, en especial, también dentro de un campo de medición único (común), con ayuda de dos diferentes asociados de unión correspondientes específicos marcados en este caso directamente (por ejemplo, con marcas luminiscentes verdes o rojas) como sustancias de detección.

25 De igual manera, se pueden detectar al mismo tiempo dos o más distintos analitos, cuando se usan para la detección del analito dos o más etiquetas luminiscentes con distintos tiempos de disminución de las emisiones.

Para el procedimiento según la invención también se prefiere que, para la detección de distintos analitos en una "muestra de inmovilización" se usen dos o más etiquetas luminiscentes. Asimismo se prefiere que, para la detección de distintos analitos en un campo de medición se usen dos o más etiquetas luminiscentes.

30 Además, es ventajoso cuando la radiación de la luz de excitación se realice en pulsos con una duración de entre 1 fseg y 10 minutos y la luz de emisión de las áreas de medición se mide resuelta en el tiempo.

35 Con preferencia, la plataforma sensora de campo evanescente comprende como soporte sólido un conductor de ondas óptico que comprende una o varias capas. En este caso, se puede tratar, por ejemplo, de un conductor de ondas de fibra óptica, compuesto por varias capas. Con preferencia, se trata sin embargo de un conductor de ondas óptico planar, que está conformado íntegramente sobre una superficie de la plataforma sensora de campo evanescente o que también puede estar dividido en áreas discretas conductoras de ondas, tal como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente WO 96/35940.

40 Se prefiere en particular una forma de realización del procedimiento según la invención que se caracteriza porque la plataforma sensora de campo evanescente comprende como soporte sólido un conductor de onda de capa fina óptico planar con una capa conductora de ondas transparente esencialmente óptica sobre una segunda capa asimismo transparente esencialmente óptica con un menor índice de refracción que la capa conductora de ondas y eventualmente una capa intermedia transparente esencialmente óptica entre la capa conductora de ondas y la segunda capa asimismo con un índice de refracción menor que la capa conductora de ondas.

45 La luz de excitación de una o varias fuentes luminosas se puede acoplar en una capa conductora de ondas de la plataforma sensora del campo evanescente a través de uno o varios elementos de acoplamiento ópticos que están seleccionados del grupo formado por acopladores de prismas, acopladores evanescentes con conductores de ondas ópticos comunes con campos evanescentes superpuestos, acopladores de cara frontal con lentes de enfoque dispuesta delante de una cara frontal de la capa conductora de ondas, con preferencia lentes cilíndricas, y acopladores de rejilla.

50 Se prefiere que el acoplamiento de luz de excitación en una capa conductora de ondas de la plataforma sensora del campo evanescente se realice con ayuda de una o varias estructuras de rejilla que están estampadas en la capa conductora de ondas mencionada.

55 Además, se prefiere que el desacoplamiento de la luz conducida en una capa conductora de ondas de la plataforma sensora del campo evanescente se realice con ayuda de una o varias estructuras de rejilla para el desacople, que están estampadas en dicha capa conductora de ondas y que tienen igual o diferente período y profundidad de rejilla que las estructuras de rejilla para el acoplamiento.

Una forma de realización de especial preferencia del procedimiento según la invención se caracteriza porque la luz de excitación de una o varias fuentes luminosas se acopla a través de una estructura de rejilla para el acoplamiento en una capa conductora de ondas de dicha plataforma sensora de campo evanescente y se conduce a las áreas de medición que se hallan en la plataforma sensora de campo evanescente como onda conducida, porque además la luminiscencia de moléculas luminiscentes generada en el campo evanescente de dicha onda conducida se registra con uno o varios detectores resueltos en el espacio y se determina la concentración relativa de uno o varios analitos de la intensidad relativa de estas señales de luminiscencia.

Una variante especial consiste en determinar, además de la determinación de una o varias luminiscencias, modificaciones del índice de refracción efectivo en las áreas de medición.

Para otra mejora de la sensibilidad, puede ser ventajoso cuando una o varias luminiscencias y / o determinaciones de señales luminosas se realizan con polarización selectiva en la longitud de ondas de excitación. En este caso, se prefiere que se midan una o varias luminiscencias en otra polarización que la de la luz de excitación.

Otro objeto de la presente invención es una plataforma analítica para analizar una multiplicidad de muestras en lo relativo a compuestos biológicamente relevantes como participantes de reacciones de bioafinidad contenidos en las muestras como analitos, que comprende

– una plataforma sensora de campo evanescente como soporte sólido

– al menos una matriz uni- o bidimensional de áreas de medición diferenciadas con asociados de unión allí inmovilizados sobre dicha plataforma sensora de campo evanescente para la detección de dichos analitos en una reacción de bioafinidad,

caracterizada porque

dichas áreas de medición diferenciadas se generaron por aplicación de dichas muestras o fracciones de dichas muestras directamente o después de diluciones adicionales de estas muestras o de sus fracciones, con los analitos a detectar allí, como una primera multiplicidad de asociados de unión específicos, porque distintas muestras o fracciones o distintas diluciones de las muestras o de sus fracciones están dispuestas en distintos áreas de medición diferenciadas y porque en el caso de uno o varios asociados de unión inmovilizados, que forman dicha primera multiplicidad de asociados de unión específicos, se trata de uno o varios analitos en sí que están contenidos en las muestras a analizar.

A este respecto, se puede haber fraccionado una muestra por ensayar separada en dichas fracciones por medio de un procedimiento de separación, que puede estar seleccionado del grupo de procedimientos formando por centrifugación, HPLC y micro-HPLC (“cromatografía líquida de alta presión”) por medio del método de cromatografía en “fase normal”, cromatografía “en fase inversa”, cromatografía por intercambio iónico o cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), “cromatografía por exclusión de tamaño”, cromatografía en gel, electroforesis, electroforesis capilar, electrocromatografía, “electroforesis de flujo libre”, etc.

Una o varias de dichas muestras pueden haberse extraído de organismos biológicos o estructuras tisulares o celulares o células y haberse aplicado directamente (es decir, después del lisado de las células) sin posterior dilución, sobre dicho soporte sólido.

La plataforma analítica según la invención se caracteriza por una sensibilidad tan grande que es posible diluir una muestra o una fracción de una muestra antes de la aplicación sobre dicha plataforma sensora de campo evanescente como soporte sólido al menos en un factor 10. Incluso es posible diluir una muestra o una fracción de una muestra por ensayar en un factor 30 ó 100 y a pesar de ello, detectar cuantitativamente una multiplicidad de analitos en un campo de medición que se genera por aplicación de una fracción fuertemente diluida.

A continuación, se deben resumir, a su vez, las fracciones de muestras para aplicar en áreas de medición diferenciadas y las diluciones de fracciones de muestras para aplicar bajo el término de “muestras de inmovilización.

Las muestras por ensayar con los analitos a detectar eventualmente después de un fraccionamiento pueden estar seleccionadas del grupo de extractos de células sanas o enfermas (por ejemplo, de extractos celulares humanos, animales, bacterianos o vegetales), extractos de tejido animal o humano, como, por ejemplo tejido orgánico, de la piel, del cabello o de los huesos, o de tejido vegetal, así como de líquidos corporales o sus componentes como, por ejemplo, sangre, suero o plasma, líquidos articulares, líquido lagrimal, orina, saliva, líquido tisular, linfa.

En especial, una muestra por ensayar (“muestra de inmovilización”) también puede estar seleccionada del grupo que comprende extractos de células estimuladas o no tratadas y extractos de tejido sano o enfermo.

Los analitos contenidos en las muestras o sus fracciones o bien sus diluciones, es decir, en especial, biopolímeros como, por ejemplo ácidos nucleicos o proteínas, pueden presentarse en forma nativa o en forma desnaturalizada, después del tratamiento de la “muestra original” por ejemplo con urea o tensioactivos (por ejemplo, SDS).

