

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
19 de Junio de 2008 (19.06.2008)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2008/071816 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
G01N 35/00 (2006.01) **G01N 33/543** (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2007/000717

(22) Fecha de presentación internacional:
11 de Diciembre de 2007 (11.12.2007)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200603210
11 de Diciembre de 2006 (11.12.2006) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
[ES/ES]; CTT-Edif I1 y I2, Camino de Vera, E-46022 Valencia (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **BAÑULS POLO, María José** [ES/ES]; Universidad Politécnica de Valencia, CTT-Edif. 6G, Camino de Vera, E-46022 Valencia (ES). **LLORENTE SAEZ, Roberto** [ES/ES]; Universidad Politécnica de Valencia, CTT-Edif 6G, Camino de Vera, E-46022 Valencia (ES). **MAQUEIRA CATALA, Angel** [ES/ES]; Universidad Politécnica de Valencia, CTT-Edif. 6G, Camino de Vera, E-46022 Valencia (ES). **MARTI SENDRA, Javier** [ES/ES]; Universidad Politécnica de Valencia, CTT-Edif. 6G, Camino de Vera, E-46022 Valencia (ES). **MIRA SALVADOR,**

David [ES/ES]; Universidad Politécnica de Valencia, CTT-Edif. 6G, Camino de Vera, E-46022 Valencia (ES). **PUCHADES PLA, Rosa** [ES/ES]; Universidad Politécnica de Valencia, CTT-Edif. 6G, Camino de Vera, E-46022 Valencia (ES).

(74) Mandatario: **DURAN ORTEGA, Sila**; Universidad Politécnica de Valencia, CTT-Edif. 6G, Camino de Vera, E-46022 Valencia (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe

(54) Title: INTEGRATED SYSTEM, METHOD AND DISK FOR STORING DATA FOR THE CHEMICAL ANALYSIS OF SAMPLES AND FOR THE DETECTION AND STORAGE OF THE ANALYTICAL RESULTS

(54) Título: SISTEMA INTEGRADO, PROCEDIMIENTO Y DISCO DE ALMACENAMIENTO DE DATOS PARA ANALISIS QUIMICOS DE MUESTRAS Y PARA DETECTAR A ALMACENAR LOS RESULTADOS ANALITICOS

(57) Abstract: The invention relates to an integrated system (100) for chemically analysing samples and detecting and storing the results of the analyses, comprising: (a) a data storage disk recorder (102) for recording on a recording side (107) of a storage disk (106); and (b) an excitation source (108) for irradiating the assay side (105) of a disk in the recording position. The invention is characterised in that the system includes a camera (104, 408, 514) and, when a disk is in the recording position (107) and a mixture (405) of the sample and a fluorescence-varying substance is provided on the assay side (105, 208), the camera is used to control the appearance of fluorescence signals (110, 510) and to capture said signals in order to convert same into digital signals (518).

(57) Resumen: Esta invención concierne un sistema integrado (100) para analizar químicamente muestras, detectar y almacenar el resultado del análisis, que comprende: a. un grabador (102) de discos de almacenamiento de datos para grabar una cara de grabación (107) de un disco de almacenamiento (106), b. una fuente de excitación (108) para irradiar una cara de ensayo (105) de un disco en posición de ser grabado, caracterizado porque comprende una cámara (104, 408, 514) para, cuando un disco está en posición de grabación (107) y cuando se realiza en la cara de ensayo (105, 208) del disco una mezcla (405) entre la muestra y una sustancia que hace variar la fluorescencia, controlar la aparición de señales de fluorescencia (110, 510) y captarlas para convertirlas en datos digitales (518).



WO 2008/071816 A2

Sistema integrado, procedimiento y disco de almacenamiento de datos para análisis químico de muestras y para detectar y almacenar los resultados analíticos.

5

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a un sistema integrado, procedimiento y disco de almacenamiento de datos para analizar al menos una muestra y para detectar y almacenar el resultado del análisis.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La tecnología de micromatrices ('microarrays') basada en la interacción receptor-analito, está reemplazando a los ensayos tradicionales que utilizan geles, filtros y columnas, por chips de vidrio capaces de almacenar por ejemplo decenas de miles de sondas (secuencias de ácidos nucleicos) o proteínas, que proporcionan por ejemplo información sobre los niveles de expresión génica, síntesis de proteína o polimorfismos de nucleótido único ('single nucleotide polymorphisms o SNPs').

20

Las superficies empleadas para micromatrices deben ser, preferentemente, planas y uniformes, de modo que permitan el anclaje de un elevado número (e.g., centenares o miles) de moléculas (por ejemplo sondas o proteínas) espacialmente dispuestas.

25

Debido a su transparencia óptica, baja autofluorescencia, estabilidad térmica, propiedades químicas y precio, el vidrio ha sido históricamente el material de referencia empleado como soporte en esta tecnología.

30

No obstante, el gran interés en el estudio de nuevos soportes y el gran mercado que existe en esta área de trabajo, han conducido a la búsqueda de nuevos materiales alternativos. De todos ellos, los materiales poliméricos sintéticos presentan propiedades químicas y mecánicas muy atractivas, buen
5 precio, alta flexibilidad y biocompatibilidad, y buenas propiedades ópticas, así como una fácil fabricación. Además, pueden utilizarse como soportes activos ya que pueden incorporar el tratamiento de la muestra y la detección de los resultados. Por todo ello, los materiales poliméricos se han convertido en una alternativa al vidrio para el desarrollo de ensayos basados en micromatrices.

