



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 538**

51 Int. Cl.:
G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02700526 .3**

96 Fecha de presentación : **27.02.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1366351**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2003**

54 Título: **Fluorímetro de obtención de imágenes para fluorescencia analizada en el tiempo.**

30 Prioridad: **28.02.2001 US 272083 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73 Titular/es: **GE Healthcare Niagara Inc.
Brock University, 500 Glenridge Avenue
St. Catharines, ON L2S 3A1, CA**

72 Inventor/es: **Zarate, Carlos;
Donders, Paul;
Yekta, Ahmed;
Masoumi, Zahra y
Ramm, Peter**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 316 538 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

Fluorímetro de obtención de imágenes para fluorescencia analizada en el tiempo.

5 **Referencia a las solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica prioridad bajo el 35 U.S.C. §119(e), basándose en la solicitud provisional de EE.UU. con número de serie 60/272.083, presentada el 28 de febrero de 2001, cuya descripción completa se incorpora en esta memoria como referencia.

10 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a un aparato y un método para fluorescencia con resolución temporal de obtención de imágenes en muestras bioquímicas y médicas.

15 **Antecedentes de la invención**

Se emite fluorescencia cuando un fluoróforo interactúa con un fotón incidente (excitación). La absorción del fotón hace que un electrón en el fluoróforo salte desde su estado fundamental hasta un nivel de energía superior. Después de un tiempo, que depende del fluoróforo y su entorno, el electrón vuelve a su nivel original, liberando un fotón (emisión de fluorescencia), dependiendo la longitud de onda de la cantidad de energía que se libera durante el retorno al estado anterior. Un fluoróforo puede emitir en una única longitud de onda o en múltiples (creando un espectro de emisión), mientras los electrones caen desde diversas órbitas hasta sus estados fundamentales. El espectro de emisión es constante para cada especie de fluoróforo.

25 Las etiquetas fluorescentes son típicamente pequeñas moléculas de tinte orgánico, tales como fluoresceína, Texas Red o rodamina, que se pueden conjugar fácilmente para realizar sondeos de moléculas, tales como estreptavidina. Los fluoróforos pueden ser detectados por iluminación con luz de una frecuencia de excitación apropiada y las emisiones espectrales resultantes pueden ser detectadas por sensores electroópticos o a ojo.

30 Los métodos para realizar análisis en materiales fluorescentes son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Lakowicz, J. R., "Principles of Fluorescence Spectroscopy", New York: Plenum Press (1983); Herman, B., "Resonance Energy Transfer Microscopy", en: Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture, parte B, Methods in Cell Biology, volumen 30, edición Taylor, D. L. y Wang, Y.-L., San Diego: Academic Press (1989), páginas 219-243; Turro, N. J., Modern Molecular Photochemistry, Menlo Park: Benjamin/Cummings Publishing Co, Inc. (1978), páginas 296-361 y en el Molecular Probes Catalog (2001), OR, U.S.A.

Un fluorímetro es un instrumento que mide la fluorescencia. Los fluorímetros tienen tres componentes principales: (a) fuente de luz para excitación, que es la mayoría de veces típicamente una fuente láser o de banda ancha; (b) filtros y/o monocromadores dispersivos para seleccionar zonas de longitud de onda de interés, tanto en excitación como en emisión; (c) un detector que convierte la emisión de fluorescencia incidente en una señal eléctrica. La presente invención se refiere a fluorímetros que miden la fluorescencia en muestras biológicas, más específicamente en muestras biológicas utilizadas en programas de descubrimiento de medicamentos.

45 Algunos fluorímetros (fluorímetros micro) están fabricados en torno a microscopios confocales o no confocales, y están diseñados para observar células marcadas de modo fluorescente o microvolúmenes de muestra como objetivos discretos. Existe un conjunto enorme de la técnica anterior que es relevante para tales fluorímetros micro. Un subconjunto de este conjunto de la técnica anterior se refiere al uso de fluorímetros micro con placas de micropocillos o microplaquetas (por ejemplo, Galbraith, *et al.*, 1991; Rigler, 1995).

50 Otros fluorímetros (fluorímetros macro) no miden la resolución celular sino, más bien, usan óptica de bajo aumento para recoger señales procedentes de cada muestra en una pluralidad de muestras (como en las patentes de EE.UU. números 5.125.748, de Bjornson *et al.*; y 5.340.747, de Eden), más típicamente, los pocillos están dispuestos dentro de placas de micropocillos (como en las patentes de EE.UU. números 6.071.748, de Modlin *et al.*; y 5.670.113, de Akong *et al.*).

55 Los medios con los que se mide una pluralidad de muestras difieren entre un "fluorímetro de exploración", un "fluorímetro de etapas" y un "fluorímetro de obtención de imágenes por zonas".

60 En un fluorímetro macro de exploración (como se describe en la patente de EE.UU. número 5.672.880, de Kain), se realizan detecciones de una pluralidad de muestras en serie, explorando un haz de excitación la muestra y recogiendo en serie cada punto de emisión. Un fluorímetro de exploración puede resolver cada muestra en múltiples puntos de resolución.

65 En un fluorímetro macro de etapas, el haz de excitación y el detector (usualmente un tubo fotomultiplicador o diodo) se mueven de forma gradual de muestra a muestra. El detector (o agrupación de detectores) realiza una medición unitaria procedente de cada muestra, y no discrimina múltiples puntos de resolución dentro de cada muestra (como por ejemplo en las patentes de EE.UU. números 5.589.351, de Harootunian; 5.670.113, de Akong *et al.*; 6.144.455, de Tuunanen *et al.*; y 6.127.133, de Akong *et al.*).

ES 2 316 538 T3

En un fluorímetro macro de obtención de imágenes por zonas, el detector está expuesto a una pluralidad de muestras en paralelo (sin exploración o sin etapas), y se realizan detecciones de cada muestra en una porción diferente de la zona del detector. Al localizar muestras diferentes en puntos diferentes del detector, el fluorímetro de obtención de imágenes por zonas mantiene la capacidad para discriminar muestras discretas de una pluralidad de muestras. El fluorímetro macro de obtención de imágenes por zonas puede discriminar o no múltiples puntos de resolución dentro de cada muestra.

Son bien conocidos los fluorímetros macro de obtención de imágenes por zonas (por ejemplo, Haggart, 1994; las patentes de EE.UU. números 6.140.653, de Che; 6.069.734, de Kawano *et al.*; y muchos sistemas comerciales). La mayoría de los mismos son adecuados para muestras planas, tales como geles de electroforesis. Algunos documentos (por ejemplo, las patentes de EE.UU. números 5.275.168, de Reintjes *et al.*; y 5.309.912, de Knuttel) requieren métodos altamente especializados, tales como espectroscopia de Raman o modulación de fase/amplitud de la iluminación, y no serían adecuados para mediciones de la intensidad de fluorescencia inmediata o resolución temporal como se usan con una pluralidad de muestras biológicas. Otros documentos (5.854.684, de Stabile *et al.*) mencionan el uso general de detectores de obtención de imágenes para cuantificar la luz reflejada desde una pluralidad de muestras, sin describir realizaciones específicas dentro de los sistemas de iluminación y detección óptica que permitirían el uso eficaz de los detectores de obtención de imágenes en fluorimetría macro. Finalmente, otros documentos (WO 96/05488, de McNeil *et al.*) describen medios específicos para conseguir fluorimetría macro de obtención de imágenes por zonas, medios que no son óptimos para este objetivo.

Existe una necesidad de conseguir altos valores de rendimiento para las muestras en aplicaciones de descubrimiento de medicamentos, en las que los especímenes fluorescentes están agrupados usualmente dentro de una pluralidad de pocillos, por lo que se requiere un alto rendimiento. Aunque un fluorímetro de obtención de imágenes por zonas ofrece ventajas conocidas en su capacidad para cuantificar gran número de muestras en paralelo, consiguiendo por ello un alto rendimiento, se requieren realizaciones específicas apropiadas para este objetivo si el instrumento ha de ser tanto de alto rendimiento como de alta sensibilidad.