- Con preferencia, los analitos contenidos en las “muestras de inmovilización”, es decir, en especial, biopolímeros como, por ejemplo, ácidos nucleicos o proteínas, después del tratamiento con urea, se presentan en forma desnaturalizada, en donde los epítomos de dichos analitos son de libre acceso para la unión de sus correspondientes sustancias de detección, por ejemplo de anticuerpos. Esto se posibilita por medio de la destrucción de la estructura terciaria o cuaternaria como consecuencia del tratamiento de urea.
- De modo correspondiente, además de “Laser Micro Dissection”, una muestra también se puede haber extraído de un organismo o estructura tisular o celular o célula por medio de un método del grupo de cortes tisulares, o biopsia.
- Una muestra aplicada puede comprender el material de menos de 20000 células, incluso de menos de 1000 células. La muestra puede tener un volumen de menos de 1 µl, incluso menos de 10 nl.
- La cantidad necesaria de muestra puede comprender incluso el material de menos de 100 células y se puede analizar de modo confiable. Esto sucede cuando en el caso de los analitos a detectar, se trata de ingredientes que se presentan en una concentración relativamente elevada.
- Distintas muestras aplicadas se pueden extraer del mismo organismo. En este caso, las muestras pueden extraerse en diversas posiciones del mismo organismo. Distintas muestras aplicadas también se pueden extraer del mismo cultivo celular o uno diferente.
- Pero distintas muestras aplicadas también pueden extraerse de distintos organismos o distintos cultivos celulares.
- Se prefiere que la plataforma sensora de campo evanescente, para mejorar la capacidad de adhesión de las “muestras de inmovilización” aplicadas en áreas de medición diferenciadas, comprenda una capa adhesiva sobre la que se aplican dichas muestras o sus fracciones o diluciones.
- A este respecto, con preferencia, el espesor de la capa de adhesión es menor a 200 nm, con preferencia especial, menor a 20 nm.
- La capa adhesiva puede comprender compuestos del grupo de silanos, silanos funcionalizados, epóxidos, polímeros funcionalizados, cargados o polares y “mono- o multicapas pasivas o funcionalizadas autoorganizadas”, tioles, fosfatos y fosfonatos de alquilo, copolímeros de bloque multifuncionales tales como, por ejemplo, poli(L)lisina/polietilenglicoles.
- Se mostró particularmente ventajoso que dicha capa adhesiva comprenda compuestos del grupo de ácidos organofosfóricos de la fórmula general I (A)
- $Y-B-OPO_3 H_2$ (IA) o de ácidos organofosfónicos de la fórmula general I (B)
- $Y-B-PO_3 H_2$ (IB) y sus sales, en las que B significa un resto alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, hetarilo o hetarilalquilo e Y es hidrógeno o un grupo funcional de la serie hidroxilo, carboxilo, amino, mono- o dialquilamino eventualmente sustituido con alquilo inferior, tiol, o un grupo ácido negativo de la serie éster, fosfato, fosfonato, sulfato, sulfonato, maleimida, succinimidilo, epoxi o acrilato.
- Una forma de realización especial de la plataforma analítica según la invención se caracteriza porque una o varias “muestras de inmovilización” antes de su aplicación sobre la plataforma sensora de campo evanescente como soporte sólido (para mejorar la adherencia sobre dicho soporte sólido y aumento de la homogeneidad de la aplicación) se mezclan con una solución de polímeros o monómeros polimerizables, eventualmente en presencia de iniciadores, o de “Cross-Linkern” químicos (por ejemplo, glutaraldehído). Esta variante del procedimiento puede contribuir, por ejemplo, a evitar la formación de inhomogeneidades de la distribución del material de muestra dentro de un campo de medición en el proceso de evaporación del líquido de muestra, lo cual lleva a una mejor “morfología de mancha”, facilitando así la evaluación de los resultados. En este caso, se prefiere que dicha solución de polímeros o monómeros polimerizables o “Cross-Linkers” químico esté seleccionada del grupo que comprende soluciones de polisacáridos como, por ejemplo, agarosa, o de acrilamidas o de glutaraldehído, etc.
- Tal forma de realización especial de una plataforma analítica según la invención también se caracteriza porque los componentes de una o varias “muestras de inmovilización” después de su mezcla con una solución polimérica, unido en una estructura reticular tridimensional están inmovilizados sobre la plataforma sensora del campo evanescente y allí son accesibles para sus sustancias de detección, con las que se ponen en contacto en una posterior etapa de una reacción de bioafinidad. Con ello, se puede lograr un mayor grado de recubrimiento de la superficie de la plataforma sensora de campo evanescente que una monocapa, lo cual puede llevar a un posterior aumento de las señales mensurables en la etapa de la detección de analitos. En este caso, sin embargo, no se deberá extender la estructura reticular polimérica lograda más allá de la profundidad de penetración del campo evanescente en el medio, ya que una detección de analitos más allá de esta distancia de la superficie de la plataforma sensora de campo evanescente no es posible.
- Son ventajosas aquellas formas de realización de una plataforma analítica según la invención en las que una matriz comprende más de 50, con preferencia más de 500, con preferencia especial, más de 5000 áreas de medición.

A este respecto, cada área de medición puede contener una muestra inmovilizada igual o diferente a la de otras áreas de medición.

Las áreas de medición de una matriz están dispuestas en una densidad de más de 10, con preferencia de más de 100, con preferencia especial, de más de 1000 áreas de medición por centímetro cuadrado.

5 También es ventajosa una forma de realización de una plataforma analítica según la invención caracterizada porque sobre la plataforma sensora del campo evanescente están dispuestas como portadores sólidos una multiplicidad de matrices de áreas de medición. En especial, sobre la plataforma sensora del campo evanescente pueden estar dispuestos al menos 5, con preferencia al menos 50 matrices de áreas de medición. Es particularmente ventajoso cuando están dispuestas distintas matrices de áreas de medición de una variante tal de una plataforma analítica
10 según la invención en distintos recipientes de muestra. A modo de ejemplo, en las solicitudes de patente internacionales WO 01/13096 y WO 01/43875, se describe cómo una plataforma sensora de campo evanescente, que es apropiada para una plataforma analítica según la invención, se puede combinar como plataforma de suelo con un cuerpo colocado apropiado para generar una matriz apropiada de recipientes de muestra en cada caso para el alojamiento de una matriz de áreas de medición.

15 Con esta forma de realización de una plataforma analítica según la invención, se permite una concepción experimental que se puede denominar como "multidimensional": por ejemplo, en las líneas y columnas de una matriz, se pueden aplicar distintas muestras, por ejemplo de distintos organismos (por ejemplo, según las columnas), en diferente dilución (por ejemplo, según las líneas). Se puede poner en contacto distintas matrices de áreas de medición, en diferentes recipientes de muestras, con distintos segundos múltiplos de asociados de unión específicos
20 como sustancias de detección para determinar distintos analitos inmovilizados den diferentes matrices. Es obvio que, con tal variante de una plataforma analítica según la invención, se puede realizar una cantidad casi ilimitada de diversos experimentos.

También es ventajoso que áreas entre las áreas de medición diferenciadas para minimizar la unión inespecífica de sustancias de detección "estén pasivadas", es decir, que entre las áreas de medición separados espacialmente
25 estén aplicados componentes "químicamente neutros" respecto de los analitos y otros ingredientes de las "muestras de inmovilización" aplicadas, así como respecto de las sustancias de detección para dichos analitos, es decir, componentes que no se unan a éstos.

Dichos componentes "químicamente neutros", respecto de los analitos y otros ingredientes de las "muestras de inmovilización" aplicadas, así como respecto de las sustancias de detección para dichos analitos, es decir, que no se unen a éstos se pueden seleccionar de los grupos formados por albúminas, en especial, albúmina de suero bovino o albúmina de suero humano, caseína, anticuerpos, policlonales o monoclonales, inespecíficos de especies extraña o empíricamente inespecíficos para el o los analitos a detectar, (en especial, para inmunoensayos), detergentes –tales como, por ejemplo Tween 20–, ADN natural o sintético fragmentado que no hibride con los polinucleótidos a analizar, o también polímeros no cargados pero hidrófilos, por ejemplo un extracto de esperma de arenque o salmón
30 (en especial, para ensayos de hibridación de polinucleótidos), o tal polímeros no cargados pero hidrófilos como, por ejemplo, polietilenglicoles o dextranos.

Sin limitar la generalidad, en el caso de los analitos a detectar contenidos en las "muestras de inmovilización" aplicadas en las áreas de medición diferenciadas de una plataforma analítica según la invención se puede tratar, por ejemplo, de compuestos del grupo formado por proteínas, por ejemplo anticuerpos mono- o policlonales y fragmentos de anticuerpos, péptidos, enzimas, glucopéptidos, oligosacáridos, lactinas, antígenos para anticuerpos, proteínas funcionalizadas con sitios de unión adicionales ("proteínas Tag", como, por ejemplo, "proteínas Tag de histidina"), así como ácidos nucleicos (por ejemplo ADN, ARN).

En especial, en el caso de los analitos a detectar contenidos en las muestras aplicadas en las áreas de medición diferenciadas se trata de compuestos del grupo que comprende proteínas celulares citosólicas o unidas a membrana, en especial, proteínas participantes de los procesos de la transducción de señales en células como, por ejemplo, quinasas. Los analitos pueden ser también biopolímeros biotécnicamente modificados, por ejemplo con grupos luminescentes o bien fluorescentes y biopolímeros biológicamente expresados como, por ejemplo, con "blue fluorescent proteins" (BFP), "green fluorescent proteins" (GFP) o "red fluorescent proteins" (RFP).

Una variante especial de una plataforma analítica según la invención se caracteriza porque la plataforma sensora de campo evanescente, como componente de la plataforma analítica, comprende una capa metálica delgada eventualmente sobre una capa intermedia que se halla debajo con un índice de refracción preferentemente de < 1,5, como por ejemplo dióxido de silicio o fluoruro de magnesio, en donde el espesor de la capa de metal y la capa intermedia eventual está elegido de forma tal que se pueda excitar un plasmón de la superficie con una longitud de onda de una luz de excitación irradiada y / o con la longitud de onda de una luminiscencia generada.

55 En este caso, se prefiere que el metal esté seleccionado del grupo que comprende oro y plata. Además, se prefiere que la capa metálica tenga un espesor de entre 10 nm y 1000 nm, con preferencia de entre 30 nm y 200 nm.

Con preferencia, la plataforma sensora de campo evanescente comprende como soporte sólido un conductor de ondas óptico que comprende una o varias capas. En este caso, se puede tratar por ejemplo de un conductor de

ondas de fibra óptica compuesto por varias capas. Con preferencia, sin embargo, se trata de un conductor de ondas óptico planar que está formado por completo sobre una superficie de la plataforma sensora de campo evanescente o también puede estar dividido en áreas discretas conductoras de ondas tal como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente WO 96/35940.

- 5 Con preferencia especial, se prefiere tal forma de realización del procedimiento según la invención que se caracteriza porque la plataforma sensora de campo evanescente comprende como soporte sólido un conductor de ondas de capa fina óptico planar con una capa conductora de ondas óptimamente transparentes sobre una segunda capa óptimamente transparente con menor índice de refracción que la capa conductora de ondas y eventualmente una capa intermedia transparente asimismo esencialmente óptica entre la capa conductora de ondas (a) y la
10 segunda capa con índice de refracción asimismo menor que la capa conductora de ondas.

Con preferencia, una plataforma analítica según la invención se conforma de modo que una capa conductora de ondas de la plataforma sensora de campo evanescente esté en contacto óptico con uno o varios elementos de acoplamiento ópticos, que permiten el acoplamiento de luz de excitación de una o varias fuentes luminosas en la dicha capa conductora de ondas, en donde dichos elementos ópticos de acoplamiento están seleccionados del
15 grupo de acopladores de prismas, acopladores evanescentes con conductores de ondas ópticos reunidos con campos evanescentes superpuestos, acoplados de superficie frontal con lentes de enfoque dispuestos delante de una cara frontal de dicha capa conductora de ondas de la plataforma sensora de campo evanescente, con preferencia lentes cilíndricas y acopladores de rejilla.

Se prefiere en especial que en una capa conductora de ondas de la plataforma sensora de campo evanescente estén estampadas una o varias estructuras de rejilla para el desacople con el mismo o diferente período de rejilla y profundidad de rejilla que las estructuras de rejilla para el acoplamiento, que permiten el desacoplamiento de la luz conduce en dicha capa conductora de ondas.

Otras formas de realización de plataformas sensoras de campo evanescente que son apropiadas para una plataforma analítica según la invención, se describen por ejemplo en las solicitudes de patente WO 95/33197, WO 95/33198 y WO 96/35940, que se incorporan en la presente asimismo por completo como parte integral de la presente invención.