10

Los discos compactos de audio/video (CDs) constituyen una prometedora plataforma para la construcción de este tipo de dispositivos. Un CD estándar se compone de una base de policarbonato donde se imprime la información, recubierta de una capa metálica de aluminio, níquel, oro o plata, o
15 bien de una capa de un colorante fotoreactivo, protegida por una capa de un polímero acrílico como por ejemplo: polimetacrilato de metilo.

20

Entre las ventajas que presentan los CDs como soportes para micromatrices destacan la gran superficie disponible, una baja fluorescencia de fondo, la fabricación con materiales de alta calidad óptica y mecánica, su bajo
precio y fácil manipulación. Asimismo, dichos soportes permiten la organización espacial cuadrática, circular o espiral de las sondas y proteínas impresas, ofreciendo información numérica para identificar cada punto, existiendo la
posibilidad de utilizar una de las caras del CD para la realización de los ensayos
25 bioquímicos y su detección, y la contraria para grabar la información, leyendo en todos los casos los resultados mediante lectores de CDs modificados (ver el documento US 6.395.562).

30

Un grupo de investigadores, encabezado por J. Remacle, ha venido efectuando desarrollos para micromatrices sobre discos compactos para

ordenadores. Un procedimiento de detección propuesto por estos investigadores emplea el propio láser del lector de CDs para efectuar el barrido de la superficie, a una sola longitud de onda.

- 5 La solicitud de patente europea EP 1 324 042 A2, siendo uno de sus inventores José Remacle, divulga un método para detectar y/o cuantificar una determinada molécula al juntarla con una molécula de captura fijada en la superficie del disco. Este método se adapta para la utilización de un disco CD estándar y se pueden efectuar etapas de lectura o de grabación en un lado del
- 10 disco y de lectura biológica y/o de detección en la otra cara del disco. Se puede medir en el método propuesto señales de fluorescencia.

- Este método sin embargo utiliza costosos y complicados medios de detección de las señales de detección y/o de cuantificación que provienen de la
- 15 unión de una molécula presente en una muestra con una molécula de captura en la cara del disco

- Es pues objetivo de la presente invención el resolver el problema que consiste en capturar los resultados analíticos realizados en una cara de un disco
- 20 de almacenamiento de datos y obtener su transposición en datos digitales para su posterior procesamiento y/o grabado en la otra cara del disco, de forma económica y sencilla.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- 25 Según esta invención, esto se consigue con un sistema integrado para análisis de muestras y para detectar y almacenar los resultados obtenidos, que comprende:

- a. un grabador de discos de almacenamiento de datos para grabar una cara de grabación de un disco de almacenamiento que esté en posición de

grabación

b. una fuente de excitación para irradiar la cara opuesta, llamada cara de ensayo, de un disco en posición de ser grabado por el grabador,

caracterizado porque comprende una cámara para, cuando un disco está en posición de grabación y se mezcla en la cara de ensayo del disco una muestra y una sustancia que hace variar la fluorescencia de la mezcla en función de la composición de la muestra, controlar la aparición de señales de fluorescencia emitidas por la mezcla y, en su caso, captarlas para convertirlas en datos digitales.

10

Gracias a esta cámara, en un mismo dispositivo, preferentemente estático en relación al disco, se detectan las señales de fluorescencia, se las capta si existen y se transforman en datos digitales.

15

Esta cámara es preferiblemente una cámara CCD ('Charge Coupled Device' o dispositivo de carga acoplada), que incluyen componentes electrónicos CCD. La cámara CCD a parte de proporcionar ventajas implícitas tales como por ejemplo la adquisición simultánea de toda la superficie de análisis, una velocidad de medida importante, una sensibilidad elevada y/o un coste moderado, proporciona una versatilidad suficiente para implementar los diferentes métodos de medida desarrollados, ya sean por ejemplo estáticos, con moviendo giratorio y/o con análisis espectral.

20

Un disco utilizado puede ser cualquier disco de un estándar comercial (como por ejemplo un CD ('compact Disc' o disco compacto) o un DVD ('Digital Versatile Disc' o 'Digital Video Disc')) o no, que se pueda grabar en una grabadora que preferiblemente utilice un cabezal láser para grabar.

25

Gracias a esta invención, se combina dos ventajas de los discos de almacenamiento de datos: además de ser soportes sobre los que se efectúan ensayos químicos, pueden utilizarse para grabar y leer información.

5 Gracias a esta invención, puede preferiblemente integrarse un lector/grabador de CD/DVD con el sistema de detección basado en cámara CCD capaz de monitorizar el desarrollo de ensayos químicos y almacenar los resultados analíticos utilizando discos compactos estándar gravables.

10 Se obtiene pues un sistema integrado relativamente sencillo y de coste menor a los sistemas utilizados en los antecedentes de la invención.

Según una realización, la sustancia contiene al menos un fluoróforo.

15 En una realización, el sistema integrado comprende una unidad de control de la fuente de excitación para hacer variar la periodicidad de la intensidad de la radiación emitida por la fuente de excitación, de acuerdo con las características fotoquímicas de la sustancia.

20 Gracias a esta realización, se pueden utilizar fuentes de excitación pulsadas para el análisis del tiempo de vida de la fluorescencia. Preferentemente, además, se utilizan dichas fuentes de excitación pulsadas para la mejora de la relación señal a ruido de las medidas de potencia de emisión.