Es evidente, en vista de la técnica de fluorímetros macro de obtención de imágenes por zonas, situar una cámara CCD a fin de obtener imágenes de un espécimen, suministrar excitación de fluorescencia por medios conocidos y recoger la luz emitida usando una lente de forma conocida. Sin embargo, los fluorímetros de obtención de imágenes de la clase descrita por McNeil *et al.* (WO 96/05488) no consiguen la equivalencia en sensibilidad con fluorímetros que no son de obtención de imágenes, y adolecen de errores en la detección de señales. Por ejemplo, utilizan sistemas de lentes estándares que no contienen mecanismos calculados de manera que minimicen las reflexiones y otras formas de señales falsas, adolecen de errores de paralaje y requieren usualmente que las placas de micropocillos sean de la clase que tiene una parte inferior transparente, a través de la que se leen las muestras. En contraste a esto, los fluorímetros que no son de obtención de imágenes son altamente sensibles, no tienen errores de paralaje, son capaces de leer desde la parte superior o inferior de una placa y no requieren placas de parte inferior transparente que son caras. Los usuarios potenciales de los fluorímetros de obtención de imágenes por zonas en cribado de fármacos no han adoptado ampliamente ningún sistema de la técnica anterior, debido a factores tales como los detallados anteriormente.

Se presentan desafíos al aplicar fluorimetría de obtención de imágenes por zonas al cribado de fármacos, en su mayor parte, por cuatro factores:

a) Los pocillos forman aberturas que interactúan con el ángulo de incidencia de la iluminación. Los pocillos que reciben iluminación con ángulos mayores están iluminados peor que los pocillos que reciben iluminación más directa. Como la mayoría de los fluorímetros de obtención de imágenes por zonas, suministran iluminación desde una zona lateral a la lente de recogida (por ejemplo, Neri *et al.*, 1996), pueden tener éxito con especímenes planos, pero no logran iluminar apropiadamente pocillos profundos. En la práctica, no es poco frecuente observar variaciones en exceso del 300% en el suministro de luz a los pocillos que se encuentran en diferentes posiciones de una placa de micropocillos, a menos que se presente un suministro de iluminación sólo a través de la parte inferior de la placa de micropocillos (como en la patente de EE.UU. número 5.355.215, de Schroeder, y en el documento WO 96/05488, de McNeil *et al.*).

b) Los pocillos están muy poco iluminados. Una pluralidad de pocillos contenidos dentro de una placa de micropocillos estándar ocupa una extensión espacial de aproximadamente 96 centímetros cuadrados. Si un fluorímetro macro de obtención de imágenes por zonas ha de ser capaz de obtener imágenes de todos los pocillos en paralelo, todos ellos deben ser iluminados al mismo tiempo. Por lo tanto, la cantidad de iluminación suministrada a cualquier pocillo (como se describe por una relación geométrica inversa entre zona iluminada e intensidad/área unitaria) es muy baja y la cantidad de fluorescencia emitida desde cualquier pocillo tiende también a ser pequeña, por lo que se requiere un detector sensible. Por muy sensible que sea el detector, es importante que todos los pocillos reciban el haz de iluminación tan eficientemente como sea posible. Si la iluminación no logra alcanzar el contenido de algunos pocillos, incluso el detector más sensible será incapaz de extraer una señal que se pueda utilizar.

c) Existen errores de paralaje. Los pocillos profundos situados en posiciones diferentes dentro de una placa de micropocillos sirven para generar, por una lente estándar, imágenes con ángulos diferentes. Estos errores de paralaje bien conocidos tienen un efecto principal sobre la precisión de la óptica de recogida de luz, particularmente cuando la óptica genera imágenes de la pluralidad de pocillos desde la parte superior.

ES 2 316 538 T3

5 d) Los rayos de iluminación interactúan con la óptica de detección. La óptica para el suministro de iluminación a una placa de pocillos completa, y para la recogida simultánea de emisión de fluorescencia desde la pluralidad de pocillos en la placa, debe tener propiedades especiales. Por ejemplo, el método de iluminación más eficiente es desde dentro de la lente de recogida (epiiluminación), pero una lente macro de epiiluminación está sometida a reflexiones y a otras fuentes no evidentes de señales falsas.

10 Un sistema de obtención de imágenes para conjuntos digitales de análisis en placas de pocillos, geles y blots se describe en las solicitudes de patente de EE.UU. números 09/240.649 y 09/477.444, de Ramm *et al.* Este sistema satisface la necesidad de que la fluorimetría de obtención de imágenes por zonas tenga alto rendimiento, y consigue un avance técnico porque supera los problemas planteados en los puntos a-d anteriores. Más específicamente, el sistema descrito:

15 a) interactúa mínimamente con las aberturas de los pocillos para iluminar una pluralidad de los mismos de forma eficiente y uniforme, desde arriba o desde abajo;

b) al iluminar de manera eficiente, se permite mejor sensibilidad en fluorimetría de obtención de imágenes por zonas;

20 c) usa una óptica telecéntrica para evitar errores de paralaje;

d) contiene una óptica y unos componentes calculados para minimizar las fuentes de señales de fondo que surgen en fluorimetría macro de obtención de imágenes por zonas (por ejemplo, minimiza las reflexiones internas desde filtros de emisión montados dentro de la lente de recogida).

25 El sistema descrito se ha reducido para su puesta en práctica y se ha usado ampliamente para obtener imágenes por zonas de señales de luminiscencia y fluorescencia inmediata. En las solicitudes de patente citadas, se describen medios para usar el sistema a fin de obtener imágenes de fluorescencia con resolución temporal, pero sin descripción detallada de las realizaciones para este objetivo. La presente invención describe realizaciones preferidas de un fluorímetro con resolución temporal de obtención de imágenes por zonas para análisis en placas de pocillos, geles y blots.

30 La emisión de fluorescencia inmediata está definida por el suministro de iluminación de excitación, al mismo tiempo que se recoge la fluorescencia emitida. Los desafíos en fluorescencia inmediata incluyen:

- 35 • las alteraciones muy pequeñas en emisión se deben detectar mientras el sistema se inunda de luz de excitación;
- la emisión es mucho menor en intensidad que la excitación, y es difícil filtrar toda la excitación para dejar la emisión sin alterar;
- 40 • el medio de las muestras (por ejemplo, disolventes, células que contienen compuestos marcados), la óptica (por ejemplo, en Beverloo *et al.*, 1990, 1992) y el soporte de las muestras (placa de pocillos, cubeta) pueden emitir componentes espectrales similares a los del fluoróforo de interés.

45 Colectivamente, cualquier contribución de luz de excitación o medio de las muestras que alcanza el detector se denomina "efecto de fondo". Un filtro de emisión está colocado entre la muestra y el detector para bloquear tanto como sea posible la señal del efecto de fondo impidiendo que alcance el detector (como se describe en la publicación de solicitud internacional de patente número WO 99/08233, de Ramm *et al.*). Sin embargo, el filtro de emisión no puede eliminar todo el efecto de fondo y la fuga restante del efecto de fondo sobre el detector da como resultado una degradación de la sensibilidad de detección. Es decir, la sensibilidad de los fluorímetros tiende a estar limitada por la presencia de altos niveles de señales del efecto de fondo.

50 La fluorescencia con resolución temporal (TRF) es una técnica bien conocida (por ejemplo, en las patentes de EE.UU. números 4.565.790, de Hemilla *et al.*, 4.808.541, de Mikola *et al.*, y 5.736.410, de Zarling *et al.*) que se utiliza para reducir el efecto de fondo y aumentar la sensibilidad de detección. En TRF, una fuente de luz se usa para excitar la muestra y se extingue o cierra entonces rápidamente. Durante el periodo de excitación, el detector está apagado. Al estar apagado, no está sometido a las contribuciones del efecto de fondo que surgen del periodo de excitación (por ejemplo, las fugas de la luz de excitación a través del filtro de emisión).

60 La mayoría de contribuciones del efecto de fondo no están presentes o se desintegran rápidamente (por ejemplo, la fluorescencia de los disolventes) después de terminar la excitación. En contraste a esto, los fluoróforos no cesan su emisión inmediatamente. Más bien, existe un periodo (que varía de picosegundos a milisegundos) durante el que el fluoróforo sigue emitiendo después de que ha terminado la excitación. Durante este periodo, el detector está encendido para observar las señales de fluorescencia relevantes con efecto de fondo mínimo. Esta sincronización retardada del periodo de detección es el principio clave de la TRF.