Otro objeto de la presente invención es el uso de un procedimiento según la invención o de una plataforma analítica según la invención para análisis cuantitativos y / o cualitativos para la determinación de analitos químicos, bioquímicos o biológicos en procedimientos de control en la investigación farmacológica, la química combinatoria, el desarrollo clínico y preclínico, estudios de unión en tiempo real y para la determinación de parámetros cinéticos en el control de afinidad y en la investigación, para determinaciones cualitativas y cuantitativas de analitos, en especial, para el análisis de ADN y ARN y la determinación de diferencias genómicas o proteómicas en el genoma como, por ejemplo, polimorfismos de mononucleótidos, para la medición de interacciones de proteína y ADN, para la determinación de mecanismos de control para la expresión de ARNm y para la (bio)síntesis de proteínas, para la confección de estudios de toxicidad, así como para la determinación de perfiles de expresión, en especial, para la determinación de sustancias marcadoras biológicas y químicas como ARNm, proteínas, péptidos o sustancias (mensajeras) orgánicas de bajo peso molecular, así como para la detección de anticuerpos, antígenos, patógenos o bacterias en la investigación y desarrollo farmacéuticos, el diagnóstico humano y veterinario, la investigación y el desarrollo de productos agroquímicos, el diagnóstico sintomático y presintomático en plantas, para la estratificación de pacientes en el desarrollo de productos farmacéuticos y para la selección terapéutica de medicamentos, para la detección de agentes patógenos, sustancias nocivas y agente causantes especialmente de salmonelas, priones, virus y bacterias, en especial, en el análisis ambiental y de comestibles.

La invención se explicará con mayor detalle a continuación por medio de ejemplos de realización, en los que las formas de realización allí descritas no implican una limitación de la generalidad.

45 **Ejemplos 1.**

Plataforma analítica

1.1. Plataforma sensora de campo evanescente

Como plataforma analítica sirve una plataforma sensora de campo evanescente como soporte sólido con las dimensiones de 14 mm de ancho x 57 mm de largo x 0,7 mm de espesor. La plataforma sensora de campo evanescente está acuñada como un conductor de ondas de capa fina, que comprende un sustrato de vidrio (AF 45) y una capa de pentóxido de tantalio de alto índice de refracción de 150 nm de espesor aplicado sobre él. En el sustrato de vidrio, paralelamente al largo, se modulan dos rejillas de relieve superficial (período de rejilla: 318 nm, profundidad de rejilla: (12 +/- 2) nm) en una distancia de 9 mm. En la siguiente aplicación de la capa de alto índice de refracción, se transfirieron estas estructuras a la superficie de la capa de pentóxido de tantalio que deben servir
50 como rejilla difractiva del acoplamiento de luz en la capa de alto índice de refracción.
55

Después de una limpieza cuidadosa de la plataforma sensora de campo evanescente, se genera en la superficie de la capa de óxido metálico una monocapa de mono-dodecilsulfato (DDP) por autoorganización espontánea como

capa adhesiva por medio de separación de solución acuosa (0,5 mM de DDP). Esta modificación superficial de la superficie de óxido metálico antes hidrofílica lleva a una superficie hidrofóbica (con un ángulo de contacto de aproximadamente 100° respecto de agua), sobre la que se debe aplicar una multiplicidad de “muestras de inmovilización” con analitos allí contenidos como participantes específicos de unión para la detección de analitos en una reacción de unión específica.

Sobre las plataformas sensoras de campo evanescentes provistas de la capa adhesiva hidrofóbica, se aplican 6 micromatrices idénticas con 90 áreas de medición cada una (Spots), a su vez, en un dispositivo de 10 filas y 9 columnas, con un Inkjet-Spotter (Modelo BCA1, Perkin Elmer, Boston, MA, Estados Unidos). Cada spot se genera por aplicación de una única gotita de 280 µL de volumen sobre la superficie del chip.

1.2. Reactivos y generación de las matrices de áreas de medición

Para la detección de analitos de proteínas biológicamente relevantes en “muestras de inmovilización” se usan cultivos de células T humanas (Jurkat, DMZ # ACC282). Estas células se cultivan en una solución que contiene RPMI 1640, 10% de FCS (suero bovino fetal), 2 mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptamicina a 37 °C (densidad celular aproximadamente 0,5–1,0 x 10⁶ células/ml). Estas células se incuban luego con anticuerpos, a saber “ratón-anti-humano-CD3” (“mouse-α-human-CD3”) o bien “ratón-anti-humano-CD28” (“mouse-α-human-CD28”), contra los receptores de superficie CD3 o bien CD28 (en una solución de 1 µg/ml durante 10 min). Para una muestra comparativa con los cultivos celulares tratados con los anticuerpos, se usa un cultivo celular por lo demás similar, que quedó sin tratar y que servirá en el procedimiento de detección analítico como control negativo. Otro cultivo celular por lo demás similar se trata con estaurosporina (concentración: 10 µM), un potente inhibidor de la proteína quinasa, durante 180 min.

Luego se enfrían los cultivos celulares tratados de esta forma o bien no tratados se enfrían hasta 4 °C y se sedimentan durante 2 minutos con una fuerza de centrifugación de 350x g (cantidad celular aproximadamente 10⁷). En este caso, se separan las células únicamente, sin daño, del medio. Luego se decanta el sobrenadante y se añade tampón de lisis (7 M de urea, 2 M de tiourea, 4% de CHAPS, 1% de DTT, 4 mM de espermidina y Complete (inhibidor de proteasa, Roche AG, 1 comprimido/50 ml)), en donde la concentración de proteína total se regula a aproximadamente 10 mg/ml. Todos los componentes celulares con contenido de proteína se desnaturalizan y solubilizan aquí de forma espontánea y completa.

Por centrifugación a 13000 x g se centrifuga el material que contiene el ADN. El sobrenadante se regula después de nueva dilución en un factor 10 (ver más abajo) como “muestra de inmovilización”.

El tratamiento con los anticuerpos mencionados sirve como sistema de modelo para la activación de coestimulación de linfocitos T humanos (M. Diehn et al., “Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation”, Proceedings of the National Academy of Sciences 99 (2002) 11796 – 11801). La unión de dichos anticuerpos con los receptores unidos a la membrana celular desencadena una cascada de fosforilación con vías de señales distintas conectadas dentro de las células en cuestión. La actividad de una determina vía de señales se puede detectar aquí por medio de la determinación del grado de fosforilación de una proteína clave implicada correspondiente (como una llamada “proteína marcadora”) o sus sustratos, lo cual se debe llevar a cabo con ayuda de una plataforma analítica según la invención.

Las muestras obtenidas con ayuda de las etapas de preparación descritas previamente se diluyen nuevamente en un factor de 10 hasta una concentración de proteína total de aproximadamente 1 mg/ml y luego se aplican en áreas de medición diferenciadas para generar una matriz de áreas de medición sobre la plataforma sensora de campo evanescente provista de la capa adhesiva.

Además de las áreas de medición con las muestras allí aplicadas, cada micromatriz contiene otros áreas de medición con albúmina de suero bovino marcado con fluorescencia Cy5 allí inmovilizada (Cy5-BSA), que se usan para referenciación de diferencias locales y / o variaciones temporales de la intensidad de la luz de excitación en la medición (“Spots de referencia”). Cy5-BSA se aplica en una concentración de 1,0 nM en solución de cloruro de sodio tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) (tasa de marcación: 3 moléculas de Cy5 por molécula de BSA).

Tras aplicar las “muestras de inmovilización” y Cy5-BSA, se almacena la plataforma analítica durante dos horas a temperatura ambiente y 100 % de humedad relativa ambiente y luego se seca a temperatura ambiente. A continuación se saturan las áreas de la superficie hidrofóbica libre no cubierta con proteína de la plataforma sensora de campo evanescente con albúmina de suero bovino (BSA), incubando la superficie con una solución de BSA (30 mg/ml) en 50 mM de imidazol / 100 mM de NaCl (pH 7,4). Luego se lava con agua la plataforma sensora de campo evanescente con las áreas de medición generados arriba y luego se seca en una corriente de nitrógeno y se almacena a 4 °C para realizar el procedimiento de detección según la invención.

La geometría de una disposición típica de las áreas de medición en una matriz bidimensional y una disposición lineal de seis matrices (idénticas) sobre una plataforma sensora de campo evanescente está representada en la Figura 1 (para los ejemplos, que se tratan con mayor detalle por medio de la Figura 3A/B o bien Figura 4A/B). El diámetro de las manchas, con una distancia de centro a centro de 600 µm, es de aproximadamente 90 µm. Una matriz de áreas de medición comprende para estos ejemplos en cada caso una disposición de áreas de medición con 8 distintas

muestras aplicadas en 5 replicaciones, en donde los 5 áreas de medición similares están dispuestos en una columna común vertical a la dirección de expansión de la luz conducida durante la etapa de detección en la capa conductora de ondas de la plataforma analítica. Con ayuda de los 5 áreas de medición similares, se debe determinar la reproducibilidad de las señales de medición dentro de la matriz de áreas de medición. Entre y junto a las columnas de las áreas de medición con muestras para analizar allí aplicadas, están dispuestas columnas de áreas de medición con Cy5-BSA allí aplicado (con fines de referenciación). La plataforma analítica según la invención comprende en este ejemplo 6 matrices similares de áreas de medición, tal como se representa en la Figura 1.

2. Procedimiento de detección analítico

2.1. Arquitectura del ensayo

La detección de determinadas proteínas en general (es decir, por ejemplo, con o sin fosforilación) o bien de determinadas proteínas en especial en forma activada (por ejemplo, fosforilada) en los lisados celulares inmovilizados como "muestras de inmovilización" aplicadas en áreas de medición diferenciadas se realiza con ayuda de una adición secuencial de correspondientes reactivos de detección como etapas del ensayo antes de la medición de las señales de fluorescencia resultantes: para preparar una primera etapa del ensayo, se diluyen anticuerpos de conejo policlonales específicos de analitos (anticuerpo A1 (#2261): sustrato fosfo-(Ser) PKC; anticuerpo A2 (#9611): sustrato fosfo-(Ser/Thr) Akt; anticuerpo A3 (#9101): fosfo-p44/42 MAP quinasa (Thr202/Tyr204); anticuerpo A4 (#9102): p44/42 MAP quinasa (Thr202/Tyr204); todos los anticuerpos adquiridos de Cell Signaling Technology, INC., Beverly, MA, Estados Unidos) típicamente en la relación 1:500 en tampón de ensayo (50 mM de imidazol, 100 mM de NaCl, 0,1% de BSA, 0,05% de Tween 20 pH 7,4). De estas cuatro soluciones de anticuerpos distintas, se aplican en cada caso 30 μ l sobre cada una de las 6 matrices idénticas de áreas de medición, seguido de una incubación a temperatura ambiente durante la noche (primera etapa de ensayo). Los anticuerpos excedentes no unidos específicamente se eliminan por lavado de cada matriz con tampón de ensayo (5x100 μ l).

