



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 551**

51 Int. Cl.:

G01N 21/77 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 21/55 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00956385 .9**

96 Fecha de presentación : **03.08.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1274986**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.01.2003**

54

Título: **Dispositivo y procedimiento para la determinación de múltiples analitos.**

30

Prioridad: **13.08.1999 CH 1486/99**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.11.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.11.2011

73

Titular/es: **BAYER TECHNOLOGY SERVICES GmbH**
51368 Leverkusen, DE

72

Inventor/es: **Abel, Andreas, P.;**
Dubeneck, Gert, L.;
Ehrat, Markus;
Kresbach, Gerhard, M.;
Pawlak, Michael y
Schürmann-Mader, Eveline

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Dispositivo y procedimiento para la determinación de múltiples analitos

La invención se refiere a un dispositivo que comprende una pluralidad de compartimentos para muestra, en los que están inmovilizados respectivamente en cinco o más campos de medida discretos distintos elementos de reconocimiento bioquímicos o biológicos para el reconocimiento específico y unión de distintos analitos, estando inmovilizados los elementos de reconocimiento biológicos o bioquímicos en estos campos de medida bien directamente o mediante una capa adhesiva y dado el caso otras capas sobre la superficie de una guía de ondas óptica como componente de una plataforma sensora, que forma una superficie límite de estos compartimentos para muestra. A este respecto la plataforma sensora puede presentarse en distintas formas de realización.

La invención se refiere también a un sistema analítico que comprende un dispositivo de acuerdo con la invención con distintas formas de realización de la plataforma sensora, un sistema óptico para la determinación de luminiscencia con al menos una fuente de luz de excitación y al menos un detector para el registro de la luz que sale de los campos de medida así como elementos de alimentación para poner en contacto una o varias muestras con los campos de medida sobre la plataforma sensora. Otro objeto de la invención son procedimientos de detección por luminiscencia con plataformas sensoras, sistemas ópticos y sistemas analíticos de acuerdo con la invención así como el uso de estos procedimientos para la sensorica de afinidad cuantitativa así como para otras aplicaciones distintas.

Es objetivo de la presente invención proporcionar disposiciones para medida con una pluralidad de compartimentos de muestra de pequeño volumen, en los que se pueda determinar una pluralidad de analitos con un procedimiento de detección de alta sensibilidad. Para la determinación de una pluralidad de analitos hay divulgados en la actualidad sobre todo procedimientos en los que se realiza en las denominadas placas de microtítulos la detección de distintos analitos en compartimentos para muestra discretos o "pocillos" de estas placas. A este respecto lo más extendido son placas con una retícula de 8 x 12 pocillos sobre un soporte típicamente de aproximadamente 8 cm x 12 cm, en donde para el llenado de cada pocillo individual se requiere un volumen de algunos cientos de microlitros. Para aplicaciones múltiples sería deseable sin embargo determinar varios analitos en un único compartimentos para muestra con uso de un volumen de muestra lo más pequeño posible.

En el documento US-P 5.747.274 se describen disposiciones para medida y procedimientos para el reconocimiento precoz de un infarto cardiaco, mediante la determinación de varios de al menos tres marcadores de infarto cardiaco, pudiendo realizarse la determinación de estos marcadores en compartimentos para muestra individuales o en uno conjunto, estando configurado en el último caso, en línea con la descripción dada, un compartimento para muestra individual como un canal de flujo ininterrumpido, cuya superficie límite forma por ejemplo una membrana, sobre la que están inmovilizados anticuerpos para los tres distintos marcadores. Sin embargo no hay indicio alguno de una preparación de varios compartimentos para muestra o canales de flujo de este tipo sobre un soporte conjunto. Además no se dan datos geométricos sobre el tamaño de las superficies de medida.

En los documentos WO 84/01031, US-P 5.807.755, US-P 5.837.551 y US-P 5.432.099 se propone la inmovilización de elementos de reconocimiento específicos para los analitos en forma de pequeñas "manchas" con superficie en parte claramente por debajo de 1 mm² sobre soportes sólidos, para poder llevar a cabo mediante unión de una molécula de analito presente en pequeñas proporciones una determinación de concentración del analito dependiente solo del tiempo de incubación, pero –en ausencia de un flujo continuo–, esencialmente independiente del volumen de muestra absoluto. Las disposiciones para medida descritas en los ejemplos de realización pertinentes se basan en la detección de fluorescencia en placas de microtítulos convencionales. A este respecto se describen también disposiciones en las que se miden manchas de hasta tres anticuerpos marcados con fluorescencia distintos en un pocillo de placa de microtítulos conjunta. Como consecuencia de las consideraciones teóricas indicadas en estos documentos de patente sería deseable una minimización del tamaño de la mancha. Sería limitante no obstante la altura de señal mínima que pudiese diferenciarse de la señal base.

Para conseguir límites de detección más bajos se han desarrollado en años recientes múltiples disposiciones para medida, en los que la detección del analito se basa en este efecto de cambio con el campo evanescente, que está relacionado con la conducción de luz en una guía de ondas óptica, estando inmovilizados sobre la superficie de la guía de ondas elementos de reconocimiento bioquímicos o biológicos para el reconocimiento y unión específicos de la molécula de analito.

Si se acopla una onda de luz en una guía de ondas óptica, que está rodeada por medios ópticamente más finos, es decir, medios con menor índice de refracción, entonces se conduce mediante reflexión total en la superficie límite de la capa de guía de ondas. En los medios ópticamente más finos aparece a este respecto una fracción de la energía electromagnética. Esta proporción se designa como campo evanescente o amortiguado transversalmente. La fuerza del campo evanescente es muy elevada dependiendo del grosor de la capa de guía de ondas propiamente así como de la relación de los índices de refracción de la capa de guía de ondas y de los medios que rodean. Con guías de onda finas, es decir, grosores de capa del mismo grosor o inferior que la longitud de onda conducida, se pueden diferenciar

modos discretos de luz conducida. Tales procedimientos tienen la ventaja de que está limitado el efecto de cambio con los analitos a la profundidad de penetración del campo evanescente en el medio rodeante, en la magnitud de algunos cientos de nanómetros, y se pueden evitar en gran medida señales distorsionantes desde la profundidad del medio. Las primeras disposiciones para medida propuestas de este tipo se basaban en guías de onda correspondientes multimodales autoportantes de una capa como, por ejemplo, fibras o plaquetas de plástico transparente o vidrio, con espesores de algunos cientos de micrómetros hasta varios milímetros.

En el documento US-P 4.978.503 se describe una disposición para medida en la que se incorpora una muestra líquida mediante fuerzas capilares en una cavidad, estando configurada una pared lateral ópticamente transparente como guía de ondas multimodal autoportante, en donde está inmovilizado al menos sobre una parte de su superficie que da a la cavidad ("parche") un elemento de reconocimiento bioquímico para el reconocimiento y unión de un analito de una muestra. Concretamente se describe en el documento de patente anterior la preparación de conjuntos de tales disposiciones con varios parches discretos, derivándose no obstante de las demás aclaraciones que los parches están provistos lateralmente con arcos de unión, para la unión de placas para fondo y de cubierta de capilares, estando separados entre sí de modo que tras aislamiento del conjunto cada capilar contenga solo un parche de elementos de reconocimiento inmovilizados. Además es desventajoso en esta disposición que no se prevea un cambio del líquido que llega a los capilares, lo que sería deseable por ejemplo en un conjunto de varias etapas.

En el documento WO 94/27137 se describen disposiciones para medida en las que están inmovilizados "parches" con distintos elementos de reconocimiento, para la detección de distintos analitos sobre una guía de ondas de sustrato óptico autoportante (guía de ondas de una capa) con acoplamiento de luz en superficie frontal, realizándose la inmovilización espacial selectiva mediante reticulantes fotoactivables. Según la descripción dada pueden estar dispuestos varios parches en serie en canales de flujo paralelos conjuntos o compartimentos para muestra, extendiéndose los canales de flujo paralelos o compartimentos de muestra por toda la longitud del campo usado como sensor de la guía de ondas para evitar una afección de la conducción de luz en la guía de ondas. Sin embargo no se hace referencia alguna a la integración en dos dimensiones de una pluralidad de parches en compartimentos para muestras respecto a menores dimensiones, es decir, claramente menor de 1 cm^2 de superficie base. En una disposición similar se describen en el documento WO 97/35203 distintas formas de realización de una disposición en las que están inmovilizados respectivamente distintos elementos de reconocimiento para la determinación de distintos analitos en canales de flujo paralelos separados o compartimientos para muestras para la muestra y soluciones de calibración de baja y dado el caso además de alta concentración de analito. Tampoco aquí se da indicación alguna a como se podría conseguir una alta densidad de integración de distintos elementos de reconocimiento en una muestra alimentada a un compartimento conjunto. Además no es suficiente la sensibilidad de guías de onda en una capa autoportantes multimodales para una pluralidad de aplicaciones en las que se requiere la consecución de límites de detección muy bajos.

Para mejorar la sensibilidad y al mismo tiempo la preparación sencilla en la fabricación en serie se propusieron guías de onda de de capa delgada planas. Una guía de ondas de capa delgada plana se compone en el caso más sencillo de un sistema en tres capas: material soporte, capa guía de ondas, superestrato (o bien muestra en estudio), en donde la capa guía de ondas posee el mayor índice de refracción. Capas intermedias adicionales pueden mejorar aún más el efecto de la guía de ondas plana.

Se conocen distintos procedimientos para el acoplamiento de luz de excitación en una guía de ondas plana. Los procedimientos usados en un principio se basaban en el acoplamiento de superficies frontales o acoplamiento de prismas, aplicándose para evitar reflexiones a consecuencia de ranuras de aire por lo general un líquido entre el prisma y la guía de ondas. Estos dos procedimientos son adecuados sobre todo en lo que respecta a guías de ondas de densidad de capa relativamente grande, es decir, guías de onda particularmente autoportantes, así como con un índice de refracción de la guía de ondas claramente por debajo de 2. En consecuencia para el acoplamiento de luz de excitación en capas muy finas guías de ondas el uso de rejillas de acoplamiento es un procedimiento esencialmente más elegante.

Se pueden diferenciar distintos procedimientos para la detección de analito en campo evanescente de ondas de luz conducidas en guías de ondas en capas ópticas. Debido al principio de medida usado se puede diferenciar por ejemplo entre procedimientos de fluorescencia o de luminiscencia general por un lado y procedimientos de refracción por otro. A este respecto se pueden considerar procedimientos para la generación de una resonancia de plasmones de superficie en una capa de metal fina sobre una capa dieléctrica con bajo índice de refracción en el grupo de procedimientos de refracción, en tanto como base para la determinación de la magnitud de medida sirva el ángulo de resonancia de la luz de excitación irradiada para la generación de la resonancia de plasmones de superficie. Pero la resonancia de plasmones de superficie se puede usar también para el refuerzo de una luminiscencia o para la mejora de la relación señal a fondo en una medida de luminiscencia. Las condiciones para la generación de una resonancia de plasmones de superficie así como para la combinación con medidas de luminiscencia así como con estructuras guía de ondas se describen en múltiples referencias bibliográficas, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos US-P 5.478.755, US-P 5.841.143, US-P 5.006.716 y US-P 4.649.280.

Con el término "luminiscencia" se designa en esta solicitud la emisión espontánea de fotones en la región de ultravioleta a infrarrojo tras excitación óptica o no óptica como, por ejemplo, eléctrica o química o bioquímica o térmica. Por ejemplo se incluyen quimioluminiscencia, bioluminiscencia, electroluminiscencia y de forma particular fluorescencia y fosforescencia en el término "luminiscencia".

En los procedimientos de medida por refracción se usa el cambio del denominado índice de refracción efectivo basado en adsorción o desorción molecular sobre la guía de ondas para la detección del analito. Este cambio del índice de refracción efectivo en el caso de sensores de acoplador de rejilla se determina con el cambio del ángulo de acoplamiento para el acoplamiento o desacoplamiento de luz en o desde el sensor acoplador de rejilla, y en el caso de sensores interferométricos del cambio de la diferencia de fases entre la luz de medida conducida en un brazo del sensor y un brazo de referencia del interferómetro.

El estado de la técnica para el uso de una o varias rejillas de acoplamiento para el acoplamiento y/o desacoplamiento de ondas guiadas mediante una o varias rejillas de acoplamiento se describe, por ejemplo, en K. Tiefenthaler, W. Lukosz, "Sensitivity of grating couplers as integrated-optical chemical sensors", J. Opt. Soc. Am. B6, 209 (1989); W. Lukosz, Ph.M. Nellen, Ch. Stamm, P. Weiss, "Output Grating Couplers on Planar Waveguides as Integrated, Optical Chemical Sensors", Sensors and Actuators B1, 585 (1990), y en T. Tamir, S.T. Peng, "Analysis and Design of rating Couplers", Appl. Phys. 14, 235-254 (1977).

