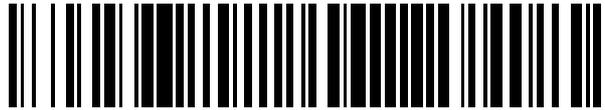


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 437**

51 Int. Cl.:

**B01L 7/00**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2005 E 05007267 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 1710017**

54 Título: **Termociclado de un bloque que comprende múltiples muestras**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.04.2013**

73 Titular/es:

**ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (50.0%)  
SANDHOFER STRASSE 116  
68305 MANNHEIM, DE**

72 Inventor/es:

**SCHLAUBITZ, THOMAS;  
BURDACK, TORSTEN;  
FEDERER, PAUL;  
GEORGE, CHRISTIAN;  
GRUETER, GUIDO;  
SCHOLLE, ANDRÉAS y  
TENZLER, GUENTER**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 401 437 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Termociclado de un bloque que comprende múltiples muestras

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo del análisis de alto rendimiento de muestras. En particular, la presente invención se refiere a un dispositivo, a un sistema y a un método para el atemperado simultáneo de múltiples muestras.

10

## Antecedentes de la técnica

Los dispositivos para atemperar muestras o mezclas de reacción de una manera controlada se utilizan en prácticamente todos los campos de la química o de la bioquímica, y la ciencia básica resulta afectada de la misma manera que el desarrollo industrial o la producción farmacéutica. Debido a que el tiempo de mano de obra, así como los reactivos, son caros, el desarrollo tiende a incrementar el rendimiento de la producción y del análisis, minimizando simultáneamente los volúmenes de reacción necesarios.

15

En general, los dispositivos de atemperado presentan un bloque térmico que se encuentra en contacto térmico con la muestra bajo investigación. El bloque térmico se atempera hasta una temperatura deseada, afectando también a la temperatura de la muestra. El bloque térmico más simple es una placa calefactora común.

20

Con el fin de llevar a cabo un atemperado eficiente, el dispositivo debe disponer de medios para calentar y enfriar las muestras. Con este fin, el bloque térmico puede conectarse a dos medios separados o a un único medio capaz de llevar a cabo tanto calentamiento como enfriamiento. Dichos medios únicos de atemperado son, por ejemplo un medio de flujo, mientras que un sistema de tuberías en el interior o próximo al bloque térmico presenta un flujo de un líquido externamente atemperado, por ejemplo agua o aceite, que transporta calor hacia o desde el bloque térmico. En el caso de dos medios separados, en general se utiliza un calentamiento resistivo en combinación con un enfriamiento disipativo. Un buen resumen sobre el control térmico en el campo de los equipos médicos y de laboratorio ha sido escrito por Robert Smythe (Medical Device & Diagnostic Industry Magazine, enero de 1998, páginas 151 a 157) y a continuación se proporciona un extracto de este artículo.

25

30

Un dispositivo de enfriamiento disipativo común es un sumidero de calor en combinación con un ventilador. Generalmente, los disipadores de calor están hechos de aluminio debido a la conductividad térmica relativamente alta del metal y su bajo coste. Se extruyen, estampan, unen, moldean o mecanizan para conseguir una forma que maximice la superficie, facilitando la absorción de calor del aire más frío circundante. La mayoría presenta un diseño de aletas o de pins. En el caso de que se utilicen con ventiladores (convección forzada), los sumideros de calor pueden disipar grandes cantidades de calor, manteniendo los componentes diana a una temperatura 10-15°C superior a la temperatura ambiente. Los sumideros de calor son económicos y ofrecen flexibilidad de instalación, aunque no pueden enfriar componentes a una temperatura igual o inferior a la ambiente. Además, los sumideros de calor no permiten el control de la temperatura.

35

40

La configuraciones más sofisticadas utilizan dispositivos termoelectricos (TE) como bombas de calor para el calentamiento y el enfriamiento activo de un bloque térmico. Los dispositivos termoelectricos son bombas de calor de estado sólido realizadas en materiales semiconductores que comprenden una serie de parejas o juntas de semiconductores de tipo P y de tipo N entre placas cerámicas. El calor resulta absorbido por electrones en la junta fría a medida que pasan de un nivel energético bajo en un elemento de tipo P a un nivel de energía más alto en un elemento de tipo N. En la junta caliente, se expulsa energía a, por ejemplo, un sumidero de calor a medida que los electrones se mueven del elemento de tipo N de alta energía a un elemento de tipo P de baja energía. Una fuente de alimentación DC proporciona la energía para mover los electrones por el sistema. Un dispositivo TE típico contiene hasta 127 juntas y puede bombear hasta 120 W de calor. La cantidad de calor bombeado es proporcional a la cantidad de corriente que fluye por el dispositivo TE y, por lo tanto, resulta posible un control estrecho de la temperatura. Mediante la inversión de la corriente, los dispositivos TE pueden funcionar como calentadores o como enfriadores, lo que puede resultar útil para controlar un objeto en ambientes variables o durante el ciclado a temperaturas diferentes. Los tamaños se encuentran comprendidos entre 2 y 62 mm y pueden utilizarse múltiples dispositivos TE para un mayor enfriamiento. Debido a la cantidad relativamente elevada de calor bombeada sobre un área pequeña, los dispositivos TE en general requieren un sumidero de calor para disipar el calor hacia el entorno ambiente. Un tipo bien conocido de dispositivo TE es el elemento Peltier.

45

50

55

La disipación de calor resulta esencial para un enfriamiento eficiente. En el caso de que el calor no pueda disiparse en origen, dicho calor puede transferirse a otro sitio mediante tubos de calor. Un tubo de calor es un recipiente de vacío sellado con una estructura interna de mecha que transfiere calor por evaporación y condensación de un líquido interno de trabajo. Típicamente se utilizan amonio, agua, acetona o metanol, aunque se utilizan líquidos especiales para aplicaciones criogénicas y a alta temperatura. A medida que se absorbe calor en un lado del tubo de calor, se vaporiza el fluido de trabajo, creando un gradiente de presiones dentro del tubo de calor. Se fuerza a que el vapor fluya hacia el extremo más frío del tubo, en donde condensa, liberando su calor latente a la estructura de mecha y

60

65

después al entorno ambiente mediante, por ejemplo, un sumidero de calor. El fluido de trabajo condensado vuelve al evaporador por gravedad o acción capilar en el interior de la estructura interna de mecha. Debido a que los tubos de calor aprovechan el efecto de calor latente del fluido de trabajo, pueden diseñarse para mantener un componente a prácticamente las condiciones ambientales. Aunque resultan más efectivos en el caso de que el líquido condensado funcione con la gravedad, los tubos de calor pueden funcionar en cualquier orientación. Las bombas de calor típicamente son pequeñas y altamente fiables, pero no pueden enfriar objetos a una temperatura inferior a la ambiente.

Un bloque térmico puede atemperarse con dos tubos de calor, un tubo de calor transporta calor desde una fuente de calor a dicho bloque térmico y el otro tubo de calor transporta calor fuera de dicho bloque térmico. Se da a conocer un bloque térmico con dos tubos de calor en la solicitud de patente WO nº 01/51209. En la patente US nº 4.950.608 se utiliza una pluralidad de tubos de calor para realizar un recipiente de temperatura regulada. En la patente US nº 4.387.762 da a conocer un tubo de calor con una conductancia térmica controlable.

Aparte de los tubos de calor, recintos de estado sólido en forma de tubo con un equilibrio líquido-vapor, también se conocen estos recintos de estado sólido en una forma similar a un plato, son producidos por la compañía Thermacore (Lancaster, USA) y se denominan Therma-Base™. Estos Therma-Base™ presentan una forma sustancialmente plana y se utilizan en, por ejemplo, ordenadores, para distribuir el calor en los circuitos integrados (patente US nº 6.256.199). Se da a conocer en la patente US nº 5.161.609 un aparato para la regulación de la temperatura de elementos en contacto térmico con un líquido contenido en equilibrio de líquido-vapor en el interior de un recinto. La patente US nº 5.819.842 describe una unidad de control de la temperatura que comprende una placa distribuidora para el control independiente de múltiples muestras que se encuentran muy próximas entre sí.

La solicitud de patente WO nº 01/24930 da a conocer un ensamblaje termociclador con un tubo de calor en forma de plato dispuesto entre una bomba de calor y un bloque térmico para obtener una distribución del calor altamente homogénea dentro del bloque térmico.

La solicitud de patente WO nº 2004/105947 da a conocer un ensamblaje termociclador con un bloque térmico segmentado, en el que los segmentos pueden ciclarse independientemente, y los tubos de calor pueden disponerse para obtener una distribución homogénea del calor dentro de segmentos individuales del bloque térmico.

De esta manera, el objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo para el atemperado simultáneo de las muestras. En un aspecto de la presente invención, la invención se refiere al termociclado simultáneo de múltiples muestras para llevar a cabo una PCR en un formato de placa de microtitulación.

Breve descripción de la invención

La invención se refiere a un dispositivo para el termociclado simultáneo de múltiples muestras, que comprende:

- a) un bloque térmico 1 que comprende dichas múltiples muestras, b) por lo menos una bomba de calor 2, c) por lo menos una base térmica 4, d) un sumidero de calor 5, y
- e) una unidad de control 3 para controlar dicho termociclado simultáneo de múltiples muestras,

caracterizado porque se dispone una base térmica 4 interpuesta y en contacto térmico con dicho sumidero de calor 5 y dicha bomba o bombas de calor 2, dicha bomba o bombas de calor 2 se encuentra en contacto térmico con dicho bloque térmico 1, en el que dicha base térmica 2 es un dispositivo de cámara de vapor para transportar y distribuir calor y en el que dicho contacto térmico se basa en una pasta que presenta una elevada conductancia térmica, una lámina térmicamente conductora o fuerza mecánica.

Durante toda la presente invención, el termociclado simultáneo de múltiples muestras comprende todos los tipos de atemperado de una pluralidad de muestras. El termociclado simultáneo resume una variación cíclica de la temperatura de dichas múltiples muestras, mientras que la temperatura al inicio de un ciclo es la misma que la temperatura al final de dicho ciclo. Un ciclo de temperatura comprende etapas de calentamiento y enfriamiento y etapas de temperatura constante. La variación de la temperatura con el tiempo se resume en el protocolo de termociclado.

La expresión "múltiples muestras" comprende cualquier número de muestras, mientras que dichas múltiples muestras pueden disponerse de varias maneras. Una manera habitual de disponer múltiples muestras es la utilización de placas de microtitulación. Alternativamente, pueden disponerse múltiples recipientes de reacción en medios de soporte. Comprendido dentro del alcance de la presente invención, las múltiples muestras son muestras fluidas. Cada una de dichas múltiples muestras comprende un solvente y uno o más dianas en solvente que deben analizarse.

Un bloque térmico 1 es un dispositivo de estado sólido dispuesto para presentar una buena conductividad térmica. Existe una pluralidad de materiales conocidos por el experto en la materia que presentan una buena conductividad térmica, y sin restringirse a ninguna teoría en particular, la mayoría de los materiales que presentan una buena

conductividad eléctrica también son buenos conductores térmicos. Por lo tanto, materiales como el cobre, el aluminio, la plata o el grafito resultan adecuados para el bloque térmico. Por otra parte, los plásticos y las cerámicas también pueden presentar suficiente conductividad térmica para ser utilizados como material para el bloque térmico.

