

(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
29 de septiembre de 2016
(29.09.2016)



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2016/151167 A1

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

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2016/070174

(22) Fecha de presentación internacional:
16 de marzo de 2016 (16.03.2016)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201530371 20 de marzo de 2015 (20.03.2015) ES

(71) Solicitante: **UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA** [ES/ES]; Centro de Transferencia de Tecnología, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia (ES).

(72) Inventores: **MAQUIEIRA CATALÁ, Ángel**; Centro de Transferencia de Tecnología, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia (ES). **TORTAJADA GENARO, Luis Antonio**; Centro de Transferencia de Tecnología, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia (ES). **SANTIAGO FELIPE, Sara**; Centro de Transferencia de Tecnología, Camino de Vera

s/n, 46022 Valencia (ES). **MORAIS EZQUERRO, Sergi Beñat**; Centro de Transferencia de Tecnología, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia (ES).

(74) Mandatario: **CUETO PRIEDE, Sénida**; C/ Los Madroños 23, 28891 Velilla de San Antonio, Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: BUILT-IN DEVICE FOR MONITORING REACTIONS, BASED ON MICROREACTORS IN OPTICAL DISKS

(54) Título : DISPOSITIVO INTEGRADO PARA EL SEGUIMIENTO DE REACCIONES BASADO EN MICROREACTORES EN DISCO ÓPTICO

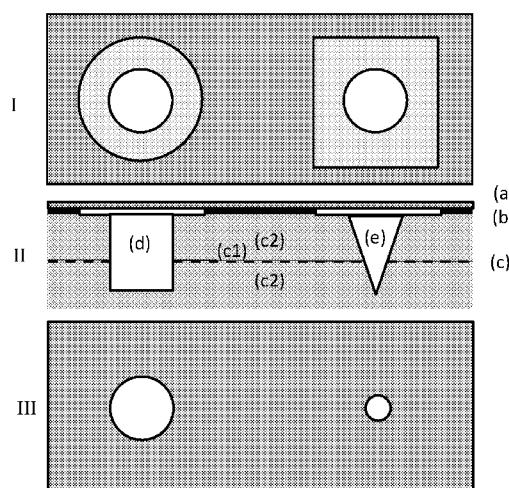


Fig 1.

(57) Abstract: The invention relates to a built-in device for monitoring reactions, comprising: a rotating optical disk comprising non-through microwells perforated therein; and an optical system for detecting a signal indicating the disappearance of reagents and/or the formation of products in said microwells. The invention also relates to a method for monitoring reactions using said device.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un dispositivo integrado para el seguimiento de reacciones que comprende -un disco óptico rotatorio que dispone de micropocillos no pasantes perforados en él, y un -sistema óptico de detección de una señal indicativa de la desaparición de reactivos y/o de la formación de productos en dichos micropocillos, así como a un procedimiento para el seguimiento de reacciones mediante el uso de dicho dispositivo.



WO 2016/151167 A1



CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Publicada:

- *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*
- *con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))*

DISPOSITIVO INTEGRADO PARA EL SEGUIMIENTO DE REACCIONES BASADO EN MICRORREACTORES EN DISCO ÓPTICO

Campo de la invención

- 5 La presente invención se engloba en la tecnología de análisis químico y bioquímico, más concretamente relativa a la monitorización de reacciones que pueden ser procesos químicos, bioquímicos o biológicos, con fines cualitativos o cuantitativos.

Antecedentes de la invención

- 10 El potencial de las herramientas instrumentales en áreas como el control de la seguridad alimentaria, la monitorización de medioambiente y el diagnóstico clínico está altamente reconocido. Muchos métodos se basan en el seguimiento de una reacción con el tiempo e interpretación de las curvas cinéticas registradas. Se han desarrollado diferentes plataformas instrumentales capaces de llevar a cabo estos ensayos de
15 forma parcial o totalmente automatizada.

- Ejemplos destacados son los métodos cuantitativos basados en la amplificación vía reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y detección fluorescente, que son conocidos como PCR cuantitativa (qPCR) o PCR a tiempo real (RT-PCR). Se basan en el estudio cinético del número de copias existentes a lo largo del proceso de
20 amplificación. También destacan los ensayos basados en la medición de la actividad enzimática para establecer la concentración de un analito presente en la muestra. En estos ensayos, se miden las diferencias en los perfiles de respuesta con el tiempo ocasionados por la presencia de compuestos que actúan como inhibidores o activadores de una reacción química o bioquímica. Asimismo, existen métodos que
25 monitorizan en el tiempo procesos biológicos como el crecimiento de células en medios de cultivo.

- Se han descrito diferentes tecnologías capaces de registrar los cambios de las propiedades ópticas de la mezcla a medida que progresa la reacción, lo que permite conocer la cinética y el grado de progreso del proceso en tiempo real. En esta
30 categoría se incluyen instrumentos como los espectrofotómetros, fluorímetros, turbidímetros, entre otros, o instrumentos que incorporan un sistema de detección basado en la medida de propiedades ópticas como los termocicladores empleados en qPCR. Sin embargo, el coste de adquisición y mantenimiento, tamaño, peso y

consumo eléctrico de estos equipos hace que sean adquiridos principalmente por laboratorios centrales bien dotados. Existe, por lo tanto, una gran demanda de nuevas soluciones tecnológicas que eviten dichas limitaciones y amplíen la utilidad de las herramientas basadas en monitorización de la desaparición de reactivos y/o la
5 formación de productos. Una aproximación es el uso de un disco óptico, tal como un disco compacto (CD de ahora en adelante), un *digital versatile disc* (DVD), o un *Blu-Ray disc* (BD) como plataforma de análisis y el uso de lectores de discos ópticos como detectores.

Los artículos S. Morais, J. Carrascosa, D. Mira, R. Puchades, y A. Maquieira
10 "Microimmunoanalysis on standard compact discs to determine low abundant compounds" *Anal. Chem.* 2007, 79, 7628-7635; y S. Morais, J. Carrascosa, J. Tamarit-López, D. Mira, R. Puchades, y A. Maquieira; "Analytical prospect of compact disk technology in immunosensing", *Anal. Bioanal. Chemistry*, 391:2837:2844, describen inmunoensayos realizados en la superficie plana del disco en un formato de
15 micromatrices, generando un producto sólido final que es registrado por un lector de discos. Mientras, en la presente invención se realizan las reacciones en micropocillos ubicados en el sustrato de un disco óptico, lo que permite el continuo seguimiento de las reacciones en disolución por un lector de discos.

En la patente US5892577A se describe el uso de un disco transparente y un lector de
20 discos ópticos para la detección de muestras biológicas, bioquímicas y químicas adheridas a la superficie plana del disco. Mientras que en la presente invención se propone el estudio cinético de reacciones químicas o bioquímicas que tienen lugar en el interior de los micropocillos ubicados en el disco óptico.

En el área de ácidos nucleicos por ejemplo, se conocen métodos en los que un ensayo
25 de hibridación se realiza en la superficie de un disco semitransparente donde están ancladas las sondas. La detección del producto hibridado final tiene lugar mediante precipitación obtenida por reacción de un marcador de oro y una disolución de sales de plata, por ejemplo en el trabajo de Alexandre y cols. (*Biotechniques*. 2002, 33(2):435-439), se describe un ensayo de hibridación de fragmentos de ADN, los
30 cuales son previamente amplificados por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fuera del disco compacto. En la presente invención, para el caso de los ácidos nucleicos, no existe un proceso de hibridación del producto de amplificación, sino una reacción de amplificación isoterma de los ácidos nucleicos. Dicha reacción tiene lugar en el interior de los micropocillos de un disco óptico, además la medida es
35 a tiempo real, es decir, que tanto la amplificación como la detección tienen lugar en la

misma plataforma de análisis y de manera sincrónica, mediante el escaneo continuo del disco óptico.

Otros métodos y dispositivos de análisis, como el método descrito en WO9935499 (*Method comprising capture molecule fixed on disc surface*) se refiere a la detección y/o método de cuantificación de una molécula diana mediante su unión con una molécula de captura fijada en la superficie de un disco. Se propone la posibilidad de realizar la amplificación del ADN mediante PCR en fase sólida sobre el soporte plano (bidimensional). Así la reacción da lugar a productos de amplificación directamente anclados a la superficie del disco, sin tener que llevar a cabo la fase de hibridación. Sin embargo, según la presente invención la amplificación del ADN se realiza a temperatura constante en un micropocillo (tridimensionales) y se monitoriza la reacción a tiempo real, lo que permite su cuantificación.

En el documento EP1324042 (*Detection and/or quantification method of a target molecule by a binding with a capture molecule fixed on the surface of a disc*) se propone un método para la detección y/o la cuantificación de una molécula diana mediante su unión con una molécula de captura fijada en el lado de un disco, mientras que en el lado opuesto se almacenan los datos registrados. En la reivindicación 1, se describen diferentes cámaras colocadas en serie para llevar a cabo etapas de extracción, amplificación e hibridación de ácidos nucleicos. Como en el documento anterior, se hace referencia a la posibilidad de realizar amplificación en fase sólida. Sin embargo, no se menciona la posibilidad de realizar la amplificación a tiempo real y en disolución como se describe en la presente invención.

El artículo "Detection of food-borne pathogens with DNA arrays on disk"; *Talanta* 2012, 101: 405-412, propone el empleo de DVDs como plataforma bioanalítica, mientras que en "High density MicroArrays on Blu-ray discs for massive screening" *Biosens. Bioelecton.* 2014, 51: 109-114, se propone el empleo de discos tipo Blu-ray. En ellos se determinan ácidos nucleicos mediante métodos basados en la amplificación fuera del disco y posterior ensayo de hibridación en la superficie del mismo (bidimensional). La detección se efectúa a partir de la formación de un precipitado relacionado con la extensión de la reacción de hibridación sonda-diana y posterior medida a tiempo final.