25 Preferiblemente, se mejora la excitación de la fluorescencia mediante la sincronización de la fuente de excitación con el tiempo de vida de emisión del compuesto óptimamente activo, por ejemplo un fluoróforo, incluido en la sustancia, para tiempos de exposición relativamente largos, de forma que se reduce la señal de fondo obtenida en la captura.

Por ejemplo, la fuente de excitación es conmutada de encendido a apagado y el tiempo a nivel bajo es aproximadamente igual al tiempo de vida del fluoróforo utilizado.

- 5 De esta forma se reduce el efecto de saturación luminosa y se reduce el ruido de fondo.

Según una realización, la frecuencia de captura de la cámara es calculada según un número predeterminado de mezclas redundantes que se pueden
10 disponer angularmente en la cara de ensayo del disco para obtener un valor medio de las señales de fluorescencia emitidas por cada mezcla redundante.

Gracias a esta realización, la medida realizada interpreta el conjunto de mezclas como una sola dando como resultado el valor medio de las mismas: por
15 tanto la probabilidad de falso positivo se reduce de manera inversamente proporcional al número de muestras redundantes.

En una realización, la fuente de excitación es al menos una matriz de diodos emisores de luz.
20

Según una realización, comprendiendo el grabador un láser para grabar y siendo el disco al menos parcialmente transparente a la radiación del láser, la fuente de excitación es al menos el láser del grabador.

- 25 En una realización, la frecuencia de captura de la cámara se sincroniza con la velocidad de giro del disco en el grabador.

Según una realización, el sistema integrado comprende un dispositivo de difracción entre la cara de ensayo de un disco cuando este último esta en posición
30 de grabación y la cámara, para separar las diferentes longitudes de onda de la

posible señal de fluorescencia emitida desde la cara de ensayo a la cámara.

Gracias a esta realización, se pueden obtener los componentes espectrales de la fluorescencia producida por diferentes muestras de forma simultánea, aprovechando la estructura bi-dimensional de las matrices CCD.

En una realización, comprendiendo la cámara al menos un captor óptico para detectar señales de fluorescencia, el sistema integrado comprende una caja opaca a la radiación luminosa que aísla de las radiaciones luminosas exteriores el espacio comprendido entre la cara de ensayo de un disco cuando este último esta en posición de grabación y el captor óptico.

Esta realización, que comprende una caja opaca también llamada caja negra, que aísla de la radiación exterior, permite el funcionamiento óptimo y reproducible del sistema integrado.

Según una realización, la cámara que trasforma estas señales fluorescentes en unos datos digitales tiene una capacidad de detectar señales fluorescentes con longitudes de onda de emisión comprendidas entre 380nm y 850nm.

En una realización, el sistema integrado comprende un cabezal de impresión de sondas para depositar microgotas en la cara de ensayo del disco.

Gracias a esta realización, se pueden depositar muestras de forma precisa en la cara de ensayo del disco.

Según otro aspecto de la invención, esta invención concierne a un procedimiento para analizar al menos una muestra y para detectar y almacenar al menos un resultado del análisis, que comprende las siguientes etapas:

a. colocar un disco de almacenamiento de datos en un grabador de

datos en discos, de manera que el grabador pueda grabar en una cara de grabación del disco,

b. depositar al menos una muestra que se quiere analizar en la otra cara del disco, llamada cara de ensayo, que contiene al menos una sustancia susceptible de reaccionar con la muestra en función de su composición,

c. irradiar con una fuente de excitación la cara de ensayo,

d. con el grabador, grabar en la cara de grabación del disco datos ligados al análisis de la muestra.

caracterizado porque una cámara capta la emisión de señales de fluorescencia provenientes de la cara de ensayo y transforma estas señales en unos datos digitales a partir de los cuales se obtienen, por lo menos en parte, los datos ligados al análisis de la muestra que el grabador graba en la cara de grabación del disco.

En una realización de la invención, se adapta la intensidad de la fuente de excitación a las características fotoquímicas de la sustancia.

Según una realización de la invención, los diferentes puntos que forman el ensayo previsto se distribuyen linealmente sobre una dirección radial del disco, y se depositan muestras iguales de forma redundante en diferentes posiciones angulares equidistantes, de manera que, a una distancia radial dada, se obtienen un número de repeticiones angularmente distribuidas de un mismo resultado y se multiplica la frecuencia de captura de la cámara por el número de muestras reiteradas.

25

En una realización, se utiliza una realización de un sistema integrado conforme a la invención para, cuando un disco de almacenamiento de datos está en la posición de grabación, analizar al menos una muestra en la cara de ensayo del disco, detectar al menos un resultado de dicho análisis controlando gracias a la cámara la existencia de señales fluorescentes provenientes de la cara de ensayo

30

y, proporcionando dicha cámara datos digitales según el resultado, almacenar al menos dichos datos digitales o el resultado de un procesamiento de dichos datos en la cara de grabación del disco, grabando está última.

- 5 Según otro aspecto de la invención, esta invención concierne a un disco de almacenamiento de datos, caracterizado porque esta especialmente concebido para cooperar con una cualquiera de las realizaciones de un sistema integrado conforme a la invención, de manera que se pueda poner en práctica una cualquiera de las realizaciones de un procedimiento conforme a la invención.

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características del invento, de acuerdo con un ejemplo de realización preferente y práctica del mismo, se acompaña, como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

- La figura 1a.- Muestra una representación esquemática de una realización de un sistema integrado conforme a la invención.

La figura 2.- Muestra una representación esquemática de un sistema de impresión de sondas en una realización de la invención.

La figura 3.- Muestra un diagrama esquemático de curvas de intensidad de señales de excitación y de emisión en una realización de la invención.