En el documento US-P 5.738.825 se describe una disposición que se compone de una placa de microtítulos con orificios que penetran completamente y una guía de ondas de capa delgada como placa base, esta última compuesta por una película de guía de ondas fina sobre un sustrato autoportante transparente. En contacto con los compartimentos para muestra abiertos formados como placa base a partir de la placa de microtítulos taladrada y la guía de ondas de capa delgada se prevén respectivamente rejillas de reflexión para un acoplamiento y desacoplamiento de luz de excitación para determinar a partir de cambios del ángulo de acoplamiento observado los cambios del índice de refracción efectivo responsables a consecuencia de la adsorción o desorción de moléculas de analito que se van a detectar. No se prevé sin embargo una detección de varios analitos en un compartimento para muestra mediante unión a distintos elementos de reconocimiento inmovilizados en el compartimento para muestra sobre la estructura de rejilla y parece que también es difícil de realizar en base al principio de medida de refracción, es decir, la determinación de cambios relativos del ángulo de acoplamiento.

Los procedimientos de refracción citados tienen la ventaja de que se pueden usar sin uso de moléculas de marcado adicionales, las denominadas etiquetas moleculares. Sin embargo la desventaja de estos procedimientos sin etiqueta es que están limitados por los límites de detección alcanzables debido a la baja selectividad del principio de medida, en función del peso molecular de los analitos a intervalos de concentración de pico- a nanomolar, lo que no es suficiente para muchas aplicaciones de la analítica de trazas moderna, por ejemplo, para aplicaciones de diagnóstico.

Para la consecución de límites de detección más bajos parecen ser más adecuados procedimientos basados en luminiscencia debido a la mayor selectividad de generación de señales. A este respecto la excitación de luminiscencia está limitada a la profundidad de penetración del campo evanescente en el medio ópticamente más fino, por tanto sobre el entorno inmediato del campo de guía de ondas con una profundidad de penetración en el orden de magnitud de algunos cientos de nanómetros en el medio. Este principio se denomina excitación por luminiscencia evanescente.

Mediante guías de onda de de capa delgada en combinación con detección por luminiscencia, basada en una película guía de ondas fina de sólo unos cientos de nanómetros sobre un material soporte transparente, se pudo aumentar claramente en los últimos años la sensibilidad. Por ejemplo se describe en el documento WO 95/33197 un procedimiento en el que la luz de excitación se acopla por una rejilla con relieve como elemento óptico de difracción en la película guía de ondas. La superficie de la plataforma sensora se pone en contacto con una de las muestras que contienen el analito y se mide la luminiscencia irradiada isotrópicamente en la profundidad de penetración del campo evanescente de las sustancias que pueden emitir luminiscencia mediante dispositivos de medida adecuados como, por ejemplo, fotodiodos, fotomultiplicadores o cámaras CDC. Es también posible acoplar y medir la proporción de reacoplamiento en la guía de ondas de la radiación excitada evanescente mediante un elemento óptico de difracción, por ejemplo, una rejilla. Este procedimiento se describe, por ejemplo, en el documento WO 95/33198.

No obstante una desventaja de todos los procedimientos descritos anteriormente del estado de la técnica en los documentos WO 95/33197 y 95/33198 para la detección de luminiscencia excitada evanescente con guías de ondas de capa delgada se encuentra en que sobre la plataforma sensora configurada como película homogénea se puede analizar respectivamente sólo una muestra. Para poder llevar a cabo otras medidas sobre la misma plataforma sensora son necesarios en cualquier caso costosas etapas de lavado o de limpieza. Esto es válido particularmente si se debe detectar una de las primeras medidas de distintos analitos. En el caso de un inmunoensayo esto significa en general que toda la capa inmovilizada se debe intercambiar sobre la plataforma sensora o usarse una nueva plataforma sensora como tal.

Para la realización simultánea o sucesiva de medidas múltiples exclusivamente basadas en luminiscencia con guías de

onda esencialmente monomodales, planas, inorgánicas se conocen, por ejemplo, dispositivos (conjuntos) del documento WO 96/35940, en los que están dispuestos sobre una plataforma sensora al menos dos campos guía de onda separados, que se disponen por separado con luz de excitación. Sin embargo la distribución de la plataforma sensora en campos guía de ondas separados conlleva como consecuencia negativa que la necesidad de espacio para campos de medida discretos sobre toda la plataforma sensora es relativamente grande y por tanto se puede conseguir solo una baja densidad relativa de distintos campos de medida (o las denominadas "características").

En el sentido de la presente invención se deben definir campos de medida separados espacialmente (d) (según figura 1) mediante las superficies cerradas que acogen elementos de reconocimiento biológicos o bioquímicos o sintéticos inmovilizados para el reconocimiento de un analito de una muestra líquida. Estas superficies pueden presentar a este respecto una geometría discrecional, por ejemplo, la forma de puntos, círculos, rectángulos, triángulos, elipses o líneas.

En el documento WO 98/22799 se proponen además de una pluralidad de otros dispositivos para la configuración de compartimentos para muestras para disposiciones de medida para la determinación de luminiscencia excitada en el campo evanescente de una guía de ondas plana también dispositivos que corresponden a la forma de placas de microtítulos conocidas. Tampoco aquí se ha previsto la determinación de varios analitos mediante unión a distintos elementos de reconocimiento inmovilizados dentro de un compartimento para muestra individual.

Existe por tanto una necesidad de preparación de compartimentos para muestras de pequeño volumen en combinación con plataformas sensoras adecuadas, en las que se pueda determinar al mismo tiempo sin gran coste una pluralidad de analitos mediante un procedimiento de detección de alta sensibilidad.

Se ha encontrado ahora de forma sorprendente que mediante la combinación elegida de excitación de fluorescencia de alta eficiencia en campo evanescente de una guía de ondas óptica adecuada, de forma particular de guías de onda de capa delgada, y disposición de varios campos de medida con elementos de reconocimiento biológicos o bioquímicos diferentes en un compartimento para muestra individual, como parte de un conjunto en dos dimensiones de compartimentos para muestra sobre una plataforma sensora conjunta, se pueden conseguir esencialmente límites de detección más bajos y mayores densidades de integración de campos de medida que con los dispositivos y procedimientos convencionales conocidos (por ejemplo, ensayos ELISA sobre placas de microtítulos clásicas). A este respecto se puede llevar a cabo en la respectiva etapa de detección del procedimiento, con adición de parejas de unión marcadas con luminiscencia del ensayo de bioafinidad respectivo, la detección de luminiscencia sin etapa de lavado adicional, lo que significa una simplificación del procedimiento.

De forma sorprendente se puede generar mediante la disposición de varios campos de medida y distintos elementos de reconocimiento biológicos o bioquímicos en un compartimento para muestra, con adición de una muestra individual, en una medida individual información estadísticamente relevante, por ejemplo para reproducibilidad del ensayo. Al mismo tiempo los datos generados a este respecto muestran incluso una menor variabilidad que los resultados de un número correspondiente de medidas individuales en compartimentos para muestra discretos, ya que se excluyen con la medida simultánea una pluralidad de posibles fuentes de variabilidad y error para las medidas individuales dependientes una de otras. Con esto se puede conseguir un ahorro significativo de tiempo de análisis y cantidad de muestras y reactivos que se usan en comparación con los procedimientos de detección descritos y conocidos previamente (por ejemplo, ensayo ELISA). De forma particular es también posible llevar a cabo medidas de referenciación, de forma particular para la determinación de parámetros químicos como, por ejemplo, unión no específica, reactividades cruzadas, determinación de pH o pO_2 de solución de muestra etc., en cualquier compartimento para muestra individual, las que se usan uno o varios campos de medida en un compartimento para muestra para tales medidas de referenciación. Con esto se puede aumentar claramente por su parte la fiabilidad de estas medidas de referenciación frente a los procedimientos convencionales en los que se llevaron a cabo estas medidas en compartimentos para muestras respectivamente distintos.

Adicionalmente se puede aumentar considerablemente con el dispositivo y el procedimiento de detección ejecutado con el mismo el número de medidas por placa y con ello el rendimiento. De este modo se puede mejorar claramente la reproducibilidad de las medidas y la comparativa de resultados con distintas muestras, entre otros debido a que se suprimen las fuertes oscilaciones placa a placa habituales. Por ejemplo, con 96 compartimentos para muestras en los que se encuentran respectivamente 400 campos de medida, es posible llevar a cabo en una única plataforma sensora individual series de medidas masivas, por ejemplo, para el desarrollo de productos farmacéuticos, sobre un único dispositivo de acuerdo con la invención, para lo que se necesitarían de forma típica 400 placas de microtítulos. Además de la clara reducción de material para muestras y reactivos y con ello un coste reducido para la preparación de muestras se aumenta claramente al mismo tiempo la fiabilidad y exactitud de los resultados por los motivos citados.

El dispositivo de acuerdo con la invención y el procedimiento de acuerdo con la invención ofrecen posibilidades que no pueden proporcionar los sistemas y procedimientos de análisis convencionales conocidos:

- Desarrollo rápido del ensayo en una plataforma sensora / dispositivo individual

- Determinación de curvas de concentración, diafonía específica de la unión y análisis de muestra sobre una plataforma sensora / dispositivo único.
- Determinación multianálisis de alta sensibilidad en una única muestra de pequeño volumen
- Realización de series de medidas masivas en una única plataforma sensora.

5 Es objeto de la invención un dispositivo que se corresponde con la reivindicación 1.

De los respectivamente cinco o más campos de medida en un único compartimento para muestras se pueden usar respectivamente uno o más campos de medida para la referenciación.

10 Se usan de forma ventajosa campos de medida para la referenciación de los mismos parámetros químicos u ópticos en varios compartimentos para muestra distribuidos por la plataforma sensora, de modo que se pueda determinar la distribución espacial de los citados parámetros químicos u ópticos sobre la plataforma sensora. Como parámetro óptico a determinar se entiende a este respecto, por ejemplo, la intensidad de luz de excitación disponible localmente. De forma particular se pueden contemplar a partir de la distribución así determinada parámetros químicos citados, por ejemplo, diferencias en composición, concentración o volumen de distintas muestras, por ejemplo, resultantes de la preparación de muestras que se añaden en distintos compartimentos para muestras.

15 Se prefiere una forma de realización del dispositivo en la que los campos de medida citados se encuentran en interacción óptica con el campo evanescente de luz de excitación conducida en la guía de ondas óptica plana.

20 La guía de ondas óptica como componente de la plataforma sensora puede ser una guía de ondas multimodal o monomodal de un material inorgánico transparente al menos con la longitud de onda de excitación y de luminiscencia, preferiblemente vidrio o material inorgánico, preferiblemente plástico, con especial preferencia seleccionado del grupo que está formado por polimetilmetacrilato, policarbonato, poliestireno. De forma particular la guía de ondas óptica puede ser autoportante como componente de la plataforma sensora.

Se prefiere un dispositivo en el que la guía de ondas óptica como componente de la plataforma sensora sea una guía de ondas en capas óptica con una primera capa ópticamente transparente (a) (según la figura 1) sobre una segunda capa ópticamente transparente (b) (según la figura 1) con menor índice de refracción que la capa (a).

25 El material de la segunda capa ópticamente transparente (b) puede componerse de vidrio, cuarzo o un plástico termoplástico transparente, preferiblemente del grupo formado por policarbonato, poliimida, polimetilmetacrilato o poliestireno.

30 Para la generación de un campo evanescente lo más fuerte posible en la superficie de la capa ópticamente transparente (a) es deseable que el índice de refracción de la capa ópticamente transparente (a) que guía las ondas sea esencialmente mayor que el índice de refracción de las capas adyacentes. Es especialmente ventajoso que el índice de refracción de la primera capa ópticamente transparente (a) sea mayor de 1,8.

A modo de ejemplo la primera capa ópticamente transparente (a) se compone de TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 o ZrO_2 . Se prefiere especialmente que la primera capa ópticamente transparente (a) se componga de Ta_2O_5 o Nb_2O_5 .

35 Además del índice de refracción de la capa ópticamente transparente (a) de guía de ondas, el segundo parámetro determinante para la generación de un campo evanescente lo más fuerte posible en sus superficies en su grosor respecto a las capas adyacentes con menor índice de refracción. A este respecto aumenta la fuerza del campo evanescente con grosor decreciente de la capa (a) de guía de ondas, en tanto el grosor de la capa sea suficiente para conducir al menos un modo de la longitud de onda de excitación. A este respecto el mínimo grosor de capa "de corte" para la conducción de un modo es función de la longitud de onda de ese modo. Esto es mayor para luz de onda más larga que para luz de onda corta. Con acercamiento al grosor de capa "de corte" aumentan no obstante también las pérdidas de amplitud no deseadas, lo que además limita inferiormente la elección del grosor de capa preferido. Se prefieren aquellos grosores de capa de la capa ópticamente transparente (a) que posibilitan la conducción de 1 a 3 modos de una longitud de onda de excitación dada previamente, son muy especialmente preferidos grosores de capa que conducen a guías de ondas monomodales para estas longitudes de onda de excitación. A este respecto está claro que el carácter de modos discretos de la luz conducida sólo se refiere a los modos transversales.

Estos requerimientos conducen a que el grosor de la primera capa ópticamente transparente (a) sea de forma ventajosa de 40 a 300 nm. De forma muy especialmente ventajosa el grosor de la primera capa ópticamente transparente (a) sea de 100 a 200 nm.