65 Para permitir detección TRF, el detector se debe encender y apagar dentro de un periodo de tiempo controlado. El periodo de detección comienza algo después de terminar la excitación (tras un tiempo de retardo) y dura un periodo de tiempo (el tiempo de adquisición). La TRF se utiliza muy a menudo con fluoróforos basados en lantánidos (Eu,

ES 2 316 538 T3

Tb, etc.), que tienen tiempos de desintegración del orden de 100 microsegundos a 2 milisegundos, mucho más largos que los tiempos de desintegración típicos de las fuentes del efecto de fondo. Típicamente, el tiempo de retardo es del orden de decenas de microsegundos y el tiempo de adquisición es de decenas a cientos de microsegundos.

5 Durante el periodo de excitación y el tiempo de retardo, el detector está cerrado o apagado (denominado en lo sucesivo desactivado). Durante el tiempo de adquisición, el detector está expuesto a emisiones procedentes de la muestra (denominado en lo sucesivo activado). Es improbable que algún ciclo único de desactivación y activación periódicas genere una señal fiable en el detector, de manera que el ciclo se repite hasta que se han acumulado suficientes señales.

10

La emisión de fluorescencia retardada es mucho menos intensa que la emisión de fluorescencia inmediata, y los sistemas de obtención de imágenes por zonas deben trabajar con niveles muy bajos de emisión/área unitaria. Por lo tanto, un fluorímetro de obtención de imágenes por zonas está más sometido a la pérdida de emisión retardada en el límite inferior del ruido del detector que en otro tipo de fluorímetro. Por consiguiente, es deseable que un sistema TRF 15 tenga una geometría que dé como resultado alto rendimiento óptico (eficacia óptica) y bajas pérdidas de transmisión. Por ello, surgen desafíos al optimizar un sistema para conseguir esta combinación de rápida activación periódica y alta eficacia óptica.

20 Se deben poder activar periódicamente tanto la luz de excitación como el detector. Se conoce ampliamente el modo de activar periódicamente la excitación con discriminadores mecánicos y/o usando láseres pulsatorios (por ejemplo, Gadella y Jovin, 1995), como es mediante la utilización de lámparas flash que disminuyen su intensidad suficientemente rápido para que su contribución a la captación retardada sea mínima (como se describe en el documento WO 99/08233, de Ramm *et al.*; y en EP 0987540A2, de Vaisala *et al.*; Vereb *et al.* 1998).

25 Existen tres métodos en el uso común para la activación periódica de la trayectoria de emisión en TRF:

(a) Una rueda obturadora se hace girar rápidamente para producir una activación periódica a escala de microsegundos de la luz emitida. Esta aproximación se ha aplicado en microscopia TRF (Seveus *et al.*, 1992) para rechazar la señal procedente de la fluorescencia inmediata y reducir por ello la autofluorescencia. Un método similar se describe 30 en el documento EP 0626575A1, de Vaisala *et al.*, y en sistemas de detección por exploración (en la patente de EE.UU. número 5.780.857, de Harju, *et al.*). En un microscopio o en un sistema que detecta una muestra cada vez, es viable un único obturador rápido porque la eficacia óptica es muy pequeña. En contraste a esto, la eficacia óptica de sistemas macro de obtención de imágenes es grande, aproximadamente dos veces el orden de magnitud mayor que la de un microscopio. Un sistema macro de obtención de imágenes requeriría un gran mecanismo obturador mecánico, con una 35 transición relativamente gradual de abierto a cerrado.

(b) Un obturador mecánico de múltiples componentes, que usa rápidas ruedas obturadoras rotatorias, tiene aberturas sincronizadas de tal modo que expone cada vez pequeñas secciones del detector. Esta disposición (como se describe en el documento EP 0987540A2, de Vaisala *et al.*) es más rápida que la de una única rueda, pero es compleja, 40 ya que está compuesta por partes que se mueven rápidamente y tiene mala eficacia óptica.

(c) El detector está activado periódicamente, de manera eléctrica, y convierte también los fotones de emisión en electrones. En este método, un fotocátodo está colocado en la trayectoria óptica. El fotocátodo puede ser encendido y apagado en cortos intervalos para facilitar los requisitos de sincronización de la TRF. Sin embargo, este tipo de 45 dispositivo tiene bajo rendimiento cuántico y no se podría utilizar para obtener imágenes de emisión de fluorescencia muy poco iluminadas sobre un detector de obtención de imágenes. Por lo tanto, se aplica un campo eléctrico acelerador para aumentar la energía de los fotoelectrones antes del objetivo y, en muchos casos, los electrones acelerados son guiados a través de una placa microcanal, en la que se inicia la emisión de muchos más electrones acelerados. Así, el detector activado eléctricamente incorpora usualmente un amplificador de luz, que amplifica la corriente de electrones 50 antes del objetivo.

Se ha descrito (WO 99/08233, Ramm *et al.*; Ramm, 1999) un sistema macro de obtención de imágenes TRF que usa un detector activado eléctricamente, con una amplificación de fotocátodo y de placa microcanal. El uso de un fotocátodo amplificado entre la lente y el detector tiene desventajas intrínsecas:

55

(a) Más típicamente, se emite TRF en largas longitudes de onda largas. Esto es particularmente cierto con pares de donador-aceptor en transferencia de energía de resonancia por fluorescencia (FRET), que tienden a emitir en el tramo rojo del espectro. A fin de detectar estos tipos de señales, la anchura de banda del fotocátodo tiene que ser suficientemente baja para permitir que un fotón de gran longitud de onda genere un fotoelectrón. Sin embargo, los materiales 60 de baja anchura de banda son propensos a generar señales térmicas y producir un efecto de fondo instrumental que puede ser muy difícil de distinguir de la señal a detectar. Un enfriamiento ligero del fotocátodo (como se lleva a la práctica en dispositivos disponibles comercialmente) no elimina el efecto de fondo térmico. Un fuerte enfriamiento del fotocátodo, hasta temperaturas suficientemente bajas para reducir mucho el efecto de fondo térmico, presenta desafíos tecnológicos significativos y no es común en la práctica.

65

(b) El componente de la cámara de un sistema reforzado produce ruido, particularmente efecto de fondo térmico. A fin de superar lo anterior, la CCD se puede enfriar para reducir el efecto de fondo térmico (como se lleva a la práctica en varios dispositivos comerciales). Las dificultades se presentan al enfriar una CCD acoplada con fibras que

está absorbiendo carga térmica de un dispositivo reforzador, y al mantener una unión entre el acoplamiento caliente de fibras y la CCD fría.

5 (c) La QE del componente de activación periódica/amplificación es baja, típicamente del orden del 10% en longitudes de onda del azul-verde, y tan baja como el 1% en el rojo. Por lo tanto, se pierde la mayor parte de la señal que incide en el sistema de activación amplificada y es problemático el uso del sistema en compuestos fluorescentes con resolución temporal que emiten en el rojo.

10 (d) El procedimiento de amplificación no produce un número constante de electrones por fotoelectrón incidente. Este ruido de amplificación se supera, típicamente, estableciendo un umbral mínimo para casos detectados y haciendo recuento sólo de los casos que tienen una alta probabilidad de ser válidos. De este modo, el dispositivo amplificado funciona como un contador, en vez de como un generador de imágenes de integración. Aunque es altamente sensible en este modo de recuento, el dispositivo amplificado es también muy ineficiente y se requieren largos periodos de detección para acumular suficientes casos de supraumbrales a fin de creen una imagen.

15 Existen otras desventajas, incluyendo la fragilidad del amplificador de luz (es destruido fácilmente por luces brillantes) y la mala transferencia de modulación en las imágenes amplificadas. Además, las zonas brillantes del espécimen tenderán a influir en otras zonas alrededor de las anteriores y, por lo tanto, la obtención de imágenes de placas de micropocillos está altamente sometida a interferencias entre pocillos. En resumen, todos los sistemas de la técnica anterior que usan activación periódica y amplificación de fotocátodo presentan deficiencias en el campo técnico de la presente invención.