Los 4 distintos anticuerpos utilizados aquí son básicamente de distinta naturaleza: los anticuerpos A1 y A2 reconocen y se unen a una serie de proteínas diversas fosforiladas en serina o bien serina/treonina, que sirven a las proteínas quinasas como sustratos. Éstos se reconocen por una multiplicidad de bandas en Western-Blot (Figura 2A y sección 2.4, "Resultados"). Los anticuerpos A3 y A4 reconocen y unen el mismo tipo de compuesto, a saber, la p44/42 MAP-quinasa (también mencionada Erk2), pero en donde el anticuerpo A3 sólo conoce su forma fosforilada "activa" (pErk2), mientras que el anticuerpo A4 reconoce ambas formas (la forma no fosforilada Erk2 y la forma fosforilada pErk2) y se une a ellas.

Para la detección de anticuerpos específicos de analitos contenidos en áreas de medición diferenciadas unidos allí a las muestras inmovilizadas se realiza una segunda etapa de ensayo usando un anticuerpo anti-conejo marcado con Cy5 (Amersham Biosciences, Dübendorf, CH), que se une a todos los anticuerpos antes mencionados A1 – A4. Este anticuerpo marcado con Cy5 se aplica en una concentración de típicamente 10 nM en tampón de ensayo sobre las matrices (30 μ l cada una) y así se deja incubar durante 2 horas a temperatura ambiente a la oscuridad. Luego se lavan las matrices con tampón de ensayo (cinco veces con 100 μ l por vez), para eliminar los anticuerpos de Cy5-anti-conejo no unidos específicamente. Luego se almacenan las plataformas analíticas así preparadas hasta la etapa de detección por medio de excitación y detección de señales de fluorescencia resultantes en ZeptoREADER™ (ver bajo).

2.2. Determinación de las señales de fluorescencia de las matrices de áreas de medición

Las señales de fluorescencia de las distintas matrices de áreas de medición se miden automáticamente de modo secuencial con un ZeptoREADER™ (Zeptosens AG, CH-4108 Witterswil, Suiza). Para cada matriz de áreas de medición se ajusta la plataforma analítica según la invención para satisfacer la condición de resonancia para el acoplamiento de luz en la capa de pentóxido de tantalio conductora de ondas y para maximizar la luz de excitación disponible en las áreas de medición. Luego se genera en cada matriz una cantidad seleccionable por el usuario de imágenes de señales de fluorescencia de la matriz en cuestión, pudiendo seleccionar distintos tiempos de iluminación. La longitud de ondas de excitación es, en el caso de las mediciones para el presente ejemplo de 633 nm, la detección de la luz de fluorescencia se realiza con una cámara enfriada con una longitud de onda de fluorescencia de Cy5, usando un filtro de interferencia (transmisión 670 ± 20 nm) para suprimir la luz dispersa en la longitud de onda de excitación que se posiciona delante del objeto de la cámara. Las imágenes de fluorescencia generadas se almacenan automáticamente en la placa de memoria de la computadora de control. Otros detalles del sistema óptico (ZeptoREADER™) se describen en la solicitud de patente internacional PCT/EP 01/10012, que se introduce por completo como parte integral de esta solicitud.

2.3. Evaluación y referenciación:

La intensidad de señal media de las áreas de medición (Spots) se determina por medio de un software de análisis de imágenes (ZeptoVIEW, Zeptosens AG, CH-4108 Witterswil), que permite evaluar las imágenes de fluorescencia de una multiplicidad de matrices de áreas de medición de forma semiautomática.

Los datos en bruto de cada uno de los píxeles de la cámara representan una matriz bidimensional de valores de medición digitalizados con la intensidad medida como valor de medición de cada píxel correspondiente a la

superficie reflejada en ella sobre la plataforma sensora. Para la evaluación de los datos, primero se coloca manualmente una red bidimensional (de coordenadas) sobre los puntos de imagen (valores de píxeles) de forma tal que la imagen parcial de cada spot recae en un elemento de red bidimensional individual. Dentro de este elemento de red, se asigna a cada spot un "valor de evaluación" circular lo más adecuado posible (area of interest, AOI) con un radio predeterminado por el usuario (típicamente 90 μm). Mediante el software de análisis de imágenes, se determina el lugar de cada AOI de forma individual en función de la intensidad de la señal de cada píxel. En este caso, se mantiene el radio de AOI predeterminado al comienzo por el usuario. Como intensidad de señal bruta media de cada spot se determina la media aritmética de los valores de píxeles (intensidades de señales) dentro de un rango de evaluación seleccionado.

Las señales de fondo se determinan a partir de las intensidades de señales medidas entre los spots. Para ello, se definen por spot cuatro otras superficies circulares (típicamente con igual radio como para los rangos de evaluación de los spots) como rangos de evaluación para la determinación de la señal de fondo, que están dispuestas con preferencia en el medio entre spots adyacentes. De estas cuatro superficies circulares, se determina la intensidad de señal de fondo media, por ejemplo, como la media aritmética de los valores de píxeles (intensidades de señales) dentro de un AOI seleccionado para ello. La intensidad de señal neta media proveniente de las áreas de medición (spots) se calcula luego como diferencia entre la intensidad de señal bruta media local y de fondo media local de cada spot.

La referenciación de la intensidad de señales netas de todos los spots se realiza por medio de spots de referencia (Cy5-BSA) de cada matriz de áreas de medición. Para ello, se divide la intensidad de señal neta de cada spot por el valor medio de la intensidad de señal neta del spot de referencia adyacente de la misma serie (dispuesta paralelamente a la dirección de expansión de la luz conducida en la plataforma sensora de campo evanescente). Por esta referenciación, se compensan las diferencias locales de la intensidad disponible de la luz de excitación ortogonalmente a la dirección de expansión de la luz tanto dentro de una micromatriz como también entre distintas micromatrices.

2.4. Resultados

La Figura 2 muestra los resultados que se lograron por medio del procedimiento según la invención con la plataforma analítica según la invención. El diagrama de barras muestra en cada caso en comparación los resultados del cultivo celular tratado con los anticuerpos contra los receptores de superficie CD23 (" $\alpha\text{CD}3$ ") y CD28 (" $\alpha\text{CD}28$ ") (barras llenas) y el cultivo no tratado ("control negativo", barras vacías), qué muestras "de naturaleza idéntica" obtenidas después de aplicación en 6 matrices similares de áreas de medición sobre una plataforma sensora de campo evanescente descrita con anterioridad se pusieron en contacto con las soluciones de los distintos anticuerpos A1 – A4. En este caso, se aplicaron en 4 matrices similares que estaban dispuestas en distintos recipientes de muestras en una plataforma sensora de campo evanescente común, distintas soluciones que contenían uno de los 4 anticuerpos A1 – A4 mencionados y luego, tal como se describió en el punto 2.1., se añadieron anticuerpos anti-conejo marcados con Cy5. En la Figura 2 se representan los valores medios de las intensidades de señales referenciadas según el procedimiento antes descrito de cinco áreas de medición similares dentro de una matriz y sus desviaciones estándar.

A este respecto, las intensidades de señales calculadas se correlacionan con la concentración de un analito determinado presente (alta intensidad de señal equivalente a alta concentración). Claramente se puede reconocer que por tratamiento de los cultivos celulares de Jurkat con los anticuerpos contra los receptores de superficie CD23 (" $\alpha\text{CD}3$ ") y CD28 (" $\alpha\text{CD}28$ ") ("estimulación") se elevó la concentración intracelular relativa de los sustratos fosfo-(Ser) PKC- y fosfo-(Ser/Thr) Akt a casi el doble, en comparación con el control negativo. Aún más, a saber en el factor 5, aumentó la concentración de pErk2, en donde la suma del contenido de Erk2 y pErk2 (detectado con ayuda del anticuerpo A4) dentro de la precisión de medición permaneció constante. Esto significa que dentro de la duración de la estimulación de 10 minutos, el contenido total de Erk2 no se elevó por aumento de la expresión, sino sólo el contenido de pErk2 se elevó por fosforilación.

A fin de evaluar la sensibilidad del procedimiento según la invención para la detección de una única "proteína marcadora" interesante en una muestra aplicada en un campo de medición, es decir, en el proteoma inmovilizado en cada campo de medición, se dividió un lisado celular no tratado (control negativo), que según el ensayo realizado con anterioridad (cuyos resultados se representan en la Figura 2) contenía comprobablemente sólo un muy bajo contenido de pErk2 (tercer par de barras en la Figura 2), para un segundo ensayo en soluciones parciales individuales que se mezclan con esta "proteína marcadora" en distintas concentraciones de (0–3645 ng/ml). Luego se inmovilizan estas soluciones, tal como se describió con anterioridad, sobre el chip planar del conductor de ondas y se realiza un ensayo de acuerdo con el punto 2.1 (usando anticuerpo A3). La Figura 3A muestra una distribución típica de señales de una matriz de áreas de medición, en donde los rectángulos marcados representan en cada caso 5 spots de replicación de una concentración de pErk2 añadida al lisado celular no tratado (1–8: mayor concentración de acuerdo con la disposición geométrica representada en la Figura).

El resultado de esta medición para la detección de pErk2, en función de su concentración añadida, se puede describir por una típica curva de unión, adecuando una función Hill al curso de la concentración de las señales (Fig. 3B). Cada punto de datos en la Figura 3B representa el valor medio de las intensidades de señales netas

referenciadas de 5 spots de analitos replicados, cada uno con su correspondiente desviación estándar marcada por medio de barras de error. El corte ampliado de la imagen en la Figura 3B muestra el curso de la concentración de las señales para las menores concentraciones, cuyo aumento en la representación para todo el curso de la concentración ya no se puede resolver. Como sensibilidad del ensayo (Limit of Detection), sobre la base de la suma de la señal del valor 0 ("Blank", sin p-Erk2 añadido) y su doble desviación estándar, se determina un valor de 2,0 ng/ml, lo cual equivale a una fracción en peso de $2,3 \times 10^{-6}$ g por g de proteína total.