50 El nivel de la pérdida de amplitud de un modo conducido en una capa guía de ondas óptica (a) se determina en toda la masa de la rugosidad de superficie de una capa soporte que se encuentra por debajo así como por la

absorción posiblemente por cromóforos presentes en esta capa soporte, lo que además conlleva el riesgo de excitación de luminiscencia no deseada en esta capa soporte, mediante penetración del campo evanescente del modo conducido en la capa (a). Adicionalmente puede llegarse a la aparición de tensiones térmicas a consecuencia de distintos coeficientes de expansión térmica de las capas ópticamente transparentes (a) y (b). En el caso de una
 5 capa ópticamente transparente (b) sensible, en tanto se componga por ejemplo de un plástico termoplástico transparente, es deseable evitar una penetración de disolventes que pudieran atacar la capa (b) mediante microporos eventualmente presentes en la capa ópticamente transparente (a).

Por tanto es ventajoso si entre las capas ópticamente transparentes (a) y (b) en contacto con la capa (a) se encuentra otra capa ópticamente transparente (b') (según la figura 1) con índice de refracción menor que el de la
 10 capa (a) y un espesor de 5 nm a 10000 nm, preferiblemente de 10 nm a 1000 nm. La capa intermedia tiene el objetivo de una reducción de la rugosidad de superficie bajo la capa (a) o la disminución de la penetración del campo evanescente de luz conducida en la capa (a) en las capas que se encuentran una o varias por debajo o una mejora de la adherencia de la capa (a) sobre una o varias capas que se encuentran por debajo o la disminución de tensiones provocadas térmicamente dentro de la plataforma sensora óptica o el aislamiento químico de la capa
 15 ópticamente transparente (a) de capas que se encuentran por debajo mediante obturación de microporos en la capa (a) frente a capas que se encuentran por debajo.

Hay una pluralidad de procedimientos para la aplicación de los elementos de reconocimiento biológicos o bioquímicos o sintéticos sobre la capa ópticamente transparente (a). Por ejemplo se puede realizar esta mediante adsorción física o mediante interacción electrostática. La orientación de los elementos de reconocimiento es por lo
 20 general aleatoria. Además se da el riesgo de que con distinta composición de las muestras que contienen analitos o de reactivos usados en procedimientos de detección se arrastre por lavado una parte de los elementos de reconocimiento. Por tanto puede ser ventajoso que se aplique para la inmovilización de elementos de reconocimiento biológicos o bioquímicos o sintéticos sobre la capa ópticamente transparente (a) una capa adhesiva (f) (según la figura 1). Esta capa adhesiva debería ser igualmente ópticamente transparente. De forma particular la
 25 capa adhesiva no debería sobresalir de la profundidad de penetración del campo evanescente desde la capa guía de ondas (a) en el medio subyacente. Por tanto la capa adhesiva (f) debería presentar un espesor de menos de 200 nm, preferiblemente de menos de 20 nm. Esta puede estar compuesta, por ejemplo, por compuestos químicos de los grupos de silanos, epóxidos, "monocapas funcionalizadas autoorganizadas".

Como se comprueba en la definición de campo de medida es posible mediante aplicación espacialmente selectiva de elementos de reconocimiento biológicos o bioquímicos o sintéticos generar sobre la plataforma sensora generar
 30 campos de medida espacialmente separados (d). En contacto con un analito que puede emitir luminiscencia o análogo del analito marcado con luminiscencia concurrente con los analitos en la unión a los elementos de reconocimiento o una pareja de unión marcada con luminiscencia adicional en un ensayo múltiple se unen estas moléculas que pueden emitir luminiscencia sólo selectivamente en los campos de medida a la superficie de la
 35 plataforma sensora, que se definen por las superficies que son acogidas por los elementos de reconocimiento inmovilizados.

Para la aplicación de los elementos de reconocimiento biológicos o bioquímicos o sintéticos se pueden usar uno o varios procedimientos del grupo de procedimientos formado por "marcaje por chorro de tinta, marcaje mecánico mediante lápiz o resorte, impresión por microcontacto, contacto fluido de campos de medida con los elementos de
 40 reconocimiento biológicos o bioquímicos o sintéticos mediante su alimentación en microcanales en paralelo o cruzados, con acción de diferencias de presión o potenciales eléctricos o electromagnéticos".

Como elementos de reconocimiento biológicos o bioquímicos o sintéticos se puede aplicar componentes del grupo formado por ácidos nucleicos (ADN, ARN), análogos de ácidos nucleicos (PNA), anticuerpos, aptámeros, receptores unidos a membrana y aislados, sus ligandos, antígenos para anticuerpos, "componentes de histidina-
 45 Tag", cavidades generadas mediante síntesis química para la captación de impresiones moleculares etc.

Entre este último tipo de elementos de reconocimiento se entienden cavidades que se preparan en un procedimiento que se describió en la bibliografía como "impresión molecular". A tal fin se encapsula en la mayoría de los casos en solución orgánica, el analito o un análogo del analito, en una estructura polimérica. Se designa como "imprint". Luego se obtiene de nuevo el analito o su análogo de la estructura polimérica con adición de
 50 reactivos adecuados de modo que se deja la cavidad vacía. Esta cavidad vacía se puede usar luego como un punto de unión con mayor selectividad estérica en un procedimiento de detección posterior.

Es también posible aplicar como elementos de reconocimiento bioquímicos o biológicos células completas o fragmentos celulares. En muchos casos se limita el límite de detección de un procedimiento analítico con las denominadas señales de unión no específicas, es decir, con señales que se generan mediante unión del analito u
 55 otros compuestos usados para la detección del analito, que se usen no sólo en la zona de los elementos de reconocimiento biológicos o bioquímicos o sintéticos inmovilizados usados, sino también en zonas no cubiertas por los mismos de una plataforma sensora, por ejemplo, mediante adsorción hidrófoba o mediante intercambio

electrostático. Por tanto es ventajoso que se apliquen entre los campos de medida espacialmente separados (d) compuestos "químicamente neutros" frente al analito para evitar la unión no específica o adsorción. Como compuestos "químicamente neutros" se designan a este respecto aquellas sustancias que no presentan puntos de unión específicos para el reconocimiento y unión del analito o un análogo del analito o de una pareja de unión
5 adicional en un ensayo múltiple y bloquean mediante su presencia el acceso del analito o sus análogos o de la pareja de unión adicional a la superficie de la plataforma sensora.

Como compuestos "químicamente neutros" se pueden usar, por ejemplo, sustancias de los grupos que están formados, por ejemplo, de albúminas, de forma particular albúmina de suero bovino, esperma de arenque o también de polietilenglicoles.

10 Se prefiere que el acoplamiento de la luz de excitación con los campos de medida (d) se realice con ayuda de una o varias estructuras de rejilla (c) (según la figura 1), que están grabadas en la capa ópticamente transparente (a).

Puede tener lugar una interferencia óptica de un campo de medida con otros campos de medida mediante la ampliación de luz acoplada en la guía de ondas, de forma particular también de luz luminiscente reacoplada. Para evitar una interferencia de este tipo es ventajoso que el desacoplamiento de la luz conducida a la capa ópticamente
15 transparente (a) se realice con ayuda de estructuras de rejilla (c') (según la figura 1), que están grabadas en la capa ópticamente transparente (a). A este respecto estructuras de rejilla (c) y (c') grabadas en la capa ópticamente transparente (a) pueden tener igual o diferente periodo y pueden encontrarse en paralelo o no en paralelo unas con otras.

20 De forma particular se pueden usar estructuras de rejilla (c) y (c') de forma intercambiable como rejilla de acoplamiento y/o desacoplamiento.

Las estructuras de rejilla (c) y dado el caso estructuras de rejilla (c') presentes adicionalmente presentan de forma ventajosa un periodo de 200 nm a 1000 nm, y la profundidad de modulación de la rejilla es de forma ventajosa de 3 a 100 nm, preferiblemente de 10 a 30 nm.

25 Se prefiere que la relación de profundidad de modulación al grosor de la primera capa ópticamente transparente (a) sea igual o inferior a 0,2.

Una estructura de rejilla (c) puede ser una rejilla con relieve con perfil en forma de rectángulo, triángulo o semicírculo o una rejilla de fases o volumen con una modulación periódica del índice de refracción en la capa ópticamente transparente (a) esencialmente plana.

30 Para el refuerzo de una luminiscencia o para la mejora de la relación señal a fondo es además ventajoso que entre la capa ópticamente transparente (a) y los elementos de reconocimiento biológicos o bioquímicos o sintéticos inmovilizados se aplique una capa de metal fina, preferiblemente de oro o plata, dado el caso una capa dieléctrica adicional con menor índice de refracción que la capa (a), por ejemplo, de sílice o fluoruro de magnesio, seleccionándose el grosor de esta capa de metal y de la capa intermedia eventualmente adicional de modo que se pueda excitar un plasmón de superficie en la longitud de ondas de excitación y/o de la longitud de onda de
35 luminiscencia.

Para muchas aplicaciones es ventajoso que la estructura de rejilla (c) sea una rejilla de difracción con un periodo uniforme. El ángulo de resonancia para el acoplamiento de la luz de excitación por la estructura de rejilla (c) hasta los campos de medida es uniforme en toda la zona de la estructura de rejilla. Si se acopla por ejemplo la luz de excitación de distintas fuentes de luz con longitudes de onda claramente distintas entonces pueden diferenciarse
40 claramente los ángulos de resonancia correspondientes para el acoplamiento, lo que puede requerir el uso de elementos de ajuste adicionales en un sistema óptico para la acogida de la plataforma sensora o puede conducir a ángulos de acoplamiento espacialmente muy favorables. Por ejemplo para evitar distintos ángulos de acoplamiento puede ser ventajoso por tanto que la estructura de rejilla (c) sea una rejilla multidifracción.

45 Para aplicaciones en las que se deben evitar cambios de ángulos de acoplamiento y desacoplamiento a consecuencia de un contacto con la muestra, puede ser ventajoso que se encuentren estructuras de rejilla (c) y dado el caso estructuras de rejilla (c') adicionalmente presentes fuera de la zona de los compartimentos de muestra.

50 Para otras aplicaciones, de forma particular con excitación laminar de gran magnitud se prefiere en consecuencia que las estructuras de rejilla (c) y dado el caso estructuras de rejilla (c') adicionalmente presentes se extienda por la zona de varios o todos los compartimentos para muestras.

Si la luz de excitación acoplada con una estructura de rejilla (c) debe discurrir por la capa ópticamente transparente (a), que se extiende por varios compartimentos para muestras, entonces es necesario que el material de la capa (g) de sellado estanco que se encuentra en contacto con la plataforma sensora en la superficie sustrato con la

plataforma sensora sea transparente al menos en una profundidad de penetración del campo evanescente tanto para la radiación de excitación como también para la radiación luminiscente excitada.

Para evitar reflexiones o luz dispersa es ventajoso que la capa (g) se presente como capa doble, la primera que está en contacto con la superficie de la plataforma sensora, es transparente tanto para la radiación de excitación como también para la radiación de luminiscencia excitada, mientras que la siguiente capa que se encuentra distanciada de la plataforma sensora en la zona espectral de la radiación de excitación y de la radiación luminiscente excitada es absorbente.

Para aplicaciones en las que la amplificación de la luz de excitación y dado el caso luz luminiscente generada y reacoplada en la capa ópticamente transparente (a) guía de ondas se debe limitar respectivamente a la zona de un compartimento para muestras individual, siendo en consecuencia ventajoso que el material de la capa (g) de sellado estanco, en contacto con la plataforma sensora sea absorbente en la zona espectral de la radiación de excitación y de la radiación luminiscente excitada.

Es ventajoso que el material de la capa (g) de sellado estanco en contacto con la plataforma sensora sea autoadherente con la plataforma sensora.

Por tanto se prefiere de forma particular que el material de la capa (g) de sellado estanco en contacto con la plataforma sensora se componga de un polisiloxano.

Se prefiere que en un compartimento para muestras se encuentren de 5 a 1000, preferiblemente de 10 a 400 campos de medida.

Adicionalmente se prefiere que un campo de medida individual acoja en un compartimento para muestras una superficie de 0,001 a 6 mm², presentando el campo de medida igual o distinto tamaño.

Los compartimentos para muestras presentan de forma ventajosa respectivamente un volumen de 100 nl a 1 ml.

El dispositivo de acuerdo con la invención se puede operar tanto como sistema de flujo cerrado como también como sistema abierto. En el primer caso el dispositivo se configura de modo que los compartimentos para muestras estén cerrados sobre el lateral opuesta a la capa ópticamente transparente (a), con excepción de las aberturas de entrada y/o salida para la alimentación o la salida de muestras y dado el caso reactivos adicionales, y la alimentación o la salida de muestras y dado el caso reactivos adicionales se realice en un sistema de flujo cerrado, en donde en el caso de alimentación de líquidos se dividan preferiblemente en varios campos de medida o segmentos con aberturas de entrada y salida conjuntas o se dirijan consecutivamente.

A este respecto puede realizarse la alimentación de las muestras y dado el caso de reactivos adicionales en microcanales paralelos o cruzados, con acción de diferencias de presión o potenciales eléctricos o electromagnéticos.

En el caso de un sistema abierto el dispositivo de acuerdo con la invención está configurado de modo que en el compartimento para muestras en el lateral opuesto a la capa ópticamente transparente (a) se presentan aberturas para la adición o retirada dirigida localmente de muestras u otros reactivos. Adicionalmente pueden estar provistos compartimentos para reactivos que se ponen en contacto con los campos de medida durante el procedimiento para la detección de analito.