Las solicitudes de patente WO 2006121266, WO2007073107 y WO2006118420 divulgan un dispositivo microfluídico. Es decir, un sistema de cámaras y válvulas para el control del movimiento de fluidos a baja escala. Dicho dispositivo es un sistema centrífugo pero no un disco de audio-video. El sistema funciona secuencialmente, de modo que primero tiene lugar la amplificación y posteriormente la hibridación, tal como

se describe en las reivindicaciones del documento WO2006121266, o en el documento WO2006118420. La amplificación por PCR, la hibridación y la detección enzimática tienen lugar en cámaras diferentes y el paso de una a otra se controla mediante un sistema de válvulas, bombeo y centrifugación. La presente invención difiere en que la
5 amplificación y la detección tienen lugar de manera simultánea y en el mismo micropocillo, sin necesidad de reacciones enzimáticas de detección ni de estructuras microfluídicas. Además, en la presente invención la amplificación-detección opera a tiempo real, es decir se obtiene información durante el proceso (datos cinéticos) y no al final como ocurre en las citadas publicaciones.

- 10 Respecto a los procesos de control de la temperatura, las tres solicitudes internacionales mencionadas se basan en una amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa PCR por termociclado donde la temperatura oscila de forma repetitiva. La presente invención se basa en un dispositivo con micropocillos que difiere de un dispositivo microfluídico. Además, cuando se trabaja con ácidos nucleicos
15 la amplificación es isoterma de modo que la temperatura se mantiene constante a lo largo del proceso y la detección es a tiempo real.

A la vista del estado de la técnica se observa que por un lado, sigue existiendo la necesidad de disponer de dispositivos y métodos de análisis químicos y bioquímicos más eficaes, que permitan la detección de la señal resultante del ensayo en tiempo
20 real, además de efectuar un seguimiento continuo del ensayo para poder tomar decisiones basadas en dicha señal de modo inmediato.

El dispositivo de la invención permite seguir el análisis dando información sobre la cinetica del ensayo, integrando la propia reacción y la detección, y con el que se ha conseguido además miniaturizar esta tecnología, haciéndola mucho más eficaz.

25

Descripción de la invención

Se ha desarrollado un dispositivo integrado para el seguimiento de reacciones basado en el sensado mediante la tecnología de disco óptico que integra el desarrollo de la reacción y la detección en un único dispositivo, que a su vez puede estar integrado en
30 una plataforma analítica. Para ello, se ha diseñado, desarrollado y puesto a punto la metodología de ensayo y los componentes que constituyen el sistema analizador / detector.

Así, la presente invención se refiere en primer lugar a un dispositivo integrado para el seguimiento de reacciones, que pueden ser procesos químicos, bioquímicos o biológicos, que comprende:

- un disco óptico rotatorio que dispone de micropocillos no pasantes perforados en él, y un
- sistema óptico de detección de una señal indicativa de la desaparición de reactivos y/o de la formación de productos en dichos micropocillos.

Dichas reacciones pueden ser la expresión de un proceso químico, bioquímico o biológico, o formar parte de un proceso de cualquiera de los tres mencionados.

En el dispositivo integrado de la invención, el disco óptico se compone de al menos:

- un disco de audio-vídeo modificado de modo que contiene los micropocillos integrados en él
- una capa polimérica intermedia de material adhesivo que comprende cámaras coincidentes con los micropocillos, y
- una capa superior protectora de sellado total o parcial del disco.

El disco de audio-vídeo se refiere a todos aquellos discos que pueden actuar como medio de almacenamiento de datos. En esta categoría, se incluyen discos compactos CD, tipo *digital versatile disc* DVD y *Blu-Ray disc* BD en sus diferentes aproximaciones, aunque no se excluyen otros tipos de discos basados en las mismas tecnologías.

De modo general, el patrón de codificación de la información se basa en los surcos microscópicos generados sobre la capa inferior del disco. Dichos surcos siguen un recorrido en espiral continuo que cubre la superficie del disco de audio-video entera, extendiéndose desde la pista más interna hasta la más externa. El disco óptico según realizaciones concretas comprende una zona en forma de corona circular próxima al eje de rotación que comprende un elemento codificado y una segunda zona en forma de corona circular de radio mayor que la anterior y que corresponde a una zona de análisis en la que se encuentran los micropocillos. El acceso a los datos, lectura, se realiza cuando esta superficie es iluminada con un haz de láser generado por un diodo láser presente en una unidad lectora/grabadora de discos ópticos, la cual hace girar el

disco a velocidades variables que pueden alcanzar hasta las 2000 rpm. Los surcos en la superficie modifican el comportamiento del haz de láser reflejado en la capa metálica del disco de audio-video decodificando la información que contienen.

- 5 Las capas del disco comercial de audio-vídeo (capa metálica y de policarbonato) están ya en el disco de partida y tienen un espesor y composición común a todos los discos ópticos comerciales estándar (ver Figura 1, II, Capas C1 y C2).

En la superficie superior - capa superior - del disco óptico, se ha vaciado el sustrato para crear micropocillos. Este diseño permite realizar las reacciones de forma efectiva
10 sin pérdida de las propiedades ópticas y mecánicas del disco.

Los micropocillos tienen dimensiones entre nanométricas y micrométricas. Además, también pueden tener formas diversas, como circular y poligonal (hexagonal, pentagonal, triangular, rectangular, cuadrangular, hexagonal, etc.). Además, los micropocillos pueden estar posicionados en el disco óptico con configuraciones de
15 múltiples formas, por ejemplo, configuración radial, circular, con formato de matriz, etc.

El tamaño, forma y configuración de los micropocillos influye en el desarrollo de la reacción y condiciona aspectos como: volumen de cada micropocillo, afectando a la cantidad de reactivos y muestras necesarios; densidad de micropocillos del disco (número de pocillos/unidad de área), determinando el número total de muestras que
20 son analizadas por disco; registro generado por el lector, en términos de número de datos proporcionados por cada micropocillo.

Los micropocillos están realizados de tal manera que no aborten la lectura del disco óptico. La fabricación de los micropocillos en el policarbonato del disco óptico puede realizarse empleando instrumentos como taladros de control numérico (con brocas de
25 diferentes formas y tamaños), cortadoras láser, o similares.

La capa intermedia del disco óptico la compone un material polimérico de espesor variable a conveniencia (entre 0,05 y varios mm), que debe adherirse al ser unido a los materiales de las capas adyacentes. A modo de ejemplo, puede ser cualquier polímero adherente convencional o material polimérico combinado con un pegamento o
30 adhesivo. En los ejemplos de la invención se ha utilizado un polímero adherente, comercialmente disponible (material adhesivo de dos caras).

La capa superior protectora del disco óptico es una película polimérica que cubre totalmente la superficie del disco o bien cubre sólo aquellos micropocillos objeto de

ensayo, y se compone de al menos un polímero o composite que permita el sellado efectivo, la esterilización, el desarrollo de la reacción objeto del ensayo y el paso de la radiación de lectura.

El sistema óptico de detección comprende un equipo de lectura / escritura. El equipo
5 de lectura puede ser un lector de discos compactos comercial que incorpora un cabezal láser, un analizador de transmisión y una tarjeta de adquisición de datos. El lector es una unidad lectora/grabadora de discos capaz de rotar el disco y que usa un cabezal láser como parte del proceso de lectura/escritura de los datos codificados en los discos ópticos. Dicho cabezal contiene al menos un emisor láser, una lente que
10 guía el haz de láser y un fotodiodo que detecta la luz reflejada en la superficie del disco. El analizador de transmisión puede ser un fotodiodo o un sistema similar y se ubica en línea (180°) con el haz láser, midiendo la intensidad de luz que atraviesa el disco procedente del cabezal.

Tanto el analizador de transmisión como la tarjeta de adquisición de datos pueden ser
15 comerciales. El principio de lectura se describe en el artículo de Morais *et al.* "Microimmunoanalysis on standard compact discs to determine low abundant compounds" *Anal. Chem.* 2007, 79, 7628-7635. El sistema detector se aprovecha de la emisión de un haz láser desde el cabezal de la unidad lectora para el seguimiento de la espiral de los surcos microscópicos del disco óptico y la medida de la variación de la
20 intensidad de luz reflejada. Además, el analizador de transmisión detecta la luz láser transmitida que atraviesa el disco óptico y la convierte en una señal eléctrica analógica. En la presente invención, la intensidad del haz láser registrada es aquella reflejada en el micropocillo (reflexión) o aquella transmitida al atravesar el micropocillo (transmisión).

25 Todo el equipo de lectura, incluyendo reconocimiento del tipo de disco, giro del disco, potencia del láser, captura de la señal, tratamiento de datos y presentación de resultados, está gobernado por un programa informático. La información del experimento es transferida al motor que desplaza el cabezal óptico, al fotodiodo del cabezal, al analizador de transmisión y al motor de giro del disco. Esto permite el
30 escaneado de la superficie y registro de la señal asociada a los micropocillos de forma puntual, continua o cíclica. Las señales registradas son analizadas realizándose actividades como evaluación de parámetros (ej. relación señal-ruido), comparación con controles, calibración e interpolación de muestras.

Según realizaciones particulares, el sistema óptico de detección está dotado de un medio de termostatación integrado o auxiliar. En su aproximación más simple puede ser un sistema calefactor/refrigerador por aire incorporado en el lector. Está compuesto por una resistencia generadora de calor a partir de energía eléctrica, un ventilador que disipa el aire caliente y un termostato que mantiene la temperatura constante durante el transcurso de la reacción y la lectura. También puede emplearse una cámara de control de temperatura o estufa donde se introduce el lector, o alternativamente se puede trabajar utilizando una lámpara infrarroja que ilumina el disco.