Las Figuras 4A y 4B muestran los resultados de un tercer ensayo esencialmente análogo al segundo. Como diferencia del segundo ensayo previamente descrito con los resultados representados en la Figura 3A y 3B, se realiza en este tercer ensayo el ensayo de acuerdo con el punto 2.1 usando el anticuerpo A4 (es decir, con adición a la matriz similar como en el segundo ensayo). En este ensayo, también se determina la totalidad de compuesto fosforilado y no fosforilado (pErk2 y Erk2), correspondiente a la adición diferente de pErk2. La Figura 4A muestra una típica distribución de señales de una matriz de áreas de medición, en donde los rectángulos marcados a su vez representan en cada caso 5 spots de replicación de una concentración de pErk2 añadida al lisado celular sin tratar (1-8: mayor concentración, según la disposición geométrica representada en la Figura 1). En este caso, se determina para la sensibilidad del ensayo (Limit of Detection) un valor de 110 ng/ml, lo cual equivale a una fracción en peso de $1,1 \times 10^{-4}$ g por g de proteína total.

En otro cuarto experimento se ensaya si también distintas modificaciones de la concentración en pErk2 como consecuencia de la coestimulación de células Jurkat se pueden detectar con α CD3/ α CD28, con distinta duración de estimulación y si las diferencias de estas modificaciones se pueden resolver con el procedimiento según la invención. Para ello, se incuban cultivos celulares Jurkat antes de su lisis durante un tiempo diferente (en el intervalo de los minutos) con 1 μ g/ml de α CD3/ α CD28. Además, se trata un cultivo celular Jurkat con estaurosporina (inhibidor de proteína quinasa). Este último cultivo celular sirve como control negativo, ya que aquí debido a la inhibición de todas las proteína quinasa no debía haber pErk2 (ver también el punto 1.2), una señal medida para ello también debería corresponder a la señal de una muestra libre de pErk2. Luego se someten a spots los lisados celulares tratados de esta manera sobre la plataforma sensora de campo evanescente y se realiza un ensayo de acuerdo con el punto 2.1, usando el anticuerpo A3 para la detección de las modificaciones de las concentraciones de pErk2.

El resultado de esta medición se representa en la Fig. 5A. Cada una de las barras mostradas en el gráfico representa el valor medio referenciado de la intensidad de señal neta de 5 spots de analitos referenciados con la correspondiente desviación estándar. Se ha de reconocer bien que la modificación de la concentración de pErk2, detectado con el anticuerpo 3, se puede disolver bien, donde la función del tiempo, es decir, la dependencia del tiempo de estimulación, se caracteriza por un rápido aumento de la concentración de pErk2, seguido de una caída al nivel de la concentración inicial después de un tiempo de estimulación de 60 minutos, en donde se alcanza el máximo de concentración después de aproximadamente 10 minutos. La señal de la muestra de control no estimulada es ligeramente superior a aquella de la muestra tratada con estaurosporina, lo cual representa la proporción natural de pErk2 sin estimulación.

Como medición de control, se realizan un ensayo por lo demás similar y un procedimiento de detección, en donde en lugar del anticuerpo 3, se usa el anticuerpo 4 para la detección de la totalidad de la forma proteica correspondiente fosforilada y no fosforilada, es decir, del contenido total relativo de Erk2/pErk2. En este caso, dentro de la precisión experimenta, no se comprobó ninguna diferencia significativa de las señales, es decir, ninguna modificación de la concentración para las distintas duraciones de estimulación de hasta 60 minutos, ni tampoco una diferencia con la muestra de control no tratada y con la muestra tratada con estaurosporina (Fig. 5B).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para ensayar una multiplicidad de muestras en lo relativo a los compuestos contenidos en las muestras, biológicamente relevantes como participantes en reacciones de unión específicas, como analitos, caracterizado porque
- 5 – dichas muestras o fracciones de dichas muestras con los analitos a detectar allí contenidos, como una primera multiplicidad de asociados de unión específicos se aplican directamente o después de diluciones adicionales de las fracciones en al menos una matriz unidimensional o bidimensional en áreas de medición diferenciadas en una plataforma sensora de campo evanescente como soporte sólido, en donde se disponen distintas muestras o fracciones o distintas diluciones de muestras o fracciones en distintos áreas de medición diferenciadas,
- 10 – una o varias sustancias de detección, como una segunda multiplicidad de asociados de unión específicos, para la detección específica de uno o varios analitos contenidos en las muestras o sus fracciones, a partir de dicha primera multiplicidad de asociados de unión específicos, se ponen en contacto en una única etapa o en varias etapas de una reacción de unión específica con las muestras o fracciones aplicados en dichas áreas de medición diferenciadas o sus diluciones,
- 15 – modificaciones de señales optoelectrónicas como consecuencia de la unión de sustancias de detección con analitos contenidos en áreas de medición diferenciadas, se miden con resolución local en el campo evanescente de la plataforma sensora de campo evanescente, y a partir del tamaño relativo de las modificaciones de dichas señales optoelectrónicas de los respectivos áreas de medición se determina cualitativa y / o cuantitativamente la presencia de los analitos a detectar allí de forma específica.
- 20 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por un procedimiento de separación para dividir la muestra en una o varias de dichas fracciones del grupo de procedimientos formado por centrifugación, cromatografía líquida de alta presión y microcromatografía líquida de alta presión por medio del método de cromatografía en fase normal, en fase inversa, de intercambio iónico o de interacción hidrófoba, cromatografía por exclusión de tamaño, cromatografía en gel, electroforesis, electroforesis capilar, electrocromatografía, electroforesis de flujo libre.
- 25 3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–2, caracterizado porque se diluye una fracción de una muestra antes de la aplicación sobre dicha plataforma sensora de campo evanescente como soporte sólido al menos en un factor 10.
4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–2, caracterizado porque se diluye una fracción de una muestra antes de la aplicación sobre dicha plataforma sensora de campo evanescente como soporte sólido al menos en un factor 30.
- 30 5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–4, caracterizado porque las muestras están seleccionadas del grupo de extractos de células sanas o enfermas, extractos de tejido animal o humano o de tejido vegetal, así como de líquidos corporales o sus componentes.
6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–4, caracterizado porque las muestras están seleccionadas del grupo que comprende extractos de células estimuladas o no tratadas y extractos de tejido sano o enfermo.
- 35 7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–6, caracterizado porque una muestra por ensayar de un organismo o estructura tisular o celular o célula se extrajo por medio de un método del grupo de cortes de tejidos, biopsia o “Laser Capture Micro Dissection”.
- 40 8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–7, caracterizado porque una muestra inmovilizada comprende el material de menos de 20000 células.
9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–8, caracterizado porque una muestra inmovilizada comprende el material de menos de 1000 células.
- 45 10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–9, caracterizado porque los analitos contenidos en una muestra inmovilizada están presentes en forma nativa o desnaturalizada.
11. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–9, caracterizado porque los analitos, ácidos nucleicos o proteínas contenidos en una muestra inmovilizada, después del tratamiento con urea, se presentan en forma desnaturalizada, en donde los epítomos de dichos analitos tienen libre acceso para la unión a sus correspondientes sustancias de detección.
- 50 12. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–11, caracterizado porque las cantidades totales relativas de uno o varios compuestos como analitos contenidas en una muestra inmovilizada son determinadas, como suma de sus presencias en forma fosforilada o no fosforilada y / o en forma glicosilada y / o no glicosilada.

13. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–11, caracterizado porque las cantidades relativas de uno o varios compuestos como analitos contenidas en una muestra inmovilizada se determinan en cada caso por su presencia en forma fosforilada y / o no fosforilada y / o en forma glicosilada y / o no glicosilada, para una o varias de dichas formas.
- 5 14. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–11, caracterizado porque se determina el grado de activación uno o varios de analitos contenidos en una muestra inmovilizada.
15. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–11, caracterizado porque se determina el grado de fosforilación y / o el grado de glucosilación de uno o varios de analitos contenidos en una muestra inmovilizada.
- 10 16. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–15, caracterizado porque se detectan diferencias de menos del 20 %, con preferencia de menos del 10 %, de las cantidades relativas de uno o varios compuestos contenidos en una muestra inmovilizada y en una o varias muestras comparativas en forma fosforilada y / o no fosforilada y / o en forma glicosilada y / o no glicosilada como analitos, para una o varias de dichas formas.
- 15 17. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 – 16, caracterizado porque dicha muestra inmovilizada y una o varias muestras comparativas se extrajeron del mismo lugar de origen en diferentes momentos y porque se determinan modificaciones temporales de las cantidades relativas de uno o varios compuestos contenidas en estas muestras en forma fosforilada y / o no fosforilada y / o en forma glicosilada y / o no glicosilada como analitos.
- 20 18. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–17, caracterizado porque se extrajeron diferentes muestras del mismo organismo o del mismo cultivo celular.
- 20 19. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, caracterizado porque se extrajeron diferentes muestras en diversas posiciones del mismo organismo.
20. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–17, caracterizado porque se extrajeron diferentes muestras de distintos organismos o distintos cultivos celulares.
- 25 21. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–20, caracterizado porque la plataforma sensora de campo evanescente, para mejorar la adherencia de la muestra inmovilizada a aplicar en las áreas de medición diferenciadas, comprende una capa adhesiva sobre la que se aplican dichas fracciones de muestras o diluciones de estas fracciones.
- 25 22. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 21, caracterizado porque dicha capa adhesiva tiene un espesor de menos de 200 nm, con preferencia de menos de 20 nm.
- 30 23. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 21–22, caracterizado porque dicha capa adhesiva comprende compuestos del grupo de silanos, silanos funcionalizados, epóxidos, polímeros funcionalizados, cargados o polares y mono– o multicapas pasivas o funcionalizadas autoorganizadas, tioles, fosfatos y fosfonatos de alquilo, copolímeros de bloque multifuncionales.
- 35 24. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 21–22, caracterizado porque dicha capa adhesiva comprende compuestos del grupo de ácidos organofosfóricos de la fórmula general I (A)
- Y–B–OPO₃ H₂ (IB) o de ácidos organofosfónicos de la fórmula general I (B)
- Y–B–PO₃ H₂ (IB) y sus sales, en los que B significa un resto alquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo, aralquilo, hetarilo o hetarilalquilo e Y hidrógeno o un grupo funcional de la serie de hidroxilo, carboxilo, amino, mono– o dialquilamino eventualmente sustituido con alquilo inferior, tiol, o un grupo ácido negativo de la serie de éster, fosfato, fosfonato, sulfato, sulfonato, maleimida, succinimidilo, epoxi o acrilato.
- 40 25. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–24, caracterizado porque una o varias muestras inmovilizadas se mezclan antes de su aplicación sobre la plataforma sensora de campo evanescente como soporte sólido con una solución de polímeros o monómeros polimerizables, eventualmente en presencia de iniciadores o de reticulantes químicos.
- 45 26. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 25, caracterizado porque dicha solución de polímeros o monómeros polimerizables o reticulantes químicos está seleccionada del grupo que comprende soluciones de polisacáridos.
- 50 27. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 25–26, caracterizado porque la mezcla de una o varias muestras inmovilizadas con una solución de polímeros o monómeros polimerizables da lugar a la inmovilización de una estructura de red tridimensional con componentes de muestras allí unidas, accesibles para sustancias de detección en la siguiente etapa de una reacción de bioafinidad sobre la plataforma sensora de campo evanescente como soporte sólido.