Sobre la plataforma sensora es ventajoso aplicar marcados reconocibles óptica o mecánicamente para facilitar el ajuste en un sistema óptico y/o para la unión con la capa (g) que contiene los recesos para los compartimentos para muestras.

Otro objeto de la invención es un sistema analítico para la determinación de una o varias luminiscencias en correspondencia con la reivindicación 23.

A este respecto es ventajoso que la luz de excitación emitida por al menos una fuente de luz sea coherente y se irradie con el ángulo de resonancia para el acoplamiento en la capa ópticamente transparente (a) sobre el o los campos de medida.

Para excitar una pluralidad de campos de medida o todos los campos de medida simultáneamente y determinar su luminiscencia simultáneamente se prefiere que amplificar la luz de excitación de al menos una fuente de luz con una óptica de amplificación hasta un haz de rayos esencialmente paralelos y se irradie bajo el ángulo de resonancia para el acoplamiento en la capa ópticamente transparente (a) sobre uno o varios campos de medida.

Para disminuir las señales de luminiscencia fuera del campo de medida puede ser ventajoso también sin embargo que la luz de excitación de al menos una fuente de luz se descomponga mediante uno, en el caso de varias fuentes de luz dado el caso varios elementos ópticos de difracción, preferiblemente rejilla Damman, o elementos ópticos

refractivos, preferiblemente conjuntos de microlentes, en una pluralidad de rayos individuales de intensidad lo más igual posible de rayos parciales con origen en una fuente de luz conjunta, que se irradian respectivamente esencialmente en paralelo entre sí sobre campos de medida separados espacialmente.

5 En el caso de intensidad suficiente de una fuente de luz individual o de necesidad de fuentes de luz de distinta longitud de onda de emisión, por ejemplo, para aplicaciones biológicas es ventajoso que se usen como fuentes de luz de excitación dos o más fuentes de luz coherentes con igual o distinta longitud de onda de emisión.

Para absorber por separado las señales de una pluralidad de campos de medida se prefiere que para la detección se use al menos un detector de posicionamiento.

10 A este respecto se puede usar como el al menos un detector de posicionamiento al menos un detector del grupo de cámaras CDC, microplacas CCD, conjuntos de fotodiodos, conjuntos de diodos de avalancha, placas multicanal y fotomultiplicadores de canales múltiples.

15 En el sistema analítico de acuerdo con la invención según una de las realizaciones citadas se pueden usar entre una o varias fuentes de luz de excitación y la plataforma sensora según una de las realizaciones citadas previamente y/o entre la plataforma sensora citada y el o los varios detectores, componentes ópticos del grupo de lentes o sistemas de lentes para la conformación del haz de luz que se transmite, espejos planos o curvados para la desviación y dado el caso para la conformación adicional de haces de luz, prismas para la derivación y dado el caso para la distribución espectral de haces de luz, espejos dicróicos para la desviación selectiva espectral de partes de haces de luz, filtros neutros para la regulación de intensidad de luz que se transmita, filtros ópticos o monocromadores para la transmisión selectiva espectral de partes de haces de luz o elementos selectivos de polarización para la elección de dispositivos de polarización discretos de la luz de excitación o de luminiscencia.

20 Para una serie de aplicaciones es ventajoso que la irradiación de la luz de excitación se realice en pulsos con una duración entre 1 segundo y 10 minutos.

25 Para medidas cinéticas o para la discriminación inmediata de fluorescencia en disminución de impurezas fluorescentes en la muestra o en materiales de componentes del sistema óptico o de la plataforma sensora propiamente puede ser ventajoso que se mida la luz de emisión de los campos de medida en relación al tiempo.

30 Adicionalmente se prefiere que el sistema óptico de acuerdo con la invención comprenda componentes con los que se midan las señales de luz para la referenciación de la luz de excitación disponible del grupo constituido por luz de excitación en la zona de fuentes de luz o después de su amplificación o después de su división en rayos parciales, luz dispersa con la longitud de onda de excitación en la región de uno o varios campos de medida espacialmente separados, y luz desacoplada de longitud de onda de excitación mediante la estructura de rejilla (c) junto a los campos de medida. A este respecto es especialmente ventajoso que los campos de medida sean idénticos para la determinación de la luz de emisión y de la señal de referencia.

35 Es también posible que la irradiación de la luz de excitación y la detección de la luz de emisión se realicen desde uno o varios campos de medida secuencialmente para campos de medida individuales o múltiples. A este respecto la excitación secuencial y detección puede realizarse con uso de componentes ópticos en movimiento, que están constituidos del grupo de espejos, prismas de desviación y espejos dicróicos. Normalmente se usan para excitación secuencial y detección en sistemas de dispositivos bioanalíticos los denominados escáneres comercialmente disponibles, con los que se conduce al menos mediante espejos en movimiento un rayo de luz de excitación secuencialmente por la superficie que se va a investigar. En la mayoría de los sistemas de escáner se cambia a este respecto el ángulo entre la superficie iluminada y el rayo de luz de excitación. Para cumplir la condición de resonancia del acoplamiento de la luz de excitación en la capa guía de ondas de la plataforma sensora de acuerdo con la invención este ángulo debe permanecer esencialmente constante, es decir, un escáner de uso debe funcionar en consonancia angular en el sistema óptico de acuerdo con la invención. Este requisito se cumple en algunos escáneres que se adquieren comercialmente. Al mismo tiempo tampoco puede cambiarse el tamaño de la superficie excitada sobre la plataforma sensora. Por tanto es un objeto adicional de esta invención un sistema óptico que se caracteriza porque se realiza excitación secuencial y detección con uso de un escáner esencialmente de control de ángulo y foco.

45 Otra forma de realización posible es que la plataforma sensora se mueva entre etapas de excitación y detección secuenciales. En este caso se pueden fijar espacialmente la o las fuentes de luz de excitación y los componentes usados para la detección.

Otro objeto de la invención es un procedimiento para la detección de luminiscencia de uno o varios analitos en correspondencia con la reivindicación 31.

A este respecto se prefiere que los campos de medida citados se encuentren en interacción óptica con el campo evanescente de luz de excitación conducida en la guía de ondas óptica plana.

En el procedimiento citado previamente es posible que se midan simultáneamente (1) la luminiscencia irradiada isótropa o (2) luminiscencia o luminiscencias acopladas en la capa ópticamente transparente (a) y desacopladas por la estructura de rejilla (c) de ambas partes (1) y (2).

5 En el procedimiento de acuerdo con la invención se puede usar para la generación de luminiscencia o fluorescencia una etiqueta de luminiscencia o fluorescencia que se puede excitar y emitir con una longitud de onda de 300 nm y 1100 nm.

10 Las etiquetas de luminiscencia o de fluorescencia pueden tratarse de colorantes de luminiscencia o de fluorescencia convencionales o también de las denominadas nanopartículas luminiscentes o fluorescentes basadas en semiconductores (W. C. W. Chan und S. Nie, "Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection", Science 281 (1998) 2016 - 2018).

La etiqueta de luminiscencia puede estar relacionada con los analitos o en un ensayo competitivo con un análogo del analito o en un ensayo múltiple con una de las parejas de unión de los elementos de reconocimiento biológicos o bioquímicos o sintéticos inmovilizados o con los elementos de reconocimiento biológicos o bioquímicos o sintéticos.

15 Adicionalmente se pueden usar una segunda o más etiquetas de luminiscencia con igual o distinta longitud de onda de excitación que la primera etiqueta de luminiscencia e igual o distinta longitud de onda de emisión. A este respecto puede ser ventajoso si se puedan excitar la segunda o las demás etiquetas de luminiscencia con la misma longitud de onda que la primera etiqueta de luminiscencia, pero emiten con otras longitudes de onda.

20 Para otras aplicaciones es ventajoso que los espectros de excitación y los espectros de emisión de la etiqueta de luminiscencia usada se solapen poco o casi no lo hagan.

En el procedimiento de acuerdo con la invención puede ser ventajoso adicionalmente que se use para la detección del analito transferencia de energía por carga u óptica desde una primera etiqueta de luminiscencia que sirve como donador hasta una segunda etiqueta de luminiscencia que sirve como aceptor.

25 Adicionalmente puede ser ventajoso determinar uno o varios cambios luminiscentes del índice de refracción efectivo en los campos de medida. A este respecto puede ser adicionalmente ventajoso emprender por polarización selectiva una o varias luminiscencias y/o determinaciones de señales de luz en las longitudes de onda de excitación. Además el procedimiento permite la posibilidad de que se midan las o las luminiscencias con otra polarización que la de la luz de excitación.

30 El procedimiento de acuerdo con la invención según una de las formas de realización indicadas previamente posibilita una determinación simultánea o secuencial, cuantitativa o cualitativa de uno o varios analitos del grupo de anticuerpos o antígenos, receptores o ligandos, quelantes o "componentes de histidina-Tag", oligonucleótidos, hebras de ADN o ARN, análogos de ADN o ARN, enzimas, cofactores de enzima o inhibidores, lectinas e hidratos de carbono.

35 El procedimiento descrito anteriormente permite determinar material biológico directamente sin mecanismos de multiplicación biológicos o bioquímicos (por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)). Además de la simplificación de la forma de proceder se consigue aquí una correlación lineal de ARNm y señal observada. Esto significa que también se pueden determinar con alta sensibilidad y cuantitativamente los denominados "mensajes extraños", es decir, ARNm biológicamente relevantes, que aparecen en concentraciones muy pequeñas. La realización en paralelo de las medidas en una plataforma de placa de 96 pocillos hace posible obtener resultados en calidad y conversión desconocida hasta ahora (véase el ejemplo de realización 1e). Por tanto como consecuencia se evidencia claramente que en los estudios preclínicos y clínicos se pueden elaborar cantidades de muestra grandes con mucha más rapidez y precisión que con los procedimientos manuales usados hasta ahora. La detección de dos marcadores de fluorescencia sobre una mancha de sustancia hace posible además la determinación directa de la inducción relativa en una medida individual (véase el ejemplo 2e). No es necesario por tanto una referenciación de microplaca a microplaca. Por tanto las exigencias de calidad en reproducibilidad lote a lote de las plataformas sensoras se pueden reducir de forma significativa.

40 Las muestras que se van a estudiar pueden ser líquidos corporales de origen natural como sangre, suero, plasma, linfa o líquidos de tejidos u orina o yema de huevo.

50 Pero una muestra que se va a estudiar puede ser también un líquido ópticamente turbio, agua superficial, un extracto de suelo o de plantas, un caldo biológico o de proceso de síntesis.

Las muestras que se van a estudiar pueden obtenerse también de partes de tejidos biológicos.

Otro objeto de la presente invención es el uso de un dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 22 o del

sistema analítico según una de las reivindicaciones 23 a 30.

Con los ejemplos de realización siguientes se debe aclarar y demostrar más exactamente la invención.

Ejemplo 1: dispositivo y procedimiento para la determinación simultánea de diferencias en el modelo de expresión de ARNm seleccionado de distintas posiciones de tejidos tumorales

Se recogen tejidos en distintas posiciones de un tumor extraído – en este ejemplo de una glándula próstata – y se investiga en cuanto a diferencias en el modelo de expresión de ARNm seleccionado como función de la posición en tejido tumoral. Los resultados permiten un dictamen basado en informaciones genéticamente puras independientemente de las investigaciones histológicas. En la bibliografía se describe la importancia biológica de un procedimiento de este tipo y aspectos de la preparación de muestras (Kristina A. Cole, David B. Krizmann, and Michael R. Emmert-Buck, "The genetics of cancer - a 3D model" Nature Genetics Supplement 21 (1999) 38-41).

Preparación y aplicación de elementos de reconocimiento biológicos en una plataforma sensora de un dispositivo con 400 campos de medida discretos en 96 compartimentos para muestra

a) Se seleccionan clones de 100 genes que – en base a resultados descritos en la bibliografía – juegan un papel en la carcinogénesis o en reacciones inflamatorias (véase Kristina A. Cole, David B. Krizmann, and Michael R. Emmert-Buck, "The genetics of cancer - a 3D model", Nature Genetics Supplement 21 (1999) 38-41, así como la bibliografía pertinente ahí citada), así como aquellos genes que no juegan de forma típica papel alguno en estos procesos, cuyo nivel de expresión puede mantenerse constante en el caso ideal y por tanto pueden aprovecharse para la estandarización (los denominados "genes caseros" como por ejemplo β -actina, GAPDH, tubulina, ubiquitina, fosfolipasa A2, etc.), como elementos de reconocimiento biológicos, que se deben inmovilizar sobre la plataforma sensora en campos de medida discretos.

Al primer grupo de genes de importancia potencial para la enfermedad seleccionados pertenecen entre otros serina/treonina-quinasa (STK2), la subunidad beta de proteasoma (PSMB4), antígeno CD36 (receptor de colágeno de tipo I, receptor de trombospondina), fosfolipasa A2 (PLA2G1B), proteína ribosomal L17 (RPL17), desmogleína 2 (DSG2), proteína-tirosin-quinasa Tyro 3 (TYRO3), colágeno de tipo IV (COL4A4), "factor 3 de transcripción activante" (ATF3), anexina 1 (ANX), otros enzimas de reparación, quinasas, etc.