10 Con el dispositivo de la invención se pueden realizar ensayos en los que la reacción generadora de la señal que se detecta tiene lugar en disolución, aunque también puede tener lugar una reacción heterogénea que origine un producto sólido.

El dispositivo de la invención permite realizar un seguimiento en tiempo real de procesos químicos, bioquímicos o biológicos, al poder tener información continuada de dicho proceso gracias a la detección permanente del progreso del mismo, en el momento justo en que se está produciendo la reacción que genera la señal detectada por el lector de discos.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para el seguimiento de reacciones o realizar estudios cinéticos, o lo que es lo mismo, para el seguimiento de procesos químicos, bioquímicos o biológicos, usando el dispositivo descrito.

El procedimiento de la invención para realizar estudios cinéticos de reacciones, usando el dispositivo descrito, comprende al menos:

- dispensar muestras y reactivos en micropocillos perforados en un disco óptico rotatorio,
- 25 - monitorizar en tiempo real una señal indicativa del progreso del proceso, procedente de la desaparición de reactivos y/o de la formación de productos en dichos micropocillos, mientras dicho disco óptico gira.

Las reacciones pueden consistir en, o formar parte de procesos químicos, bioquímicos o biológicos de todo tipo, tales como por ejemplo: análisis de ácidos nucleicos, análisis de actividad enzimática, crecimiento de un microorganismo, crecimiento de cultivos celulares, experimentos sobre inmunoensayos etc.

La detección puede tener lugar mediante un lector de disco óptico que es capaz de registrar las variaciones en la intensidad del láser emitido por un lector de discos, basándose en los principios de detección por reflexión o por transmisión del láser mediante el fotodiodo del cabezal o mediante el analizador de transmisión.

- 5 Según realizaciones concretas del procedimiento, la monitorización comprende la detección de la señal mediante un lector de discos que escanea los micropocillos de forma recurrente midiendo la intensidad de un láser que es reflejado o transmitido a través del contenido de cada pocillo.

10 El sistema óptico de detección puede registrar las variaciones de la intensidad del láser de forma puntual, continua o cíclica.

El procedimiento puede comprender añadir a los micropocillos, además de las muestras y reactivos para el ensayo característicos del proceso objeto de estudio, reactivos seleccionados entre colorimétricos, turbidimétricos, reflectométricos, refractométricos, interferométricos y mezclas de los mismos. Así por ejemplo, la
15 monitorización puede comprender la detección cíclica mediante lectura turbidimétrica o absorciométrica de los productos de reacción, permitiendo conocer la cinética y el grado de progreso del proceso en tiempo real.

Los reactivos necesarios pueden estar en disolución o anclados a la superficie del pocillo. Durante el transcurso de la reacción, los reactivos iniciales o productos
20 resultantes son analizados en el mismo micropocillo.

El procedimiento puede comprender además una etapa de sellado del disco óptico con una película protectora que cubre total o parcialmente dicho disco.

Según realizaciones concretas el procedimiento comprende la detección a tiempo real de un reactivo o producto específico, en condiciones de temperatura constante. Para
25 ello, al mismo tiempo que se efectúa la ejecución del control de la temperatura de trabajo, el lector de discos escanea los micropocillos de forma recurrente. La variación en la intensidad de la luz láser se relaciona con el avance de una reacción química o bioquímica. En concreto, se realiza la medida de la intensidad de un haz láser que es reflejado o transmitido a través de, preferentemente, la disolución contenida en cada
30 pocillo. De este modo, se obtienen registros cinéticos, cuyo perfil se relaciona con la concentración del analitos de interés o con parámetros de cinética química o bioquímica.

Una realización preferente del procedimiento es el análisis de ácidos nucleicos en el que se realiza la detección a tiempo real de productos generados por reacciones de amplificación isoterma de ácidos nucleicos desarrolladas en disolución.

Según una realización preferente adicional del procedimiento, se realiza la detección a tiempo real de la evolución de una reacción a temperatura constante y catalizada química o enzimáticamente. En una realización más concreta del procedimiento, la reacción es una reacción enzimática y se lleva a cabo el análisis de la actividad enzimática.

La reacción se realiza preferentemente en disolución en cada micropocillo y los productos resultantes son analizados en el mismo micropocillo.

Según una realización preferente adicional del procedimiento se monitoriza el crecimiento de un cultivo microbiológico o celular.

Según una realización preferente adicional del procedimiento se monitorizan experimentos sobre inmunoensayos.

Se consigue mediante la presente invención que el lector de discos no se pare, y por tanto que no se aborte la lectura, mientras el disco sigue girando.

Por lo tanto, la presente invención se refiere también a una plataforma analítica caracterizada porque comprende el dispositivo integrado de seguimiento de reacciones descrito.

Esta plataforma analítica es capaz de registrar los cambios en las propiedades ópticas de las disoluciones, mezclas o especies contenidas en los micropocillos. También es capaz de obtener resultados en tiempo real o al final de las reacciones, detectando los reactivos, intermediarios y/o productos de reacción. Permite también la detección de la evolución de reacciones, así como realizar la lectura turbidimétrica, absorciométrica, reflectométrica, refractométrica y/o interferométrica a medida que progresa la reacción (medidas cinéticas) y/o el estado tras la finalización de la misma.

Con esta plataforma analítica se puede llevar a cabo una detección cualitativa y cuantitativa de los analitos de interés al hacer reaccionar con los reactivos (incluyendo o no un reactivo turbidimétrico, colorimétrico o reflectométrico) en el interior de los micropocillos. Los analitos de interés son preferentemente, determinadas regiones de ácidos nucleicos, inhibidores o activadores de actividad enzimática, entre otros.

La invención descrita tiene las siguientes diferencias respecto al estado de la técnica y que aportan las siguientes ventajas cuantificables y demostrables:

- detección a tiempo real, con lo que todo el proceso está integrado espacial y temporalmente en el mismo micropocillo del disco óptico, y con lo que se obtiene su cinética,
- posibilidad de realizar la reacción en disolución en el interior de los micropocillos sitios en el disco óptico,
- uso de discos ópticos legibles por un lector de discos,
- desarrollo de la reacción a temperatura constante en disolución en el seno de micropocillos situados en el propio sustrato del disco,
- el sistema de termostatación es versátil,
- los reactivos específicos están diseñados de acuerdo a las propiedades del disco óptico de análisis y el detector, que incluye los discos objeto de la patente y un lector/grabador/reproductor de tales discos,
- lector: se propone un sistema para obtener los perfiles cinéticos basado en el registro de la señal reflejada y/o transmitida (de forma simultánea o no) del haz láser emitido por un lector de discos al mismo tiempo que se produce la lectura, simulación o grabación de un disco de audio-video,
- se describe un sistema integrado de detección óptica no fluorescente para la monitorización de reacciones.

El nuevo desarrollo puede utilizarse en una amplia variedad de escenarios, tanto en investigación como en desarrollo y control de calidad en muy diferentes ámbitos, dado el carácter genérico de las reacciones consideradas y la detección utilizada.

La invención descrita además, ofrece las siguientes ventajas:

1. Utilizar volúmenes de muestra muy reducidos, del orden de 0,5-10 microlitros de extracto de suero, plasma, orina, saliva, cultivos celulares, homogeneizados de tejidos, alimentos, etc.

2. Minimizar la manipulación de muestra

3. Ahorrar significativamente en reactivos

4. Alcanzar elevadas sensibilidades
5. Gran capacidad de trabajo pudiendo procesar simultáneamente hasta 500 muestras diferentes o un número proporcional de réplicas.
6. Trabajar en tiempos de ensayo reducidos, 10-120 minutos.
- 5 7. Sistema realmente portátil y robusto que permite trabajar en lugares poco dotados o en campo, es decir en lugares próximos a los puntos de necesidad de la información, sin más que contar con un medio de termostatación autónomo (estufa de incubación), discos ópticos y lector de discos.
8. Requerir un mantenimiento mínimo y tener un consumo energético muy bajo lo que
- 10 permite utilizarlo con pilas o con fuentes de baja potencia (células solares, etc.).
9. Precio del material fungible (discos) y equipamiento extraordinariamente competitivos, con un coste del orden de 300€/detector, por lo que no se requieren inversiones significativas de capital, ni en infraestructura, ni en equipamiento.
10. Integrar la reacción y la detección en un único sistema
- 15 11. Permitir realizar reacciones de forma efectiva sin pérdida de las propiedades ópticas del disco.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una realización particular del disco óptico, incluyendo las capas, que pueden ser utilizadas en el disco óptico de la invención. En concreto muestra la

20 sección superior (I), transversal (II) e inferior (III) de dos micropocillos en la plataforma. En dicha figura, se muestra la capa de sellado (a), capa polimérica adhesiva con cámaras (circular y rectangular) (b), disco óptico (c), que en este caso a su vez está formado por una capa metálica (c1) entre dos capas poliméricas (policarbonato) (c2).

25 En la figura se muestra a modo de ejemplo un pocillo cilíndrico (d) y un micropocillo cónico (e).

La Figura 2 muestra formatos particulares de la distribución de los pocillos en el disco. La figura 2a muestra un disco con 8 matrices de 5 micropocillos (diámetro 2 mm). La figura 2b muestra un disco con 99 micropocillos (diámetro 1 mm).

30 La Figura 3 muestra el esquema de una realización del dispositivo y lector de discos con los elementos más importantes que lo componen. La termostatación se logra mediante un sistema auxiliar e independiente del disco y del lector que crea las

condiciones térmicas requeridas. Los componentes del dispositivo integrado para análisis mostrados en la figura 3 son:

- 1 disco óptico
- 2 motor que hace girar el disco óptico
- 5 3 unidad de proceso – controlador/adquisición de datos
- 4 cabezal láser (emisor del láser, analizador de reflexión)
- 5 micropocillo
- 6 analizador de transmisión
- 7 sistema de termostatación.