20 Es posible fabricar un fluorímetro macro de obtención de imágenes por zonas para TRF, en el que las funciones de activación periódica y amplificación sean intrínsecas al detector. Por ejemplo, se ha determinado que una CCD de bombardeo de electrones (EBCCD) puede estar implementada dentro de un sistema de la configuración descrita por Ramm *et al.* (WO 99/08233). Se prevé que otros detectores amplificados integralmente, tales como la CCD amplificadora de electrones (como se lleva a la práctica por la firma Marconi Applied Technologies del Reino Unido), serían aplicables también a un sistema de la configuración descrita. En comparación con las cámaras CCD reforzadas, una ventaja de la EBCCD (y, quizás, de otros detectores activados integralmente) es que muestra muy pocas interferencias en la obtención de imágenes de placas de micropocillos, mientras se mantiene suficientemente sensible para detectar débiles señales de fluorescencia retardada.

25 Casi cualquier tipo de obturador rápido se podría disponer como activación para un sistema TRF. Se ha descrito (WO 99/08233, Ramm *et al.*) una TRF con un sistema macro de epiiluminación que usa un cristal líquido, lámina u otro obturador montado en la trayectoria óptica después del espécimen, pero antes del detector. En una realización preferida, la presente invención incorpora tal obturador implementado dentro de un sistema que está optimizado para permitir su uso.

30 Aunque no se ha descrito específicamente la automatización del procedimiento por el que se aplica la presente invención, es previsible que la misma se pueda usar con sistemas y métodos que utilizan estaciones de trabajo que están automatizadas y se pueden integrar para identificar moduladores, trayectorias, productos químicos que tienen actividad útil y otros métodos descritos en esta memoria. Tales sistemas se describen generalmente en la técnica (véanse, la patente de EE.UU. número 4.000.976, de Kramer *et al.* (expedida el 4 de enero de 1977), la patente de EE.UU. número 5.104.621, de Pfof *et al.* (expedida el 14 de abril de 1992), la patente de EE.UU. número 5.125.748, de Bjornson *et al.* (expedida el 30 de junio de 1992), la patente de EE.UU. número 5.139.744, de Kowalski (expedida el 18 de agosto de 1992), la patente de EE.UU. número 5.206.568, de Bjornson *et al.* (expedida el 27 de abril de 1993), la patente de EE.UU. número 5.350.564, de Mazza *et al.* (27 de septiembre de 1994), la patente de EE.UU. número 5.589.351, de Harootunian (expedida el 31 de diciembre de 1996) y las solicitudes PCT números: WO 93/20612, de la firma Baxter Deutschland GmbH (publicada el 14 de octubre de 1993), WO 96/05488, de McNeil *et al.* (publicada el 22 de febrero de 1996) y WO 93/13423, de Agong *et al.* (publicada el 8 de julio de 1993)).

35 De acuerdo con la presente invención, se ha previsto un sistema de obtención de imágenes según la reivindicación 1.

40 En algunas realizaciones, un sistema de obtención de imágenes por zonas para fluorimetría con resolución temporal de muestras en placas de pocillos, geles y blots incorpora un obturador de emisión electrónica de actuación rápida implementado dentro de un sistema iluminado con estroboscopia de gran eficacia óptica, acoplado a una cámara de alta sensibilidad (preferiblemente como se describe en el documento WO 99/08233, de Ramm *et al.*). El obturador de emisión del sistema está basado en la tecnología de cristal ferroeléctrico (FLC). El obturador FLC es un dispositivo con base ferroeléctrica compuesto por un polarizador de entrada, un material ferroeléctrico que cambia la rotación de polarización dependiendo del campo eléctrico y un analizador de polarización insertado en la trayectoria de emisión de sistemas direccionales de obtención de imágenes, entre la muestra y un detector direccional de estado sólido.

45 Una propiedad del sistema de la presente invención es que los componentes ópticos/de detección que contienen el obturador FLC son tan sensibles que se facilita la pérdida de transmisión a través del obturador electrónico, sin requerir una etapa de amplificación luminosa. En una configuración preferida, el rendimiento cuántico del detector es alto y la eficacia óptica del sistema óptico es grande. Cuando se usa dentro de tal sistema, el obturador de la presente invención transmite suficiente fluorescencia retardada para producir mediciones comparables a las obtenidas a partir

ES 2 316 538 T3

de fluorímetros con resolución temporal que no son de obtención de imágenes, y excede la sensibilidad de sistemas que usan fotocátodos amplificados sin las desventajas (interferencias, fragilidad, etc.) de tales sistemas.

Un experto en la técnica apreciará que un obturador electrónico rápido sería útil como un mecanismo de activación periódica para TRF. Sin embargo, la mayoría de los obturadores rápidos, como las células de Kerr, los moduladores optoacústicos o los moduladores electroópticos, tienen eficacia óptica limitada que restringe sus aplicaciones a sistemas con pequeña eficacia óptica, como es el caso de los microscopios. Una ventaja del obturador electrónico de la presente invención es que tiene una gran apertura y se aprovecha de la eficacia óptica del sistema de la presente invención.

El sistema podría estar equipado con un obturador con base de cristal líquido. Mientras que este tipo de obturador puede tener una apertura suficiente para ser utilizada con la gran eficacia óptica del presente sistema, tiene una mala relación del estado transmisor al estado de bloqueo (definida como la relación de contraste). Más típicamente, la relación de contraste de un obturador de cristal líquido es del orden de $<200:1$, si se compara con el $>400:1$ observado con un obturador FLC. El obturador con base de cristal líquido no es tampoco suficientemente rápido para obtener imágenes TRF con muchos compuestos fluorescentes utilizados comúnmente.

El sistema de la presente invención incorpora un único obturador con base de cristal ferroeléctrico (FLC). Una ventaja del sistema de la presente invención es que el obturador FLC puede pasar de activado a desactivado en menos de 100 microsegundos, y es adecuado para obtener imágenes de fluorescencia retardada de compuestos fluorescentes de lantánido, europio y terbio utilizados comúnmente.

La desventaja de los FLC, como se describe en intentos previos de usar obturadores FLC en microscopia TRF, ha sido el débil rechazo de la fluorescencia inmediata debido a una relación de contraste inadecuada (Verwoerd *et al.*, 1994; Shotten, 1995). Esta mala relación de contraste ha llevado al uso de dos obturadores FLC en serie, y la pérdida de transmisión resultante ha sido tan alta (Vereb *et al.*, 1998) que sería imposible su uso en un fluorímetro macro de obtención de imágenes. En la presente invención, el FLC está colocado dentro de la óptica, en una posición que produzca la mejor relación de contraste posible. Una propiedad del sistema de la presente invención es que la óptica está fabricada de modo que el obturador rápido está situado en la trayectoria óptica de la fluorescencia emitida, de tal manera que los ángulos de incidencia con respecto a la normal sobre el obturador no exceden los 20° . Esta colocación consigue la mejor relación de contraste posible desde el obturador, y minimiza los efectos de dicho obturador sobre las características de longitud de onda de la luz transmitida.

En una realización preferida de la presente invención, la fuga a través del obturador FLC se corrige haciendo, en primer lugar, una imagen de fluorescencia inmediata con el obturador cerrado (la imagen de fuga). Esta imagen se lee a la salida de la cámara CCD, antes de la captación de la imagen de fluorescencia retardada. Luego, la imagen de fuga se sustrae de la imagen de fluorescencia retardada para dejar esta última sin efecto de fondo añadido por fuga a través del obturador FLC.

Una ventaja del sistema de iluminación y del obturador electrónico de la presente invención es que pueden ser adaptados para su uso en fluorímetros macro existente de obtención de imágenes por zonas, sin requerir modificaciones importantes de dichos dispositivos (por ejemplo, como se describe en el documento WO 99/08233, de Ramm *et al.*). Más bien, el sistema de iluminación de la presente invención se puede montar en un fluorímetro macro existente de obtención de imágenes por zonas, y el obturador se puede montar también en dicho dispositivo sin modificaciones importantes.

Una ventaja de la presente invención es que el obturador se inserta o retira fácilmente de un fluorímetro macro de obtención de imágenes por zonas, lo que permite que dicho fluorímetro se use para una variedad muy amplia de aplicaciones sin que dicho obturador interfiera.