El material genético requerido puede obtenerse en forma de plásmido del UniGene Set NIHs Cancer Genome Anatomy Projects o de forma alternativa de fuentes comerciales que comercializan el material del I.M.A.G.E. Konsortiums. La transformación y amplificación de las secuencias génicas en el plásmido respecto a los ADNc correspondientes se realiza por medio de las parejas de cebadores correspondientes y genera moléculas de doble hebra (ADNc muestras) con una longitud entre aproximadamente 300 y 1000 pares de bases.

b) Se usa una plataforma sensora con las dimensiones exteriores de 76 mm de anchura x 112 mm de longitud x 0,7 mm de grosor, sobre cuya superficie se encuentran los 96 pocillos con las dimensiones interiores de 7 x 7 mm de una placa de microtítulos clásica. El material sustrato (capa ópticamente transparente (b)) se compone de vidrio AF 45 (índice de refracción $n = 1,52$ a 633 nm). En el sustrato se genera mediante iluminación holográfica de la capa (b) cubierta con fotolaca proyectada y a continuación se graba químicamente por vía húmeda una estructura ininterrumpida de una rejilla en relieve de superficie de un periodo de 360 nm y de una profundidad de 25 +/- 5 nm, con orientación de las líneas de rejilla en paralelo respecto a la anchura contrastada de la plataforma sensora. La capa ópticamente transparente (a) guía de ondas de Ta₂O₅ se genera sobre la capa ópticamente transparente (b) mediante chisporroteo DC soportado por campo magnético reactivo (véase el documento DE-A-4410258) y presenta un índice de refracción de 2,15 a 633 nm (grosor de capa 150 nm). A consecuencia del proceso de separación la estructura de rejilla se transmite a la superficie de la capa guía de ondas aproximadamente en relación 1:1.

Para la preparación de la inmovilización de elementos de reconocimiento bioquímicos o biológicos o sintéticos se purifica las plataformas sensoras con cloroformo en el equipo de ultrasonidos y se activa químicamente mediante una reacción de silanización con glicidiloxipropiltrimetoxisilano y se prepara de este modo para la inmovilización de la muestra de ADNc como elemento de reconocimiento biológico. Los ADNc individuales se aplican en una concentración de 50 ng/μl mediante una micropipeta de control piezométrico comercial (GeSim GmbH, Großkrummannsdorf, DE) respectivamente con 10 gotas en 0,1 nl en un punto, lo que conduce a diámetros de mancha como campos de medida discretos de aproximadamente 150 μm. En una disposición de manchas de 20 x 20 (dispositivo de 400 rasgos) se generan respectivamente 4 campos de medida con igual ADNc, de modo que al final del proceso de inmovilización se conoce la posición fijada mediante un algoritmo estadístico de 100 ADNc distintos que sirven como elementos de reconocimiento, predefiniéndose no obstante estadísticamente. Las manchas presentan una distancia de los puntos medios de mancha de 300 μm y ocupan una superficie de 6 x 6 mm sobre la plataforma sensora, que con la que la

capa (g) de cierre estanco de polimetilsiloxano (PDMS) con la que se encuentra en contacto, los recesos cuadráticos correspondientes que rodean los dispositivos de 7 mm x 7 mm forma una placa de 96 pocillos. Sobre la plataforma sensora se genera en el fondo de los 96 compartimentos para muestra conjuntos una retícula idéntica de campos de medida discretos. Mediante tratamiento térmico – calentamiento a 60° C durante 30 minutos se puede optimizar la inmovilización.

c) Material para muestras:

En distintas posiciones de una glándula próstata (tanto en tejido obtenido fenotípicamente como también en tejido no obtenido fenotípicamente) se obtiene material de tejido (aproximadamente de 50000 a 100000 células) por ejemplo en forma de cortes finos de tejido. El tejido se presenta mecánicamente en estado congelado y se aísla "ARN completo" mediante una extracción con fenol / cloroformo patrón. Mediante una columna Oligotex Spin (Qiagen, Hilden, DE) se aísla ARNm de la fracción de ARN completo. Mediante un procedimiento de transcriptasa inversa (por ejemplo, Life Technologies) en presencia de una nucleobase marcada con Cy5 (Pharmacia Amersham) (Cy5-dUTP) se transforman los tipos de ARNm completo en moléculas de ADNc marcadas con fluorescencia. El material así obtenido se recoge en tampón de hibridación de modo que presente una concentración total de 10 ng/μg como máximo como muestra líquida.

d) Sistema analítico

Sistema óptico

i) Unidad de excitación

La plataforma sensora está montada sobre una unidad de ajuste asistida informáticamente, que permite la traslación en paralelo o vertical respecto a las líneas de rejilla así como una rotación del eje de giro en paralelo respecto a las líneas de rejilla y por el centro de gravedad de la mancha de luz de excitación que aparece sobre la estructura de rejilla (I) para el acoplamiento en la plataforma sensora citada en el ejemplo 1b. Inmediatamente tras el láser usado como fuente de luz de excitación se encuentra en la trayectoria de la luz un diafragma, para bloquear la trayectoria de la luz, si no se deben recoger datos de medida. Adicionalmente se pueden establecer en la trayectoria de la luz filtros neutros o polarizadores en estos lugares o también otras posiciones en otra trayectoria de la luz de excitación respecto a la plataforma sensora para variar la intensidad de excitación por etapas o de forma continua.

El rayo de luz de excitación de un láser de helio-neón a 632,8 nm se pondera con una óptica de ampliación de 25 veces sobre un haz de rayos paralelo con sección transversal en forma de círculo de 25 mm de diámetro. De esto se selecciona una superficie cuadrática de 10 mm de longitud x 10 mm de anchura (que corresponde con las designaciones para las estructuras de rejilla) desde la parte central del haz de luz de excitación y conduce por un espejo dicróico (650 DRLP, Omega Optical, Brattleborough, VT, EEUU) por la capa ópticamente transparente (a) a una matriz de 96 en el centro del haz de luz de excitación. La plataforma sensora se ajusta al acoplamiento máximo que se pueda reconocer en uno del mínimo de transmisión de luz de excitación por la plataforma sensora y un máximo de la suma de luz de excitación reflejada y dentro de las exactitudes de medida con igual ángulo que el de la reflexión tras acoplamiento en la plataforma sensora de luz de excitación acoplada de nuevo con la estructura de rejilla (c) atravesada. El ángulo de acoplamiento óptimo se puede determinar tanto por control visual como también informáticamente con las señales de fotodiodos posicionados en las salidas de rayos correspondientes con refuerzos subsiguientes. De este modo se determina como ángulo de resonancia para el acoplamiento un ángulo de +3,5°.

ii) Detección

Como detector de posicionamiento sirve una cámara CCD (TE3/A Astrocarn, Cambridge, Reino Unido) con enfriamiento por Peltier (temperatura de operación -30° C). El registro de las señales y focalización sobre la microplaca CCD se realiza con un objetivo Heligon-Tandem ((Rodestock, Cine-Heligon 2,1/100 mm doble). Entre las dos mitades del objetivo Heligon-Tandem se encuentran montados sobre un intercambiador de filtro, 2 filtros de interferencia (Omgega, Brattleborough, Vermont, EEUU) con longitudes de onda central de 680 nm y 40 nm de ancho de banda, así como un filtro neutro (para la transmisión de la luz de excitación controlada, debilitada y luz de luminiscencia mucho más débil de los campos de medida) o un filtro neutro en combinación con un filtro de interferencia (para la transmisión de la luz de excitación debilitada, dispersada por los campos de medida). Las señales con las longitudes de onda de excitación y de luminiscencia se miden de forma alternante. La valoración de los datos se realiza mediante software de procesamiento de imágenes adquirido comercialmente (ImagePro Plus).

e) Procedimiento para la detección de luminiscencia de la reacción de hibridación:

En cada uno de los 96 compartimentos para muestra del dispositivo anteriormente descrito con matrices de ADNc inmovilizadas se incorporan manualmente o con un robot de laboratorio (por ejemplo Beckman 2000) 30 μl de la

muestra líquida tratada previamente como en el párrafo “material de muestra”. La placa de 96 pocillos se tapa a continuación herméticamente con una cubierta de modo que cada pocillo disponga de un espacio de vapor como máximo de 100 µl. En una primera etapa térmica (aumento de temperatura hasta 85° C durante 30 minutos) se deshíbridan los ADNc de doble hebra inmovilizados en la superficie (reunidos) y se preparan de este modo para la hibridación con el ADNc de hebra única marcado con Cy5 disponible en la muestra. Mediante enfriamiento lento hasta 43° C (aproximadamente 2° C por minuto) y 8 horas de acondicionamiento térmico a 43° C es posible una hibridación de ADNc de hebra única inmovilizada con las moléculas marcadas con Cy5 complementarias en las condiciones estrictas indicadas anteriormente (hibridación sólo de hebras individuales complementarias completas). Mediante intercambio del líquido de muestra que queda y reducción hasta temperatura ambiente se puede estabilizar este estado.

Para la lectura de la matriz en los compartimentos para muestra individuales se usa el dispositivo previamente descrito en el sistema analítico descrito y se ajusta hasta el acoplamiento máximo de la luz de excitación en la matriz del primero de los 96 compartimentos para muestra en correspondencia a la descripción anterior, lo que se controla con la posición del intercambiador de filtro para la longitud de onda de excitación. A continuación se mide la intensidad de la luz de fluorescencia de los campos de medida (manchas) de la matriz con posición del intercambiador de filtro para la longitud de onda de luminiscencia. La lectura de la matriz en los compartimentos para muestra adicionales se realiza secuencialmente (respectivamente para un compartimento para muestra con una matriz de 400 campos de medida discretos uno tras otro), mediante la traslación del dispositivo hasta la siguiente posición para la lectura de las señales de luminiscencia desde el siguiente compartimento para muestra.

Ejemplo 2: determinación del tipo y de la magnitud de la inducción de enzima en toxicología y metabolismo del fármaco mediante un procedimiento diferencial rápido y en paralelo basado en micromatrices

En el desarrollo de productos farmacéuticos se llevan a cabo tras aplicación de xenobióticos (sustancias químicas de efecto biológico y/o farmacológico) en animales de ensayo y en humanos estudios del metabolismo de principios activos y estudios toxicológicos. A este respecto se estudian entre otros en el “First Path Metabolismus” las primeras reacciones de degradación metabólicas en el hígado. Frecuentemente se observa tras la administración de tales sustancias una “inducción de enzima” es decir una influencia de la concentración del enzima que participa en el metabolismo del hígado, de forma típica del grupo de isoenzimas P450 (monooxigenasas funcionales mixtas). Este cambio influye también en la calidad y en la velocidad de otros metabolismos de tales sustancias. Existe la necesidad de medir prematuramente en el ensayo de nuevas sustancias farmacológicamente activas esta influencia en el procedimiento de ensayo sobre el plano de ARNm cuantitativamente y con mayor sensibilidad en comparación con el metabolismo de organismos no tratados (no inducidos).

Preparación y aplicación de elementos de reconocimiento biológicos sobre una plataforma sensora de un dispositivo con 100 campos de medida discretos en 96 compartimentos para muestra

- a) Se seleccionan clones de los 20 isoenzimas de citocromo P450 más importantes descritos en la bibliografía que juegan un papel en “First Path Metabolismus” en el hígado, así como 5 clones de genes que de forma típica no juegan papel alguno en estos procesos, cuyo nivel de expresión se mantiene constante en el caso ideal y por tanto puede aprovecharse para la estandarización (los denominados “genes caseros” como por ejemplo β -actina, GAPDH, tubulina, ubiquitina, fosfolipasa A2, etc.), como elementos de reconocimiento biológicos que se deben inmovilizar sobre la plataforma sensora en campos de medida discretos.

Al primer grupo de sustancias marcadoras biológicas seleccionadas pertenecen entre otros CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1, CYP2B2, CYP3A1, CYP3A2, CYP4A1.

El material genético requerido se puede adquirir comercialmente en forma de plásmido. La transformación y amplificación de las secuencias génicas en el plásmido en los ADNc correspondientes se realiza mediante los pares de cebadores correspondientes y genera moléculas de doble hebra (ADNc muestras) con una longitud entre aproximadamente 300 y 100 pares de bases.

- b) Se usa una plataforma sensora con las dimensiones exteriores de 76 mm de anchura x 112 mm de longitud x 0,7 mm de grosor, sobre cuya superficie se pueden generar mediante combinación con una placa de polimetilmetacrilato con cavidades abiertas en la dirección de la plataforma sensora con las dimensiones interiores de 7 mm de anchura x 7 mm de longitud x 0,15 mm de altura 96 celdas de microflujo en la retícula de una placa de microtítulos clásica. Mediante anillos de estanqueidad que rodean las cavidades se cierran de forma estanca las cavidades unas contra otras.