10 La Figura 4 muestra un esquema del diagrama de control de programa informático que controla el sistema óptico de detección.

La Figura 5 ilustra como la señal registrada durante el escaneo del disco óptico cambia en función de si el láser incide sobre las zonas del disco sin modificar (línea base) y sobre los pocillos. La figura 5a muestra los registros obtenidos durante el escaneado de tres pocillos consecutivos midiendo la intensidad de láser reflejada. La figura 5b muestra los registros obtenidos durante el escaneado de tres pocillos consecutivos midiendo la intensidad de láser transmitida.

La Figura 6 ilustra un ejemplo donde las propiedades ópticas de la disolución cambian con el tiempo dependiendo si la muestra contiene el analito de interés o no. Muestra la evolución temporal del contenido de un pocillo para una muestra negativa o sin la molécula diana (a) y para una muestra positiva o con la molécula diana.

La Figura 7 muestra perfiles cinéticos netos (densidad óptica-tiempo) registrados por el lector de discos compactos durante la monitorización de un reactivo (a) y durante la monitorización de un producto (b).

25 La Figura 8a muestra los resultados de ensayo de amplificación de ADN a tiempo real del ejemplo 1.1. En este experimento de análisis de ADN se observa una relación entre la señal medida (densidad óptica) y la concentración de ADN (patógeno *Salmonella*). La Figura 8b muestra los resultados del mismo experimento de análisis de ADN, en la que se observa que el tiempo umbral fue menor conforme aumentaba la concentración de ADN inicial (relación lineal).

La Figura 9a muestra los resultados de ensayo de amplificación de ADN a tiempo real del ejemplo 1.2. En este experimento de análisis de ADN se observa una relación entre la señal medida (densidad óptica) y la concentración de ADN (carne de ternera). La Figura 9b muestra los resultados del mismo experimento de análisis de ADN, en la que se observa que el tiempo umbral fue menor conforme aumentaba la concentración de ADN inicial (relación lineal).

La Figura 10 muestra los resultados del ejemplo de ensayo de actividad enzimática del ejemplo 2.1, en la que se observa que a mayor concentración de extracto de enzima, aumenta la señal con el tiempo, lo que indica una mayor velocidad de reacción.

La Figura 11 muestra los resultados del ejemplo de ensayo de inhibición enzimática del ejemplo 2.2, en la que se observa que a mayor concentración del inhibidor (ácido L-ascórbico), disminuye la señal con el tiempo, lo que indica una menor velocidad de reacción.

Ejemplos de realización de la invención:

Ejemplo 1. Amplificación de ADN a tiempo real

Se lleva a cabo una reacción de amplificación isoterma mediante la enzima *Bst* DNA polimerasa.

La capa inferior del disco consistió en un DVD con 90 pocillos realizados mediante un taladro, gobernado por un equipo de control numérico. La profundidad de los pocillos en este ejemplo fue de 1,1 mm y el diámetro fue 1,0 mm.

La segunda capa - capa intermedia - del disco consistió en un adhesivo de doble cara sensible a la presión de un grosor de 0,08 mm.

La capa superior estaba compuesta por una hoja de acetato de celulosa usada para sellar el sistema y el volumen total de cada micorreactor fue de 3 μ L.

La capa intermedia y la de sellado se prepararon mediante un plotter de corte y se unieron al disco por adhesión.

La reacción de amplificación de ADN se llevó a cabo a una temperatura constante de 65 °C y el lector realizó una medida, en cada micorreactor secuencialmente cada 2 min. Como valor umbral se tomó la señal correspondiente a 3 veces la desviación estándar del fondo. El tiempo necesario de cada muestra para exceder dicha señal se define como el tiempo umbral.

- Ejemplo 1.1. Detección de *Salmonella* spp.

La cepa de referencia elegida fue *Salmonella* spp. serotipo Typhimurium grupo B (CECT 443), y la secuencia de interés el gen *invA*.

La mezcla de reacción contenía tampón de reacción 1 × ThermoPol® Reaction Buffer, 6 mM MgCl₂, 1,2 μM dNTPs, 8 U de la enzima, 1600 nM de los cebadores ceb-1.1 y ceb-1.2, 200 nM de los cebadores ceb-1.3 y ceb-1.4, 800 nM de los cebadores ceb-1.5 y ceb-1.6 (Tabla 1), y 120 μM del indicador azul de hidroxinaftol. A cada micorreactor se le añadieron 2,5 ng de extracto de ADN procedente de cultivo bacteriano puro, cubriendo un intervalo entre 10⁴ y 0 u.f.c./mL.

10 Tabla 1. Secuencias de los cebadores para la amplificación de *Salmonella* spp.

Cebador	Secuencia 5'-3'
ceb-1.1	CGGCCCGATTTTCTCTGG
ceb-1.2	CGGCAATAGCGTCACCTT
ceb-1.3	GCGCGGCATCCGCATCAATATGCCCGGTAAACAGATGAGT
ceb-1.4	GCGAACGGCGAAGCGTACTGTCTGCACCGTCAAAGGAAC
ceb-1.5	GGCCTTCAAATCGGCATCAAT
ceb-1.6	GAAAGGGAAAGCCAGCTTTACG

El indicador cambió de color violeta al azul en presencia del ADN diana, produciendo un aumento en la señal de absorbancia registrada durante la amplificación.

15 Los resultados mostraron una relación lineal entre la señal medida (densidad óptica) y la concentración de ADN (Figura 7a). Además, el tiempo umbral fue menor conforme aumentaba la concentración de ADN inicial (Figura 7b).

De acuerdo con la lista de secuencias que acompaña esta descripción la correspondencia es la siguiente:

20 ceb-1.1: SEQ ID NO: 1

ceb-1.2: SEQ ID NO: 2

ceb-1.3: SEQ ID NO: 3

ceb-1.4: SEQ ID NO: 4

ceb-1.5: SEQ ID NO: 5

ceb-1.6: SEQ ID NO: 6

- Ejemplo 1.2. Detección de la presencia de carne de ternera.

- 5 La molécula diana era un gen de ADN mitocondrial bovino, específico para la especie *Bos primigenius taurus*.

La mezcla de reacción se compuso del tampón de reacción 1 × ThermoPol® Reaction Buffer, 6 mM MgCl₂, 1,2 μM dNTPs, 16 U de la enzima, 1600 nM de los cebadores ceb-2.1 y ceb-2.2, 200 nM de los cebadores ceb-2.3 y ceb-2.4 (Tabla 2). A cada micro-
10 reacción se le añadieron 2,5 ng de extracto de ADN procedente de carne de ternera cubriendo un intervalo entre 10⁵ y 0 μg/g.

Tabla 2. Secuencias de los cebadores para la amplificación de carne de bovino.

Cebador	Secuencia 5'-3'
ceb-2.1	CACCAATTCTTGCTAATACAGT
ceb-2.2	CACTCTATTCTTAGTTTACTGCTAA
ceb-2.3	ACACCTTGACCTAACGTTTTTATGTCTATATACCGCCATCTTCAGC
ceb-2.4	TGAAATGGGAAGAAATGGGCTACCCTCCTTTGGTTATTGGTTTC

- La presencia del gen diana originaba la formación de un precipitado de pirofosfato de
15 magnesio, que podía monitorizarse por la medida de la turbidez de la disolución. Los resultados mostraron una relación lineal entre la señal medida y la concentración de ADN (Figura 8a). Además, el tiempo umbral fue menor conforme aumentaba la concentración de ADN inicial (Figura 8b).

- De acuerdo con la lista de secuencias que acompaña esta descripción la
20 correspondencia es la siguiente:

ceb-2.1: SEQ ID NO: 7

ceb-2.2: SEQ ID NO: 8

ceb-2.3: SEQ ID NO: 9

ceb-2.4: SEQ ID NO: 10

Ejemplo 2. Medidas de actividad enzimática

Los métodos de barrido de alta capacidad tienen un papel clave en la búsqueda de nuevas enzimas, sistemas de conservación de alimentos, fármacos, etc. Las determinaciones basadas en la medida de la actividad enzimática o la medida de inhibición son ensayos comunes.

Como ejemplo de la capacidad de la invención, se ha aplicado al estudio de la actividad enzimática de peroxidasas, un tipo de enzimas muy extendidas en todo el árbol filogenético de la vida, actuando en los mecanismos de defensa de los organismos, síntesis de hormonas, funciones anti-oxidantes, etc. Catalizan reacciones bisustrato de carácter redox, utilizando un peróxido como oxidante y un segundo sustrato de características reductoras que es oxidado por el peróxido:



Para estos ensayos se empleó un dispositivo con pocillos en formato matriz. La capa inferior del disco consistió en un DVD con 40 pocillos (8 matrices de 5 pocillos cada una) fabricados según se ha descrito más arriba, siendo en este caso su capacidad 5 μL .

La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y el lector realizó una medida cada 60 s.

- Ejemplo 2.1 Medida de la actividad enzimática

Se trata de una aplicación para demostrar la capacidad de la invención para determinar la acción catalítica de las enzimas presentes en lisados celulares. Para la obtención del extracto de peroxidasas, se trituraron 0,2 g de material vegetal en 6 mL de tampón fosfato 0,2 M, pH 7,5. El homogeneizado resultante se centrifugó a 12.000 r.p.m. durante 30 min y se recuperó el sobrenadante, en el cual se halla el extracto enzimático. La cuantificación de la enzima se realizó midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro UV/visible a $\lambda=403$ nm.

La mezcla de reacción contenía tampón citrato 0,025 M pH 4,5, peróxido de hidrógeno 0,002 M, sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina a concentración 0,25 g/L y diferentes concentraciones del extracto enzimático: 0 – 0,05 – 0,1 – 0,15 – 0,2 – 0,25 nM. El sustrato se transforma a un producto de color azul produciendo un aumento en la señal de absorbancia registrada por el lector durante la reacción.