- La figura 4.- Muestra una representación esquemática de una realización de la invención.

La figura 5.- Muestra una representación esquemática de una realización de la invención.

DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES DE LA INVENCION

En esta descripción y en las reivindicaciones se considera que:

- 5 - un disco es todo soporte de datos digitales que se lee por medio de un cabezal láser cuando el disco rota sobre su eje. Los discos comprenden entre otros los discos realizados con las normas CD, mini-CD o DVD; pueden ser discos compactos comerciales o no, como, por ejemplo, discos compactos parcialmente transparentes al láser de un lector/grabador de discos CDs (longitud de onda $\lambda=780\text{nm}$) que permite al lector leer o
10 grabar el disco, así como el procesamiento de la información almacenada y también el almacenamiento (grabación digital de datos) del resultado analítico obtenido por el dispositivo CCD
- 15 - una cámara CCD es un dispositivo de captación de por lo menos una característica óptica (por ejemplo la fluorescencia) que contiene un componente CCD ('Charge Coupled Device' o dispositivo de carga acoplada) para transformar lo captado en datos digitales.

En la figura 1, se puede observar una representación esquemática de un sistema integrado 100 conforme a una realización de la invención.

20

El sistema integrado 100 se compone de un módulo lector / grabador de CD/DVD 102 sobre el cual se dispone una cámara CCD 104, llamada también detector CCD, bidimensional ($N \times M$ celdas), con los elementos auxiliares necesarios para la captura de señales de fluorescencia 110 producidas en una cara
25 de ensayo 105 de un disco CD 106 compacto a consecuencia de ensayos químicos realizados sobre esa cara de ensayo 105 y de su excitación por una fuente de radiación o de excitación.

Dicha fuente de excitación debe proporcionar una intensidad de radiación
30 en el margen de longitudes de onda adecuadas para la excitación del fluoróforo

utilizado. A este respecto, es factible la utilización de diodos emisores de luz (LED), luz coherente Láser, o cualquier otra fuente óptica que pueda funcionar en el margen espectral exigido.

- 5 Dicha fuente de excitación, en esta realización, comprende dos matrices de LEDs 108, buscando la máxima simplicidad del diseño y bajo coste.

El disco 106 está en posición para ser grabado por el grabador 102 en su cara de grabación 107.

10

El sistema integrado 100 es un sistema compacto de análisis, almacenamiento y conservación de muestras y resultados, todo ello realizado sobre un mismo soporte (el disco CD 106). Además, este sistema integrado 100 puede también almacenar en el disco CD 106 la información administrativa
15 relacionada con los resultados obtenidos en la analítica.

El modo de operar del sistema integrado 100 comprende la etapa de explorar muestras depositadas sobre la cara de ensayo 105 del disco CD 106.

- 20 En alguna realización, el disco de almacenamiento de datos utilizado podría ser, en vez de un disco CD compacto, un DVD, un disco magneto-óptico o cualquier soporte similar disponible.

- En alguna realización, la cara de ensayo del disco de almacenamiento de
25 datos es tratada químicamente por diversas vías, de modo que o bien queda adaptada para el anclaje covalente de secuencias de, por ejemplo, ácidos nucleicos o proteínas, o bien se deposita directamente un polímero diferente (por ejemplo poliestireno, nylon o acetato de celulosa) sobre el que a su vez se fija, por ejemplo, avidina, proteína A, ovoalbumina biotinilada, lectinas u otras
30 sustancias con características similares.

En la realización representada esquemáticamente en la figura 1, la fluorescencia es activada de manera precisa por la conmutación temporal de la excitación, de acuerdo con las características fotoquímicas del fluoróforo
5 utilizado, lo cual permite una mejora de la sensibilidad del análisis. Esta conmutación temporal se realiza mediante una unidad de control 118 que hace variar la intensidad de la radiación producida por las matrices de LEDs 108.

La información del análisis es extraída y almacenada en el propio soporte
10 (disco compacto 106), de manera compatible con los formatos utilizados por programas informáticos (software) comerciales, desarrollados para el tratamiento de datos obtenidos en ensayos basados en técnicas de micromatrices (microarraying).

15 En la figura 1, se puede observar que la zona central del sistema integrado 100 está aislada de la iluminación parásita exterior por medio de una caja negra 116.

El sistema integrado 100 comprende una red de difracción 112 ('grating')
20 y el conjunto de lentes de enfoque y colimadores que permiten implementar el esquema estándar de un espectrómetro utilizando como detector el CCD de la cámara. La estructura esta diseñada para separar simultáneamente los componentes espectrales 110 de, por ejemplo, 8 muestras que han sido depositadas sobre la superficie del CD siguiendo un patrón lineal a lo largo del
25 radio del mismo. De forma que el eje vertical de la imagen obtenida en el CCD se divide entre las 8 muestras, y en eje horizontal se representan los componentes espectrales de cada una de ellas.

El sistema desarrollado puede poner en práctica un procedimiento según
30 una realización de la invención para, por ejemplo, desarrollar el proceso

completo de lectura de resultados de ensayos con muestras provenientes de estudios proteómicos, genómicos o cualquier otro basado en la disposición espacial controlada de receptores químicos específicos.