El material sustrato (capa ópticamente transparente (b) se compone de vidrio AF 45 (índice de refracción $n = 1,52$ a 633 nm). En el sustrato se genera mediante iluminación holográfica de la capa (b) cubierta con fotolaca proyectada y a continuación grabado mediante química por vía húmeda una retícula de pares de líneas de rejilla de

acoplamiento y desacoplamiento que discurren en paralelo por la anchura de la plataforma sensora (periodo de 360 nm) de 12 +/- 3 nm de profundidad de rejilla, estando las líneas de rejilla remarcadas por toda la anchura de la plataforma sensora. La distancia entre los pares de rejilla sucesivos es de 9 mm, la longitud de las estructuras de rejilla individuales (paralelas a la longitud de la plataforma sensora) es de 0,5 mm. La distancia entre la rejilla acoplada y desacoplada de un par de rejillas es de 5,5 mm, de modo que puede tener lugar un acoplamiento y desacoplamiento de la luz de excitación respectivamente dentro de la zona del compartimento para muestras, tras combinación de la plataforma sensora con la placa de polimetilmetacrilato descrita anteriormente.

La capa ópticamente transparente (a) guía de ondas de Ta₂O₅ sobre la capa ópticamente transparente (b) se genera mediante chisporroteo DC soportado por campo magnético reactivo (véase el documento DE-A-4410258) y presenta un índice de refracción de 2,15 a 633 nm (densidad de capa 150 nm). A consecuencia del proceso de separación la estructura de rejilla se transmite a la superficie de la capa guía de ondas aproximadamente en relación dimensional 1:1, transmitiéndose la estructura de rejilla.

Los compartimentos para muestra formados por la plataforma sensora y las placas de polimetilmetacrilato combinadas con ella presentan sobre las superficies límite contrapuestas a la plataforma sensora aberturas realizadas cónicamente, de modo que se puede realizar un llenado o vaciado de los compartimentos para muestra mediante introducción a presión desde pipetas adquiridas comercialmente convencionales de polipropileno.

Para la preparación de la inmovilización de elementos de reconocimiento bioquímicos o biológicos o sintéticos se purifica las plataformas sensoras con cloroformo en el equipo de ultrasonidos y se activa químicamente mediante una reacción de silanización con glicidiloxipropiltrimetoxisilano y se prepara de este modo para la inmovilización de la muestra de ADNc como elemento de reconocimiento biológico. Los ADNc individuales se aplican en una concentración de 50 ng/μl mediante una micropipeta de control piezométrico comercial (GeSim GmbH, Großhermannsdorf, DE) respectivamente con 10 gotas en 0,1 nl en un punto, lo que conduce a diámetros de mancha como campos de medida discretos de aproximadamente 150 μm. En una disposición de mancha de 10 x 10 (dispositivo de 100 matrices) se generan respectivamente 4 campos de medida con igual ADNc, de modo que al final del proceso de inmovilización se conoce la posición fijada mediante un algoritmo estadístico de 25 ADNc distintos que sirven como elementos de reconocimiento, predefiniéndose no obstante estadísticamente. Las manchas presentan una distancia de los puntos medios de mancha de 400 μm y ocupan una superficie de 4 x 4 mm sobre la plataforma sensora. Mediante tratamiento térmico – calentamiento a 60° C durante 30 minutos se puede optimizar la inmovilización.

Sobre la plataforma sensora así preparada se aplica la placa de polimetilmetacrilato descrita de modo que los compartimentos para muestra individuales se cierra de forma estanca unos contra otros mediante las juntas circundantes y las matrices se disponen centralmente en el fondo de los compartimentos para muestra respectivamente en 100 campos de media formados por las manchas.

c) Material para muestra:

i) ARNm de animales de ensayo no inducidos (no tratados con xenobióticos)

Se congelan por choque aproximadamente 250 mg de hígado de ratones sacrificados con nitrógeno líquido, se trituran en el mortero y se desengrasan con cloroformo. A continuación se aísla "ARN completo" mediante una extracción con fenol/cloroformo convencional. Mediante una columna Oligotex Spin (Qiagen) se aísla el ARNm de la fracción de ARN completo. Mediante un procedimiento de transcriptasa inversa (por ejemplo, Life Technologies) en presencia de una nucleobase marcada con Cy5 (Pharmacia Amersham) (Cy5-dUTP) se transforman todos los tipos de ARNm en moléculas de ADNc marcadas con fluorescencia. El material así obtenido se recoge en tampón de hibridación de modo que presente una concentración total de 10 ng/μl máxima como muestra líquida.

ii) ARNm de animales de ensayo inducidos (tratados con xenobióticos siendo adecuado por ejemplo como inductor de ensayo fenobarbital)

La ejecución se realiza de forma análoga a como se describe previamente en el ejemplo 2.c.i), con la única diferencia de que se realiza el marcado de fluorescencia con Cy3 (Pharmacia Amersham) en lugar de Cy5.

iii) Se mezcla ARNm marcado de los preparados i) e ii) en relación 1:1

d) Sistema analítico

Sistema óptico

i) Unidad de excitación

La plataforma sensora está montada sobre una unidad de ajuste asistida informáticamente, que permite la

traslación en paralelo o vertical respecto a las líneas de rejilla así como una rotación del eje de giro en paralelo respecto a las líneas de rejilla y por el centro de gravedad de la mancha de luz de excitación que aparece sobre la estructura de rejilla (I) para el acoplamiento en la plataforma sensora citada en el ejemplo 2b). Inmediatamente tras el láser usado como fuente de luz de excitación se encuentra en la trayectoria de la luz un diafragma, para bloquear la trayectoria de la luz, si no se deben recoger datos de medida. Adicionalmente se pueden establecer en la trayectoria de la luz filtros neutros o polarizadores en estos lugares o también otras posiciones en otra trayectoria de la luz de excitación respecto a la plataforma sensora para variar la intensidad de excitación por etapas o de forma continua.

El rayo de luz de excitación de un láser de helio-neón (2 mW) se amplía con una combinación de lentes, con uso de una lente cilíndrica, en un rayo de luz en forma de ranura (paralelo a las líneas de rejilla de la plataforma sensora). Las regiones periféricas superior e inferior de la luz de excitación ligeramente divergente paralela a las líneas de rejilla, pero paralela a la proyección vertical de la misma, se ocultan con una ranura. El haz de luz resultante con sección transversal en forma de ranura sobre la estructura de rejilla se conduce sobre el canto derecho de la rejilla de acoplamiento en uno de los compartimentos para muestra. La mancha de luz de excitación presenta un tamaño de aproximadamente 0,8 mm de longitud x 4 mm de anchura. La plataforma sensora se ajusta al acoplamiento máximo, lo que se puede reconocer a intensidad máxima de la luz dispersada que se irradia a lo largo de la luz de excitación conducida en modo acoplado mediante dispersión. Este máximo se puede determinar tanto por determinación visual como también por representación de la luz dispersa recogida con el sistema de representación a lo largo del modo de excitación sobre un detector optoelectrónico, por ejemplo con los píxeles de una cámara CCD como ejemplo de un detector de posicionamiento o de un fotodiodo como ejemplo de un detector no de posicionamiento. En las mismas condiciones de acoplamiento se mide una señal máxima para la luz de excitación transmitida en la guía de ondas desacoplada en la rejilla de desacoplamiento. Como ángulo de resonancia para el acoplamiento se determina un ángulo de $+3,8^\circ$.

Como segunda fuente de luz de excitación se usa un láser de helio-neón verde con emisión a 543 nm. Mediante un espejo que se puede plegar tanto manualmente como también mediante motor entre posiciones fijas, se puede conducir el rayo de excitación en el mismo curso del rayo que el rayo láser de helio-neón rojo descrito previamente (633 nm), bloqueándose al mismo tiempo el paso del rayo del láser rojo.

El establecimiento del ángulo de resonancia para el acoplamiento se hace de igual modo a lo descrito anteriormente, determinándose un valor de $+15^\circ$.

ii) Detección

Como detector de posicionamiento sirve una cámara CCD (TE3/A Astrocarn, Cambridge, Reino Unido) con enfriamiento por Peltier (temperatura de operación -30°C). El registro de las señales y focalización sobre la microplaca CCD se realiza con un objetivo Heligon-Tandem ((Rodenstock, Cine-Heligon 2,1/100 mm doble). Entre las dos mitades del objetivo Heligon-Tandem se encuentran montados sobre un intercambiador de filtro, 2 filtros de interferencia (Omgega, Brattleborough, Vermont, EEUU) con longitudes de onda central de 680 nm y 40 nm de ancho de banda, así como un filtro neutro (para la transmisión de la luz de excitación controlada, debilitada y luz de luminiscencia mucho más débil de los campos de medida) o un filtro neutro en combinación con un filtro de interferencia (para la transmisión de la luz de excitación debilitada, dispersada por los campos de medida). Las señales con las longitudes de onda de excitación y de luminiscencia se miden de forma alternante. La valoración de los datos se realiza mediante software de procesamiento de imágenes adquirido comercialmente (ImagePro Plus).

e) Procedimiento para la detección de luminiscencia de la reacción de hibridación:

Se rellena individualmente cualquiera de las 96 celdas de microflujo con ayuda del robot de laboratorio con material biológico tratado según el procedimiento indicado anteriormente. En una primera etapa térmica (aumento de temperatura hasta 85°C durante 30 minutos) se deshibridan los ADNc de doble hebra inmovilizados en la superficie (reunidos) y se preparan de este modo para la hibridación con el ADNc de hebra única marcado con Cy5 o bien Cy3 disponible en la muestra. Mediante enfriamiento lento hasta 43°C (aproximadamente 2°C por minuto) y 8 horas de acondicionamiento térmico a 43°C es posible una hibridación de ADNc de hebra única inmovilizada con las moléculas marcadas con Cy5 o bien Cy3 complementarias en las condiciones estrictas indicadas anteriormente (hibridación sólo de hebras individuales complementarias completas), sin embargo sin preferencia cinética o termodinámica de las distintas moléculas marcadas. En una etapa adicional se reemplaza con ayuda del robot de laboratorio el líquido sobrenadante por tampón de hibridación puro, para separar el material excitable para la fluorescencia así como el material no específico unido a la superficie. Tras la medida de luminiscencia se puede alimentar para la regeneración con ayuda del robot de laboratorio solución de urea 2 molar como reactivo caótopo. Un aumento de la temperatura hasta los 80°C completa este proceso. Tras lavado adicional con tampón fosfato 10 mM y reequilibrado con tampón de hibridación puro se puede reutilizar el sistema fluido/matriz.

Para la lectura de la matriz en los compartimentos para muestra individuales se usa el dispositivo previamente

descrito en el sistema analítico descrito y se ajusta hasta el acoplamiento máximo de la luz de excitación (en primer lugar para 633 nm) en la matriz del primero de los 96 compartimentos para muestra en correspondencia a la descripción anterior, lo que se controla con la posición del intercambiador de filtro para la longitud de onda de excitación. A continuación se mide la intensidad de la luz de fluorescencia de los campos de medida (manchas) de la matriz con posición del intercambiador de filtro para la longitud de onda de luminiscencia (en primer lugar con filtro 680 DF 40, Omega Brattleborough, VT, para Cy5). La lectura de la matriz en los compartimentos para muestra adicionales se realiza secuencialmente (respectivamente para un compartimento para muestra con una matriz de 100 campos de medida discretos uno tras otro), mediante la traslación del dispositivo hasta la siguiente posición para la lectura de las señales de luminiscencia desde el siguiente compartimento para muestra.

A continuación se retorna el dispositivo a la posición de acoplamiento para la matriz en el primer compartimento para muestra y se fija tras despliegue del espejo a acoplamiento máximo para la luz de excitación verde (543 nm). A continuación se mide la intensidad de la luz de fluorescencia desde los campos de medida (manchas) de la matriz con posición del intercambiador de filtro para la longitud de onda de luminiscencia de onda corta (con filtro 580 DF 40, Omega Brattleborough, VT, EEUU, para Cy3). La lectura de la matriz en los compartimentos para muestra adicionales se realiza secuencialmente (respectivamente para un compartimento para muestra con una matriz de 100 campos de medida discretos uno tras otro), mediante la traslación del dispositivo hasta la siguiente posición para la lectura de las señales de luminiscencia desde el siguiente compartimento para muestra.

Ejemplo 3: dispositivo y procedimiento para la determinación cuantitativa simultánea de varias proteínas marcadoras de citoquina en una y varias muestras de análisis (placa multi-citoquina)

a) Como dispositivo sirve una plataforma sensora cuadrática con las dimensiones exteriores de 101,6 mm x 101,6 mm (4 pulgadas x 4 pulgadas) x 0,7 mm de grosor, unida con una capa de PDMS de 5 mm de espesor (polidimetilsilicona, Sylgard 184 Silicon Elastomer Kit de Dow Corning), en las cavidades abiertas, redondas, respectivamente de 7 mm de diámetro, a una distancia (centro a centro) de 9 mm, para los compartimentos para muestras para la recepción del volumen de análisis (de 10 a 100 µl). Las cavidades están organizadas en forma de 11 filas y 11 columnas en la capa (total 121 pocillos). Para la supresión de luz dispersa se tintó el material polimérico con pigmento oscuro.