Una ventaja del sistema de la presente invención es que se puede usar con sistemas y métodos que utilizan estaciones de trabajo que están automatizadas y que se pueden integrar para identificar moduladores, trayectorias, productos químicos que tienen actividad útil y otros métodos descritos en esta memoria. Tales sistemas se describen generalmente en la técnica (véanse, la patente de EE.UU. número 4.000.976, de Kramer *et al.* (expedida el 4 de enero de 1977), la patente de EE.UU. número 5.104.621, de Pfof *et al.* (expedida el 14 de abril de 1992), la patente de EE.UU. número 5.125.748, de Bjornson *et al.* (expedida el 30 de junio de 1992), la patente de EE.UU. número 5.139.744, de Kowalski (expedida el 18 de agosto de 1992), la patente de EE.UU. número 5.206.568, de Bjornson *et al.* (expedida el 27 de abril de 1993), la patente de EE.UU. número 5.350.564, de Mazza *et al.* (27 de septiembre de 1994), la patente de EE.UU. número 5.589.351, de Harootunian (expedida el 31 de diciembre de 1996) y las solicitudes PCT números: WO 93/20612, de la firma Baxter Deutschland GmbH (publicada el 14 de octubre de 1993), WO 96/05488, de McNeil *et al.* (publicada el 22 de febrero de 1996) y WO 93/13423, de Akong *et al.* (publicada el 8 de julio de 1993)).

Aunque la presente invención está dirigida a la obtención de imágenes por zonas de fluorescencia macro con resolución temporal, se ha de comprender que un experto en la técnica podría usar las capacidades de polarización de la presente invención, como se consiguen con el obturador FLC, para fabricar un sistema de obtención de imágenes por zonas de fluorescencia macro de polarización. En tal sistema, la luz de excitación es polarizada al hacerla pasar, en primer lugar, a través de un obturador FLC. La luz emitida se hace pasar a través de un polarizador montado en la trayectoria de emisión. Se puede hacer girar cualquier polarizador con respecto a otro, y el sistema es de tan alta

sensibilidad que consigue una medición de polarización comparable a la de dispositivos por zonas que no son de obtención de imágenes.

Breve descripción de los dibujos

- 5 Los anteriores y otros objetivos, propiedades y ventajas de la presente invención se entenderán más completamente a partir de la descripción siguiente de realizaciones actualmente preferidas, pero no obstante ilustrativas, de acuerdo con la presente invención, haciendo referencia a los dibujos que se acompañan, en los que:
- 10 la figura 1 es una vista esquemática en sección transversal de una realización preferida de un sistema óptico, de acuerdo con la presente invención, útil para obtener imágenes de fluorescencia;
- la figura 2 es una vista en sección transversal de un sistema óptico, como en la figura 1, con el iluminador anular reemplazado por un sistema de iluminación epitaxial;
- 15 la figura 3 es una vista en sección transversal, similar a la figura 2, que muestra la adición de un obturador rápido;
- la figura 4 es un diagrama de rayos de luz que muestra el funcionamiento del obturador y el filtro en el sistema óptico;
- 20 la figura 5 muestra gráficos que comparan el comportamiento de un sistema, de acuerdo con la presente invención, con el de un fluorímetro con resolución temporal que no es de obtención de imágenes; y
- la figura 6 muestra gráficos que comparan el comportamiento de una cámara CCD de bombardeo de electrones implementada dentro del sistema actual con el de un fluorímetro con resolución temporal que no es de obtención de imágenes.
- 25

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

- 30 La figura 1 muestra un sistema óptico 1 en sección transversal, como se usa para obtener imágenes de fluorescencia de una pluralidad de pocillos 2 contenidos dentro de una placa 3 de micropocillos. Los componentes principales del sistema óptico 1 son un sistema de lentes 4, una fuente de luz pulsatoria 5, un filtro de excitación primaria 6, un iluminador anular 7, un filtro de emisión primaria 8 (para eliminar longitudes de onda que son irrelevantes para la señal de muestreo deseada) y un sistema de cámara CCD 9. El sistema de lentes 4 del sistema óptico 1 comprende un elemento delantero 4a que funciona en un espacio telecéntrico, y que forma una imagen de la placa 3 de pocillos sobre un detector CCD 10 de la cámara CCD 9.
- 35

- En funcionamiento, la fuente de luz 5 proporciona la energía luminosa necesaria para ser aplicada a los especímenes dentro de los pocillos 2. Preferentemente, la fuente de luz puede ser modulada desde una intensidad alta hasta menos del 1% de dicha intensidad alta en un tiempo menor que 100 microsegundos. La luz procedente de la fuente se transmite a través del filtro 6 y se dirige mediante una guía de luz, tal como un mazo de fibra óptica o una guía luminosa líquida, al iluminador anular 7, interno al sistema de lentes, realizando dicho iluminador anular epiiluminación, iluminando preferiblemente una zona mayor que 25 centímetros cuadrados. La energía luminosa emitida por un espécimen excitado por epiiluminación se transmite a través de la lente 4a y de todo el sistema de lentes 4 a la cámara 9, en la que se forma una imagen sobre el detector CCD 10.
- 40
- 45

- La figura 2 repite la figura 1, con el reemplazo del iluminador anular por un sistema de iluminación epitaxial. La iluminación epitaxial está compuesta por una fuente de luz pulsatoria 11, un filtro de excitación primaria 12 y un espejo dicróico 13 para reflejar las longitudes de onda de excitación sobre la muestra y transmitir las longitudes de onda emitidas desde un espécimen hacia la cámara.
- 50

- La figura 3 repite la figura 2, con la adición del obturador rápido 14. El obturador 14 se encuentra muy próximo al filtro de emisión 8, en una posición en la que todos los rayos están próximos al eje óptico. El obturador 14 está hecho de un material que se puede poner opaco (desactivado) o transparente (activado), con un periodo de activación-desactivación más corto que 100 microsegundos y con una relación de contraste en exceso de 200:1. Se prefiere también que el obturador sea transmisor más del 20% a longitudes de onda de la luz entre 500 y 700 nanómetros. El obturador 14 es un dispositivo FLC. Sin embargo, el principio de aplicar un obturador electrónico de actuación rápida en la trayectoria de emisión es general y, como un ejemplo comparativo, el obturador 14 podría ser cualquier otro obturador electrónico de actuación rápida. Por ejemplo, el obturador 14 podría estar constituido por un polarizador de entrada compuesto por un material piezoeléctrico que cambia la rotación de polarización dependiendo del campo eléctrico, y un analizador de polarización, colocado entre la muestra 3 y la cámara CCD 9.
- 55
- 60

- La figura 4 muestra cómo los rayos A1-A3, que tienen su origen en un punto de una esquina de la placa, pasan entonces a través del obturador rápido 14 y del filtro de emisión 8. Se muestran también los rayos B1-B3 y los rayos C1-C3, que tienen su origen en el centro y en las esquinas opuestas de la placa, respectivamente. El obturador 14 y el filtro 8 están en una posición calculada para ser la posición conjugada infinita con respecto a la placa 3 cuando se obtienen las imágenes a través de la lente 4. El obturador 14 y el filtro 8 están situados de manera que: a) los ángulos con los que los rayos de emisión (como se muestra por los rayos A1'-A3', B1'-B3' y C1'-C3') pasan a través del eje
- 65

óptico del filtro 8 son ambos próximos a la normal a su superficie, y están centrados alrededor de la normal al filtro 8, y b) la distribución de rayos procedentes de la placa 3 sobre el filtro 8 es uniforme. En la configuración mostrada, el sistema de la presente invención es capaz de minimizar los desplazamientos espectrales que surgen de las acciones del filtro de emisión 8, cuando el filtro es de la clase de interferencia. Las características de esta realización, en la que el filtro de emisión está en la posición conjugada infinita de la lente 4, y en la que los haces golpean también el obturador 14 con un pequeño ángulo respecto a la normal, tienen las propiedades beneficiosas: a) la relación de contraste del obturador 14 es máxima; b) el tamaño del filtro de emisión 8 y del obturador 14 están minimizados para un ángulo máximo de incidencia dado; y c) el efecto de los defectos puntuales inevitables del obturador 14 se distribuirá uniformemente por todo el detector, sin producir puntos brillantes u oscuros en la imagen creada sobre el detector 10.

La figura 5 muestra el comportamiento del sistema de la presente invención, si se compara con un fluorímetro con resolución temporal que no es de obtención de imágenes (en este caso mostrado por un Wallac Victor 2 (Perkin Elmer Life Sciences)) equipado con los componentes óptimos para fluorescencia con resolución temporal. El límite de detección para el europio está definido por una relación señal a ruido de 3:1, y es similar para ambos instrumentos. Si acaso, la presente invención proporciona un comportamiento superior cerca del límite de detección.