5 Una realización de un procedimiento conforme a la invención que utilice el sistema integrado 100 comprende las siguientes etapas:

- Etapa A: La deposición (siguiendo patrones de micromatrices o cualquier otra distribución que pueda resultar interesante) de una serie de muestras sobre una superficie polimérica (en adelante soporte), generalmente policarbonato (PC), polimetacrilato de metilo (PMMA), poliestireno (PS) u oro,
10 en esta realización, la cara 105 de ensayo

- Etapa B: la detección de los resultados de los ensayos químicos desarrollados en la superficie del soporte, obtenidos mediante métodos ópticos y

- Etapa C: el procesado y almacenamiento de resultados junto, con la
15 información administrativa en formato digital sobre el mismo sustrato de análisis, en su cara opuesta de grabación 107.

La figura 2 muestra un sistema de impresión de sondas en una cara de ensayo 208 de un disco de almacenamiento de datos 206 en una realización de la invención y, más precisamente, un cabezal de impresión de sondas 200, parte del
20 sistema 100 de la figura 1, que interviene, en esta realización, en la etapa A del procedimiento según esta realización de la invención. La distribución de las sondas sobre la superficie de análisis se realiza depositando micro-gotas 202 (diámetro de entre 20 y 500 μm), siguiendo patrones regulares predefinidos,
25 normalmente matrices 204. Para ello, preferentemente, se utiliza un cabezal de impresión piezoeléctrico que facilita y optimiza el proceso gracias a la gran versatilidad para variar el tamaño y la distribución de las matrices utilizadas.

No obstante, la deposición de sondas se puede efectuar mediante otros
30 sistemas de micro-impresión, manuales o automáticos. Junto con estos patrones,

se marca la superficie con estructuras de referencia a fin de localizar unívocamente las distintas sondas depositadas. El proceso permite el análisis de un gran número de muestras en un espacio muy reducido.

5 En la etapa B del procedimiento según esta realización de la invención, la extensión de la reacción entre las sondas inmovilizadas y las especies a identificar es evaluada cuantificando la fluorescencia de los marcadores presentes sobre la superficie de reacción una vez finalizado el ensayo. Los marcadores utilizados pueden ser los utilizados normalmente en este tipo de ensayos (por
10 ejemplo Cy5 o fluoresceína) pero la versatilidad de el sistema integrado 100 (ver figura 1) permite ajustarlo para la utilización de otros compuestos luminiscentes que se activan en el Ultra-violeta o Violeta como, por ejemplo, nanopartículas de óxidos y otros compuestos de tierras raras.

15 Esta cuantificación de la fluorescencia de los marcadores presentes sobre la superficie de reacción una vez finalizado el ensayo se realiza mediante una cámara CDD, es decir un mecanismo detector basado en matrices CCD de alta sensibilidad que mide la intensidad de radiación por unidad de superficie (W/cm²).
20

Las señales de fluorescencia son producidas, en una realización, por un marcador fluorescente, cuando el fluoróforo es excitado con una radiación incidente cuya potencia media es constante y uniforme a lo largo de la superficie analizada.

25

En esta realización, como método de reducción del ruido de fondo y por tanto mejora de la relación señal a ruido (S/N) de las muestras, en lugar de mantener una iluminación continua de la muestra durante el periodo de adquisición de señales de la cámara CCD, la fuente de iluminación (en este caso
30 LEDs) es conmutada de encendido a apagado modulando la corriente de

alimentación de los mismos con una señal cuadrada con un ciclo de trabajo variable entre el 50-100% cuyo tiempo a nivel bajo es aproximadamente igual al tiempo de vida del fluoróforo utilizado.

5 De esta forma, también se reduce el efecto de fotodegradación ('photobleaching') que se produce para tiempos de exposición largos, disminuyendo la degradación de las muestras. De esta manera, se conjuga las ventajas de una fuente de iluminación continua estándar con los beneficios de un láser pulsado.

10

Este efecto se muestra en la figura 3, que es un diagrama 300 en el cual se representa conjuntamente la intensidad 302 de una señal de conmutación de la fuente de excitación (representativa de lo que es la señal de excitación correspondiente) y la intensidad 304 de la señal de emisión de fluorescencia. En este diagrama 300, se relaciona la intensidad luminosa (en ordenadas 306) con el tiempo (en abscisas 308). Se puede observar como estas dos señales 302 y 304 se sincronizan para reducir la saturación luminosa y mejorar la relación señal a ruido, abreviado como S/N.

15

20 En otro tipo de realizaciones (ver figura 4), se utiliza como fuente de excitación el propio cabezal láser 400 de un lector/grabador de discos CD y/o DVD, comprendido en un sistema integrado conforme a una realización de la invención.

25

En la realización representada en la figura 4, se utiliza un disco soporte CD - R (es decir, gravable) 402 especial, conforme a una realización de un disco de almacenamiento de datos conforme a la invención, con una capa reflectante más fina que la de los discos CD estándares, de forma que gran parte de la potencia del láser 401 se trasmite a través del mismo (por sus características esto no impide que el lector siga reconociéndolo y manejándolo como un CD-R).

30

Esta figura 4 es un ejemplo de utilización del láser 401 como fuente de excitación, en el cual además se introduce una red de difracción 406 para resolver en tiempo real las componentes espectrales de la muestra.

5

Esta potencia óptica que alcanza la otra cara del CD y por ejemplo una distribución radial 404 de muestras 405, puede utilizarse para excitar un fluoróforo que se excita y emite en el infrarrojo cercano, como por ejemplo el colorante denominado IRD-800 y medir la emisión producida gracias a una cámara CCD 408. También pueden medirse las variaciones que se producen en la potencia recibida planteando ensayos de absorción. En el caso de utilizar el láser para excitar la fluorescencia del marcador, la captura de la cámara 408 se sincroniza preferentemente con la velocidad de giro 403 del CD: como el disco soporte CD-R 402 tiene una velocidad de giro 403, se puede utilizar una cámara 408 sincronizada con el giro del disco soporte CD-R 402.