Los resultados mostraron que a mayor concentración de extracto de enzima, aumenta la señal con el tiempo, lo que indica una mayor velocidad de reacción, según se muestra en figura 9.

5 - Ejemplo 2.2 Inhibición de la actividad enzimática

Diferentes compuestos pueden actuar como inhibidores en la acción catalítica de peroxidasas en la reacción entre el peróxido de hidrógeno y compuestos dadores de hidrógeno. Como ejemplo de la capacidad de la invención, se ha caracterizado la inhibición del ácido L-ascórbico sobre la enzima peroxidasa de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*).

La mezcla de reacción contenía tampón cítrico/citrato 0,025 M pH 4,5, peróxido de hidrógeno 0,002 M, sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) o ácido 2'2-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico] (ABTS) a concentración 0,25 g/L, enzima HRP a 0,25 nM y ácido L-ascórbico a diferentes concentraciones: 0 – 20 – 40 – 80 – 100 nM. Los resultados mostraron que a mayor concentración de ácido L-ascórbico, se produjo una mayor inhibición enzimática, y por tanto, una menor velocidad de reacción, permitiendo correlacionar la concentración de inhibidor presente con la variación en la cinética de la reacción, según se muestra en la figura 10.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo integrado para el seguimiento de reacciones que pueden ser procesos químicos, bioquímicos o biológicos que comprende
 - un disco óptico rotatorio que dispone de micropocillos no pasantes perforados en él, y un
 - sistema óptico de detección de una señal indicativa de la desaparición de reactivos y/o de la formación de productos en dichos micropocillos.
2. Un dispositivo según la reivindicación 1, en el que el disco óptico está seleccionado entre un disco compacto CD, *digital versatile disc* DVD y *Blu-Ray disc* BD.
3. Un dispositivo según una de las reivindicaciones 1 o 2, en el que los micropocillos tienen dimensiones comprendidas entre dimensiones del orden de nanómetros y del orden de milímetros.
4. Un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, en el que los micropocillos tienen formas seleccionadas entre circular y poligonal.
5. Un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4, en el que los micropocillos tienen formas rectangular o hexagonal.
6. Un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los micropocillos están posicionados en el disco óptico con configuraciones seleccionadas entre radial, circular y con formato de matriz.
7. Un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el disco se compone, al menos, de:
 - un disco de audio-vídeo que se ha modificado de modo que contiene los micropocillos integrados en él
 - una capa polimérica intermedia de material adhesivo que comprende cámaras coincidentes con los micropocillos y
 - una capa superior protectora de sellado total o parcial del disco.
8. Un dispositivo según la reivindicación 7, en el que la capa superior es una película polimérica o de composite, que cubre totalmente la superficie del disco o sólo los micropocillos objeto de ensayo.
9. Un dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el sistema óptico de detección comprende un equipo de lectura / escritura que comprende:

- un lector de discos compactos capaz de hacer rotar el disco,
- un cabezal láser,
- un analizador de transmisión y
- una tarjeta de adquisición de datos.

5 10. Un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sistema óptico de detección está dotado de un sistema de termostatación integrado o auxiliar.

11. Un dispositivo según la reivindicación 10 en el que el sistema de termostatación está seleccionado entre un sistema calefactor/refrigerador por aire incorporado en el
10 lector, una cámara de control de temperatura o estufa donde se introduce el lector, o una lámpara infrarroja que ilumina el disco.

12. Un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un motor que hace girar el disco.

13. Una plataforma analítica caracterizada porque comprende el dispositivo integrado
15 de seguimiento de reacciones definido en una de las reivindicaciones 1 a 12.

14. Un procedimiento para el seguimiento de un proceso químico, bioquímico o biológico, usando el dispositivo descrito en una de las reivindicaciones 1 a 12.

15. Procedimiento según la reivindicación 14, que comprende al menos:

- dispensar muestras y reactivos en micropocillos perforados en un disco óptico
20 rotatorio,

- monitorizar en tiempo real una señal indicativa del progreso del proceso procedente de la desaparición de reactivos y/o de la formación de productos en dichos micropocillos, mientras dicho disco óptico gira.

16. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que en la monitorización
25 comprende la detección de la señal mediante un lector de discos que escanea los micropocillos de forma recurrente midiendo la intensidad de un láser que es reflejado o transmitido a través del contenido de cada pocillo.

17. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, en el que el cabezal láser proporciona variaciones de señal de forma puntual, continua o cíclica.

30 18. Procedimiento según la reivindicación 15 que comprende añadir a los micropocillos además de las muestras y reactivos, reactivos seleccionados entre colorimétricos,

turbidimétricos, reflectométricos, refractométricos, interferométricos y mezclas de los mismos.

19. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en el que la monitorización comprende la detección mediante lectura turbidimétrica o
5 absorciométrica, cíclicamente, de los productos de reacción, permitiendo conocer la cinética y el grado de progreso del proceso en tiempo real.

20. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en el los reactivos necesarios pueden estar en disolución o anclados a la superficie del pocillo, de manera que, durante el transcurso de la reacción y, los reactivos iniciales o
10 productos resultantes son analizados en el mismo micropocillo.

21. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, que comprende además una etapa de sellado del disco óptico con una película protectora que cubre total o parcialmente dicho disco.

22. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, en el que se
15 realiza la detección a tiempo real de productos generados por reacciones de amplificación isoterma de ácidos nucleicos desarrolladas en disolución.

23. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, en el que se realiza la detección a tiempo real de la evolución de una reacción a temperatura constante y catalizada química o enzimáticamente.

20 24. Procedimiento según la reivindicación 23, en el que la reacción es una reacción enzimática y se analiza la actividad enzimática.

25. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, en el que se monitoriza el crecimiento de un cultivo microbiológico o celular o experimentos sobre inmunoensayos.

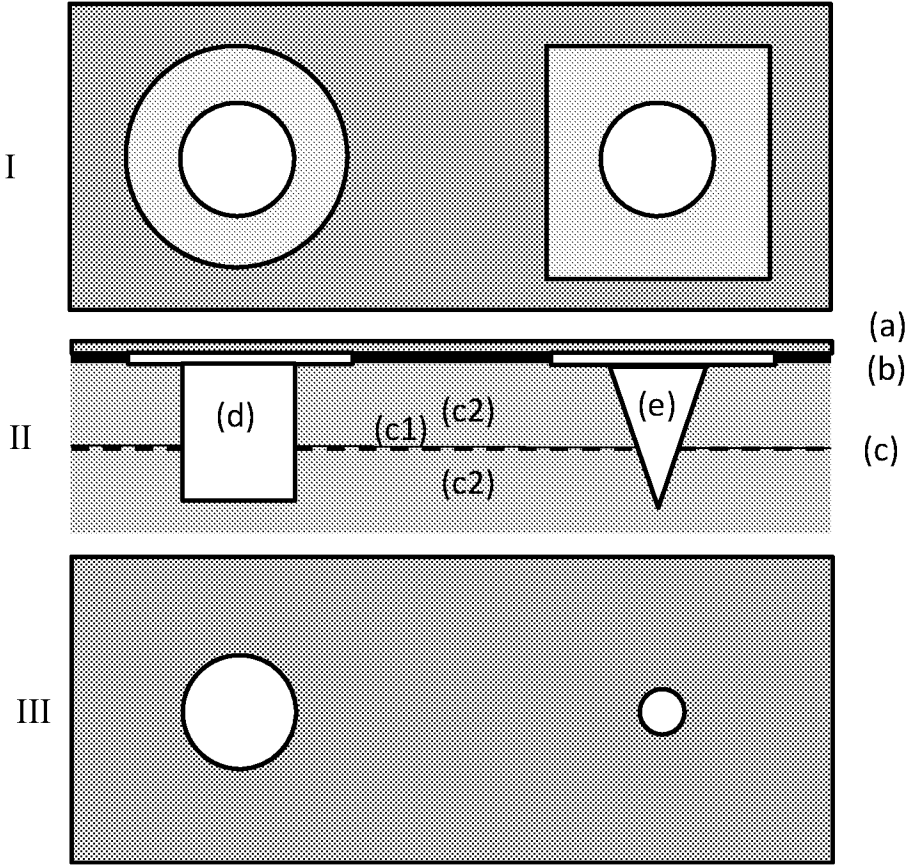


Fig 1.