La figura 6 muestra el comportamiento de una cámara CCD de bombardeo de electrones (Hamamatsu), como está implementada dentro del sistema de la presente invención. En este caso, se consigue la activación periódica dentro del detector CCD de bombardeo de electrones en oposición al uso de un obturador electrónico rápido montado dentro de la lente 4. En esta configuración, el comportamiento es, de nuevo, igual al de un fluorímetro que no es de obtención de imágenes. La figura 6 muestra que el sistema de la presente invención puede ser implementado con múltiples formas de activación periódica electrónica, bien por un obturador en la trayectoria de emisión o por un mecanismo de activación periódica implementado dentro del dispositivo de detección.

Se apreciará por las figuras 5 y 6 que la presente invención hace posible conseguir un comportamiento en un sistema de fluorímetro de obtención de imágenes con resolución temporal que es al menos tan satisfactorio como los mejores fluorímetros que no son de obtención de imágenes.

Así, la descripción anterior es ilustrativa y no limitativa. Por lo tanto, la intención es que esté limitada sólo por el alcance de las reivindicaciones adjuntas a dicha descripción.

Bibliografía

1. **Beverloo, H.B., van Schadewijk, A., van GelderenBoele, S. y Tanke, H.J.**: "Inorganic phosphors as new luminescent labels for immunocytochemistry and time-resolved microscopy", *Cytometry*. 11:784-92 (1990).
2. **Beverloo, H.B., van Schadewijk, A., Bonnet, J., van derGeest, R., Runia, R., Verwoerd, N.P., Vrolijk, J., Ploem, J.S. y Tanke, H.J.**: "Preparation and microscopic visualization of multicolor luminescent immunophosphors", *Cytometry*. 13:561-70 (1992).
3. **Gadella, T.W.J. Jr. y Jovin, T.M.**: "Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studies by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model of tyrosine kinase receptor activation", *The Journal of Cell Biology* 129:1543-1558 (1995).
4. **Galbraith, W., Wagner, M.C.E., Chao, J., Abaza, M., Ernst, L.A., Nederlof, M.A., Hartsock, R.J., Taylor, D.L. y Waggoner, A.S.**: "Imaging cytometry by multiparameter fluorescence", *Cytometry* 12:579-596 (1991).
5. **Haggart, R.**: "Cooled slow-scan charge coupled device imaging fluorometer", *Analytical Chimica Acta* 290:48-57 (1994).
6. **Neri D., Prospero T., Petrul H., Winter G., Browne M. y Vanderpant L.**: "Multipurpose high sensitivity luminescence analyzer (LUANA): use in gel electrophoresis". *Biotechniques* 20:708-13 (1996).
7. **Ramm, P.**: "Imaging Systems in Assay Screening", *Drug Discovery Today* 4:401-410 (1999).
8. **Rigler, R.**: "Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening applications in biotechnology", *Journal of Biotechnology* 41:177-186 (1995).
9. **Seveus, L., Vaisala, M., Sandberg, M., Kuusisto, A., Harju, R., Salo, J., Hemmila, I., Kojola, H. y Soini, E.**: "Time-resolved fluorescence imaging of europium chelate label in immunohistochemistry and *in situ* hybridization", *Cytometry* 13:329-338 (1992).
10. **Shotton, D.M.**: "Electronic Light Microscopy - Present Capabilities and Future Prospects". *Histochemistry and Cell Biology* 104:97-137 (1995).
11. **Vereb, G., Jares-Erijman, E., Selvin, P.R. y Jovin, T.M.**: "Temporally and Spectrally Resolved Imaging Microscopy of Lanthanide Chelates". *Biophysical Journal* 74 (5), 2210-2222 (Mayo de 1998).

ES 2 316 538 T3

12. **Verwoerd N.P., Hennink E.J., Bonnet J., Van der Geest C.R. y Tanke, H.J.:** "Use of ferro-electric liquid crystal shutters for time-resolved fluorescence microscopy". *Cytometry*, 1 de junio de 1994; 16(2):113-7.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 316 538 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Un sistema de obtención de imágenes para fluorimetría con resolución temporal de muestras químicas, biológicas y médicas dispuestas sobre un medio que las contiene en el que se han de someter a iluminación, haciendo que las mismas emitan luz, comprendiendo el sistema de obtención de imágenes:

10 una fuente de iluminación (5, 11) que puede ser modulada desde una intensidad sustancialmente completa en las muestras hasta menos de aproximadamente el 1% de la intensidad completa, en un tiempo menor que aproximadamente 100 microsegundos;

un sistema de iluminación (6, 7, 12, 13) para iluminar desde la fuente hasta una zona en la que las muestras pueden ser mayores que el campo de visión de un microscopio;

15 un sistema de lentes (4) para recoger la luz emitida desde las muestras contenidas dentro de la zona iluminada;

un dispositivo (4) de formación de imágenes situado de manera que la luz desde las muestras, que pasa a través de las lentes, incide en el dispositivo y el dispositivo produce una representación de una imagen de las emisiones de la muestra;

20 un único obturador de cristal ferroeléctrico (14) colocado entre las muestras y el dispositivo de formación de imágenes, que comprende un analizador de polarización y que incluye un dispositivo de cristal ferroeléctrico configurado como un polarizador que cambia la rotación de polarización de la luz que pasa a través del mismo, dependiendo de un campo eléctrico aplicado; y

25 un analizador de polarización insertado en la trayectoria de emisión entre las muestras y el dispositivo de formación de imágenes;

30 de manera que el obturador (14) se puede hacer opaco (desactivado) o transparente (activado), con un periodo de activación-desactivación más corto que aproximadamente 100 microsegundos y con una relación de contraste entre activación y desactivación en exceso de aproximadamente 100:1; y

un dispositivo de control para ajustar los tiempos de activación/desactivación de la fuente de iluminación y los tiempos de apertura/cierre del obturador;

35 en el que el sistema de lentes (4) tiene una óptica fabricada de este modo y el obturador está situado dentro de la óptica en la trayectoria óptica de la luz emitida, de manera que los ángulos de incidencia de la luz con respecto a la normal sobre el obturador no exceden los 20°, de modo que se consigue la mejor relación de contraste posible y se minimizan los efectos de dicho obturador sobre las características de la longitud de onda de la luz transmitida.

40 2. El sistema según cualquier reivindicación precedente, en el que el medio que contiene las muestras está compuesto por una pluralidad de pocillos dispuestos dentro de una placa y la lente está fabricada para detectar todo el contenido de los pocillos sin error de paralaje.

45 3. El sistema de iluminación según cualquier reivindicación precedente, en el que la fuente de iluminación (5, 7) es una lámpara flash.

50 4. El sistema según cualquier reivindicación precedente, en el que el dispositivo de control está fabricado para accionar el obturador y la fuente de iluminación por múltiples ciclos de activación y desactivación, acumulando el dispositivo de formación de imágenes la luz que incide en el mismo durante múltiples ciclos.

55 5. El sistema de obtención de imágenes según cualquier reivindicación precedente, en el que la luz emitida presenta una disminución de intensidad y el obturador se activa y se desactiva más de una vez durante la desintegración que sigue a una iluminación de las muestras, para adquirir imágenes en diferentes momentos durante el proceso de desintegración.

6. El sistema según cualquier reivindicación precedente, en el que el sistema de iluminación está fabricado para guiar la luz desde la fuente hacia dentro y hacia fuera de la lente en dirección a las muestras.

60 7. El sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el sistema de iluminación comprende un divisor de haz entre la lente y las muestras, fabricado para guiar la luz a través del sistema de lentes en dirección a la lente.

65 8. El sistema según cualquier reivindicación precedente, que comprende además un procesador de corrección adaptado para almacenar una imagen de fuga de fluorescencia inmediata con el obturador cerrado y adaptado para sustraer esta imagen de fuga, almacenada a partir de una imagen posterior de fluorescencia retardada, para producir una imagen corregida de fluorescencia retardada.