10
15

En una realización, para aumentar la fiabilidad del resultado, cada muestra 405 se deposita de forma redundante en diferentes posiciones angulares equidistantes dentro de una misma distancia radial y se multiplica la frecuencia de captura de la cámara 408 por el número de muestras 405 reiteradas. De esta forma, la medida realizada interpreta estas muestras 405 como una sola dando como resultado el valor medio de las mismas: por lo tanto la probabilidad de falso positivo se reduce de manera inversamente proporcional al número de muestras redundantes.

20
25

Para aumentar la capacidad de análisis del sistema, se sitúa la red de difracción 406 en el camino de la luz emitida/reflejada en la superficie del CD, consiguiendo que las diferentes longitudes de onda se separen en la dirección horizontal del CCD (siendo la dirección vertical equivalente a la radial del disco CD 402, ver Figura 4).

30

De esta forma, en el eje x de la imagen se obtiene una representación en el espectro para cada punto del eje y (ver Figura 4), esto permite analizar simultáneamente una muestra marcada con diferentes fluoróforos.

5

Preferentemente, se elige un conjunto de fluoróforos que se exciten a una longitud de onda muy próxima y que emitan en diferentes zonas del espectro, como es el caso de los puntos cuánticos o '*quantum dots*' 800, gracias a que poseen un ancho espectro de excitación que nos permite excitar varios
10 simultáneamente con una fuente de luz relativamente estrecha en ancho de banda que fácilmente podremos filtrar en recepción.

También, en una realización, se puede obtener la respuesta espectral en reflexión de las muestras analizadas. En este caso, se utiliza una luz blanca como
15 fuente de iluminación.

Cabe destacar que el esquema de detección propuesto permite ajustar el sistema para trabajar con cualquier fluoróforo cuya longitud de onda de emisión quede dentro del margen de funcionamiento especificado para el detector CCD
20 (aproximadamente desde 380 a 850 nm). Esto representa una gran ventaja frente a los antecedentes de la invención que, en el mejor de los casos, permiten trabajar con cuatro fluoróforos definidos.

La figura 5 muestra una realización de la invención. Un disco CD 500 gira
25 con una velocidad de rotación 502. Encima de dicho disco CD 500 hay una o varias matrices de sondas 504 que reciben radiación luminosa 516 de una matriz de LEDs 508. La fluorescencia resultante 510 pasa a través de una red de difracción 406 para ser captada por una cámara CCD de detección óptica 514 que produce una imagen 516. Tras la detección del nivel de reacción, y en su caso el
30 análisis de las componentes espectrales de la señal recibida, la información 518

resultante (volcado desde la cámara CCD de cuentas/fotones por píxel, de las condiciones de excitación, ensayos químicos, información administrativa, etc.) es almacenada en el mismo soporte en 520. Este almacenamiento se produce por grabación mediante un grabador de datos digitales en discos compactos y
5 especialmente gracias a su cabezal 522 que emite una radiación laser 524.

La captura de las imágenes puede realizarse a diferentes escalas/resoluciones en función de la densidad espacial de las sondas, pudiendo leer áreas desde 25mm de lado hasta la superficie completa de un disco de
10 dimensiones estándar ($\varnothing=120\text{mm}$).

En esta realización, el resultado es almacenado junto al protocolo de análisis y la información administrativa que se estime necesaria (por ejemplo y sin que la lista sea limitativa: fecha, hora, procedencia de las muestras, fluoróforo
15 utilizado, y/o potencia de excitación).

Ventajosamente, el almacenamiento se realiza en formato digital sobre el mismo soporte en el que se han efectuado los ensayos químicos. Este modo de manejar la información permite su almacenamiento de forma segura y
20 económica, evitando cruces de datos y facilitando posteriores comprobaciones.

REIVINDICACIONES

1. Sistema integrado (100) para análisis de muestras y para detectar y almacenar los resultados obtenidos, que comprende:

- 5 a. un grabador (102) de discos de almacenamiento de datos para grabar una cara de grabación (107) de un disco de almacenamiento (106, 206, 402, 500) cuando está en posición de grabación,
- b. una fuente de excitación (108, 401, 508) para irradiar la cara opuesta, llamada cara de ensayo (105, 208), de un disco en posición de ser
- 10 grabado por el grabador,

caracterizado porque comprende una cámara (104, 408, 514) para, cuando un disco está en posición de grabación (107) y cuando se mezcla (405) en la cara de ensayo (105, 208) del disco una muestra que se quiere analizar y una sustancia que hace variar la fluorescencia de la mezcla en función de la

15 composición de la muestra, controlar la aparición de señales de fluorescencia (110, 510) emitidas por la mezcla y, en su caso, captarlas para convertirlas en datos digitales (518).

2. Sistema integrado según la reivindicación 1, caracterizado porque

20 la sustancia contiene al menos un fluoróforo.

3. Sistema integrado según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque comprende una unidad de control (118) de la fuente de excitación (108, 401, 508) para hacer variar la periodicidad de la intensidad (302) de la fuente de

25 excitación de acuerdo con las características fotoquímicas (304) de la sustancia.

4. Sistema integrado según la reivindicación 1, 2 o 3, caracterizado porque la frecuencia de captura de la cámara (104, 408, 514) es calculada según un número predeterminado de mezclas redundantes que se pueden disponer

30 angularmente en la cara de ensayo (105, 208) del disco para obtener un valor

medio de las señales de fluorescencia (110, 510) emitidas por cada mezcla (405) redundante.