5 Una bomba de calor 2 es un dispositivo activo que es capaz de transportar calor. En general, las bombas de calor son dispositivos denominados termoeléctricos (TE) realizados en materiales semiconductores que requieren electricidad para funcionar. Una fuente de alimentación de DC proporciona la energía para el calentamiento y el enfriamiento, mientras que la inversión de la corriente no invierte la dirección de calor que se bombea. Un tipo bien conocido de dispositivo TE es el elemento Peltier.

10 Una base térmica 4 es un dispositivo de cámara de vapor para transportar y distribuir calor. Durante toda la presente invención una base térmica es un tubo de calor especial, en el que dicha base térmica presenta regiones de forma sustancialmente plana. La expresión "tubo de calor" es una expresión establecida para un recipiente de vacío sellado con una estructura interna de mecha que transfiere calor por evaporación y condensación de un líquido interno de trabajo. A medida que se absorbe calor en un lado del tubo de calor, se vaporiza el fluido de trabajo, creando un gradiente de presiones dentro de dicho tubo de calor. Se fuerza a que el vapor fluya hacia el extremo más frío del tubo de calor, en donde condensa, liberando su calor latente al entorno ambiente. El fluido de trabajo condensado vuelve al evaporador por gravedad o acción capilar en el interior de la estructura interna de mecha. Una base térmica en general es un dispositivo pasivo, aunque también puede diseñarse como un dispositivo activo en el caso de que dicha base térmica esté dotada de medios de control. Dichos medios de control modifican la conductividad térmica de la base térmica mediante el ajuste del caudal en el interior del recinto o el ajuste del volumen del recinto, afectando al vacío en el interior del recipiente.

25 Un sumidero de calor 5 es un dispositivo para disipar calor. En general, un sumidero de calor está realizado en un material térmicamente conductor análogo al del bloque térmico indicado de manera general anteriormente. Por lo tanto, los sumideros de calor están realizados mayoritariamente en metal, preferentemente en aluminio o plata. Alternativamente, los sumideros de calor pueden estar formados de plástico y cerámica, en el caso de que sólo se consiga una buena conductividad térmica. Con el fin de conseguir la máxima disipación de calor, los sumideros de calor se disponen para proporcionar una proporción de superficie a volumen elevada. Esto se consigue mediante un ensamblaje de aletas dispuestas en una placa de base. Una proporción de superficie a volumen elevada reduce la resistencia a la transferencia de calor entre el sumidero de calor y el aire circundante.

35 Una unidad de control 3 es un dispositivo para controlar dicho termociclado simultáneo de múltiples muestras. Dentro de la presente invención, dicha unidad de control ajusta la alimentación a las bombas de calor, modificando la cantidad de calor transportada hacia el bloque térmico o hacia el exterior del mismo. Además, la unidad de control puede activar los medios de control opcionales de las bases térmicas.

Otro aspecto de la presente invención es un método para el termociclado simultáneo de múltiples muestras, comprendiendo las etapas siguientes:

40 a) proporcionar un bloque térmico 1 con múltiples huecos, por lo menos una bomba de calor 2, una primera base térmica 4, en el que dicha base térmica es un dispositivo de cámara de vapor para transportar y distribuir calor, opcionalmente una segunda base térmica 6, un sumidero de calor 5 y una unidad de control 3,

45 b) disponer dicho bloque térmico 1 con múltiples huecos, dicho por lo menos una bomba de calor 2, dicha primera base térmica 4, opcionalmente dicha segunda base térmica 6 y dicho sumidero de calor 5, en el que:

50 - dicha primera base térmica 4 se dispone interpuesta y en contacto térmico con dicho sumidero de calor 5 y dicha bomba o bombas de calor 2, y

- dicha bomba o bombas de calor 2 se encuentra en contacto térmico con dicho bloque térmico 1 u opcionalmente en contacto térmico con dicha segunda base térmica 6, estando dicha segunda base térmica 6 en contacto térmico con dicho bloque térmico 1, y

55 c) introducir dichas múltiples muestras dentro de los huecos de dicho bloque térmico 1, y

d) llevar a cabo un protocolo de termociclado con dicha unidad de control 3, en el que dicho contacto térmico se basa en una pasta que presenta una elevada conductividad térmica, una lámina térmicamente conductora o fuerza mecánica.

60 Todavía otro aspecto de la presente invención es un sistema para el termociclado simultáneo de múltiples muestras con el fin de llevar a cabo múltiples reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, que comprende:

65 a) un dispositivo según la presente invención, y

b) reactivos necesarios para llevar a cabo dichas múltiples reacciones de amplificación de ácidos nucleicos.

## Descripción detallada de la invención

Un objetivo de la presente invención es un dispositivo para el termociclado simultáneo de múltiples muestras, que comprende:

5 a) un bloque térmico 1 que comprende dichas múltiples muestras, b) por lo menos una bomba de calor 2, c) por lo menos una base térmica 4, d) un sumidero de calor 5, y e) una unidad de control 3 para controlar dicho termociclado simultáneo de múltiples muestras,

10 caracterizado porque se dispone una base térmica 4 interpuesta y en contacto térmico con dicho sumidero de calor 5 y dicha bomba o bombas de calor 2, dicha bomba o bombas de calor 2 se encuentra en contacto térmico con dicho bloque térmico 1, en el que dicha base térmica 2 es un dispositivo de cámara de vapor para transportar y distribuir calor y en el que dicho contacto térmico se basa en una pasta que presenta una elevada conductancia térmica, una lámina térmicamente conductora o fuerza mecánica.

15 Existe un gran número de dispositivos conocidos por el experto en la materia que son capaces de atemperar una muestra de una manera cíclica. El término "termociclado" resume una variación cíclica de la temperatura de una muestra, mientras que la temperatura al inicio de un ciclo es la misma que la temperatura al final de dicho ciclo. Un ciclo de temperatura comprende etapas de calentamiento, enfriamiento (rampas de temperatura) y etapas de temperatura constante. La variación de la temperatura con el tiempo se resume en la expresión "protocolo de termociclado".

20 En el caso de que el dispositivo deba atemperar simultáneamente un conjunto de múltiples muestras, por ejemplo los pocillos de una placa de microtitulación, y los resultados de los experimentos en las múltiples muestras deban ser comparables, debe garantizarse que el termociclado de las muestras en el centro del conjunto y en los bordes del mismo preferentemente sean idénticos. Además, resulta deseable poner en práctica las rampas de temperatura del protocolo de termociclado con la máxima rapidez, aunque sin superar las temperaturas de las múltiples muestras al alcanzar las etapas de temperatura constante.

25 En una realización preferente del dispositivo según la presente invención, dicho bloque térmico 1 está realizado en un material térmicamente conductor.

30 Los materiales térmicamente conductores son materiales que presentan una buena conductividad térmica, y sin restringirse a ninguna teoría en particular, la mayoría de los materiales que presentan una buena conductividad eléctrica también son buenos conductores térmicos. Por otra parte, también existen plásticos y cerámicas que presentan suficiente conductividad térmica. Los materiales poliméricos, por ejemplo, pueden presentar hasta  $10 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$ .

35 En una realización más preferente del dispositivo según la presente invención, dicho bloque térmico 1 está realizado en metal, preferentemente en aluminio o plata.

40 Existe una pluralidad de materiales metálicos conocida por el experto en la materia que presenta una buena conductividad térmica y que resulta adecuada para el bloque térmico, por ejemplo cobre, aluminio o plata. El cobre y la plata, por ejemplo, presentan una conductividad térmica de aproximadamente  $400 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$  a  $300^\circ\text{K}$ , mientras que el aluminio presenta aproximadamente  $200 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$  ( $300^\circ\text{K}$ ). Sin embargo, el aluminio es un material preferente porque resulta económico y fácil de procesar. Se observa que en la mayoría de casos los materiales metálicos no son puros sino aleaciones, y que la conductividad térmica del material depende de la composición de dicha aleación.

45 En general, el bloque térmico 1 de la presente invención es un cuboide con un área de sección transversal en planta A, una longitud l, una anchura w y una altura h, siendo las dimensiones preferentes de  $l=5$  a  $200$  mm,  $w=5$  a  $200$  mm y  $h=3$  a  $100$  mm.

50 En otra realización preferente del dispositivo según la presente invención, dicho bloque térmico 1 comprende huecos 7 dispuestos para recibir dichas múltiples muestras.

55 En dicha realización del dispositivo según la presente invención, el bloque térmico 1 está dotado de múltiples huecos 7, mientras que dichos huecos 7 están dispuestos en la parte superior, alcanzando al interior de dicho bloque térmico 1. Resulta preferente que la totalidad de dichos huecos presente el mismo tamaño. Dichos huecos 7 pueden obtenerse mediante perforación de un bloque térmico 1 homogéneo. Alternativamente, dicha perforación de un bloque térmico 1 homogéneo puede llevarse a cabo de manera que los huecos 7 formen orificios que cruzan la totalidad de la altura del bloque térmico 1. Aparte del método de perforación de un bloque térmico 1 homogéneo, pueden utilizarse otros métodos, tales como el moldeo, el electroformado o el mecanizado por descarga eléctrica, para fabricar el bloque térmico con huecos.

60 En una realización preferente adicional del dispositivo según la presente invención, dichas múltiples muestras se introducen directamente en dichos huecos 7 del bloque térmico 1 ó mediante recipientes de reacción, comprendiendo cada uno una de dichas múltiples muestras.

Los huecos 7 están dispuestos para recibir dichas múltiples muestras, y son aplicables varias posibilidades que se encuentran comprendidas dentro del alcance de la presente invención. En una realización, las múltiples muestras se sitúan en dichos huecos 7 directamente mediante, por ejemplo, una etapa de pipeteado. En caso necesario, los huecos 7 pueden recubrirse con un material que es inerte para las muestras y que puede limpiarse, para reciclar el bloque térmico 1 para su utilización posterior. En otra realización, las múltiples muestras se sitúan en dichos huecos 7 mediante recipientes de reacción, estando dichos recipientes de reacción ajustados a dichos huecos 7. Resulta importante que los recipientes de reacción y los huecos estén ajustados, ya que en caso contrario el aire entre ambos componentes puede actuar como aislante térmico, perjudicando al contacto térmico.

En una realización también preferente del dispositivo según la presente invención, dichos recipientes de reacción se unen formando uno o más grupos, preferentemente dichos recipientes de reacción se unen formando una placa multipocillo.

Cada uno de dichos múltiples huecos 7 puede recibir un recipiente de reacción separado o puede introducirse uno o más grupos de recipientes de reacción asociados en dichos múltiples huecos 7. Un recipiente de reacción individual bien conocido que resulta adecuado para la presente invención es, por ejemplo, un vaso Eppendorf, mientras que un grupo adecuado de recipientes de reacción asociados es, por ejemplo, una tira de vasos Eppendorf o una placa de microtitulación que presente, por ejemplo, 96, 384 ó 1.536 pocillos individuales.

En todavía otra realización preferente del dispositivo según la presente invención, dicha bomba o bombas de calor 2 es un dispositivo termoeléctrico, preferentemente un dispositivo semiconductor, más preferentemente un elemento Peltier.