El material sustrato de la plataforma sensora (capa ópticamente transparente (b)) se compone de vidrio AF 45 (índice de refracción $n = 1,52$ a 633 nm). En el sustrato se genera mediante iluminación holográfica de la capa (b) cubierta con fotolaca proyectada y a continuación se graba químicamente por vía húmeda una estructura ininterrumpida de una rejilla en relieve de superficie de un periodo de 360 nm y de una profundidad de 25 +/- 5 nm, con orientación de las líneas de rejilla en paralelo respecto al canto de la plataforma sensora. La capa ópticamente transparente (a) guía de ondas de Ta₂O₅ se genera sobre la capa ópticamente transparente (b) mediante chisporroteo DC soportado por campo magnético reactivo (véase el documento DE-A-4410258) y presenta un índice de refracción de 2,15 a 633 nm (grosor de capa 150 nm). Las profundidades de rejilla sobre la capa guía de ondas en las que se transmite la estructura de rejilla a consecuencia del proceso de separación alcanza aproximadamente en dimensión la relación 1:1.

La superficie de la plataforma sensora se limpia con acción de un plasma de oxígeno para eliminar la contaminación orgánica. A continuación se aplica una capa de adhesivo constituida por una monocapa de fosfato de monoctadecilo mediante un proceso de autoorganización (auto-ensamblaje) sobre la superficie guía de ondas hidrófoba. Esta modificación de la superficie conduce a una superficie muy hidrófoba (ángulo de contacto 100° a 110° respecto al agua). El proceso de modificación de la superficie se describió en la bibliografía con mayor detalle (D. Brovelli y col., Langmuir 15 (1999) 4324-4327).

Sobre la superficie hidrófoba de la plataforma sensora provista con la capa adhesiva se aplican 121 matrices (en 11 filas x 11 columnas) de 25 manchas cada una, por su parte en una disposición respectivamente de 5 filas x 5 columnas con distintos anticuerpos como elementos de reconocimiento biológicos para el reconocimiento y unión de proteínas marcadoras de citoquina con un ploter de chorro de tinta, modelo NP1C (compañía GeSiM mbH, Grosserkmannsdorf, DE).

c) Los anticuerpos se aplican en una concentración de 100 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) con una proporción de azúcar (trehalosa al 0,1%), se incuban en estado líquido durante 2 a 3 horas en atmósfera de vapor de agua saturado, a continuación se lavan y se burbujea en seco con nitrógeno. El diámetro de la mancha, con una distancia de 1 mm (centro a centro), es en promedio 0,5 mm. Se usan cinco anticuerpos distintos para el reconocimiento de citoquinas, es especial de distintas interleuquinas en las 5 filas respectivas de una matriz individual. Para obtener cualquier medida individual por muestra alimentada así como los datos para la reproducibilidad estadística del ensayo, se generan por matriz respectivamente 5 campos de medida con iguales anticuerpos de interleuquina como elementos de reconocimiento biológico. A este respecto se comprueba la posición del campo de medida con el anticuerpo de interleuquina respectivo como elemento de reconocimiento biológico mediante un algoritmo

estadístico de modo que al final del proceso de inmovilización se conoce las posiciones de 5 interleuquinas distintas en la matriz de 25 manchas, predefiniéndose no obstante estadísticamente. Con ello se puede conseguir en el procedimiento de detección siguiente un ahorro significativo en tiempo de análisis y cantidad de muestra consumida en comparación con los procedimientos de detección conocidos descritos (por ejemplo, ELISA), que implican para la determinación de la reproducibilidad del ensayo por lo general una pluralidad de medidas individuales en compartimentos para muestra discretos y debido a la gran cantidad necesaria de medidas individuales también varias placas de microtítulos.

La superficie no cubierta con proteína que queda se bloquea con 10 mg/ml de albúmina de suero (tiempo de incubación 10 minutos), para la eliminación de la unión específica de anticuerpos secundarios en el procedimiento de detección posterior. Tras aplicación de anticuerpos siguiente se une la capa de PDMS con la plataforma sensora preparada, de modo que se encuentra respectivamente una matriz entro de las 121 cavidades de la capa de PDMS.

c) Sistema analítico

Sistema óptico

i) Unidad de excitación

La plataforma sensora está montada sobre una unidad de ajuste asistida informáticamente, que permite la traslación en paralelo o vertical respecto a las líneas de rejilla así como una rotación del eje de giro en paralelo respecto a las líneas de rejilla y por el centro de gravedad de la mancha de luz de excitación que aparece sobre la estructura de rejilla (l) para el acoplamiento en la plataforma sensora citada en el ejemplo 3a). Inmediatamente tras el láser usado como fuente de luz de excitación se encuentra en la trayectoria de la luz un diafragma, para bloquear la trayectoria de la luz, si no se deben recoger datos de medida. Adicionalmente se pueden establecer en la trayectoria de la luz filtros neutros o polarizadores en estos lugares o también otras posiciones en otra trayectoria de la luz de excitación respecto a la plataforma sensora para variar la intensidad de excitación por etapas o de forma continua.

El rayo de luz de excitación de un láser de helio-neón a 632,8 nm se pondera con una óptica de ampliación de 25 veces sobre un haz de rayos paralelo con sección transversal en forma de círculo de 25 mm de diámetro. De esto se selecciona una superficie cuadrática de 10 mm de longitud x 16 mm de ancho (que corresponde con las designaciones para las estructuras de rejilla) desde la parte central del haz de luz de excitación y conduce por un espejo dicróico (650 DRLP, Omega Optical, Brattleborough, VT, EEUU) por la capa ópticamente transparente (a) a un grupo de 4 a 121 matrices en el centro del haz de luz de excitación. La plataforma sensora se ajusta al acoplamiento máximo que se pueda reconocer en uno del mínimo de transmisión de luz de excitación por la plataforma sensora y un máximo de la suma de luz de excitación reflejada y dentro de las exactitudes de medida con igual ángulo que el de la reflexión tras acoplamiento en la plataforma sensora de luz de excitación acoplada de nuevo por la estructura de rejilla (c) que atraviesa. El ángulo de acoplamiento óptimo se puede determinar tanto por control visual como también informáticamente con las señales de fotodiodos posicionados en las salidas de rayos correspondientes con refuerzos subsiguientes. De este modo se determina como ángulo de resonancia para el acoplamiento un ángulo de +3,5°.

ii) Detección

Como detector de posicionamiento sirve una cámara CCD (TE3/A Astrocarn, Cambridge, Reino Unido) con enfriamiento por Peltier (temperatura de operación -30° C). El registro de las señales y focalización sobre la microplaca CCD se realiza con un objetivo Heligon-Tandem ((Rodenstock, Cine-Heligon 2,1/100 mm doble). Entre las dos mitades del objetivo Heligon-Tandem se encuentran montados sobre un intercambiador de filtro, 2 filtros de interferencia (Omgega, Brattleborough, Vermont, EEUU) con longitudes de onda central de 680 nm y 40 nm de ancho de banda, así como un filtro neutro (para la transmisión de la luz de excitación controlada, debilitada y luz de luminiscencia mucho más débil de los campos de medida) o un filtro neutro en combinación con un filtro de interferencia (para la transmisión de la luz de excitación debilitada, dispersada por los campos de medida). Las señales con las longitudes de onda de excitación y de luminiscencia se miden de forma alternante. La valoración de los datos se realiza mediante software de procesamiento de imágenes adquirido comercialmente (ImagePro Plus).

d) Procedimiento de detección

Para el reconocimiento específico de citoquinas que se van a detectar se selecciona el formato de un ensayo sándwich. Para la citoquinas seleccionadas (interleuquinas IL#1 a 11#5) se preparan respectivamente 11 soluciones de calibración en solución salina tamponada con fosfato con una adición de albúmina de suero al 0,1% y Tween 20 al 0,05% (cantidades de interleuquina 0, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300 µg/ml). Adicionalmente se preparan 11 soluciones de calibración mixtas de todas las 5 interleuquinas, que contienen cada una de las 5

interleuquinas en igual concentración, así como mediante un procedimiento aleatorio 55 soluciones de muestra, que contienen concentraciones desconocidas de las interleuquinas. Luego se preincuban las soluciones de concentración individuales con los anticuerpos de interleuquina secundarios biotinilados específicos correspondientes (respectivamente 200 picomolar) durante una hora. En correspondencia se preincuban las soluciones de calibración mixtas así como las soluciones de muestra con una mezcla de 5 anticuerpos de anti-interleuquina biotinilados secundarios (respectivamente 200 picomolar) igualmente durante una hora.

Luego se rellenan 50 µl de las soluciones de calibración individuales en cada una de las primeras 5 filas de compartimentos para muestra sobre la plataforma sensora, de modo que en la etapa de detección de fluorescencia siguiente con cualquier fila se pueda generar una curva de calibración individual (curva de dosis-respuesta) por interleuquina. En la sexta fila de 11 compartimentos para muestra se rellenan en cada uno 50 µl de las soluciones de calibración mixtas para generar posteriormente curvas de calibración correspondientes en presencia de las mezclas de analito. Las 55 soluciones de muestra se reparten correspondientemente en las 5 filas restantes de compartimentos para muestras. El tiempo de incubación con todas las 121 soluciones de medida es de 30 minutos. A continuación se lavan los compartimentos para muestra con tampón (solución salina tamponada con fosfato con una adición de albúmina de suero al 0,1% y Tween 20 al 0,05%). En la etapa de detección de fluorescencia subsiguiente se rellena en cada compartimento para muestra 50 µl de Cy5-estreptavidina 1 nanomolar (Amersham-Pharmacia) en solución tampón (solución salina tamponada con fosfato con una adición de albúmina de suero al 0,1% y Tween 20 al 0,05%) y después de un tiempo adicional de incubación de 15 minutos se miden las señales de fluorescencia de cada uno de los campos de medida en las 121 matrices.

Para la lectura de la matriz en los compartimentos para muestra individuales se usa el dispositivo previamente descrito en el sistema analítico descrito y se ajusta hasta el acoplamiento máximo de la luz de excitación en las matrices de los primeros 4 de los 121 compartimentos para muestra en correspondencia a la descripción anterior, lo que se controla con la posición del intercambiador de filtro para la longitud de onda de excitación. A continuación se mide la intensidad de la luz de fluorescencia de los campos de medida (manchas) de la matriz con posición del intercambiador de filtro para la longitud de onda de luminiscencia. La lectura de la matriz en los compartimentos para muestra adicionales se realiza secuencialmente (respectivamente para un grupo de 4 compartimentos para muestra con matrices respectivamente de 25 campos de medida discretos uno tras otro), mediante la traslación del dispositivo hasta la siguiente posición para la lectura de las señales de luminiscencia desde el siguiente compartimento para muestra.

REIVINDICACIONES

- 1.- Dispositivo que comprende una guía de ondas óptica, plana, como componente de una plataforma sensora y una capa (g) en contacto con la plataforma sensora directamente o mediante un medio de sellado, de sellado estanco directamente o de sellado estanco mediante un medio de sellado, con una pluralidad de cavidades abiertas al menos hacia el lateral de la plataforma sensora, que forman una pluralidad de compartimentos de muestra en una disposición en dos dimensiones, presentando cada compartimiento de muestra una zona de guía de ondas, en un compartimiento de muestra individual se inmovilizan elementos de reconocimiento bioquímicos o biológicos distintos para el reconocimiento específico y unión de distintos analitos en campos de medida discretos (d) y estos campos de medida se encuentran en interacción óptica con la luz de excitación de la guía de ondas óptica, como componente de una plataforma sensora, que forma una demarcación de dichos compartimentos de muestra, pudiendo clarificarse en los compartimientos de muestra líquidos de muestra o líquidos de reactivos alimentados y a continuación pueden alimentarse a los mismos compartimentos de muestra citados otros líquidos de muestra o líquidos reactivos, dado el caso sin etapa de lavado, estando integrados cinco o más campos de medida discretos (d) en dos dimensiones en el compartimiento de muestra y estando dispuestos en el campo conductor de ondas.
2. Dispositivo según la reivindicación 1, **caracterizado porque** los campos de medida se usan para la referenciación de los mismos parámetros químicos u ópticos en varios compartimentos de muestra distribuidos por la plataforma sensora, de modo que se puede determinar la distribución local de los citados parámetros químicos u ópticos sobre la plataforma sensora.
3. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado porque** la guía de ondas óptica como componente de la plataforma sensora es una guía de ondas óptica con una primera capa ópticamente transparente (a) sobre una segunda capa ópticamente transparente (b) con índice de refracción menor que la capa (a).
4. Dispositivo según la reivindicación 3, **caracterizado porque** para la inmovilización de elementos de reconocimiento biológicos o bioquímicos o sintéticos se aplica sobre la capa ópticamente transparente (a) una capa que promueve la adhesión (f).
5. Dispositivo según una de las reivindicaciones 3 a 4, **caracterizado porque** se realiza el acoplamiento de luz de excitación en los campos de medida (d) con ayuda de una o varias estructuras de rejilla (c), que están formadas en la capa ópticamente transparente (a).
6. Dispositivo según una de las reivindicaciones 3 a 5, **caracterizado porque** se realiza el acoplamiento de luz guiada en la capa ópticamente transparente (a) con ayuda de estructuras de rejilla (c'), que está formadas en la capa ópticamente transparente (a).
7. Dispositivo según una de las reivindicaciones 3 a 6, **caracterizado porque** entre la capa ópticamente transparente (a) y los elementos de reconocimiento biológicos o bioquímicos o sintéticos inmovilizados está dispuesta una capa de metal fina, preferiblemente de oro o plata, dado el caso sobre una capa dieléctrica adicional con índice de refracción menor que la capa (a), por ejemplo de sílice o de fluoruro de magnesio, seleccionándose el espesor de la capa de metal y de la capa intermedia eventualmente adicional de modo que se pueda excitar un plasmón de superficie con la longitud de ondas de excitación y/o de longitud de onda de luminiscencia.
8. Dispositivo según una de las reivindicaciones 5 a 7, **caracterizado porque** las estructuras de rejilla (c) y dado el caso estructuras de rejilla (c') presentes adicionalmente se encuentran fuera de la zona de los compartimentos de muestra.
9. Dispositivo según una de las reivindicaciones 5 a 7, **caracterizado porque** las estructuras de rejilla (c) y dado el caso estructuras de rejilla (c') presentes adicionalmente se extiende por la zona de varios o todos los compartimentos de muestra.
10. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** el material de la capa (g) de sellado estanco que se encuentra en contacto con la plataforma sensora en la superficie soporte respecto a la plataforma sensora es transparente al menos en la profundidad de penetración del campo evanescente tanto para la radiación de excitación como también para la radiación de luminiscencia de excitación.
11. Dispositivo según la reivindicación 10, **caracterizado porque** la capa (g) se encuentra presente como dos capas, en las que la primera capa se pone en contacto con la superficie de la plataforma sensora, siendo transparente tanto para la radiación de excitación como también para la radiación de luminiscencia excitada, mientras que la capa que se encuentra a continuación a distancia de la plataforma sensora es absorbente en el campo espectral de la radiación de excitación y de la radiación de luminiscencia excitada.
12. Dispositivo según la reivindicación 9, **caracterizado porque** el material de la capa (g) de sellado en profundidad que se encuentra en contacto con la plataforma sensora es absorbente en la región espectral de la radiación de

excitación y de la radiación de luminiscencia excitada.

13. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado porque** el material de la capa (g) de sellado estanco que se encuentra en contacto con la plataforma sensora es autoadherente en la plataforma sensora.
- 5 14. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado porque** el material de la capa (g) de sellado estanco que se encuentra en contacto con la plataforma sensora se compone de un polisiloxano.
15. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado porque** en un compartimento de muestra se encuentran 5-1000, preferiblemente 10-400 campos de medida.
- 10 16. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado porque** un campo de medida individual en un compartimento de muestra ocupa una superficie de 0,001 a 6 mm², presentando los campos de medida igual o distinto tamaño.
17. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 16, **caracterizado porque** los compartimentos de muestra presentan respectivamente un volumen de 100 nl a 1 ml.
- 15 18. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 17 **caracterizado porque** los compartimentos de muestra se encuentran cerrados por el lateral opuesto a la capa ópticamente transparente (a), con excepción de aberturas de entrada y/o salida para la alimentación o la salida de muestras y dado el caso reactivos adicionales, y la alimentación o la salida de muestras y dado el caso reactivos adicionales en un sistema de flujo cerrado, donde en el caso de que la alimentación de líquido se realice en varios campos de medida o segmentos con aberturas de entrada y salida conjuntas estos se dirigen preferiblemente a modo de columnas o en filas.
- 20 19. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 18, **caracterizado porque** la alimentación de las muestras y dado el caso de reactivos adicionales se realiza en microcanales paralelos o cruzados, bajo la acción de diferencias de presión o por potenciales eléctricos o electromagnéticos.
- 25 20. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 19, **caracterizado porque** los compartimentos de muestra presentan aberturas para el suministro o eliminación dirigido localmente de las muestras u otros reactivos en el lateral opuesto a la capa ópticamente transparente (a).
- 30 21. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 20, **caracterizado porque** están previstos compartimentos para los reactivos que se humedecen y se ponen en contacto con los campos de medida durante el procedimiento para la detección de analito.
22. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 21, **caracterizado porque** sobre la plataforma sensora se aplican marcados reconocibles óptica o mecánicamente para facilitar el ajuste en un sistema óptico y/o para la unión con la capa (g) que contiene los recesos para los compartimentos de muestra.
23. Sistema analítico para la determinación de una o varias luminiscencias con
- al menos una fuente de luz de excitación
 - un dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 22,
 - al menos un detector para el registro de al menos uno o varios campos de medida (d) sobre la luz que sale de la
- 35 24. Sistema analítico según la reivindicación 23 con un dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 23, **caracterizado porque** la luz de excitación que sale de al menos una fuente de luz es coherente y se irradia con el ángulo de resonancia para el acoplamiento en la capa ópticamente transparente (a) sobre uno o varios campos de medida.
- 40 25. Sistema analítico según la reivindicación 24, **caracterizado porque** como fuentes de luz de excitación se usan dos o más fuentes de luz coherentes con igual o diferentes longitudes de onda de emisión.
26. Sistema analítico según una de las reivindicaciones 23 a 25, **caracterizado porque** para la detección se usa al menos un detector de resolución espacial.
- 45 27. Sistema analítico según una de las reivindicaciones 23 a 26, **caracterizado porque** entre una o más fuentes de luz de excitación y la plataforma sensora y/o entre la plataforma sensora citada y el o los detectores se usan componentes ópticos del grupo que comprende lentes o sistemas de lentes para la conformación de los haces de luz transmitidos, espejos planos o curvados para la desviación y dado el caso adicionalmente conformación de haces de luz, prismas para la derivación y dado el caso para la distribución espectral de haces de luz, espejos dicróicos para la derivación

selectiva espectral de partes de los haces de luz, filtros neutros para la regulación de intensidad de luz transmitida, filtros ópticos o monocromadores para la transmisión selectiva espectral de partes de haces de luz o elementos selectivos para polarización para la selección de direcciones de polarización discretas de la luz de excitación o luminiscencia.

- 5 28. Sistema analítico según una de las reivindicaciones 23 a 27, **caracterizado porque** la irradiación de la luz de excitación y detección de la luz de emisión se realizan a partir de uno o más campos de medida secuencialmente para compartimentos de muestra individuales o múltiples.
29. Sistema analítico según la reivindicación 28, **caracterizado porque** se realiza la excitación secuencial y detección utilizando componentes móviles ópticos que se forma del grupo de espejos, prismas de derivación y espejos dicróicos.
- 10 30. Sistema analítico según la reivindicación 29, **caracterizado porque** se realiza la excitación secuencial y detección con uso de un escáner esencialmente de control del ángulo y foco.
31. Procedimiento para la detección por luminiscencia de uno o varios analitos en una o varias muestras en al menos cinco o más campos de medida separados especialmente por medio de un dispositivo o un sistema analítico según una de las reivindicaciones precedentes 1 a 30, **caracterizado además porque** se suministra a los compartimentos de muestra líquidos de muestra, se conduce luz de excitación a los campos de medida, excitando de este modo sustancias que pueden emitir luminiscencia en las muestras o sobre los campos de medida para la luminiscencia y midiendo la luminiscencia emitida.
- 15 32. Procedimiento según la reivindicación 31 con un dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 23, **caracterizado porque** se miden simultáneamente (1) la luminiscencia emitida isotrópicamente o (2) la luminiscencia acoplada en la capa ópticamente transparente (a) y desacoplada con la estructura de rejilla (c) o luminiscencias de ambas partes (1) y (2).
- 20 33. Procedimiento según una de las reivindicaciones 31 a 32, caracterizado porque para la generación de luminiscencia se usa un colorante de luminiscencia o nanopartículas luminiscentes como etiqueta de luminiscencia, que se puede excitar y emitir con una longitud de onda entre 300 nm y 1100 nm.
- 25 34. Procedimiento según la reivindicación 33, **caracterizado porque** la etiqueta de luminiscencia en los analitos o en un ensayo competitivo está unida a un análogo del analito o a un ensayo múltiple en una pareja de unión de elementos de reconocimiento biológicos o bioquímicos o sintéticos o en los elementos de reconocimiento biológicos o bioquímicos o sintéticos.
35. Procedimiento según una de las reivindicaciones 33 a 34, **caracterizado porque** se usan una segunda o más etiquetas de luminiscencia con longitudes de onda de excitación iguales o diferentes a la primera etiqueta de luminiscencia y longitudes de onda de emisión iguales o diferentes.
- 30 36. Procedimiento según la reivindicación 35, **caracterizado porque** se puede excitar la segunda o incluso posterior etiqueta de luminiscencia en la misma longitud de onda que el primer colorante de luminiscencia, pero que emiten con otras longitudes de onda.
- 35 37. Procedimiento según la reivindicación 35, **caracterizado porque** los espectros de excitación y espectros de emisión de los colorantes de luminiscencia usados sólo se solapan mínimamente o casi nada.
38. Procedimiento según una de las reivindicaciones 31 a 37, **caracterizado porque** además de la determinación de una o más luminiscencias, se determinan cambios del índice de refracción efectivo en los campos de medida.
39. Procedimiento según una de las reivindicaciones 31 a 38, **caracterizado porque** se llevan a cabo con polarización selectiva una o varias luminiscencias y/o determinaciones de señales de luz en las longitudes de onda de excitación.
- 40 40. Procedimiento según la reivindicación 39, **caracterizado porque** se miden una o varias luminiscencias con otra polarización distinta de la de la luz de excitación.
41. Uso del dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 22 o del sistema analítico según una de las reivindicaciones 23 a 30, para el análisis cuantitativo o cualitativo para la determinación de analitos químicos, bioquímicos o biológicos en procedimientos de cribado en la investigación de fármacos, la química combinatoria, desarrollo clínico y preclínico, para estudios de unión a tiempo real y para la determinación de parámetros cinéticos en cribado por afinidad y en la investigación, para determinaciones de analito cualitativas y cuantitativas, de forma particular para la analítica de ADN y ARN y la determinación de diferencias genómicas o proteómicas en el genoma, como por ejemplo polimorfismo de nucleótidos individuales, para la medida de efectos metabólicos de ADN en proteína, para la determinación de mecanismos de control para la expresión de ARNm y para la (bio)síntesis de proteínas, para la generación de estudios de toxicidad así como para la determinación de perfiles de expresión, de
- 45
- 50

- 5 forma particular para la determinación de marcadores biológicos y químicos, como ARNm, proteínas, péptidos o sustancias (mensajeras) orgánicas de bajo peso molecular, así como para la detección de anticuerpos, antígenos, patógenos o bacterias en la investigación y desarrollo de productos farmacéuticos, de diagnóstico humano y veterinario, de la investigación y desarrollo de productos agroquímicos, de diagnóstico de plantas sintomático y presintomático, para la estratificación de pacientes en el desarrollo de productos farmacéuticos y para la selección de medicamentos terapéuticos, para la detección de patógenos, sustancias dañinas y agentes patógenos, de forma particular de salmonela, priones, virus y bacterias, de forma particular en analítica de alimentos y ambientales.

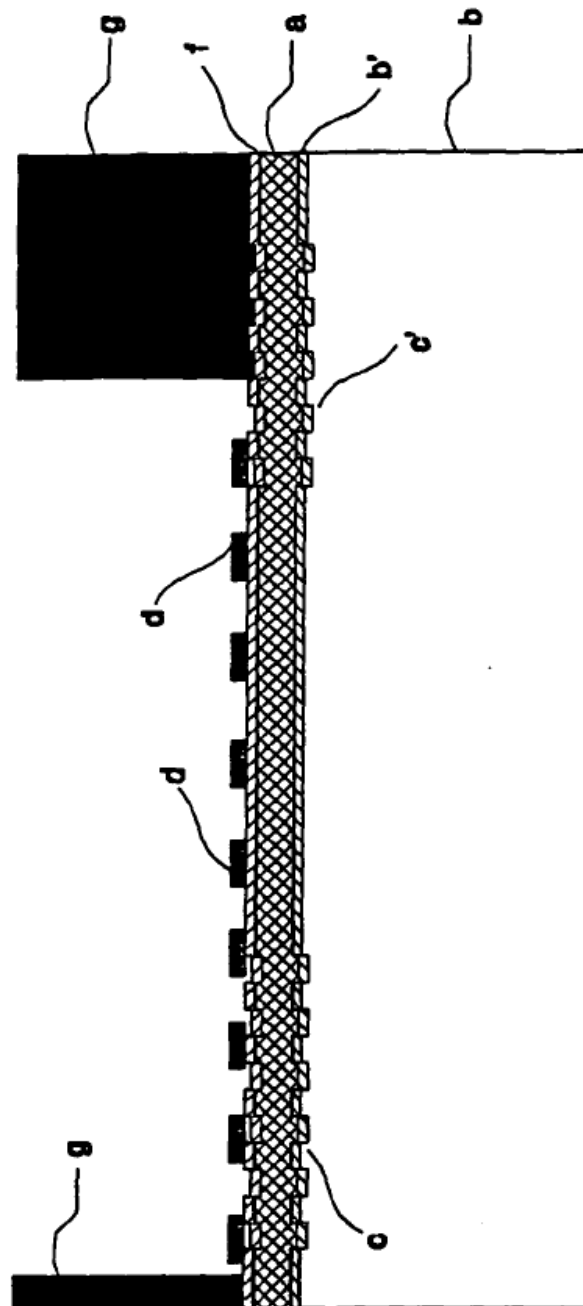


Figura 1