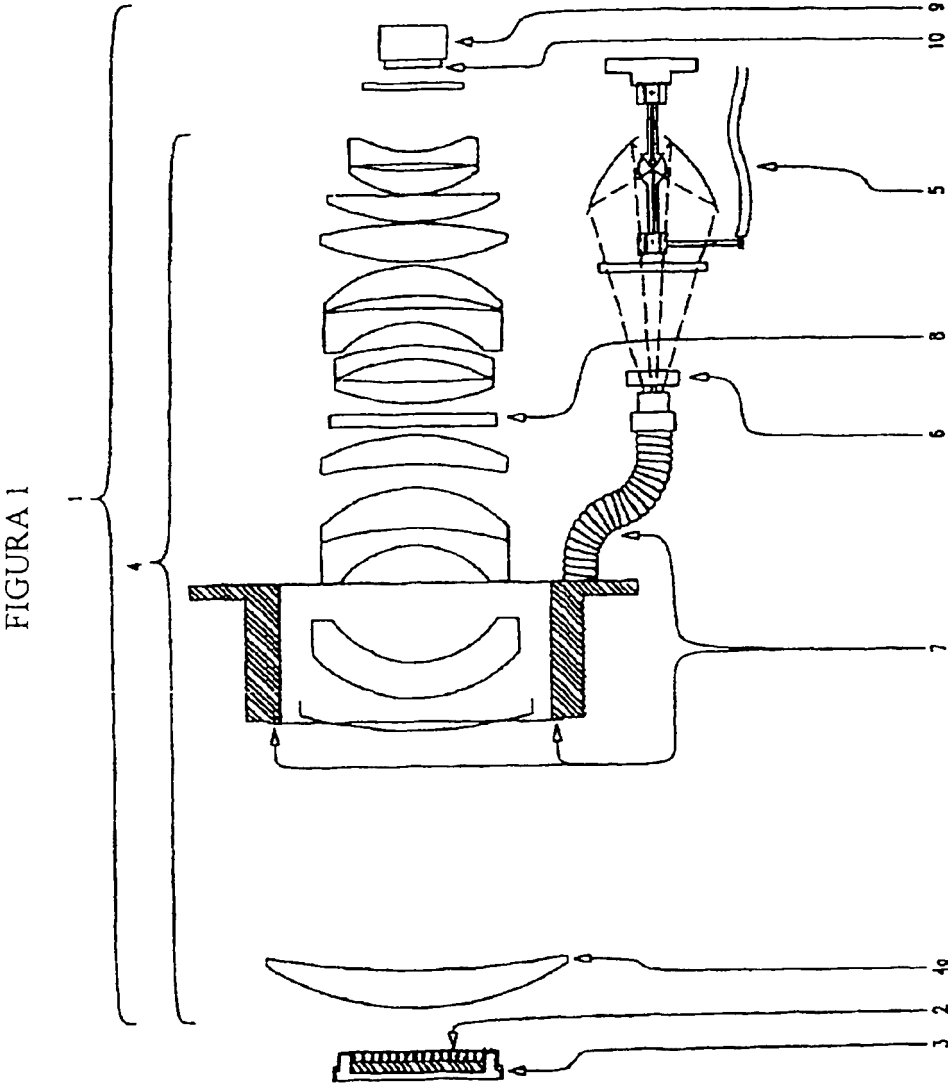


FIGURA 2

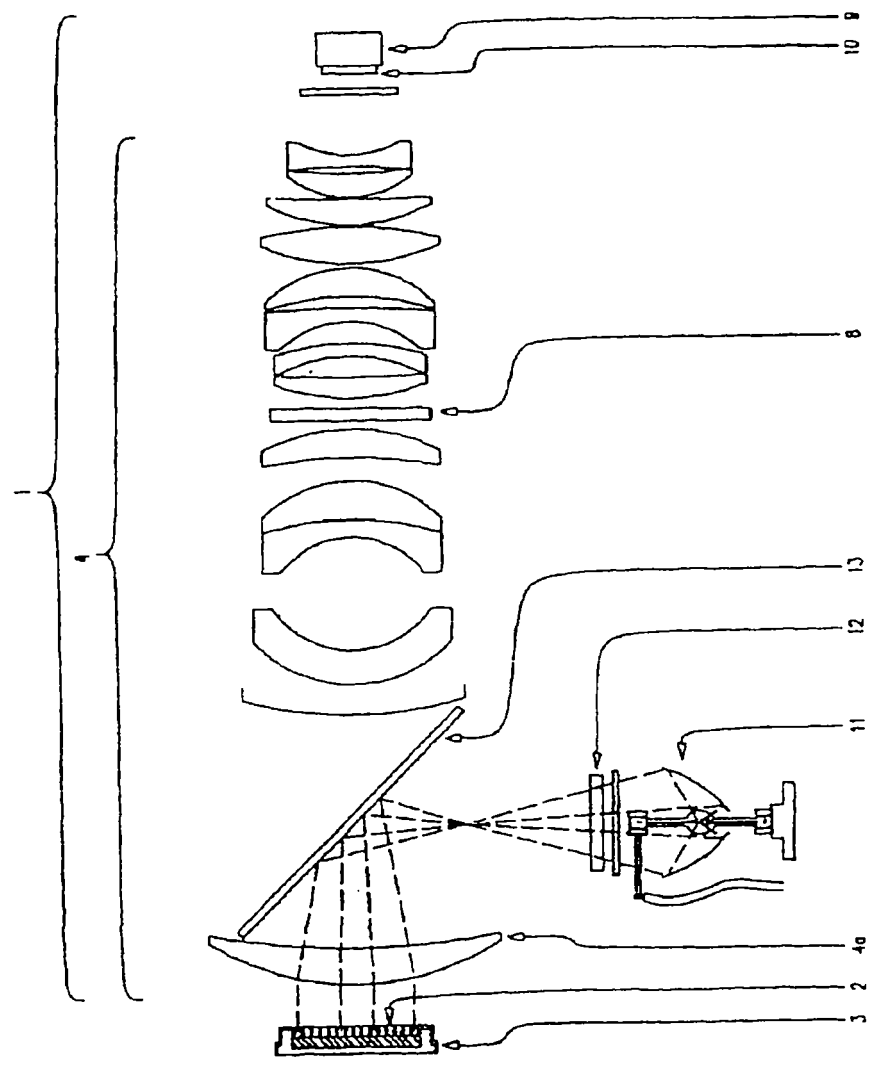
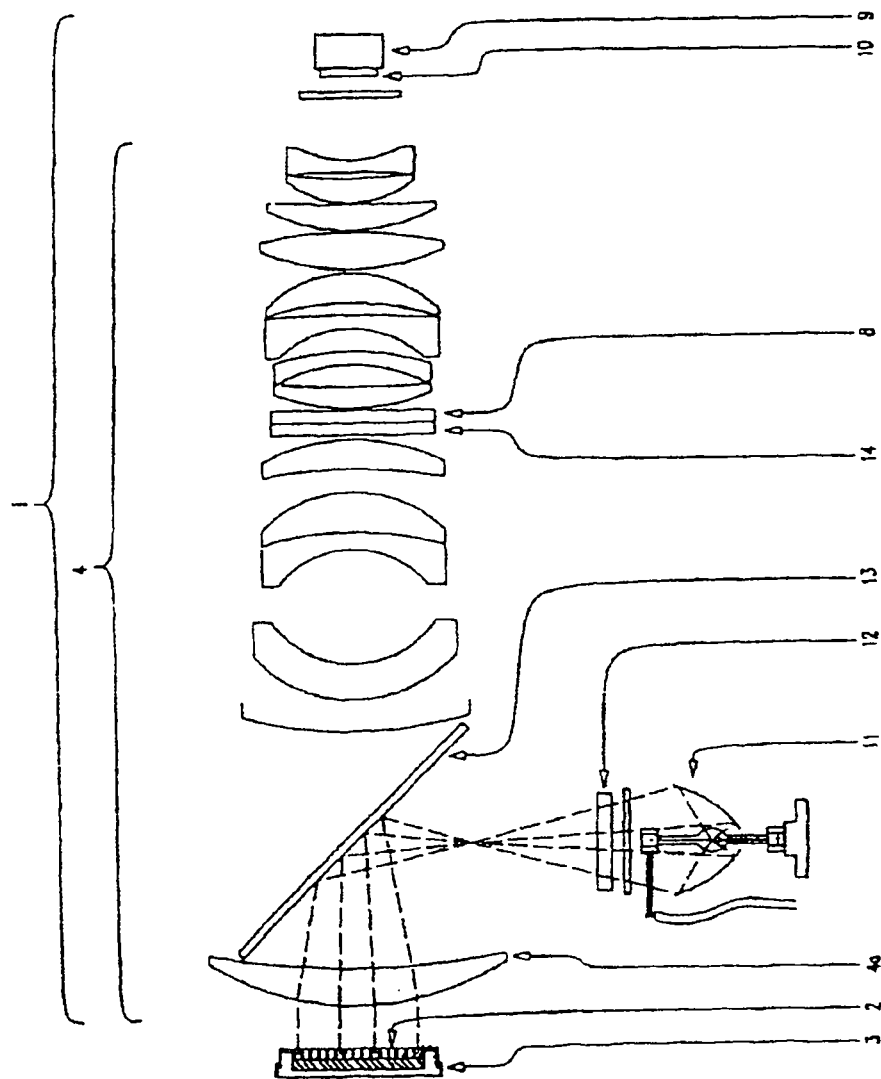