Una bomba de calor 2 es un elemento activo que requiere electricidad para generar y/o transportar calor y que también se denomina dispositivo termoeléctrico (TE) en la literatura. En general, las bombas de calor 2 TE son bombas de calor de estado sólido realizadas en materiales semiconductores que comprenden una serie de parejas o juntas de semiconductores de tipo P y de tipo N interpuestas entre placas cerámicas. Una fuente de alimentación DC proporciona la energía para mover los electrones por el sistema, transportando de esta manera calor. Un dispositivo TE típico contiene hasta 127 juntas y puede bombear hasta 120 W de calor, y la cantidad de calor bombeado es proporcional a la cantidad de corriente que fluye por el dispositivo TE. Por lo tanto, los dispositivos TE ofrecen un control estrecho de la temperatura. Mediante la inversión de la corriente, los dispositivos TE pueden funcionar como calentadores o como enfriadores, lo que puede resultar útil para controlar un objeto en ambientes variables o durante el ciclado a temperaturas diferentes. Un tipo bien conocido de dispositivo TE es el elemento Peltier. Dichos elementos Peltier se encuentran disponibles comercialmente en varias versiones diferentes con respecto al rendimiento, forma y materiales. Los dispositivos TE son rectangulares o redondos, pueden presentar orificios centrales para la fijación y presentar diferentes alturas. Algunos dispositivos TE especiales están optimizados para soportar cambios extensivos entre los modos de funcionamiento y pueden utilizarse hasta 150°C. En general, el dispositivo semiconductor se encuentra interpuesto entre placas cerámicas. Estas placas cerámicas pueden estar dotadas de ranuras para reducir el estrés térmico. Con el fin de contrarrestar el efecto bimetalico, las placas cerámicas pueden recubrirse parcialmente con un material metálico (por ejemplo cobre).

En otra variante preferente del dispositivo según la presente invención, dicha base o bases térmicas 4 son dispositivos conductores del calor que comprenden un equilibrio líquido-vapor en el interior de un recinto de estado sólido.

Tal como se ha indicado anteriormente, una base térmica 4 dentro del alcance de la presente invención es básicamente análoga a los tubos de calor conocidos por el experto en la materia, con la diferencia de que la base térmica 4 presenta por lo menos parcialmente una estructura similar a un plato, en comparación con la estructura similar a un tubo de los tubos de calor. En general, los tubos de calor, así como las bases térmicas, son recintos de estado sólido con una estructura interna de mecha que transfiere calor por evaporación y condensación de un líquido interno de trabajo. En otras palabras, dentro del recipiente sellado se mantiene un equilibrio líquido-vapor del líquido interno de trabajo, y el equilibrio local depende de la temperatura local. En mayor detalle, en el caso de que se absorba calor en un lado del tubo de calor, se vaporiza el fluido de trabajo, creando un gradiente de presiones dentro del tubo de calor. Se fuerza a que el vapor fluya hacia el extremo más frío del tubo, en donde condensa, liberando su calor latente al entorno ambiente. El fluido de trabajo condensado vuelve al evaporador por gravedad o acción capilar en el interior de la estructura interna de mecha. Típicamente se utilizan amonio, agua, acetona o metanol como líquidos de trabajo, aunque se utilizan líquidos especiales para aplicaciones criogénicas y a alta temperatura.

La base térmica presenta una conductividad pseudotérmica muy alta, de hasta  $2 \cdot 10^5 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$ , por lo tanto, la extensión del calor en la totalidad del área de sección transversal de la base térmica resulta muy eficiente. Lo anterior, por una parte, incrementa la homogeneidad durante el procedimiento de calentamiento y, por otra parte, reduce el tiempo necesario para el procedimiento de enfriamiento, debido a que la resistencia a la transferencia de calor del sumidero de calor se reduce adicionalmente.

Una variante preferente del dispositivo según la presente invención comprende una única base térmica 4, en la que dicha única base térmica 4 es sustancialmente plana y preferentemente no presenta huecos.

5 Dentro del alcance de la presente invención, resulta preferente que la base térmica única 4 sea sustancialmente plana, en donde sustancialmente plana se refiere a bases térmicas 4 cuboides con un área de sección transversal en planta A, una longitud l, una anchura w y una altura h, siendo las dimensiones preferentes de l=5 a 500 mm, w=5 a 500 mm y h=3 a 15 mm.

10 En una variante preferente adicional del dispositivo según la presente invención, dicha base térmica 4 única se encuentra en contacto térmico con dicho sumidero de calor 5 y con dicha bomba o bombas de calor 2, y dicha bomba o bombas de calor 2 se encuentra en contacto con dicho bloque térmico 1.

15 Dentro del alcance de la presente invención, la expresión "contacto térmico" entre dos componentes se utiliza para enfatizar que el contacto debe optimizarse para una conductividad térmica elevada. Debido a que el aire es un mal conductor térmico, debe garantizarse que la cantidad de aire entre dos componentes en contacto térmico sea la menor posible. Existen varias maneras de minimizar el aire en la zona de contacto de dos materiales de estado sólido. Una variante utiliza una pasta que presenta una elevada conductividad térmica como conector entre los dos componentes, por ejemplo grasa térmica. Preferentemente se utiliza una lámina térmicamente conductora blanda, por ejemplo una lámina de grafito, como material de interfaz entre los dos componentes. Dicha lámina de grafito puede alisar cierta rugosidad de los componentes y reducir el estrés mecánico debido a la expansión térmica. En todos los casos resulta ventajoso que los dos componentes se aprieten uno contra el otro mediante fuerza mecánica. Resulta preferente aplicar una fuerza mecánica de manera un contacto térmico directo resulte suficiente y no resulte necesarios materiales de interfaz adicionales entre los dos componentes. También resulta preferente que ambas áreas de contacto sean tan planas como resulte posible para minimizar el hueco de aire entre los componentes.

25 En una variante más preferente del dispositivo según la presente invención, dicha base térmica 4 única se encuentra en contacto térmico con dicho sumidero de calor 5 y mediante una lámina de grafito con dicha bomba o bombas de calor 2, y dicha bomba o bombas de calor 2 también se encuentran en contacto térmico con dicho bloque térmico 1 mediante una lámina de grafito. Si se desea, puede utilizarse grasa térmica como material de interfaz adicional entre la base térmica 4 única y dicho sumidero de calor 5.

En todavía otra variante preferente del dispositivo según la presente invención, dicha bomba o bombas de calor 2 se utilizan para generar calor y para transportar dicho calor a dicho bloque térmico 1.

35 En una realización más preferente del dispositivo según la presente invención, dicha bomba o bombas de calor 2 se utilizan además para el transporte activo de calor desde dicho bloque térmico 1 a dicha base térmica 4 única.

40 Mediante la inversión de la corriente, los dispositivos TE pueden funcionar como calefactores o como enfriadores. En un modo operativo, el dispositivo TE genera calor y dicho calor es transportador a una de las dos placas cerámicas del dispositivo. En el otro modo operativo, el dispositivo TE transporta calor de una de las placas cerámicas a la otra placa cerámica del dispositivo y, por lo tanto, enfría activamente una de las placas cerámicas. En otras palabras, aunque uno de los lados del dispositivo TE sea enfriado, el otro lado del dispositivo TE será calentado.

45 En una realización también preferente del dispositivo según la presente invención, el área de sección transversal de dicha base térmica 4 única es en menos de 20% mayor o menor que el área de sección transversal de dicho sumidero de calor 5 y el área de sección transversal de dicha base térmica 4 única es mayor que el área de sección transversal de dicho bloque térmico 1, y dichas áreas de sección transversal se encuentran dispuestas en paralelo a las áreas de contacto respectivas.

50 Durante el enfriamiento del bloque térmico debe disiparse una gran cantidad de calor en un tiempo reducido. Si la cantidad de calor que necesita disiparse se incrementa todavía más, a primera vista esto puede controlarse mediante la utilización simplemente de un sumidero de calor 5 más grande que correspondientemente proporcione un área superficial más grande para la disipación. Esta inferencia sólo resulta correcta en cierto grado, ya que al utilizar un sumidero de calor 5 metálico común, con su restringida conductividad térmica, sólo una determinada fracción del área superficial próxima a la fuente de calor participa en el proceso disipativo. Por lo tanto, agrandar el área de sección transversal de un sumidero de calor 5 metálico común por sí solo no resulta una manera apropiada de controlar la disipación de grandes cantidades de calor. Dentro de la presente invención, el área de sección de transversal es en todos los casos el área de sección de transversal de los componentes del dispositivo vistos en planta. Observar que los dibujos esquemáticos de varias realizaciones del dispositivo en la figura 1 representan vistas laterales de la composición.

55 Utilizando una base térmica 4 en combinación con un sumidero de calor 5 según la presente invención mejora la disipación del calor, ya que la enorme conductividad térmica de la base térmica 4 garantiza que incluso un sumidero de calor 5 de mucho mayor tamaño que la fuente de calor participará eficazmente en el proceso disipativo. La optimización del proceso disipativo ayuda a reducir el tiempo necesario para las etapas de enfriamiento dentro del protocolo de termociclado.