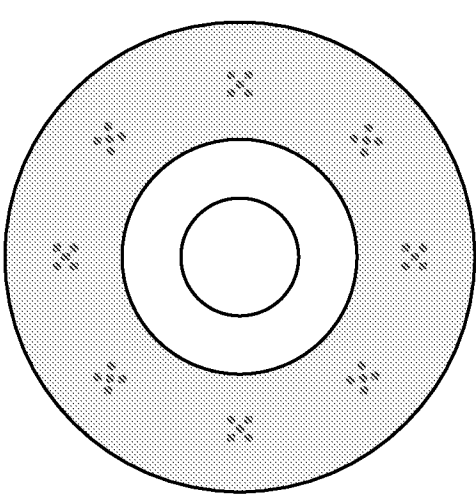


Fig. 2a

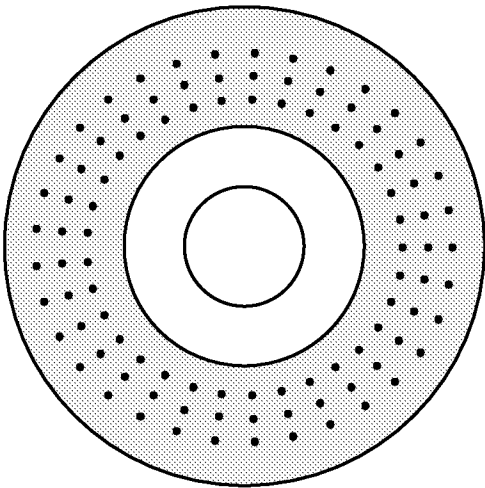


Fig.2b

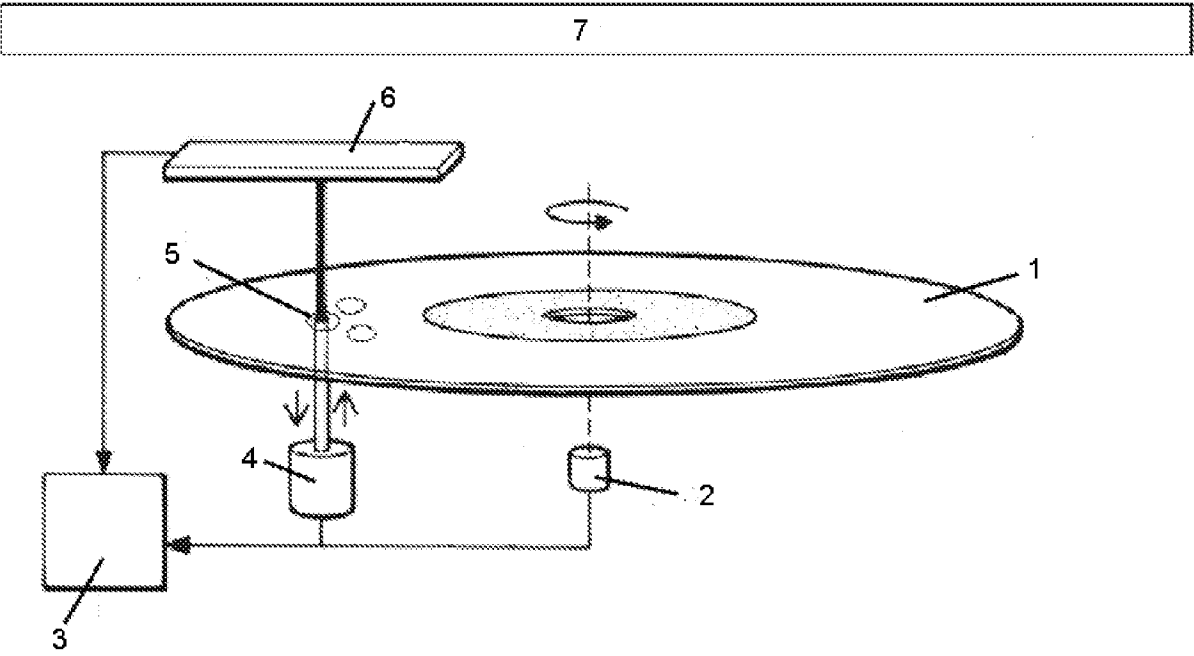


Fig. 3

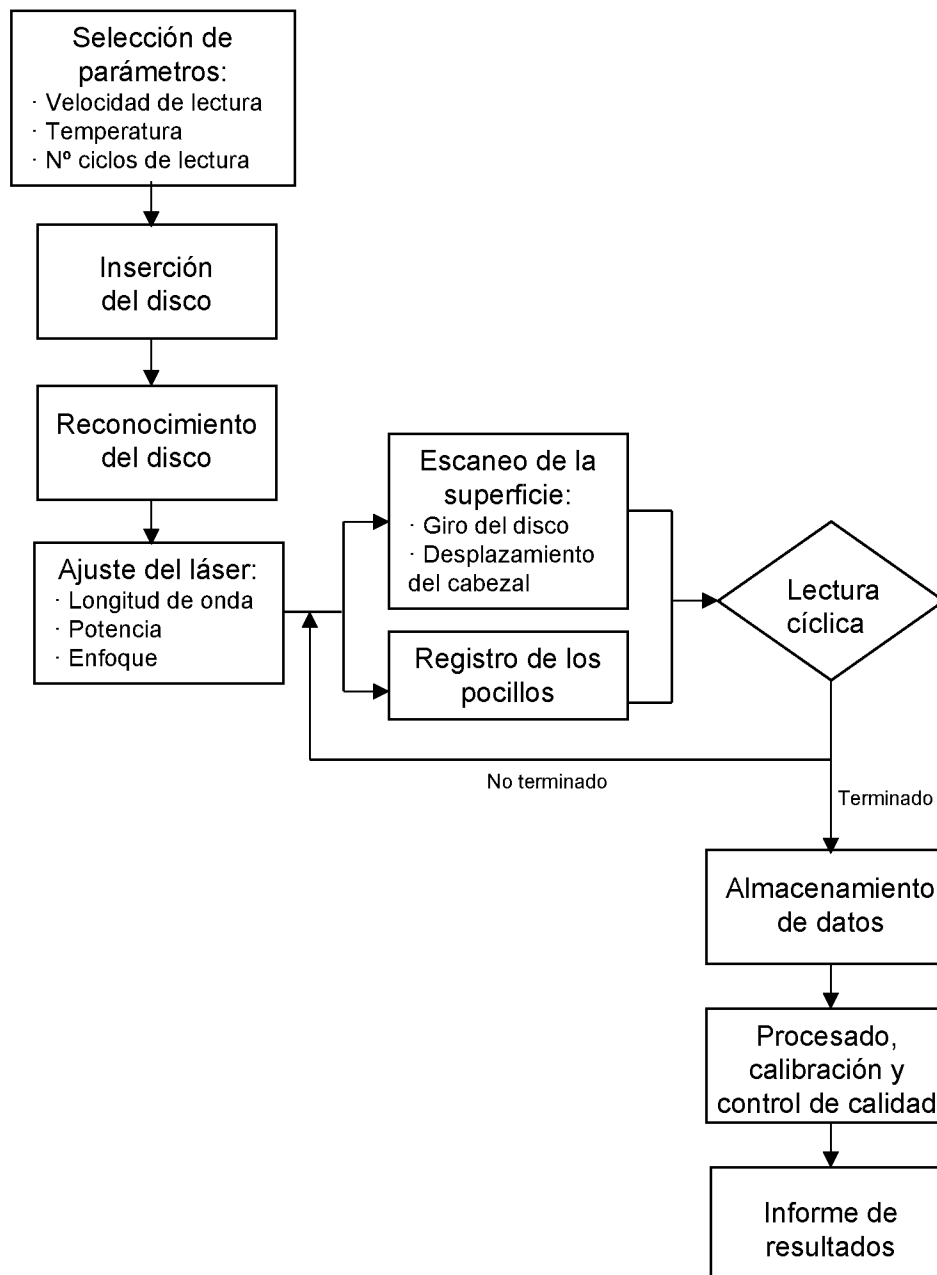


Fig. 4

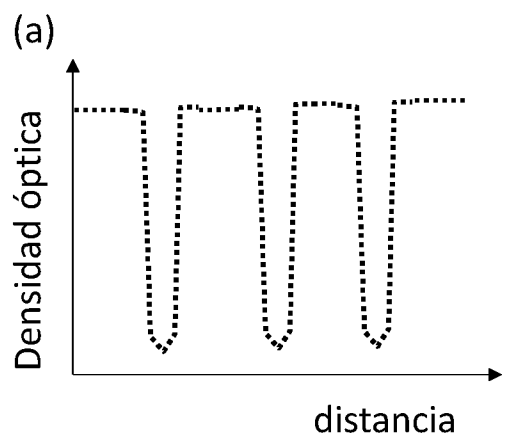


Fig. 5a

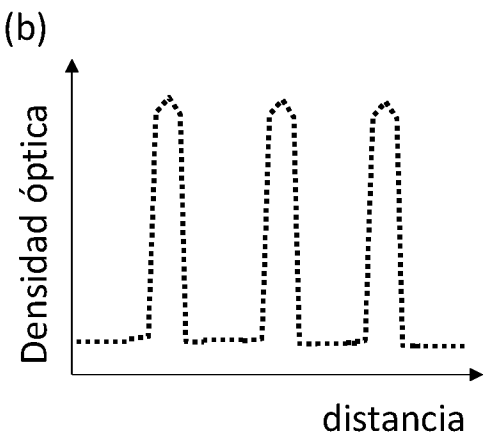


Fig. 5b

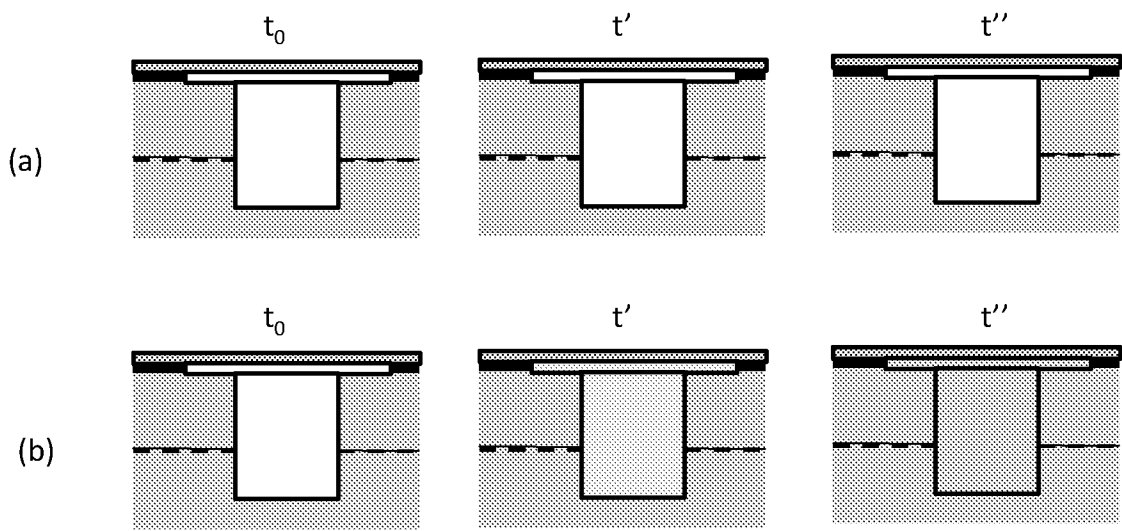


Fig. 6

5/7

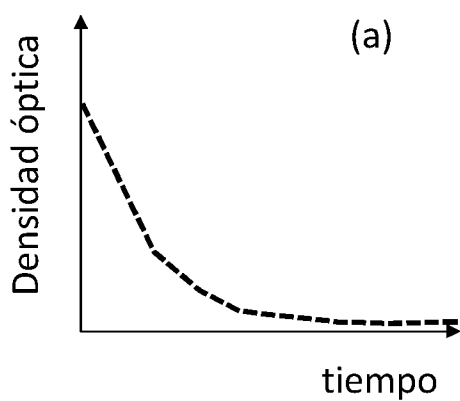


Fig. 7a

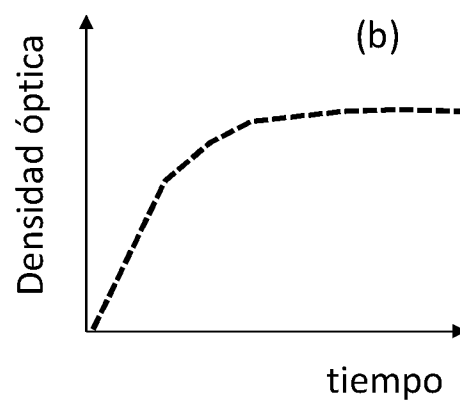


Fig. 7b

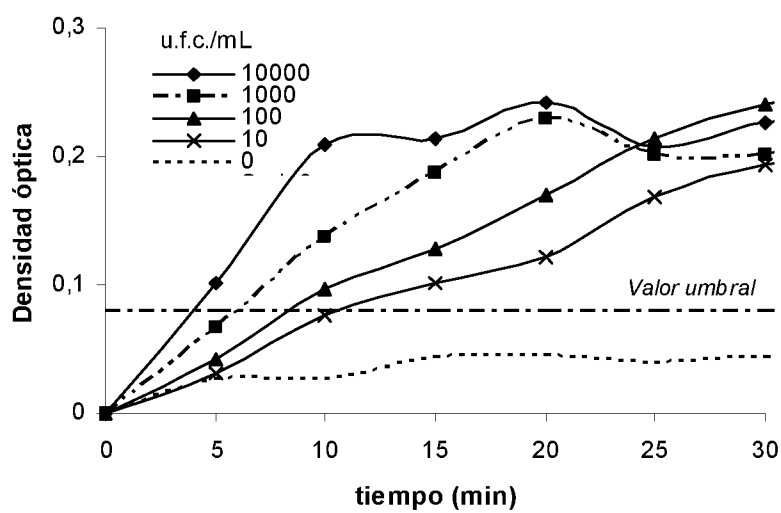


Fig. 8a

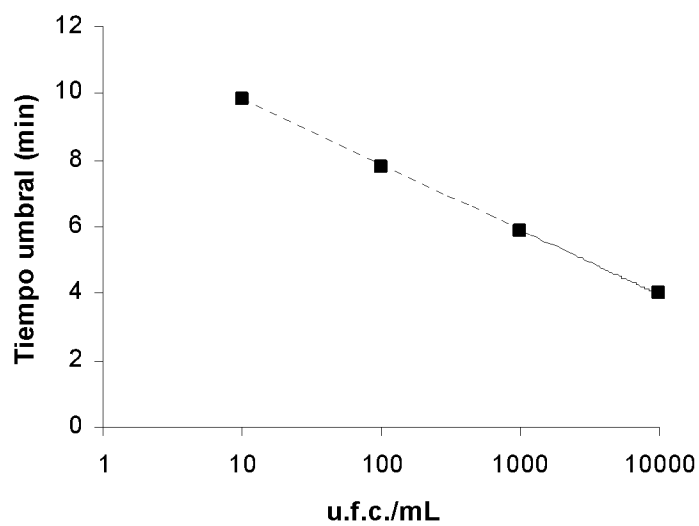


Fig. 8b

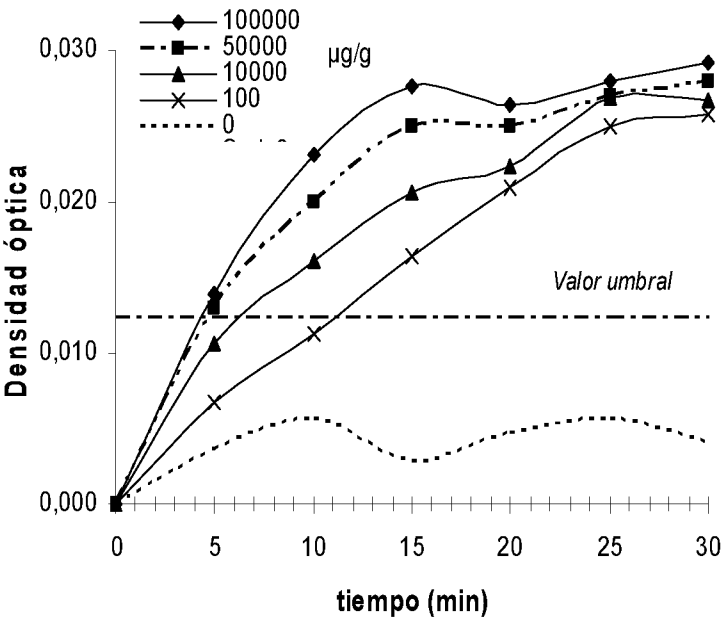


Fig. 9a

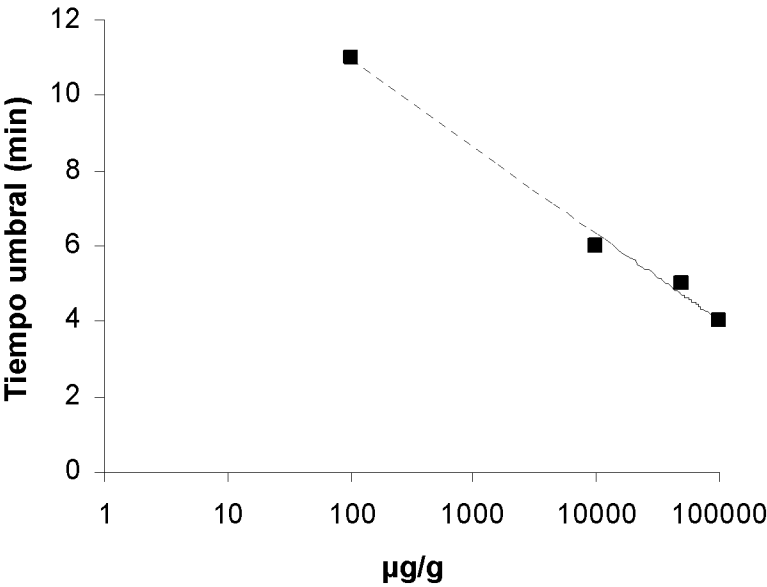


Fig. 9b

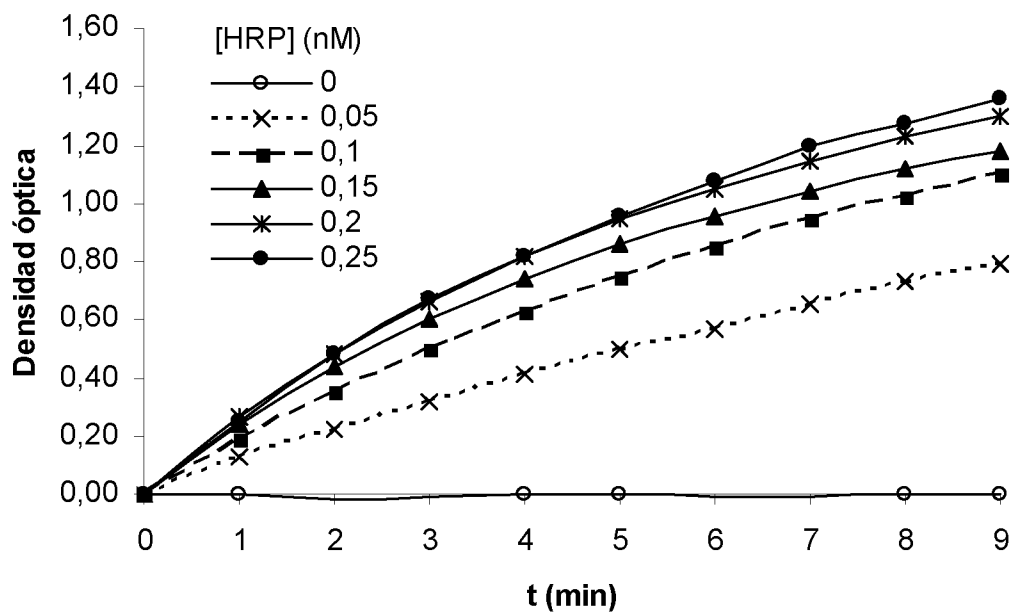


Fig. 10

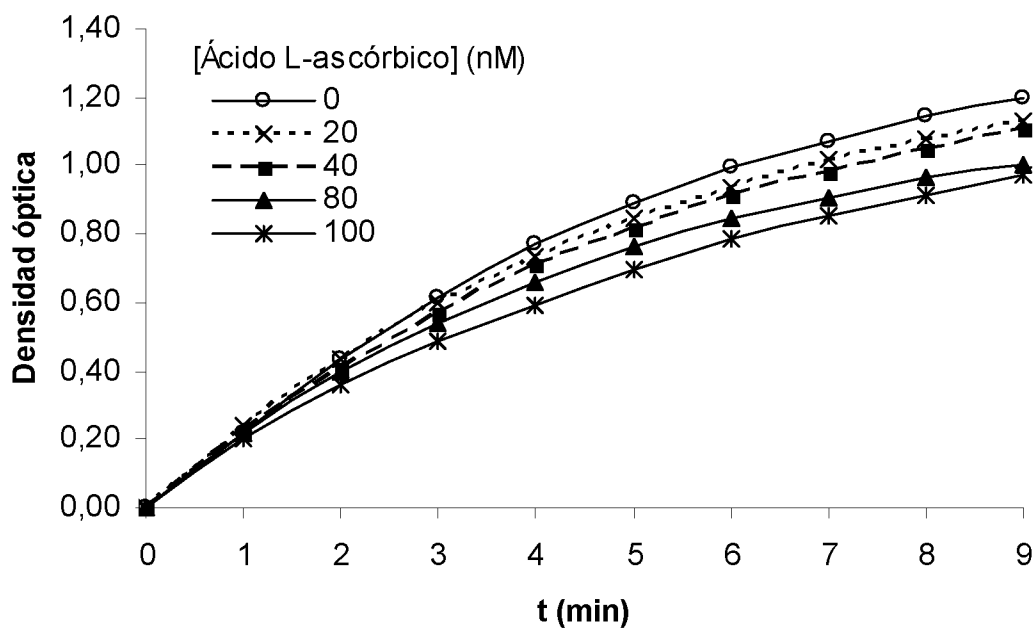


Fig. 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2016/070174

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/543 (2006.01)

G01N35/00 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9609548 A1 (THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF GLASGOW [GB/GB]) 28.03.1996, page 6, line 18 – page 14, line 4; page 20, line 9 – page 22, line 14; page 30, line 1 – page 33, line 18; Figs. 1-6.	1-25
A	EP 1324042 A2 (REMACLE, JOSÉ) 02.07.2003, page 4, paragraph [0035] – page 5, paragraph [0045]; page 7, paragraphs [0064]-[0070]; page 8, paragraphs [0081]-[0086]; page 9, paragraphs [0094]-[0097]; claims 1, 3, 7, 8, 12; Figs. 3, 8, 9.	1-25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14/06/2016

Date of mailing of the international search report
(15/06/2016)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
M. García Grávalos

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3493404

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2016/070174

C (continuation).

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 9935499 A1 (REMACLE, JOSÉ) 15.07.1999, page 4, line 14 – page 5, line 18; page 11, line 26 – page 12, line 30; Figs. 1-5.	1-25
A	WO 9801533 A1 (BURSTEIN LABORATORIES, INC. [US/US]) 15.01.1998, page 8, line 20 – page 11, line 7; page 14, line 28 – page 16, line 7; Figs. 11-13.	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2016/070174