- 5 28. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–20, caracterizado porque la muestra inmovilizada se aplica en áreas de medición diferenciadas sobre la plataforma sensora de campo evanescente directamente o sobre una capa adhesiva colocada sobre ella de forma espacialmente selectiva con ayuda de un procedimiento que se selecciona del grupo de procedimientos formados por “Inkjet spotting”, spotting mecánico por medio de vástago, muelle o capilares, “Micro contact printing”, contacto fluídico de las áreas de medición con dichas muestras suministrándolas en microcanales paralelos o cruzados bajo acción de diferencias de presión o potenciales eléctricos o electromagnéticos, así como procedimientos de inmovilización fotoquímicos o fotolitográficos.
- 10 29. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–28, caracterizado porque se aplican áreas entre las áreas de medición diferenciadas para minimizar la unión inespecífica de sustancias de detección entre las áreas de medición espacialmente separados respecto de los analitos y otros componentes de la muestra inmovilizada aplicada, así como respecto de componentes que no unen los analitos con las sustancias de detección para dichos analitos.
- 15 30. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 29, caracterizado porque estos componentes que no se unen están seleccionados de los grupos formados por albúminas, en especial, albúmina de suero bovino o albúmina de suero humano, caseína, anticuerpos, policlonales o monoclonales, inespecíficos de especies extraña o empíricamente inespecíficos para el o los analitos a detectar, detergentes, ADN natural o sintético fragmentado que no hibride con los polinucleótidos a analizar, o también polímeros no cargados pero hidrófilos.
- 20 31. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–23, caracterizado porque en el caso de los analitos a detectar contenidos en muestras inmovilizadas aplicadas en áreas de medición diferenciadas se trata de compuestos del grupo formado por proteínas, por ejemplo anticuerpos y fragmentos de anticuerpos mono- o policlonales, péptidos, enzimas, glucopéptidos, oligosacáridos, lectinas, antígenos para anticuerpos, proteínas funcionalizadas con sitios de unión adicionales, así como ácidos nucleicos.
- 25 32. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 31, caracterizado porque en el caso de los analitos a detectar contenidos en muestras inmovilizadas aplicadas en áreas de medición diferenciadas se trata de compuestos del grupo que comprende proteínas celulares citosólicas o unidas a membrana, en especial, proteína quinasas participantes de los procesos de transducción de señales en células.
- 30 33. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–32, caracterizado porque los cambios en las señales optoeléctricas medidas con resolución local se producen como consecuencia de la unión de las sustancias de detección a los analitos presentes en áreas de medición diferenciadas en las muestras inmovilizadas, por cambios locales en las condiciones de resonancia para generar un plasmón superficial en una capa de metal fina como parte de dicha plataforma sensora de campo evanescente.
- 35 34. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 33, caracterizado porque dichos cambios en las condiciones de resonancia consisten un cambio del ángulo de resonancia para la iluminación con una luz de excitación para generar un plasmón superficial en una capa fina de metal como parte de dicha plataforma sensora de campo evanescente.
- 35 35. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 33, caracterizado porque dichos cambios en las condiciones de resonancia consisten en cambio de la longitud de onda de resonancia de una luz de excitación incidente para generar un plasmón superficial en una capa fina de metal como parte de dicha plataforma sensora de campo evanescente.
- 40 36. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–35, caracterizado porque los cambios en las señales optoeléctricas medidas con resolución local se producen, como consecuencia de la unión de las sustancias de detección a los analitos presentes en áreas de medición diferenciadas en las muestras inmovilizadas, por cambios locales en el índice de refracción efectivo en estas áreas de dicha plataforma sensora de campo evanescente.
- 45 37. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–32, caracterizado porque los cambios en las señales optoeléctricas medidas con resolución local se producen, como consecuencia de la unión de las sustancias de detección a los analitos presentes en áreas de medición diferenciadas en las muestras inmovilizadas, por cambios locales de una o más luminiscencias de moléculas capaces de producir luminiscencia presentes dentro del campo evanescente de dicha plataforma sensora de campo evanescente.
- 50 38. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 37, caracterizado porque dichos cambios en una o más de las luminiscencias provienen de moléculas capaces de producir luminiscencia o nanopartículas capaces de producir luminiscencia que se unen como marcas luminiscentes a una o más sustancias de detección para los analitos presentes en las áreas de medición diferenciadas.
- 55 39. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 38, caracterizado porque se emplean dos o más marcas luminiscentes con diferentes longitudes de emisión y/o diferentes espectros de excitación, con preferencia con diferentes longitudes de emisión y la misma longitud de excitación, para la detección del analito.
40. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 38–39, caracterizado porque se emplean dos o más marcas luminiscentes con diferentes velocidades de decaimiento de la emisión para la detección del analito.

41. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 39–40, caracterizado porque para la detección de diferentes analitos en una muestra inmovilizada se utilizan dos o más marcas luminiscentes.
42. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 39–41, caracterizado porque para la detección de diferentes analitos en un área de medición se utilizan dos o más marcas luminiscentes.
- 5 43. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 37–42, caracterizado porque la iluminación con luz de excitación se lleva a cabo en pulsos de entre 1 fseg y 10 minutos, y la luz de emisión de las áreas de medición se mide de manera resuelta en el tiempo.
- 10 44. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 36–43, caracterizado porque la plataforma sensora de campo evanescente que actúa como soporte sólido comprende una guía de onda óptica, que comprende una o más capas.
45. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 44, caracterizado porque la plataforma sensora de campo evanescente que actúa como soporte sólido comprende una guía de onda óptica plana que es continua o dividida en áreas de guía de onda diferenciadas y comprende una o más capas.
- 15 46. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 45, caracterizado porque la plataforma sensora de campo evanescente que actúa como soporte sólido comprende una guía de onda óptica de película fina plana que tiene una capa conductora de la onda esencialmente ópticamente transparente sobre una segunda capa también esencialmente ópticamente transparente con un índice de refracción inferior que la capa y opcionalmente también una capa intermedia esencialmente ópticamente transparente entre la capa conductora de la onda y la segunda capa, también con un índice de refracción inferior que la capa conductora de la onda.
- 20 47. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–46, caracterizado porque la luz de excitación de una o más fuentes de luz se acopla en una capa conductora de la onda de la plataforma sensora de campo evanescente por medio de uno o más elementos de acoplamiento óptico seleccionados del grupo formado por acopladores de prismas, acopladores evanescentes con guías de onda óptica unidas con campos evanescentes superpuestos, acopladores de superficies frontales con lentes de enfoque, con preferencia lentes cilíndricas,
- 25 dispuestas antes de una cara frontal de dicha capa conductora de la onda, y acopladores de rejilla.
48. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 47, caracterizado porque el acoplamiento de la luz de excitación se realiza en una capa conductora de la onda de la plataforma sensora de campo evanescente con la ayuda de una o más estructuras de rejilla para acoplamiento que están estampadas en dicha capa conductora de la onda.
- 30 49. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–48, caracterizado porque el desacoplamiento de la luz guiada en una capa conductora de la onda de la plataforma sensora de campo evanescente se realiza con la ayuda de una o más estructuras de rejilla para desacoplamiento que están estampadas en dicha capa conductora de la onda y que tienen período y profundidad de rejilla idéntico o diferente con respecto a las estructuras de rejilla para el acoplamiento.
- 35 50. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 48–49, caracterizado porque la luz de excitación de una más fuentes de luz se acopla por medio de una estructura de rejilla para acoplar la luz de excitación en una capa conductora de la onda de dicha plataforma sensora de campo evanescente y es guiada como onda guiada a las áreas de medición de la plataforma sensora de campo evanescente, además la luminiscencia de la moléculas capaces de producir luminiscencia que se genera en el campo evanescente de dicha onda guiada se registra con resolución local con uno o más detectores y se determina la concentración relativa de uno o más analitos a partir de
- 40 dichas señales de luminiscencia.
51. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 37–50, caracterizado porque además de la determinación de una o más luminiscencias se determinan los cambios en el índice de refracción efectivo en las áreas de medición.
- 45 52. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 33–51, caracterizado porque la una o más luminiscencias y/o determinaciones de las señales luminosas en la longitud de excitación se llevan a cabo con selectiva polarización.
53. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 47–52, caracterizado porque la una o más luminiscencias se miden con una polarización diferente de la de la luz de excitación.
- 50 54. Plataforma analítica para analizar una multiplicidad de muestras en lo relativo a los compuestos contenidos en las muestras como analitos, que son biológicamente relevantes como participantes en las reacciones de bioafinidad, que comprende
- una plataforma sensora de campo evanescente que actúa como soporte sólido,