- 5 En otra variante más preferente del dispositivo según la presente invención, dicho área de sección transversal de dicha base térmica 4 única es mayor que el área de sección transversal de dicho bloque térmico 1 en por lo menos un factor de 1,5, preferentemente en por lo menos un factor de 4, y dicha base térmica 4 única presenta el mismo área de sección transversal que dicho sumidero de calor 2, y dichas áreas de sección transversal son paralelas a las áreas de contacto respectivas.
- 10 La proporción razonable máxima de área de sección transversal de dicha base térmica 4 única y el área de sección transversal de dicho bloque térmico 1 dependen de la conductividad térmica de la base térmica 4. Lo mismo es cierto para la proporción de áreas de sección transversal de sumidero de calor 5 y base térmica 4 única. La provisión de un sumidero de calor 5 con un área de sección transversal mucho mayor que la de la base térmica 4 única no mejora adicionalmente la disipación de calor.
- 15 Otra variante preferente del dispositivo según la presente invención comprende una primera base térmica 4 y una segunda base térmica 6, preferentemente no presentando huecos ninguna de ellas.
- 20 En una variante del dispositivo descrito en la presente memoria se utilizan dos bases térmicas separadas 4, 6. La primera base térmica 4 mejora el procedimiento de enfriamiento dentro de los protocolos de termociclado mediante la distribución del calor que debe disiparse homogéneamente por todo el sumidero de calor 5. La segunda base térmica 6 mejora el procedimiento de calentamiento dentro de los protocolos de termociclado mediante la distribución del calor generado en la bomba o bombas de calor 2 homogéneamente en todo el bloque térmico 1.
- 25 En todavía otra variante preferente del dispositivo según la presente invención, dicha primera base térmica 4 es sustancialmente plana, estando en contacto térmico con dicho sumidero de calor 5.
- 30 Tal como se ha indicado anteriormente, "sustancialmente plano" se refiere a bases térmicas cuboides con un área de sección transversal en planta A, una longitud l, una anchura w y una altura h, y dicha primera base térmica 4 presenta las dimensiones preferentes  $l=10$  a 500 mm,  $w=10$  a 500 mm y  $h=3$  a 15 mm. Con respecto al contacto térmico, también son aplicables todas las posibilidades indicadas anteriormente para esta variante preferente.
- 35 En una realización del dispositivo, dicha bomba o bombas de calor 2 se encuentran interpuestas entre dichas dos bases térmicas 4, 6 y dicha bomba o bombas de calor 2 se encuentran en contacto térmico con ambas bases térmicas 4, 6.
- 40 Con dicha bomba o bombas de calor 2 entre dichas dos bases térmicas 4, 6, las bombas de calor 2 son capaces de transferir calor a las segundas bases térmicas 6 durante el procedimiento de calentamiento, así como de transferir calor desde las segundas bases térmicas 6 a las primeras bases térmicas 4 durante el procedimiento de enfriamiento. En una realización preferente de la invención, dicha bomba o bombas de calor 2 son dispositivos TE.
- 45 Resulta preferente disponer un material de interfaz adicional entre dicha bomba o bombas de calor 2 y dicha primera base térmica 4, así como dicha segunda base térmica 6. En ambos casos, un material de interfaz preferente es lámina de grafito, tal como se ha indicado de manera general anteriormente.
- 50 En una variante más preferente del dispositivo según la presente invención, el área de sección transversal de dicha primera base térmica 4 es en menos de 20% mayor o menor que el área de sección transversal de dicho sumidero de calor 5 y el área de sección transversal de dicha primera base térmica 4 es mayor que el área de sección transversal de dicho bloque térmico 1, y dichas áreas de sección transversal se encuentran dispuestas en paralelo a las áreas de contacto respectivas.
- 55 El efecto positivo de un sumidero de calor 5, así como de una primera base térmica 4, en las que ambas presentan un área de sección de transversal mayor que el bloque térmico 1 se ha comentado en detalle anteriormente. Brevemente, utilizando una primera base térmica 4 en combinación con un sumidero de calor 5 mejora la disipación del calor porque la enorme conductividad térmica de la base térmica 4 garantiza que incluso un sumidero de calor 5 de mucho mayor tamaño que la fuente de calor participe eficazmente en el proceso disipativo.
- 60 En una variante todavía más preferente del dispositivo según la presente invención, el área de sección transversal de dicha base térmica 4 es mayor que el área de sección transversal de dicho bloque térmico 1 en por lo menos un factor de 1,5, preferentemente en por lo menos un factor de 4, y dicha base térmica 4 presenta el mismo área de sección transversal que dicho sumidero de calor 2, y dichas áreas de sección transversal son paralelas a las áreas de contacto respectivas.
- 65 Las proporciones razonables de áreas de sección transversal de dicha primera base térmica 4 y dicho bloque térmico 1, así como de dicha primera base térmica 4 y dicho sumidero de calor 2 dependen de la conductividad térmica de la base térmica 4.
- Tal como se ha indicado anteriormente, al utilizar dispositivos TE como bombas de calor, la inversión de la corriente de dichos elementos termoeléctricos proporciona un dispositivos de calentamiento o de enfriamiento.

Otra realización preferente según la presente invención es un dispositivo en el que se proporciona una o más de dichas una o más bases térmicas con medios de control 9 para modificar las propiedades de conducción de calor de dichas bases térmicas.

5 Resulta preferente proporcionar cada base térmica con medios de control 9, ya que, en caso de que puedan modificarse independientemente las propiedades de conducción de calor de dichas bases térmicas, resulta posible activar ("on") y desactivar ("off") la influencia de dichas bases térmicas según se desee mediante los diferentes procedimientos del protocolo de termociclado. Por ejemplo, en una realización con una primera 4 y una segunda base térmica 6, resulta deseable minimizar las propiedades de conducción de calor de la primera base térmica 4 y maximizar las propiedades de conducción de calor de la segunda base térmica 6 para el procedimiento de calentamiento del protocolo de termociclado. En el caso de que la primera base térmica 4 no pueda desactivarse ("off") durante el procedimiento de calentamiento, una mayor fracción del calor generado en la bomba o bombas de calor 2 será disipada inmediatamente en el sumidero de calor 5.

15 Existen varias maneras de controlar las propiedades de conducción de calor de una base térmica (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.417.686). En general, las propiedades de conducción de calor de una base térmica dependen del equilibrio líquido-vapor del líquido interno de trabajo afectado por el vacío del recipiente, así como del transporte de gas y líquido dentro del recipiente sellado.

20 Una realización más preferente según la presente invención es un dispositivo, en el que dichos medios de control 9 modifican las propiedades de conducción de calor de una base térmica mediante modificación del volumen interior de dicha base térmica.

25 Otra realización más preferente según la presente invención es un dispositivo, en el que dichos medios de control 9 modifican las propiedades de conducción de calor de una base térmica mediante modificación del caudal en el interior de dicha base térmica.

30 El equilibrio líquido-vapor del líquido interno de trabajo dentro de una base térmica puede modificarse mediante el cambio del volumen de la base térmica. Lo anterior puede llevarse a cabo proporcionando un recipiente adicional conectado a dicha base térmica mediante una abertura, mientras que el volumen de dicho recipiente adicional es ajustable. Dicho recipiente adicional puede ser, por ejemplo, una jeringa o un fuelle. Alternativamente, el vacío interior a dicha base térmica puede ajustarse directamente mediante la utilización de una bomba de vacío conectada a una abertura del recipiente. Además, las propiedades de conducción de calor de la base térmica pueden modificarse afectando al caudal dentro de dicho recipiente. En este caso, una válvula reductora de presión resulta adecuada, que pueda operarse desde el exterior sin afectar al vacío interior al recipiente que divide la base térmica en compartimientos.

40 En una variante preferente del dispositivo según la presente invención, dicho sumidero de calor 5 está realizado en un material térmicamente conductor.

En una variante más preferente del dispositivo según la presente invención, dicho sumidero de calor 5 está realizado en metal, preferentemente en aluminio o plata.

45 Respecto al material térmicamente conductor del sumidero de calor 5, son válidas las mismas afirmaciones que las indicadas anteriormente con respecto al bloque térmico 1.

En todavía otra variante preferente del dispositivo según la presente invención, dicho sumidero de calor 5 está dispuesto para proporcionar una proporción de superficie a volumen maximizada.

50 Sin restringirse a ninguna teoría en particular, la cantidad de calor que puede ser disipada por dicho sumidero de calor 5 es directamente proporcional a su área superficial. Por lo tanto, resulta deseable proporcionar un sumidero de calor con una proporción de superficie a volumen optimizada debido al limitado espacio interior del dispositivo de la presente invención.

55 En una variante más preferente del dispositivo según la presente invención, dicha proporción de superficie a volumen elevada se proporciona mediante el ensamblaje de aletas dispuestas sobre una placa de base.

También resulta preferente un dispositivo según la presente invención en el que dicho sumidero de calor 5 es enfriado por aire o por un flujo de agua.

60 Un ensamblaje intersticial de aletas proporciona un área superficial grande, mientras que la placa de base sólida representa el área de contacto térmico con la base térmica 4. El sumidero de calor 5 disipa calor al medio circundante. Debido a que este proceso disipativo resulta más efectivo para grandes diferencias de temperatura entre la atmósfera circundante y el sumidero de calor 5, resulta deseable enfriar activamente el medio circundante. Esto puede llevarse a cabo mediante un flujo de aire producido por un ventilador o por un flujo de líquido producido mediante, por ejemplo, una bomba peristáltica.

65

En todavía otra variante preferente del dispositivo según la presente invención, dicha unidad de control 3 se utiliza para controlar las propiedades de dicha bomba o bombas de calor 2.

- 5 En una variante más preferente del dispositivo según la presente invención, dicha unidad de control 3 se utiliza adicionalmente para el acceso a dichos medios de control 9, en los que se ajustan las propiedades de las bases térmicas 4, 6 correspondientes.

10 El dispositivo según la presente invención está dotado de una unidad de control 3. Dicha unidad de control 3 es un dispositivo eléctrico, por ejemplo un ordenador, que controla la fuente de alimentación de la bomba o bombas de calor 2 y, por lo tanto, ajusta sus propiedades de calentamiento o enfriamiento. Además, dicha unidad de control 3 puede operar los medios de control 9 de la base o bases térmicas 4, 6.

15 Otra realización preferente según la presente invención es un dispositivo en el que dicho termociclado se lleva a cabo para realizar amplificaciones de ácidos nucleicos en dichas múltiples muestras.

Una realización más preferente según la presente invención es un dispositivo que comprende además unos medios para llevar a cabo el seguimiento de dichas amplificaciones de ácidos nucleicos en tiempo real.

20 Dentro del alcance de la presente invención son aplicables todas las amplificaciones de ácidos nucleicos conocidas por el experto en la materia, por ejemplo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la reacción en cadena de la polimerasa-ligasa, la Gap-LCR, la reacción en cadena de reparación, 3SR, la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), la amplificación mediada por transcripción (TMA) o la amplificación Q $\beta$ .

25 En general, se realiza un seguimiento de las amplificaciones de ácidos nucleicos en tiempo real utilizando pigmentos fluorescentes conocidos por el experto en la materia. Para medir las señales de fluorescencia resultan adecuados todo tipo de medios ópticos comprendidos dentro del alcance de la presente invención. Resultan preferentes las cámaras CCD o los fotómetros, que pueden utilizarse con y sin componentes ópticos adicionales, tales como lentes, filtros ópticos o espejos plegables.

30 En el caso de que una aplicación determinada requiere que los medios ópticos deban orientarse hacia la parte inferior del bloque térmico 1, por ejemplo para realizar un seguimiento de la intensidad de fluorescencia de las múltiples muestras a través de orificios del fondo en dicho bloque térmico 1, resulta posible crear una composición de sumidero de calor 5, primera base térmica 4, bombas de calor 2 y opcionalmente una segunda base térmica 6 lateralmente a dicho bloque térmico 1. Para obtener un termociclado homogéneo del bloque térmico 1 resulta posible disponer una de dichas composiciones en cada uno de los cuatro lados de dicho bloque térmico 1. Alternativamente, puede disponerse una única composición circundante al bloque térmico 1.

35 Otro aspecto de la presente invención es un método para el termociclado simultáneo de múltiples muestras, comprendiendo las etapas siguientes:

40 a) proporcionar un bloque térmico 1 con múltiples huecos, por lo menos una bomba de calor 2, una primera base térmica 4, en el que dicha base térmica es un dispositivo de cámara de vapor para transportar y distribuir calor, opcionalmente una segunda base térmica 6, un sumidero de calor 5 y una unidad de control 3,

45 b) disponer dicho bloque térmico 1 con múltiples huecos, dicho por lo menos una bomba de calor 2, dicha primera base térmica 4, opcionalmente dicha segunda base térmica 6 y dicho sumidero de calor 5, en el que:

- 50 - dicha primera base térmica 4 se dispone interpuesta y en contacto térmico con dicho sumidero de calor 5 y dicha bomba o bombas de calor 2, y  
 - dicha bomba o bombas de calor 2 se encuentra en contacto térmico con dicho bloque térmico 1 u opcionalmente en contacto térmico con dicha segunda base térmica 6, estando dicha segunda base térmica 6 en contacto térmico con dicho bloque térmico 1, y

55 c) introducir dichas múltiples muestras dentro de los huecos de dicho bloque térmico 1, y

d) llevar a cabo un protocolo de termociclado con dicha unidad de control,

60 en la que dicho contacto térmico se basa en una pasta que presenta una elevada conductividad térmica, una lámina térmicamente conductora o fuerza mecánica.

65 La expresión "protocolo de termociclado" resume una variación cíclica de la temperatura de una muestra, mientras que la temperatura al inicio de un ciclo es la misma que la temperatura al final de dicho ciclo. Un ciclo de temperatura comprende etapas de calentamiento, enfriamiento (rampas de temperatura) y etapas de temperatura constante.