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO9609548 A1	28.03.1996	US2002085202 A1 US7110094 B2 US2002135754 A1 US6992769 B2 US5892577 A US6476907 B1 US6339473 B1 US6803999 B1 US6256088 B1 JP2005164615 A JP2002107289 A JP3743857B B2 JP2002022651 A JP4154684B B2 JPH10504397 A JP3364719B B2 EP0782705 A1 EP0782705 B1 EP1338887 A2 EP1338887 A3 DE69534719T T2 CN1158659 A CN1163752C C CN1530642 A CA2384665 A1 CA2200562 A1 CA2200562 C BR9509021 A AU714662B B2 AU3481595 A AT314649T T	04.07.2002 19.09.2006 26.09.2002 31.01.2006 06.04.1999 05.11.2002 15.01.2002 12.10.2004 03.07.2001 23.06.2005 10.04.2002 08.02.2006 23.01.2002 24.09.2008 28.04.1998 08.01.2003 09.07.1997 28.12.2005 27.08.2003 29.10.2003 31.08.2006 03.09.1997 25.08.2004 22.09.2004 28.03.1996 28.03.1996 21.05.2002 30.12.1997 09.04.1996 09.04.1996 15.01.2006
----- EP1324042 A2	----- 02.07.2003	----- US2002177144 A1	----- 28.11.2002
----- WO9935499 A1	----- 15.07.1999	----- US2002177144 A1 JP2002501174 A EP1044375 A1 EP1044375 B1 EP1420252 A2 EP1420252 A3 DE69832817T T2 CN1285917 A CN1230682C C CA2312173 A1 BR9814726 A AU2041899 A AU746768B B2 AT313079T T	----- 28.11.2002 15.01.2002 18.10.2000 14.12.2005 19.05.2004 04.08.2004 14.09.2006 28.02.2001 07.12.2005 15.07.1999 17.10.2000 26.07.1999 02.05.2002 15.12.2005
----- WO9801533 A1	----- 15.01.1998	----- US2002076723 A1	----- 20.06.2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2016/070174

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US2002106661 A1	08.08.2002
		US2005069923 A1	31.03.2005
		US6331275 B1	18.12.2001
		US2001016316 A1	23.08.2001
		US6312901 B2	06.11.2001
		US6342349 B1	29.01.2002
		US6200755 B1	13.03.2001
		US2003054376 A1	20.03.2003
		US2005214827 A1	29.09.2005
		NZ333907 A	29.09.2000
		KR20000023613 A	25.04.2000
		JP2002514046 A	14.05.2002
		IL127938 A	12.09.2002
		EP0918845 A1	02.06.1999
		EP0918845 A4	30.08.2000
		CN1230216 A	29.09.1999
		CA2260361 A1	15.01.1998
		BR9710702 A	11.01.2000
		AU3958597 A	02.02.1998
		AU725065B B2	05.10.2000
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2016/070174

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N33/543 (2006.01)

G01N35/00 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	WO 9609548 A1 (THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF GLASGOW [GB/GB]) 28.03.1996, página 6, línea 18 – página 14, línea 4; página 20, línea 9 – página 22, línea 14; página 30, línea 1 – página 33, línea 18; Figs. 1-6.	1-25
A	EP 1324042 A2 (REMACLE, JOSÉ) 02.07.2003, Página 4, párrafo [0035] – página 5, párrafo [0045]; página 7, párrafos [0064]-[0070]; página 8, párrafos [0081]-[0086]; página 9, párrafos [0094]-[0097]; reivindicaciones 1, 3, 7, 8, 12; Figs. 3, 8, 9.	1-25

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
14/06/2016

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
15 de junio de 2016 (15/06/2016)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. García Grávalos