5 5. Sistema integrado según la reivindicación 1, 2, 3 o 4, caracterizado porque la fuente de excitación (108, 508) es al menos una matriz de diodos (108, 508) emisores de luz.

10 6. Sistema integrado según la reivindicación 1, 2, 3, 4 o 5, caracterizado porque, comprendiendo el grabador un láser (401) para grabar y siendo el disco (402) al menos parcialmente transparente a la radiación del láser (401), la fuente de excitación (401) es al menos el láser del grabador (401).

15 7. Sistema integrado según la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5 o 6, caracterizado porque la frecuencia de captura de la cámara se sincroniza con la velocidad de giro del disco en el grabador.

20 8. Sistema integrado según la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7, caracterizado porque comprende un dispositivo de difracción (112, 406) entre la cara de ensayo (105, 208) de un disco (106, 402, 500) cuando este último está en posición de grabación y la cámara (104, 408, 514), para separar las diferentes longitudes de onda de la posible señal de fluorescencia (110, 510) emitida desde la cara de ensayo a la cámara.

25 9. Sistema integrado según la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ó 8, caracterizado porque, comprendiendo la cámara al menos un captor óptico para detectar señales de fluorescencia, comprende una caja opaca (116) a la radiación luminosa que aísla de las radiaciones luminosas exteriores el espacio comprendido entre la cara de ensayo (105) de un disco (106) cuando este último está en posición de grabación en el sistema integrado (100) y el captor óptico.

10. Sistema integrado según alguna de la reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la cámara que trasforma estas señales fluorescentes en unos datos digitales (518) tiene una capacidad de detectar señales fluorescentes (110, 510) con longitudes de onda de emisión comprendidas entre 380nm y 850nm.

5

11. Sistema integrado según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque comprende un cabezal de impresión (200) de sondas para depositar microgotas (202) en la cara de ensayo (208) del disco (206).

10

12. Procedimiento para analizar al menos una muestra y para detectar y almacenar al menos un resultado del análisis, que comprende las siguientes etapas:

15

a. colocar un disco de almacenamiento de datos (106, 206, 402, 500) en un grabador (102) de datos en discos, de manera que el grabador (102) pueda grabar en una cara de grabación (107) del disco,

20

b. depositar al menos una muestra que se quiere analizar en la otra cara del disco, llamada cara de ensayo (105, 208), que contiene al menos una sustancia susceptible de reaccionar con la muestra en función de su composición,

25

c. irradiar con una fuente de excitación (108, 401, 508) la cara de ensayo (105, 208),

d. con el grabador(102) , grabar en la cara de grabación (107) del disco (106, 206, 402, 500) datos (518) ligados al análisis de la muestra,

30

caracterizado porque una cámara (104, 408, 514) capta la emisión de señales de fluorescencia (110, 510) provenientes de la cara de ensayo (105, 208) y trasforma estas señales (110, 510) en unos datos digitales a partir de los cuales se obtienen, por lo menos en parte, los datos (518) ligados al análisis de la muestra que el

grabador (102) graba en la cara de grabación (107) del disco (106, 206, 402, 500).

13. Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado porque se
5 adapta la intensidad de la fuente de excitación (108, 401, 508) a las características fotoquímicas de la sustancia.

14. Procedimiento según la reivindicación 12 ó 13, caracterizado
porque los diferentes puntos que forman el ensayo previsto se distribuyen
10 linealmente sobre una dirección radial del disco, y se depositan muestras iguales de forma redundante en diferentes posiciones angulares equidistantes, de manera que, a una distancia radial dada, se obtienen un número de repeticiones angularmente distribuidas de un mismo resultado, y se multiplica la frecuencia de
captura de la cámara (104, 408, 514) por el número de muestras reiteradas.

15

15. Procedimiento según la reivindicación 12, 13 ó 14, caracterizado
porque se utiliza un sistema integrado según una cualquiera de las
reivindicaciones 1 a 11 para, cuando un disco de almacenamiento de datos está
en la posición de grabación, analizar al menos una muestra en la cara de ensayo
20 del disco, detectar al menos un resultado de dicho análisis controlando gracias a la cámara la existencia de señales fluorescentes provenientes de la cara de ensayo y, proporcionando dicha cámara datos digitales según el resultado, almacenar al
menos dichos datos digitales o el resultado de un procesamiento de dichos datos
en la cara de grabación del disco, grabando esta última.

25

Disco de almacenamiento de datos (106, 206, 402, 500), caracterizado porque
esta especialmente concebido para cooperar con un sistema integrado según una
cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 de manera que se pueda poner en
práctica un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15.