- 5 Tal como se ha indicado anteriormente, la expresión "contacto térmico" entre dos componentes se utiliza en toda la presente invención para enfatizar que el contacto debe optimizarse para una conductividad térmica elevada. El contacto térmico puede optimizarse mediante, por ejemplo, una pasta, por ejemplo una grasa térmica, que presente una elevada conductividad térmica, como conector entre los dos componentes, o mediante una lámina térmicamente conductora blanda, por ejemplo una lámina de grafito a modo de capa intermedia entre dos componentes. En todos los casos resulta ventajoso que los dos componentes se aprieten uno contra el otro mediante fuerza mecánica.
- 10 En una variante preferente del método según la presente invención, dicha primera base térmica 4 se encuentra en contacto térmico con dicho sumidero de calor 5 y mediante una lámina de grafito con dicha bomba o bombas de calor 2, y dicha bomba o bombas de calor 2 también se encuentran en contacto térmico con dicho bloque térmico 1 ó con dicha segunda base térmica 6 mediante una lámina de grafito.
- 15 En todavía otra variante preferente del método según la presente invención, dicha primera base térmica 4 es sustancialmente plana y preferentemente no presenta huecos.
- 20 En todavía otra variante del método según la presente invención, el área de sección transversal de dicha primera base térmica 4 es en menos de 20% mayor o menor que el área de sección transversal de dicho sumidero de calor 5 y el área de sección transversal de dicha primera base térmica 4 es mayor que el área de sección transversal de dicho bloque térmico 1, y dichas áreas de sección transversal se encuentran dispuestas en paralelo a las áreas de contacto respectivas.
- 25 En una variante más preferente del método según la presente invención, dicho área de sección transversal de dicha primera base térmica 4 es mayor que el área de sección transversal de dicho bloque térmico 1 en por lo menos un factor de 1,5, preferentemente en por lo menos un factor de 4, y dicha primera base térmica 4 presenta el mismo área de sección transversal que dicho sumidero de calor 2, y dichas áreas de sección transversal se encuentran dispuestas en paralelo a las áreas de contacto respectivas.
- 30 También resulta preferente un método según la presente invención, en el que la segunda base térmica 6 opcional es sustancialmente plana y preferentemente no presenta huecos.
- 35 Resulta preferente además un método según la presente invención en el que dicha segunda base térmica 6 opcional presenta el mismo área de sección transversal que dicho bloque térmico 1.
- Los motivos para las disposiciones preferentes anteriormente indicadas ya se comentaron anteriormente con respecto al dispositivo según la presente invención.
- 40 En una realización preferente del método según la presente invención, dicha segunda base térmica 6 opcional presenta una forma compleja que circunda parte de dicho bloque térmico 1 ó la totalidad de dicho bloque térmico 1.
- 45 La realización preferente del método según la presente invención, en la que una segunda base térmica 6 presenta una forma compleja proporciona un atemperado especialmente homogéneo del bloque térmico 1, debido a que no sólo el fondo de dicho bloque térmico 1 se encuentra en contacto térmico con la segunda base térmica 6, sino que también partes de las paredes laterales o incluso el bloque térmico 1 en su totalidad se encuentran circundados por la segunda base térmica 6.
- 50 Alternativamente a circundar el bloque térmico 1 con la segunda base térmica 6 en su totalidad, el bloque térmico 1 puede ser sustituido por una base térmica especial 8 formada ella misma a modo de bloque térmico.
- 55 En todavía otra realización preferente del método según la presente invención, dichas múltiples muestras se introducen dentro de dichos huecos de dicho bloque térmico 1 directamente o mediante recipientes de reacción, comprendiendo cada uno una de dichas múltiples muestras.
- En una realización más preferente del método según la presente invención, dichos recipientes de reacción se unen formando uno o más grupos, preferentemente dichos recipientes de reacción se unen formando una placa multipocillo.
- 60 Las diferentes opciones de introducción de múltiples muestras en el bloque térmico 1 ya se comentaron anteriormente con respecto al dispositivo según la presente invención.
- 65 En una realización preferente adicional del método según la presente invención, dicho protocolo de termociclado resulta adecuado para llevar a cabo amplificaciones de ácidos nucleicos dentro de dichas múltiples muestras.
- Resulta todavía más preferente un método según la presente invención, en el que se realiza un seguimiento de dichas amplificaciones de ácidos nucleicos en tiempo real.

Todavía otro aspecto de la presente invención es un sistema para el termociclado simultáneo de múltiples muestras con el fin de llevar a cabo múltiples reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, que comprende:

- 5 a) un dispositivo según la presente invención, y
- b) reactivos necesarios para llevar a cabo dichas múltiples reacciones de amplificación de ácidos nucleicos.

10 Los reactivos en toda la presente solicitud son todo tipo de compuestos químicos necesarios para llevar a cabo uno de los métodos indicados de manera general anteriormente, con ayuda del dispositivo inventivo según la presente invención. Estos reactivos pueden ser líquidos o sólidos, materiales puros o mezclas; pueden proporcionarse 'listos para utilizar' o en forma de concentrados.

15 En un sistema preferente según la presente invención, dichos reactivos comprenden soluciones tampón, detergentes, enzimas, nucleótidos y cebadores.

20 Los reactivos de dicho sistema preferente según la presente invención son los reactivos necesarios para llevar a cabo amplificaciones de PCR. En mayor detalle, los reactivos son un conjunto de nucleótidos individuales, una polimerasa, una pareja de cebadores y soluciones tampón.

En otro sistema preferente según la presente invención, dichas múltiples reacciones de amplificación de ácidos nucleicos son múltiples amplificaciones por PCR el seguimiento de las cuales se lleva a cabo en tiempo real.

25 Los ejemplos, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse que resulta posible llevar a cabo modificaciones de los procedimientos indicados sin apartarse del espíritu de la invención.

### 30 Descripción de las figuras

- |             |  |
|-------------|--|
| Figura 1    | Dibujos esquemáticos de varias realizaciones del dispositivo según la presente invención.  |
| 35 Figura 2 | Fotografías térmicas del bloque térmico durante un procedimiento de calentamiento del bloque térmico.  |
| Figura 3    | Fotografías térmicas del bloque térmico durante un procedimiento de enfriamiento del bloque térmico.   |
| 40 Figura 4 | Gráfico que ilustra varias temperaturas asociadas al bloque térmico como función del tiempo durante un protocolo de termociclado que comprendía 6 ciclos.  |
| 45 Figura 5 | Gráfico detallado que ilustra varias temperaturas asociadas al bloque térmico como función del tiempo durante un ciclo de termociclado.  |
| Figura 6    | Curvas de amplificación en tiempo real de un fragmento de parvovirus B19. Se analizaron cinco concentraciones diana diferentes mediante PCR en tiempo real y cada concentración está representada por cinco pocillos diferentes de la placa. (a: $10^6$ copias; b: $10^5$ copias; c: $10^4$ copias; d: $10^3$ copias; e: $10^2$ copias). |
| 50 Figura 7 | Curvas de amplificación en tiempo real de un fragmento de parvovirus B19. Registro de 96 curvas de amplificación en tiempo real en 96 pocillos diferentes de una placa, conteniendo cada una $10^4$ copias de la secuencia diana.  |

### 55 Ejemplo 1

60 Dispositivo según la presente invención para el termociclado de una placa de 384 pocillos que comprendía un bloque térmico de propia fabricación realizado en aleación de aluminio AlMgSi 0,5. Se utilizó un bloque de aluminio con las dimensiones 109 x 73 x 9,1 mm para formar 384 huecos mediante perforación; cada hueco cónico presentaba un diámetro superior de 3,44 mm (ángulo: 17°) y una profundidad de 6,8 mm.

65 Debajo de dicho bloque térmico se dispusieron 6 elementos Peltier, y se potenció el contacto térmico con una lámina de grafito térmicamente conductora. Los elementos Peltier utilizados resultaban adecuados para múltiples procedimientos de termociclado y podían calentarse hasta 130°C. Además, cada uno de ellos presentaba una capacidad de enfriamiento de 75 W.

Mediante una segunda lámina de grafito térmicamente conductora, se disponen los 6 elementos Peltier sobre una base térmica. La base térmica utilizada se produjo adaptando la Thermacore™ y presentaba las dimensiones 248 x 198 x 5 mm. La pared del recipiente estaba realizada en cobre y el fluido de trabajo era agua.

5 El sumidero de calor utilizado se encuentra disponible comercialmente de Webra (número de producto W-209) y está realizado en la aleación de aluminio AlMgSi 0,5, con las dimensiones 250 x 200 x 75 mm. Entre el sumidero de calor y la base térmica se aplicó una grasa térmica comercial con el fin de potenciar el contacto térmico.

10 Los cuatro componentes del dispositivo se fijaron entre sí mediante 17 tornillos y muelles y se potenció el proceso disipativo con cuatro ventiladores para la circulación del aire en el sumidero de calor.

#### Ejemplo 2

15 Se registraron fotografías térmicas del bloque térmico de un dispositivo tal como se ha indicado en el Ejemplo 1, con una cámara de IR (disponible comercialmente de la compañía FLIR) durante un procedimiento de calentamiento (figura 2) y un procedimiento de enfriamiento (figura 3).

20 El procedimiento de calentamiento (figura 2) se inició a una temperatura de 55°C con una tasa de calentamiento de 4°C/s hasta alcanzar 95°C, mientras que el procedimiento de enfriamiento (figura 3) se inició a una temperatura de 95°C con una tasa de enfriamiento de 2°C/s hasta alcanzar 55°C. Se obtuvieron las fotografías en diferentes tiempos durante el procedimiento de calentamiento y el procedimiento de enfriamiento, respectivamente.

#### Ejemplo 3

25 En la figura 4 se muestran gráficos de las diferentes temperaturas características de 6 ciclos de temperatura sucesivos como función del tiempo del protocolo de termociclado siguiente:

etapa	temp	rampa	tiempo de espera	número
PreCiclo	40°C	2,0°C/s	120 s	1
CicloPrinc.	95°C	4,4°C/s	10 s	6
	55°C	2,0°C/s	10 s	
	72°C	4,4°C/s	10 s	

30 En la figura se incluyen 7 perfiles de temperatura diferentes: el perfil de temperatura del protocolo de termociclado ('Temp termoc.'), la temperatura teórica del bloque térmico ('1º termoc.'), la temperatura medida del bloque térmico ('1a Temp.'), la temperatura media medida dentro de 9 huecos del bloque térmico ('Media'), la temperatura medida mínima de dichos 9 huecos del bloque térmico ('Min'), la temperatura medida máxima de dichos 9 huecos del bloque térmico ('Max') y la homogeneidad de las 9 mediciones de hueco ('Hom'; homogeneidad=temperatura máxima de hueco - temperatura mínima de hueco).

35 Se preparó una placa multipocillo estándar en los huecos del bloque térmico y 9 pocillos distribuidos en la sección transversal del bloque térmico se rellenaron con aceite (de tipo Applied Biosystems, aceite mineral Nujol, componente nº 0186-2302). Se midió la temperatura utilizando un termopar (Thermocouples Omega 5TC-TT-36-72) para cada hueco. La temperatura del bloque térmico se midió con un sensor interno de temperatura dentro del bloque térmico.