FIGURA 3



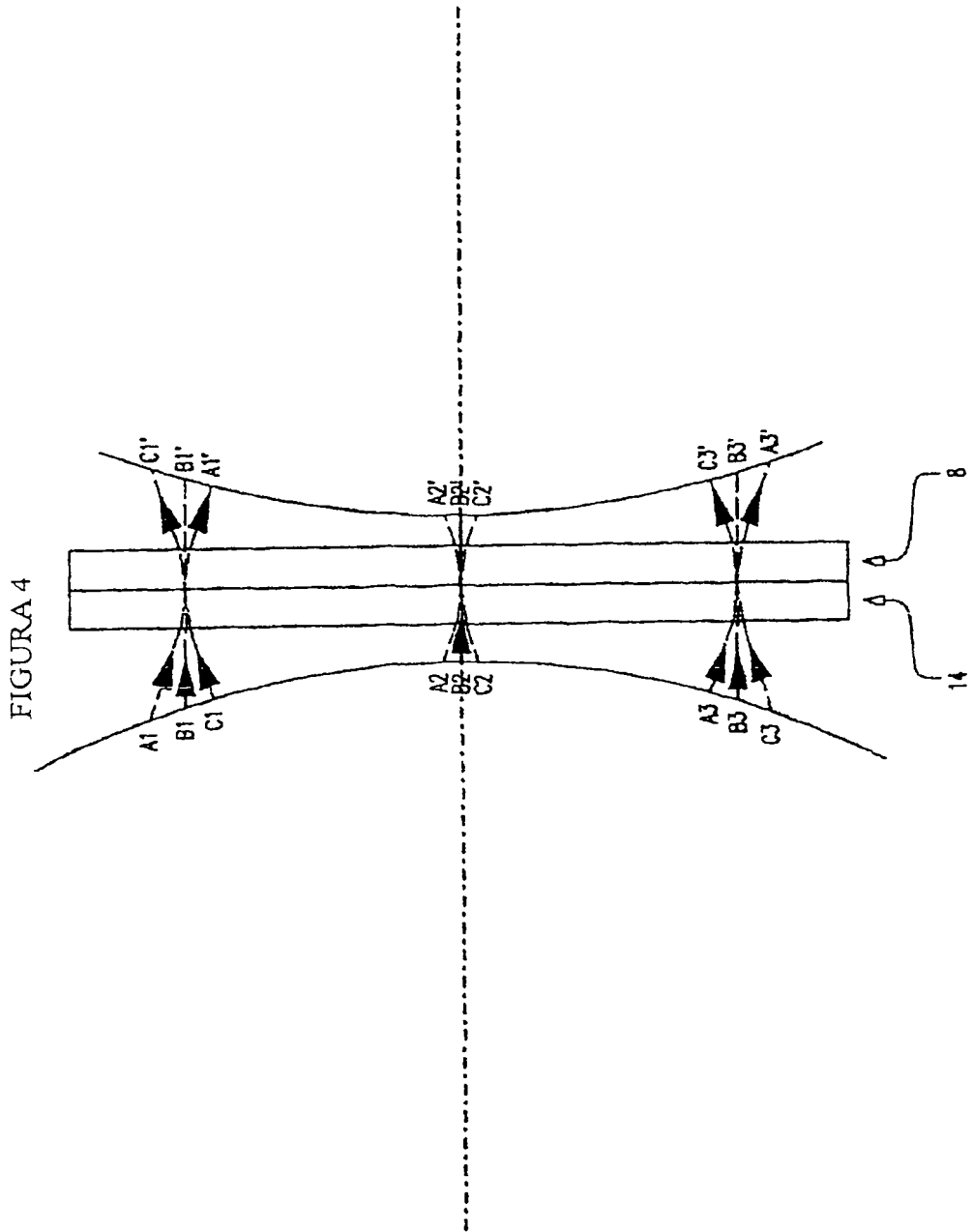


Fig. 5

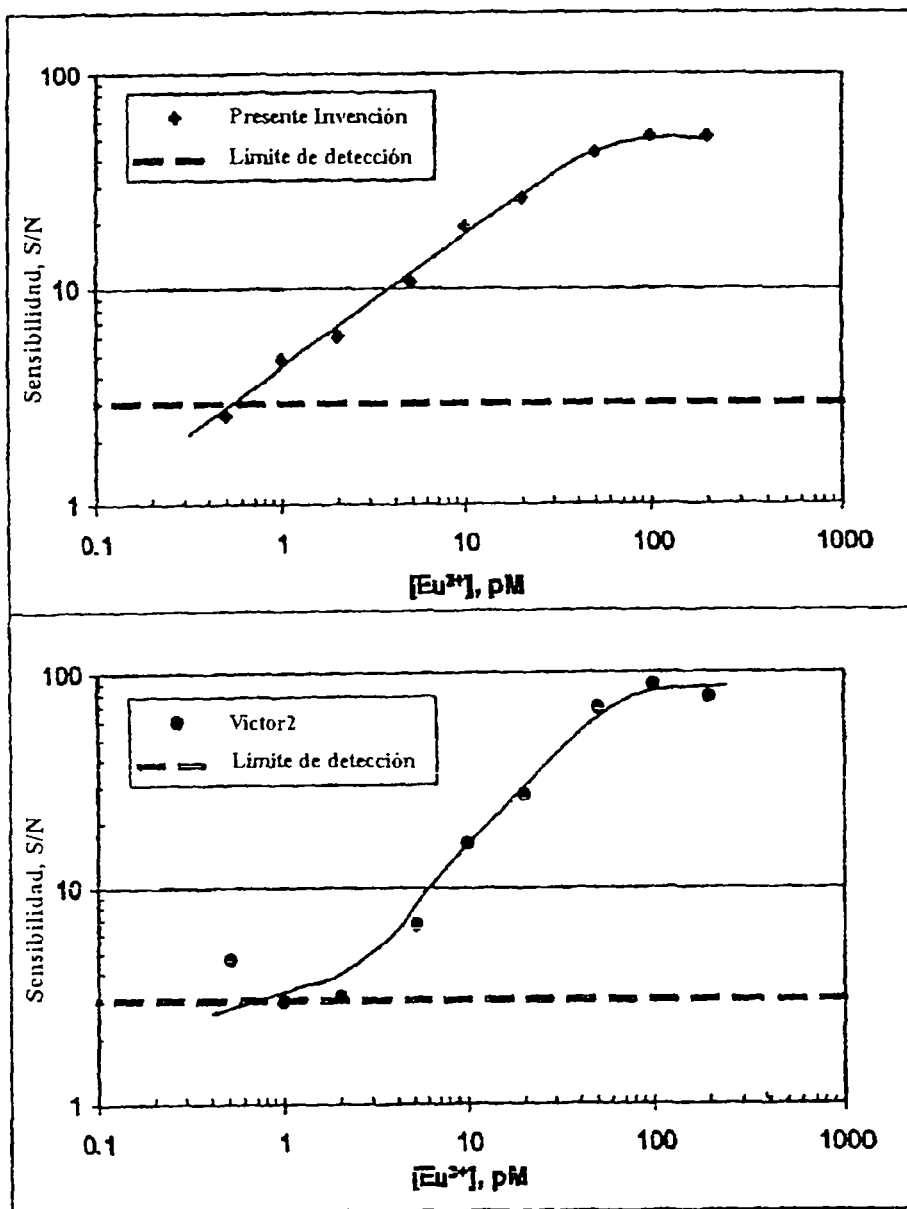


Fig. 6