Nº de teléfono 91 3493404

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2016/070174

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	WO 9935499 A1 (REMACLE, JOSÉ) 15.07.1999, página 4, línea 14 – página 5, línea 18; página 11, línea 26 – página 12, línea 30; Figs. 1-5.	1-25
A	WO 9801533 A1 (BURSTEIN LABORATORIES, INC. [US/US]) 15.01.1998, página 8, línea 20 – página 11, línea 7; página 14, línea 28 – página 16, línea 7; Figs. 11-13.	1-25

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2016/070174

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO9609548 A1	28.03.1996	US2002085202 A1 US7110094 B2 US2002135754 A1 US6992769 B2 US5892577 A US6476907 B1 US6339473 B1 US6803999 B1 US6256088 B1 JP2005164615 A JP2002107289 A JP3743857B B2 JP2002022651 A JP4154684B B2 JPH10504397 A JP3364719B B2 EP0782705 A1 EP0782705 B1 EP1338887 A2 EP1338887 A3 DE69534719T T2 CN1158659 A CN1163752C C CN1530642 A CA2384665 A1 CA2200562 A1 CA2200562 C BR9509021 A AU714662B B2 AU3481595 A AT314649T T	04.07.2002 19.09.2006 26.09.2002 31.01.2006 06.04.1999 05.11.2002 15.01.2002 12.10.2004 03.07.2001 23.06.2005 10.04.2002 08.02.2006 23.01.2002 24.09.2008 28.04.1998 08.01.2003 09.07.1997 28.12.2005 27.08.2003 29.10.2003 31.08.2006 03.09.1997 25.08.2004 22.09.2004 28.03.1996 28.03.1996 21.05.2002 30.12.1997 09.04.1996 09.04.1996 15.01.2006
----- EP1324042 A2	----- 02.07.2003	----- US2002177144 A1	----- 28.11.2002
----- WO9935499 A1	----- 15.07.1999	----- US2002177144 A1 JP2002501174 A EP1044375 A1 EP1044375 B1 EP1420252 A2 EP1420252 A3 DE69832817T T2 CN1285917 A CN1230682C C CA2312173 A1 BR9814726 A AU2041899 A AU746768B B2 AT313079T T	----- 28.11.2002 15.01.2002 18.10.2000 14.12.2005 19.05.2004 04.08.2004 14.09.2006 28.02.2001 07.12.2005 15.07.1999 17.10.2000 26.07.1999 02.05.2002 15.12.2005
----- WO9801533 A1	----- 15.01.1998	----- US2002076723 A1	----- 20.06.2002

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2016/070174

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
		US2002106661 A1	08.08.2002
		US2005069923 A1	31.03.2005
		US6331275 B1	18.12.2001
		US2001016316 A1	23.08.2001
		US6312901 B2	06.11.2001
		US6342349 B1	29.01.2002
		US6200755 B1	13.03.2001
		US2003054376 A1	20.03.2003
		US2005214827 A1	29.09.2005
		NZ333907 A	29.09.2000
		KR20000023613 A	25.04.2000
		JP2002514046 A	14.05.2002
		IL127938 A	12.09.2002
		EP0918845 A1	02.06.1999
		EP0918845 A4	30.08.2000
		CN1230216 A	29.09.1999
		CA2260361 A1	15.01.1998
		BR9710702 A	11.01.2000
		AU3958597 A	02.02.1998
		AU725065B B2	05.10.2000
-----	-----	-----	-----