40 En la figura 5, se proporciona una magnificación del último ciclo de la secuencia, con el fin de ilustrar los diferentes perfiles en mayor detalle.

#### 45 Ejemplo 4

50 Con el fin de demostrar adicionalmente la validez de la invención, se llevaron a cabo amplificaciones de PCR en tiempo real de diferentes concentraciones diana con una detección basada en sondas de hibridación marcadas con pigmento fluorescente, utilizando el aparato indicado en el Ejemplo 1. A modo de sistema de ensayo se seleccionó la amplificación por PCR en tiempo real de un fragmento de 177 pb del parvovirus B19 (SEC ID nº 1). Se utilizó una sonda fluorescente de la pareja de sondas de hibridación (SEC ID nº 4 y SEC ID nº 5) del kit de cuantificación LightCycler - Parvovirus B19 (Roche Applied Science, componente nº 3 246 809) o SybrGreen. Se muestran los resultados en las figuras 6 (pareja de sondas de hibridación) y 7 (SybrGreen).

#### 55 PCR

Se clonó un fragmento parcial de la secuencia del parvovirus B19 en un vector plásmido pCR™ 2.1 (Invitrogen). Se prepararon diluciones del ADN plasmídico de parvovirus B19 en Tris-HCl 10 mM, pH 8,3. En cada reacción de PCR, para la amplificación se utilizaron 10<sup>6</sup> a 100 copias de la diana plásmido.

Para la amplificación por PCR, se utilizó el kit de cuantificación LightCycler - Parvovirus B19 (Roche Applied Science, componente nº 3 246 809). Un ensayo de PCR típico consistía de  $10^6$  a 100 copias de plásmido de parvovirus B19, tampón de reacción, tampón de detección y 1 U de ADN polimerasa Taq FastStart según las instrucciones del fabricante. El protocolo de la PCR consistía de una etapa inicial de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificación a 95°C durante 10 s, 60°C durante 15 s y 72°C durante 10 s. Las rampas fueron de 4,8°C para el calentamiento y de 2,4°C para el enfriamiento, respectivamente. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 20 µl en una placa de microtitulación blanca de 384 pocillos (producto hecho a medida de Treff, Suiza).

Se detectó la emisión de fluorescencia en cada ciclo al final de la etapa de hibridación a 60°C utilizando una cámara de CCD acoplada a un sistema óptico que comprendía una lente telecéntrica con el fin de medir las señales de fluorescencia de todos los pocillos de la placa simultáneamente. El sistema óptico utilizado se describe en la solicitud de patente europea EP nº 05000863.0 (presentada el 18 de enero de 2005). La pareja de sondas de hibridación se excitó a 480 nm, mientras que la emisión se midió a 640 nm. Se excitó SybrGreen a 470 nm, mientras que la emisión se midió a 530 nm. Se fijó el tiempo de exposición en 1.000 ms.

En la figura 6, se muestran las curvas de amplificación de 5 concentraciones diana diferentes, mientras que cada concentración diana está representada por 5 pocillos diferentes (distribuidos en la placa de 384 pocillos). Los grupos de curvas de amplificación basados en la misma concentración diana estaban marcados con: (a)  $10^6$  copias ( $C_p$  medio (valor de inflexión): 16,6; SD: 0,033), (b)  $10^5$  copias ( $C_p$  media: 20,1; SD: 0,043), (c)  $10^4$  copias ( $C_p$  media: 23,5; SD: 0,029), (d)  $10^3$  copias ( $C_p$  media: 26,9; SD: 0,020), (e)  $10^2$  copias ( $C_p$  media: 30,4; SD: 0,2).

La figura 7 comprende 96 curvas de amplificación en tiempo real en 96 pocillos diferentes de una placa de 384 pocillos, conteniendo cada una  $10^4$  copias de la secuencia diana. Las 96 reacciones de amplificación presentaban un valor de  $C_p$  medio de 23,7, con una desviación estándar de 0,08.

*Información de secuencia del parvovirus B19 (las posiciones de los cebadores están subrayadas)*

**SEC ID nº 1:**

```

1      cagagggtgt gccatttaat ggggaagggaa ctaaggctag cataaagttt caaactatgg
61     taaactggct gtgtgaaaac agagtgttta cagaggataa gtggaacta gttgacttta
121    accagtacac tttactaagc agtagtcaca gtggaagttt tcaaattcaa agtgcactaa
181    aactagcaat ttataaagca actaatttag tgctactag cgcattttta ttgcatacag
241    actttgagca ggttatgtgt attaaagaca ataaaattgt taattgtta ctttgtcaaa
301    actatgaccc cctattggtg gggcagcatg tgttaaagtg gattgataaa aaatgtggca
361    agaaaaatac actgtggttt tatgggccgc caagtacagg aaaaacaaac ttggcaatgg
421    ccattgctaa aagtgttcca gtatatggca tggttaactg gaataatgaa aactttccat
481    ttaatgatgt agcaggaaaa agcttggtgg tctgggatga aggtattatt aagtctacaa
541    ttgtagaagc tgcaaaaagct attttaggog ggcaaccac cagggtagat taaaaaatgc
601    gtggaagtgt agctgtgcct ggagtacctg tggttataac cagcaatggt gacattactt
661    ttgttgtaag cgggaacact acaacaactg tacatgctta agccttaaaa gagcgaatgg
721    taaagttaaa ctttactgta ag
    
```

## ES 2 401 437 T3

### Secuencias de cebadores y sondas de PCR:

Cebador de PCR de orientación sentido (SEC ID nº 2): 5'-GGG GCA GCA TGT GTT AAA GTG G-3'  
Cebador de PCR antisentido (SEC ID nº 3): 5'-CCT GCT ACA TCA TTA AAT GGA AAG-3'  
Sonda aceptora (SEC ID nº 4): 5'-LCRed640-TTG GCG GCC CAT AAA ACC ACA  
GTG TAT-fosfato-3'  
Sonda donadora (SEC ID nº 5): 5'-TGG CCA TTG CCA AGT TTG TTT TTC CTG  
T-Fluoresceína-3'

### Secuencia de fragmento amplificado:

5' - g gggcagcatg tgtaaagtg gattgataaa aaatgtggca agaaaaatac actgtggttt  
tatgggccgc caagtacagg aaaaacaaac ttggcaatgg ccattgctaa aagtgttcca  
gtatatggca tggtaactg gaataatgaa aactttccat ttaatgatgt agcagg -3'

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- <110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG
  - 5 <120> Termociclado de un bloque que comprende múltiples muestras
  - <130> 23080 EP
  - <160> 5
  - 10 <170> PatentIn versión 3.2
  - <210> 1
  - <211> 742
  - <212> ADN
  - 15 <213> Parvovirus B19
  - <400> 1
- |    |   |     |
|----|---|-----|
|    | cagaggttgt gccatttaat gggaagggaa ctaaggctag cataaagttt caaactatgg   | 60  |
|    | taaactggct gtgtgaaaac agagtgttta cagaggataa gtggaaacta gttgacttta   | 120 |
|    | accagtacac ttactaagc agtagtcaca gtggaagttt tcaaattcaa agtgcactaa    | 180 |
|    | aactagcaat ttataaagca actaatttag tgcctactag cgcattttta ttgcatacag   | 240 |
|    | actttgagca ggttatgtgt attaaagaca ataaaattgt taaattgtta ctttgtcaaa   | 300 |
|    | actatgaccc cctattgggtg gggcagcatg tggttaaagtg gattgataaa aaatgtggca | 360 |
|    | agaaaaatac actgtggttt tatgggccgc caagtacagg aaaaacaaac ttggcaatgg   | 420 |
|    | ccattgctaa aagtgttcca gtatatggca tggttaactg gaataatgaa aactttccat   | 480 |
|    | ttaatgatgt agcaggaaaa agcttgggtg tctgggatga aggtattatt aagtctacaa   | 540 |
|    | ttgtagaagc tgcaaaagct attttaggcg ggcaaccac cagggtagat taaaaaatgc    | 600 |
|    | gtggaagtgt agctgtgcct ggagtacctg tggttataac cagcaatggt gacattactt   | 660 |
|    | ttgttgtaag cggaacact acaacaactg tacatgctta agccttaaaa gagcgaatgg    | 720 |
| 20 | taaagttaaa ctttactgta ag  | 742 |
- <210> 2
  - <211> 22
  - <212> ADN
  - 25 <213> Artificial
  - <220>
  - <223> Cebador de PCR de orientación sentido
  - 30 <400> 2
  - ggggcagcat gtgttaaagt gg 22
  - <210> 3
  - <211> 24
  - 35 <212> ADN
  - <213> Artificial
  - <220>
  - <223> Cebador de PCR antisentido

# ES 2 401 437 T3

<400> 3  
cctgctacat cattaaatgg aaag 24

5 <210> 4  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Sonda aceptora

<400> 4  
ttggcggccc ataaaaccac agtgtat 27

15 <210> 5  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Sonda donadora

<400> 5  
25 tggccattgc caagtttgt ttcctgt 28

**REIVINDICACIONES**

1. Dispositivo para el termociclado simultáneo de múltiples muestras, que comprende:

- 5 a) un bloque térmico (1) que comprende dichas múltiples muestras, b) por lo menos una bomba de calor 2, c) por lo menos una base térmica 4, d) un sumidero de calor 5, y e) una unidad de control 3 para controlar dicho termociclado simultáneo de múltiples muestras,

10 caracterizado porque se dispone una base térmica (4) interpuesta y en contacto térmico con dicho sumidero de calor 5 y dicha bomba o bombas de calor (2), dicha bomba o bombas de calor (2) se encuentra en contacto térmico con dicho bloque térmico (1), en el que dicha base térmica (4) es un dispositivo de cámara de vapor para transportar y distribuir calor y en el que dicho contacto térmico se basa en una pasta que presenta una elevada conductancia térmica, una lámina térmicamente conductora o fuerza mecánica.

15 2. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que dicho bloque térmico (1) comprende huecos (7) dispuestos para alojar dichas múltiples muestras.

20 3. Dispositivo según las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicha bomba o bombas de calor (2) son dispositivos termoeléctricos, preferentemente dispositivos semiconductores, más preferentemente elementos Peltier.

4. Dispositivo según las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una única base térmica (4), en la que dicha única base térmica (4) es sustancialmente plana y preferentemente no presenta huecos.

25 5. Dispositivo según las reivindicaciones 3 a 4, en el que el área de sección transversal de dicha base térmica (4) única es en menos de 20% mayor o menor que el área de sección transversal de dicho sumidero de calor (5) y en el que el área de sección transversal de dicha base térmica (4) única es mayor que el área de sección transversal de dicho bloque térmico (1), y dichas áreas de sección transversal se encuentran dispuestas en paralelo a las áreas de contacto respectivas.

30 6. Dispositivo según las reivindicaciones 1 a 2, que comprende una primera base térmica (4) y una segunda base térmica (6) preferentemente no presentando ninguna de ellas huecos.

35 7. Dispositivo según las reivindicaciones 1 a 6, en el que una o más de dichas por lo menos una base térmica se proporcionan con medios de control (9) para modificar las propiedades de conducción de calor de dichas bases térmicas.

8. Dispositivo según la reivindicación 7, en el que dicha unidad de control (3) está adaptada para controlar las propiedades de dicha bomba o bombas de calor (2).