– al menos una matriz de una o dos dimensiones de las áreas de medición diferenciadas con asociados de unión inmovilizados allí en dicha plataforma sensora de campo evanescente para detectar dichos analitos en una reacción de bioafinidad,

caracterizada porque

- 5 – dichas áreas de medición diferenciadas se generaron por la aplicación de dichas muestras o fracciones de dichas muestras en forma directa o después de diluciones adicionales de dichas muestras o de sus fracciones, con los analitos detectados allí, como una primera multiplicidad de asociados de unión específicos,
- diferentes muestras o fracciones o diferentes diluciones de dichas muestras o de sus fracciones se disponen en diferentes áreas de medición diferenciadas, y
- 10 – dicho uno o más asociados de unión inmovilizados, que forman dicha primera multiplicidad de asociados de unión específicos, son los uno o más analitos mismos que están contenidos en las muestras a analizar.
55. Plataforma analítica de acuerdo con la reivindicación 54, caracterizada porque una o más muestras o fracciones de una muestra se diluyen en al menos un factor 10 antes de la aplicación en la plataforma sensora de campo evanescente que actúa como soporte sólido, y diferentes diluciones de una fracción se aplicaron en diferentes áreas de medición diferenciadas en dicha plataforma sensora de campo evanescente.
- 15 56. Plataforma analítica de acuerdo con la reivindicación 54, caracterizada porque una o más muestras o fracciones de una muestra se diluyen en al menos un factor 30 antes de la aplicación en la plataforma sensora de campo evanescente que actúa como soporte sólido, y diferentes diluciones de una fracción se aplicaron en diferentes áreas de medición diferenciadas en dicha plataforma sensora de campo evanescente.
- 20 57. Plataforma analítica de acuerdo con una de las reivindicaciones 54–56, caracterizada porque las muestras se seleccionan del grupo de extractos de células sanas o enfermas, extractos de tejido animal humano o de tejido de planta, y de fluidos corporales o sus componentes.
58. Plataforma analítica de acuerdo con una de las reivindicaciones 54–56, caracterizada porque las muestras se seleccionan del grupo que comprende extractos de células estimuladas o no tratadas y extractos de tejido sano o enfermo.
- 25 59. Plataforma analítica de acuerdo con una de las reivindicaciones 54–58, caracterizada porque las muestras para analizar se extrajeron de un organismo o una estructura tisular celular o célula por medio de un procedimiento del grupo de cortes de tejido, biopsia o microdissección por captura láser.
60. Plataforma analítica de acuerdo con una de las reivindicaciones 54–59, caracterizada porque una muestra inmovilizada comprende el material de menos de 20000 células.
- 30 61. Plataforma analítica de acuerdo con una de las reivindicaciones 54–60, caracterizada porque una muestra inmovilizada comprende el material de menos de 1000 células.
62. Plataforma analítica de acuerdo con una de las reivindicaciones 54–61, caracterizada porque los analitos presentes en una muestra inmovilizada están en forma nativa o desnaturalizada.
- 35 63. Plataforma analítica de acuerdo con una de las reivindicaciones 54–61, caracterizada porque los analitos contenidos en las muestras inmovilizadas están en forma desnaturalizada después del tratamiento con urea, estando los epítomos de dichos analitos libremente accesibles para la unión a sus correspondientes sustancias de detección.
- 40 64. Plataforma analítica de acuerdo con una de las reivindicaciones 54–63, caracterizada porque diferentes muestras aplicadas se extrajeron del mismo organismo o el mismo cultivo celular.
65. Plataforma analítica de acuerdo con la reivindicación 64, caracterizada porque diferentes muestras aplicadas se extrajeron de varias posiciones del mismo organismo.
66. Plataforma analítica de acuerdo con una de las reivindicaciones 54–63, caracterizada porque diferentes muestras aplicadas se extrajeron de distintos organismos o cultivos celulares.
- 45 67. Plataforma analítica de acuerdo con una de las reivindicaciones 54–66, caracterizada porque la plataforma sensora de campo evanescente comprende una capa adhesiva a la que se aplican dichas muestras a fracciones de muestras o diluciones de estas fracciones, a fin de mejorar la capacidad adhesiva de las muestras inmovilizadas aplicadas en las áreas de medición diferenciadas.
- 50 68. Plataforma analítica de acuerdo con la reivindicación 67, caracterizada porque dicha capa adhesiva tiene un grosor de menos de 200 nm, con preferencia menos de 20 nm.

69. Plataforma analítica de acuerdo con una de las reivindicaciones 67–68, caracterizada porque dicha capa adhesiva comprende compuestos del grupo de silanos, silanos funcionalizados, epóxidos, polímeros cargados o polares, funcionalizados y mono o multicapas pasivas o funcionalizadas autoorganizadas, tioles, fosfatos de alquilo y fosfonatos de alquilo, copolímeros de bloque multifuncionales.
- 5 70. Plataforma analítica de acuerdo con una de las reivindicaciones 67–68, caracterizada porque dicha capa adhesiva comprende compuestos del grupo de ácidos organofosfóricos de la fórmula general I(A)
- Y–B–OPO₃H₂ (IA)
- o de ácidos organofosfónicos de la fórmula general I(B)
- Y–B–PO₃H₂ (IB),
- 10 y sus sales, en las que B significa un resto alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, hetarilo o hetarilalquilo, e Y hidrógeno o un grupo funcional de la serie de hidroxilo, carboxilo, amino, mono- o dialquilamino opcionalmente sustituido con alquilo inferior, tiol o un grupo ácido negativo de la serie de éster, fosfato, fosfonato, sulfato, sulfonato, maleimida, succinimidilo, epoxi o acrilato.
- 15 71. Plataforma analítica de acuerdo con una de las reivindicaciones 54–70, caracterizada porque una o más muestras inmovilizadas se mezclan con una solución de polímeros o monómeros polimerizables, eventualmente en presencia de iniciadores o de reticulantes químicos, antes de su aplicación a la plataforma sensora de campo evanescente que actúa como soporte sólido.
- 20 72. Plataforma analítica de acuerdo con la reivindicación 71, caracterizado porque dicha solución de polímeros o monómeros polimerizables o reticulantes químicos, se selecciona del grupo que comprende soluciones de polisacáridos.
- 25 73. Plataforma analítica de acuerdo con una de las reivindicaciones 71–72, caracterizada porque la mezcla de las una o más muestras inmovilizadas con una solución de polímeros o monómeros polimerizables, opcionalmente en presencia de iniciadores o de reticulantes químicos, produce la inmovilización de una estructura de red tridimensional con componentes de muestra allí incorporados que son accesibles a las sustancias de detección en la etapa posterior de una reacción de bioafinidad, sobre la plataforma sensora de campo evanescente que actúa como soporte sólido.
- 30 74. Plataforma analítica de acuerdo con la reivindicaciones 54–73, caracterizada porque una matriz comprende más de 50, con preferencia más de 500, particularmente con preferencia más de 5000, áreas de medición.
- 35 75. Plataforma analítica de acuerdo con una de las reivindicaciones 54–74, caracterizada porque las áreas de medición de una matriz se disponen en una densidad de más de 10, con preferencia de más de 100, particularmente con preferencia de más de 1000, áreas de medición por centímetro cuadrado.
- 40 76. Plataforma analítica de acuerdo con una de las reivindicaciones 54–75, caracterizada porque una multiplicidad de matrices de áreas de medición estén dispuestas sobre la plataforma sensora de campo evanescente que actúa como soporte sólido.
- 45 77. Plataforma analítica de acuerdo con la reivindicación 76, caracterizada porque al menos 5, con preferencia al menos 50, matrices de áreas de medición estén dispuestas sobre la plataforma sensora de campo evanescente que actúa como soporte sólido.
- 50 78. Plataforma analítica de acuerdo con una de las reivindicaciones 54–77, caracterizada porque están aplicadas áreas entre las áreas de medición diferenciadas entre las áreas de medición separadas espacialmente respecto de los analitos y otros ingredientes de las muestras inmovilizadas aplicadas, así como respecto de componentes que no se unen con las sustancias de detección para dichos analitos.
79. Plataforma analítica de acuerdo con la reivindicación 78, caracterizada porque estos componentes que no se unen se seleccionan de los grupos formados por albúminas, en particular albúmina sérica bovina o albúmina sérica humana, caseína, anticuerpos policlonales o monoclonales, inespecíficos, de especies extrañas o anticuerpos empíricamente inespecíficos para los analitos a detectar, detergentes, ADN natural o sintético fragmentado que no hibride con los polinucleótidos a analizar, o también polímeros no cargados pero hidrófilos.
80. Plataforma analítica de acuerdo con una de las reivindicaciones 54–79, caracterizada porque los analitos a detectar y contenidos en las muestras inmovilizadas aplicadas en las áreas de medición diferenciadas son compuestos del grupo formado por proteínas y ácidos nucleicos.
81. Plataforma analítica de acuerdo con una de las reivindicaciones 54–79, caracterizada porque los analitos a detectar y contenidos en las muestras inmovilizadas aplicadas en las áreas de medición diferenciadas son compuestos del grupo formado por proteínas citosólicas o celulares unidas a membrana, en particular proteínas involucradas en los procesos de transducción de señales en las células.