FIGURA 1

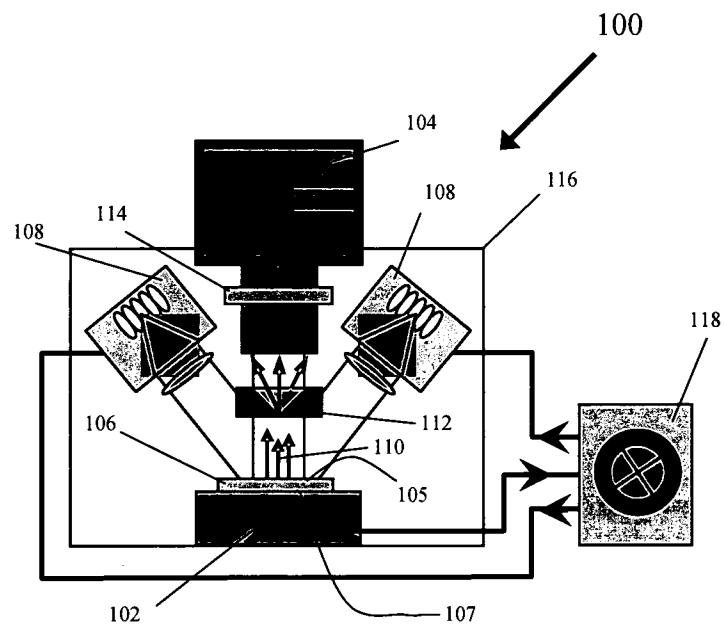


FIGURA 2

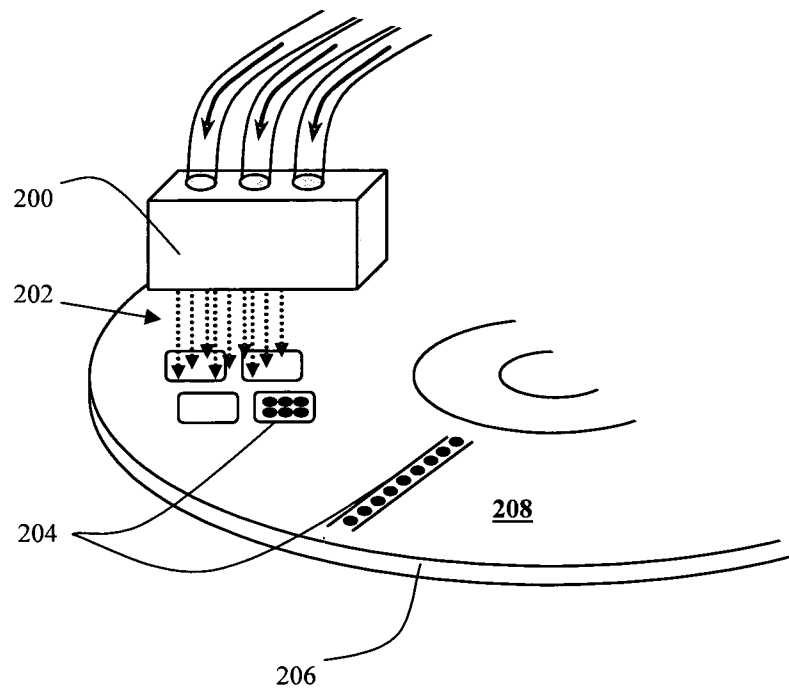


FIGURA 3

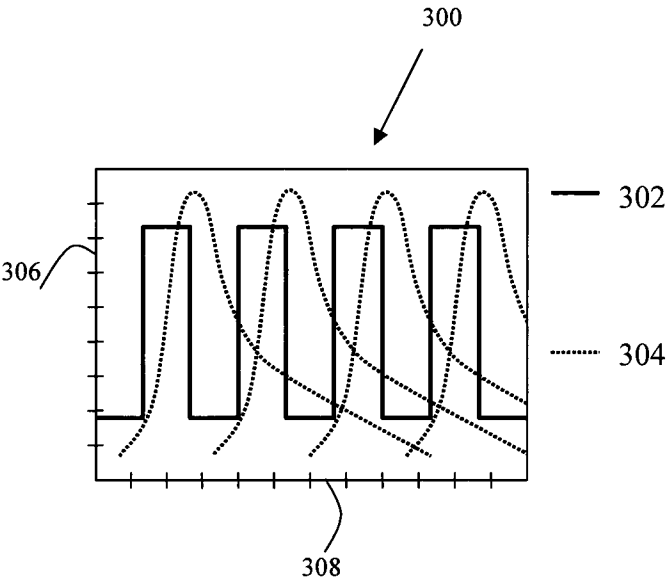
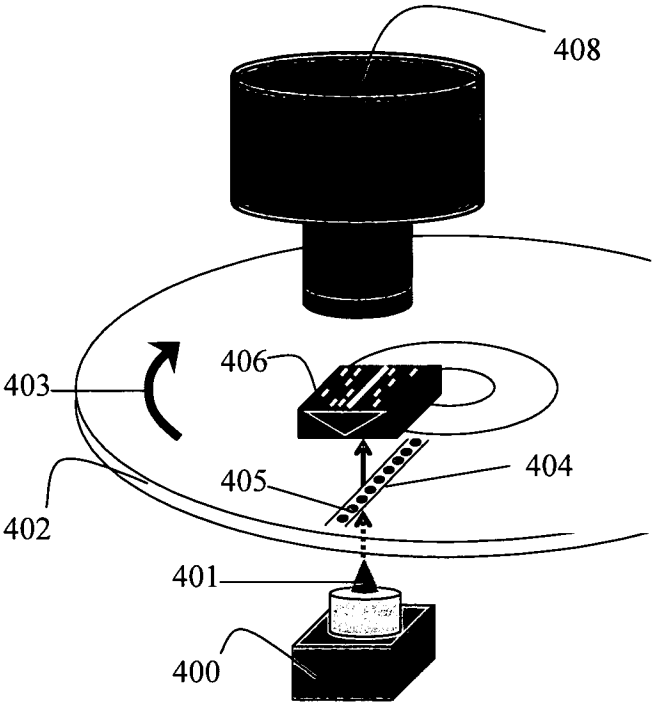


FIGURA 4



- 5/5 -

FIGURA 5