40 9. Dispositivo según la reivindicación 8, en el que dicha unidad de control (3) está adaptada adicionalmente para el acceso a dichos medios de control (9) para ajustar las propiedades de la base térmica correspondiente (4, 6).

10. Método para el termociclado simultáneo de múltiples muestras, que comprende las etapas siguientes:

- 45 a) proporcionar un bloque térmico (1) con múltiples huecos, por lo menos una bomba de calor (2) y una primera base térmica (4),

en el que dicha base térmica es un dispositivo de cámara de vapor para transportar y distribuir calor, opcionalmente una segunda base térmica (6), un sumidero de calor (5) y una unidad de control (3),

- 50 b) disponer dicho bloque térmico (1) con múltiples huecos, dicha bomba o bombas de calor (2), dicha primera base térmica (4), opcionalmente dicha segunda base térmica (6) y dicho sumidero de calor (5), de manera que:

- dicha primera base térmica (4) se encuentra interpuesta y en contacto térmico con dicho sumidero de calor (5) y dicha bomba o bombas de calor (2),

55 - dicha bomba o bombas de calor (2) se encuentran en contacto térmico con dicho bloque térmico (1) u opcionalmente en contacto térmico con dicha segunda base térmica (6), estando dicha segunda base térmica (6) en contacto térmico con dicho bloque térmico (1), y

c) introducir dichas múltiples muestras dentro de los huecos de dicho bloque térmico (1), y

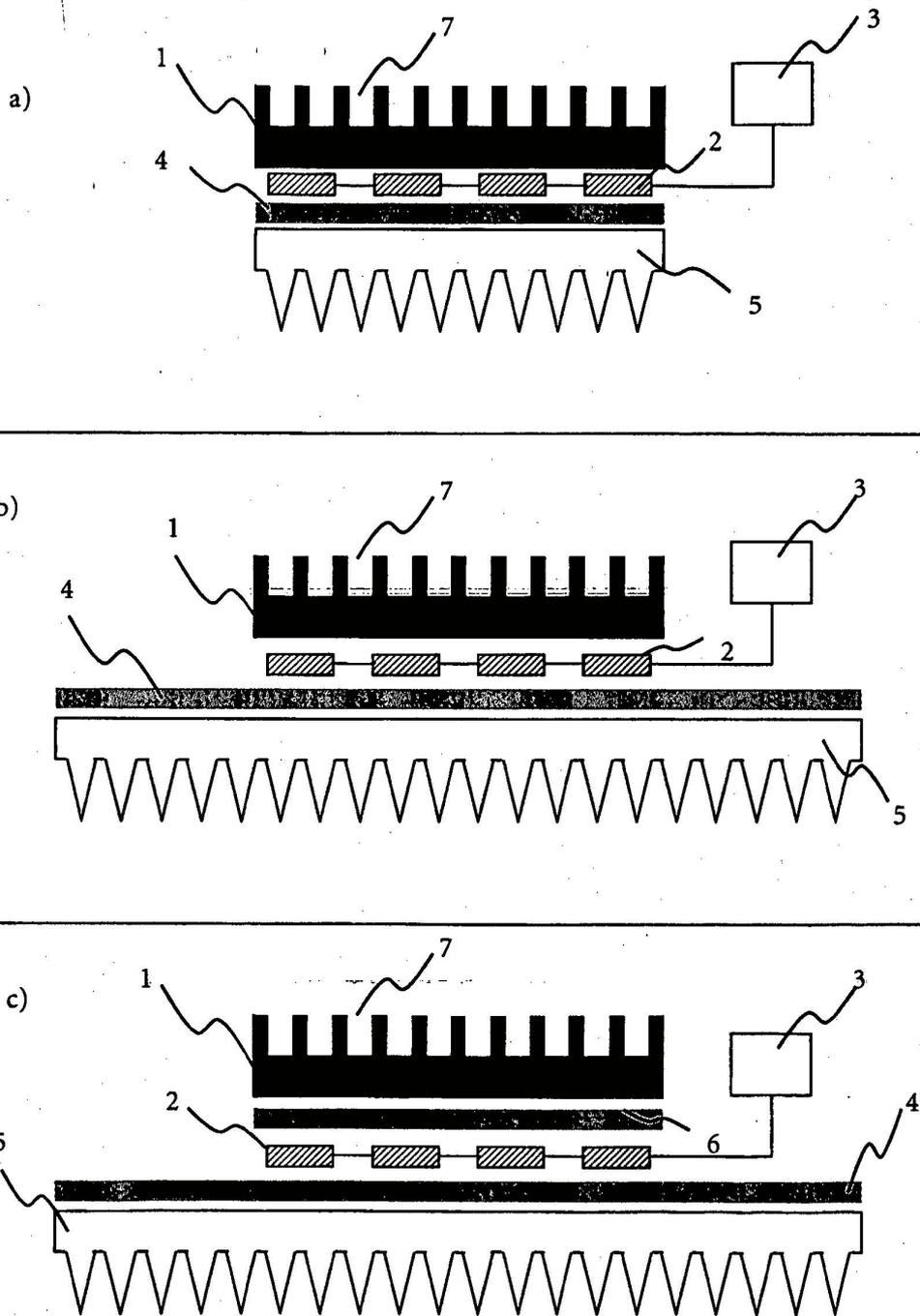
60 d) llevar a cabo un protocolo de termociclado con dicha unidad de control (3),

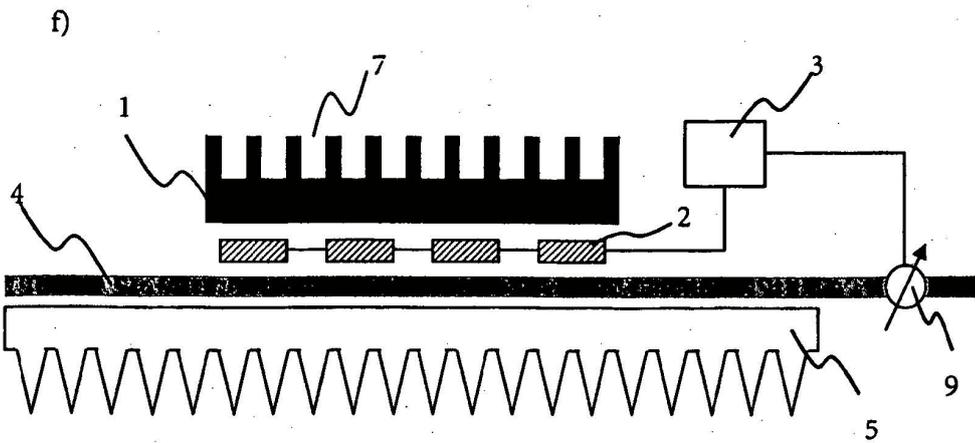
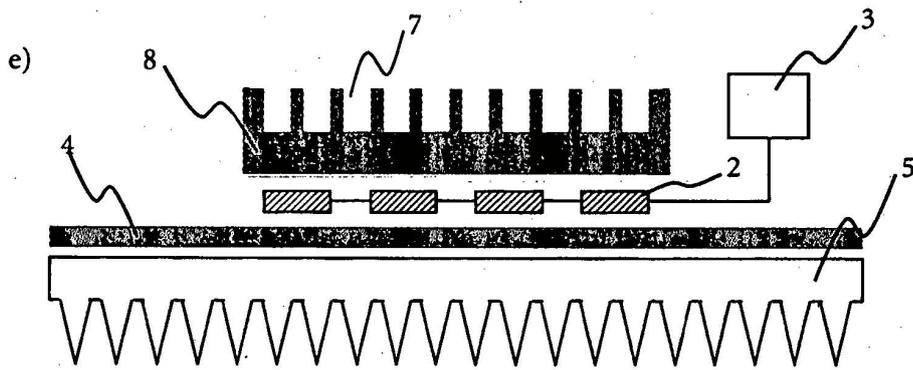
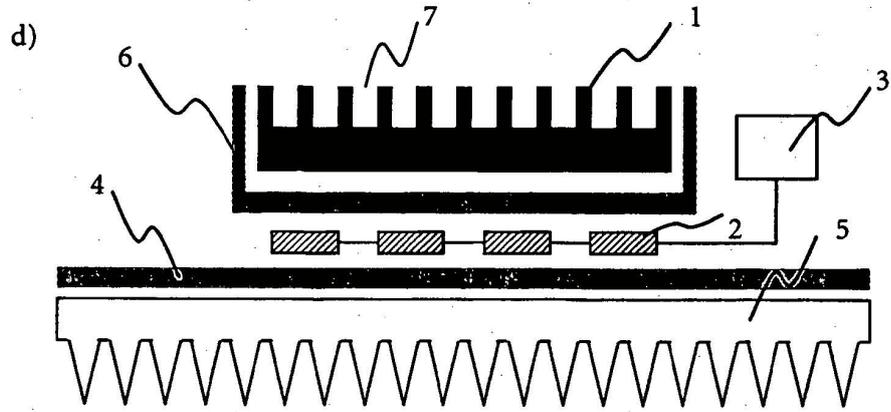
en la que dicho contacto térmico se basa en una pasta que presenta una elevada conductividad térmica, una lámina térmicamente conductora o fuerza mecánica.

65 11. Método según la reivindicación 10, en el que dicha primera base térmica (4) es sustancialmente plana y preferentemente no presenta huecos.

- 5 12. Método según la reivindicación 11, en el que el área de sección transversal de dicha primera base térmica (4) es en menos de 20% mayor o menor que el área de sección transversal de dicho sumidero de calor (5) y en el que el área de sección transversal de dicha primera base térmica (4) es mayor que el área de sección transversal de dicho bloque térmico (1), y dichas áreas de sección transversal se encuentran dispuestas en paralelo a las áreas de contacto respectivas.
13. Método según las reivindicaciones 11 a 12, en el que dicha segunda base térmica (6) opcional es sustancialmente plana y preferentemente no presenta huecos.
- 10 14. Método según las reivindicaciones 12 a 13, en el que dicho protocolo de termociclado resulta adecuado para llevar a cabo amplificaciones de ácidos nucleicos en dichas múltiples muestras.
- 15 15. Sistema para el termociclado simultáneo de múltiples muestras con el fin de llevar a cabo múltiples reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, que comprende:
- a) un dispositivo según las reivindicaciones 1 a 9, y
  - b) reactivos necesarios para llevar a cabo dichas múltiples reacciones de amplificación de ácidos nucleicos.
- 20 16. Sistema según la reivindicación 15, en el que dichos reactivos comprenden soluciones tampón, detergentes, enzimas, nucleótidos y cebadores.

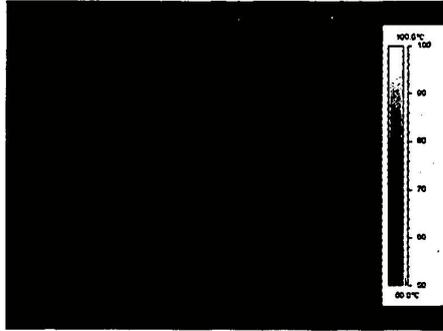
Fig. 1



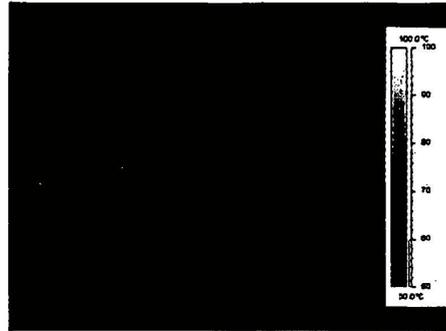


**Fig. 2**

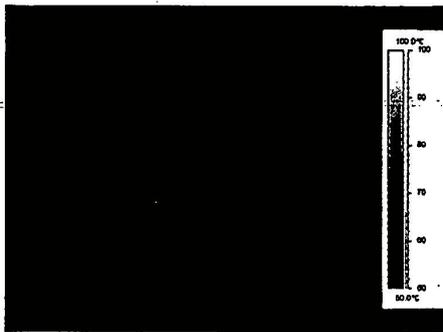
a)



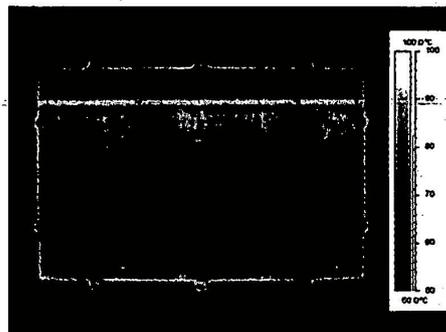
b)



c)



d)



e)

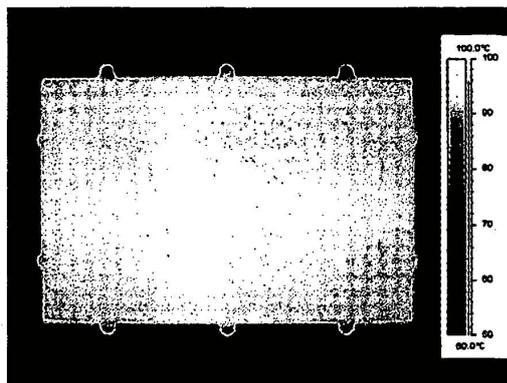
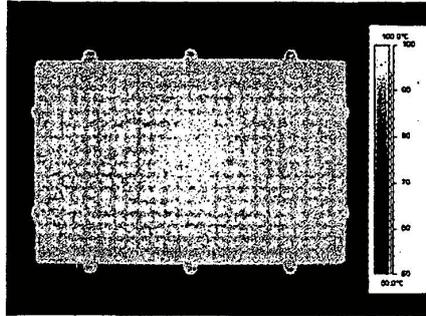
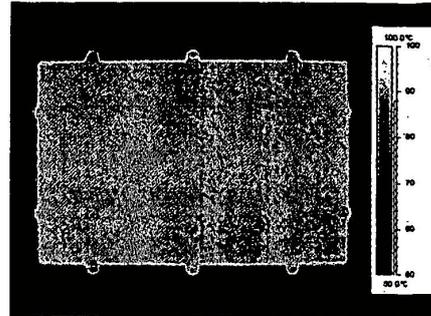


Fig. 3

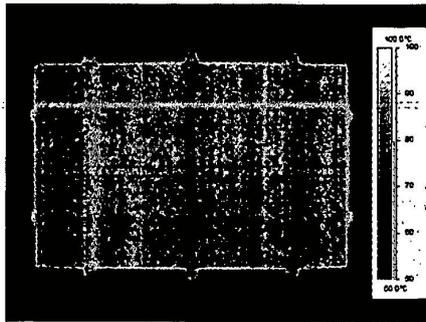
a)



b)



c)



d)



e)

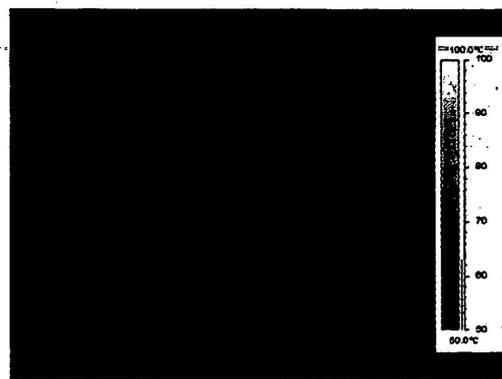


Fig. 4

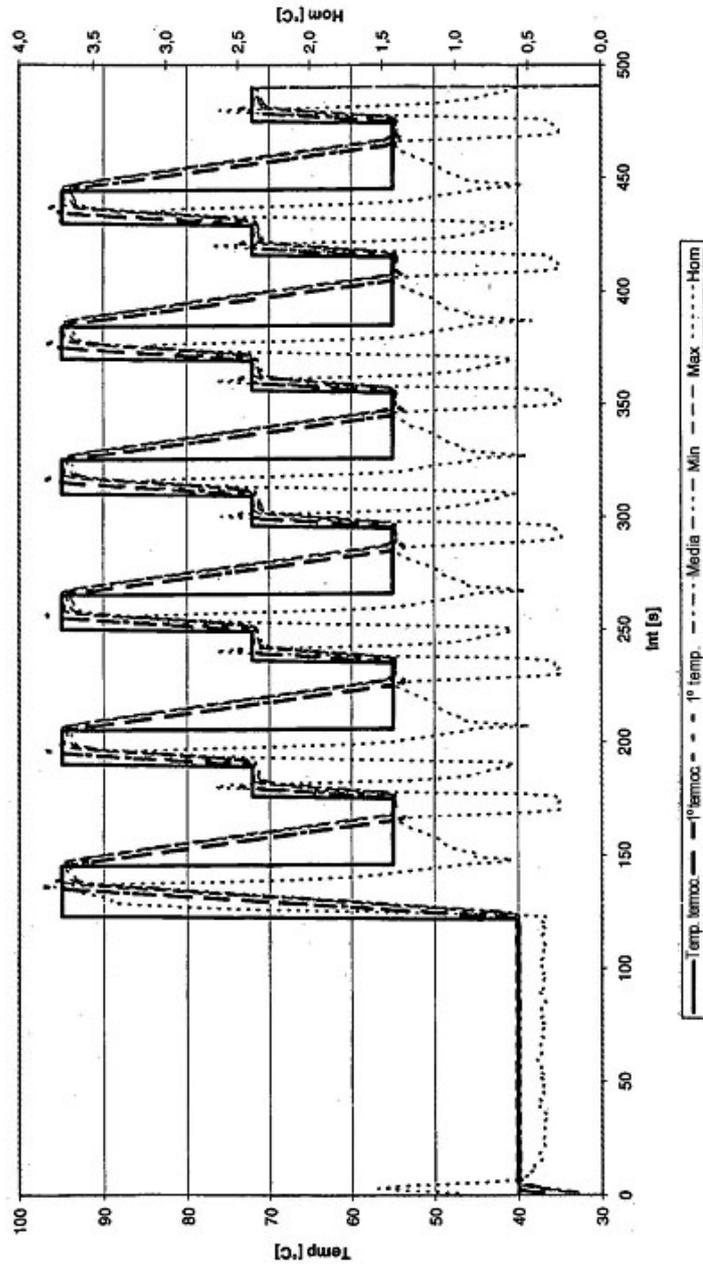


Fig. 5

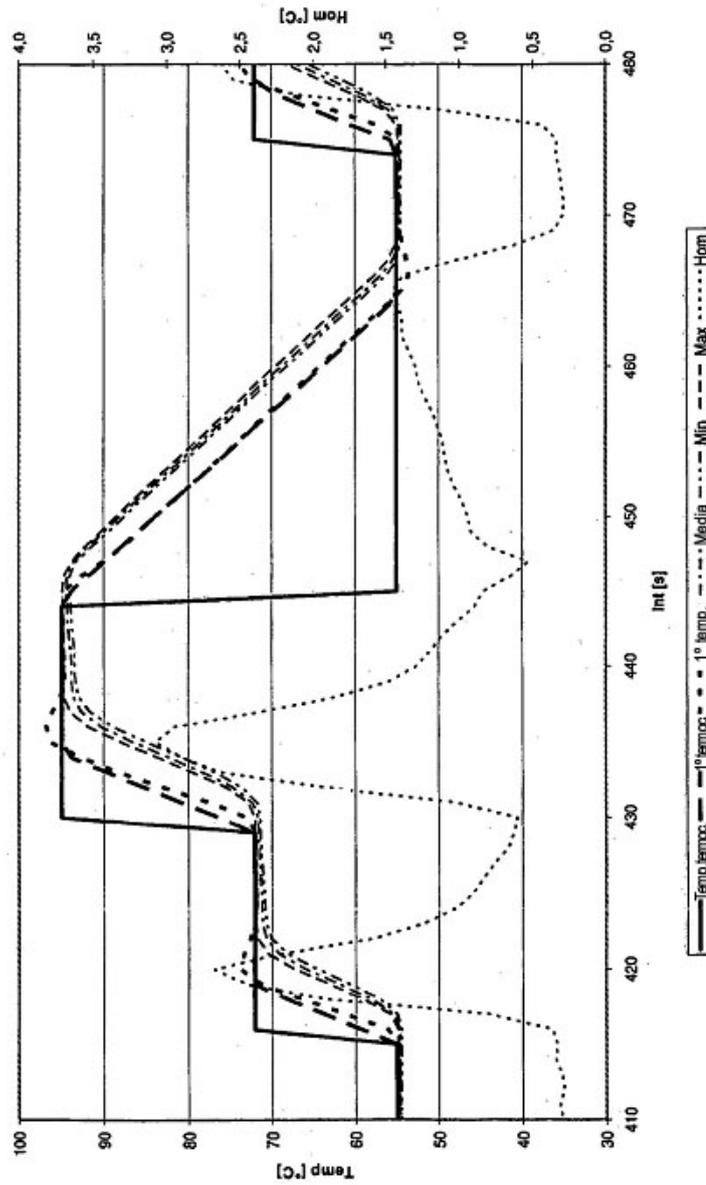


Fig. 6

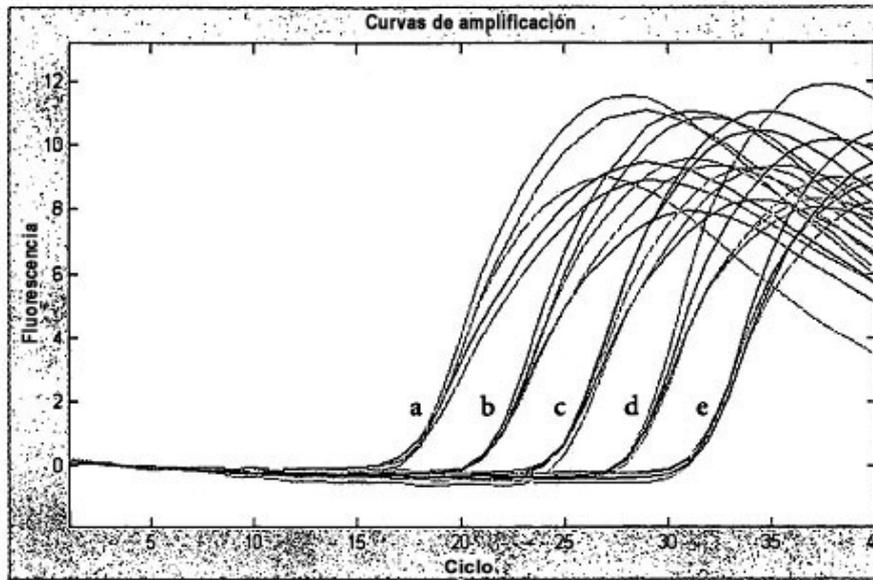


Fig. 7