- 5 82. Plataforma analítica de acuerdo con una de las reivindicaciones 54–81, caracterizada porque la plataforma sensora de campo evanescente comprende una capa fina de metal, eventualmente sobre una capa intermedia dispuesta debajo de esta y que tiene un índice de refracción de con preferencia $< 1,5$, como por ejemplo dióxido de silicio o fluoruro de magnesio en el que el grosor de dicha capa de metal y de la eventual capa intermedia se selecciona de manera que un plasmón superficial se pueda excitar a la longitud de onda de una luz de excitación incidente y/o a la longitud de onda de una luminiscencia generada.
83. Plataforma analítica de acuerdo con la reivindicación 82, caracterizada porque el metal se selecciona del grupo que comprende oro y plata.
- 10 84. Plataforma analítica de acuerdo con la reivindicación 82, caracterizada porque la capa de metal tiene un grosor de entre 10 nm y 1000 nm, con preferencia entre 30 nm y 200 nm.
85. Plataforma analítica de acuerdo con una de las reivindicaciones 54–84, caracterizada porque la plataforma sensora de campo evanescente que actúa como soporte sólido comprende una guía de onda óptica que comprende una o más capas.
- 15 86. Plataforma analítica de acuerdo con la reivindicación 85, caracterizada porque la plataforma sensora de campo evanescente que actúa como soporte sólido comprende una guía de onda óptica plana que es continua o dividida en áreas conductoras de la onda diferenciadas y comprende una o más capas.
- 20 87. Plataforma analítica de acuerdo con la reivindicación 86, caracterizada porque la plataforma sensora de campo evanescente que actúa como soporte sólido comprende una guía de onda óptica de película fina plana que tiene una capa conductora de la onda esencialmente ópticamente transparente sobre una segunda capa también esencialmente ópticamente transparente (b) con un índice de refracción inferior que la capa conductora de la onda y eventualmente también una capa intermedia esencialmente ópticamente transparente entre la capa conductora de la onda y la segunda capa, también con un índice de refracción inferior que la capa conductora de la onda.
- 25 88. Plataforma analítica de acuerdo con una de las reivindicaciones 54–87, caracterizada porque una capa conductora de la onda de la plataforma sensora de campo evanescente está en contacto óptico con uno o más elementos de acoplamiento óptico que permiten que la luz de excitación de una o más fuentes luminosas se acoplen en dicha capa conductora de la onda, estando seleccionados dichos elementos de acoplamiento óptico del grupo de acopladores de prismas, acopladores evanescentes con guías de onda óptica unidas con campos evanescentes superpuestos, acopladores de superficies frontales con lentes de enfoque, con preferencia lentes cilíndricas, dispuestas antes de una cara frontal de dicha capa conductora de la onda de la plataforma sensora de campo evanescente, y acopladores de rejilla.
- 30 89. Plataforma analítica de acuerdo con la reivindicación 88, caracterizada porque una o más estructuras de rejilla que permiten que la luz de excitación de una o más fuentes luminosas se acoplen están diseñadas en una capa conductora de la onda de la plataforma sensora de campo evanescente para el acoplamiento.
- 35 90. Plataforma analítica de acuerdo con una de las reivindicaciones 54–88, caracterizada con un período y están estampadas en una capa conductora de la onda de la plataforma sensora de campo evanescente y una o varias estructuras de rejilla para el desacoplamiento con el mismo o distinto periodo de rejilla y profundidad de rejilla que las estructuras de rejilla por el acoplamiento que permiten que se acople la luz guiada en dicha capa conductora de la onda.
- 40 91. Uso de un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1–53 o de una plataforma analítica de acuerdo con una de las reivindicaciones 54–90 para el análisis cuantitativo y/o cualitativo para determinar analitos químicos, bioquímicos o biológicos en procedimientos de rastreo en investigación farmacológica, química combinatoria, desarrollo clínico y preclínico, para estudios de unión en tiempo real y para determinar parámetros cinéticos en el análisis de afinidad y en investigación, para determinaciones cualitativas y cuantitativas, y para detectar anticuerpos, antígenos, patógenos o bacterias en la investigación y desarrollo de productos farmacéuticos,
- 45 diagnóstico humano y veterinario, investigación y desarrollo de productos agroquímicos, diagnóstico de plantas sintomático y presintomático, para estratificación de pacientes en el desarrollo de productos farmacéuticos y para la selección de medicamentos terapéuticos, para la detección de patógenos, sustancias nocivas y agentes causantes en análisis de productos alimenticios y análisis ambiental.

Fig. 1:

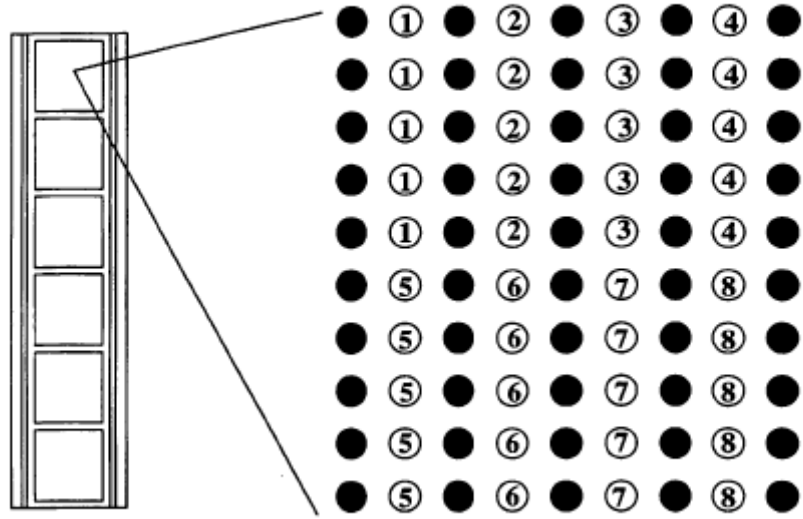


Fig. 2:

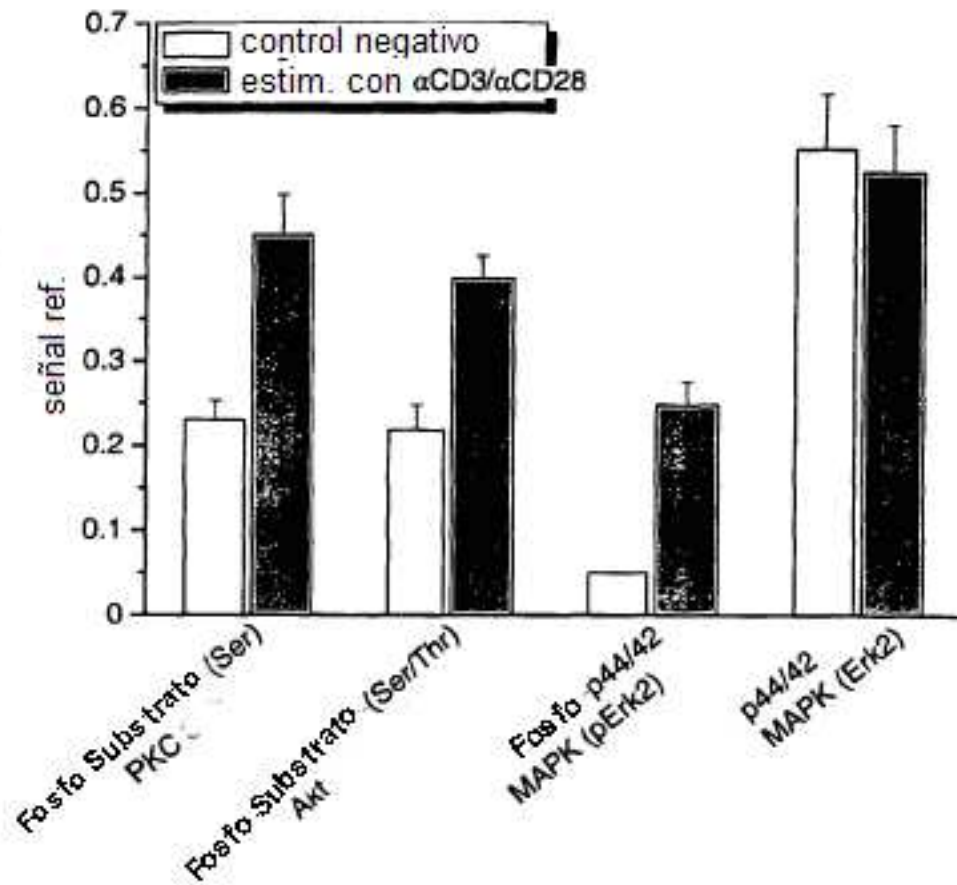


Fig. 3A:

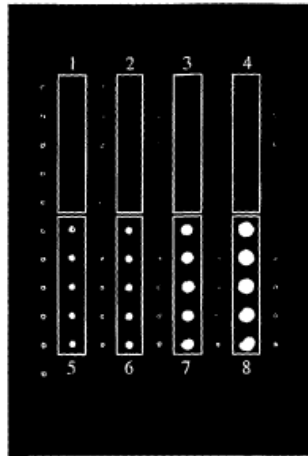


Fig. 3B:

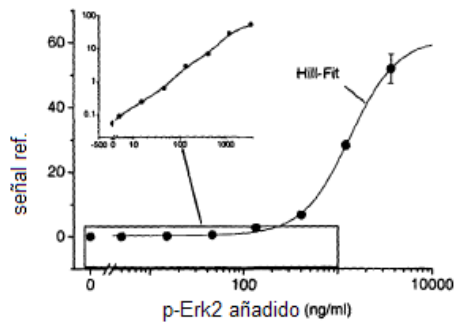


Fig. 4A:

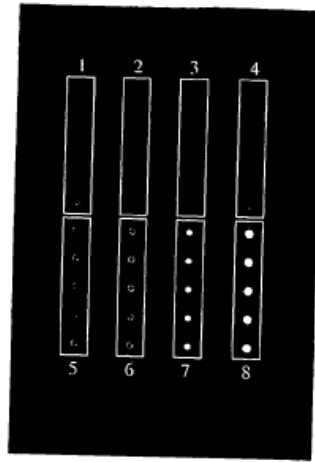


Fig. 4B

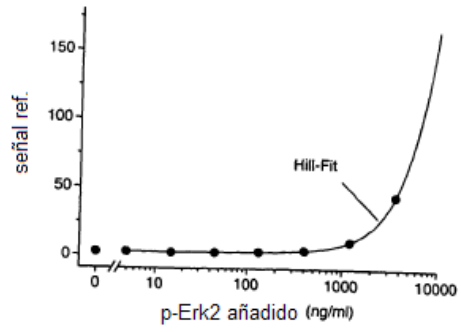


Fig. 5A

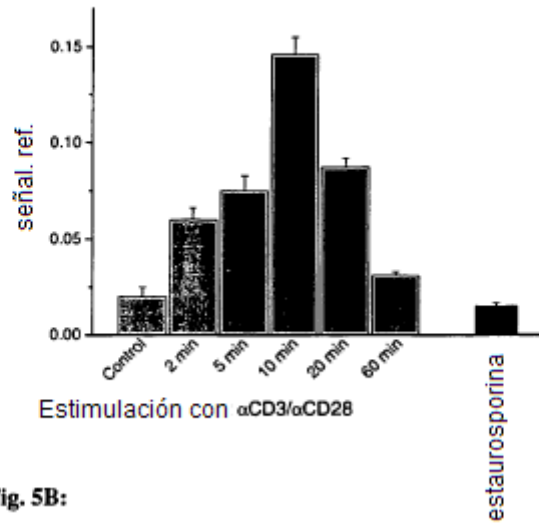


Fig. 5B:

