



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 328**

51 Int. Cl.:  
**G01N 1/40** (2006.01)  
**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08012571 .9**  
96 Fecha de presentación : **13.05.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1972919**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.09.2008**

54 Título: **Procedimiento y aparato para procesar muestras biológicas y químicas.**

30 Prioridad: **13.05.2003 US 469986 P**  
**13.05.2003 US 470021 P**  
**23.01.2004 US 538913 P**  
**01.03.2004 US 548922**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.11.2011**

73 Titular/es: **BECTON DICKINSON AND COMPANY**  
**One Becton Drive**  
**Franklin Lakes, New Jersey 07417-1880, US**

72 Inventor/es: **Chen, Xiaoxi y**  
**Shanler, Michael**

74 Agente: **De Elzaburu Márquez, Alberto**

**ES 2 367 328 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**

Procedimiento y aparato para procesar muestras biológicas y químicas.

**Campo de la invención**

Esta invención se refiere a procedimientos y aparatos para procesar muestras biológicas y químicas

**5 Antecedentes de la invención**

El depósito de muestras biológicas/químicas como pequeñas manchas de un sustrato sólido para posterior análisis o aplicación es una técnica útil en muchos campos, incluida la espectrometría y la tecnología de microhileras. En aplicaciones de microhileras, se depositan sobre un sustrato sólido pequeñas cantidades de muestras de soluciones muestra biológicas/químicas, tales como soluciones de anticuerpos, formando una hilera de manchas de alta densidad. Se inmovilizan los contenidos de las soluciones muestra, tales como anticuerpos, sobre la superficie del sustrato, dentro de una zona determinada por el tamaño de la mancha. La capacidad de depositar un gran número de diferentes muestras sobre la superficie en un formato de hilera de alta densidad es un fundamento para aplicaciones de las hileras. De hecho, el depósito como manchas de muestras biológicas/químicas sobre una placa muestra es una etapa clave de preparación de la muestra en aplicaciones de espectrometría de masas, incluidas MALDI (Ionización de Desorción con Láser Asistida con Matriz), SELDI (Desorción/Ionización de Superficie Intensificada con Láser) y DIOS (Desorción/Ionización sobre Silicio Poroso).

Existen técnicas convencionales para realizar análisis espectrométricos de masas de moléculas grandes, por ejemplo usando placas MALDI. Típicamente, con estas técnicas se introducen inicialmente soluciones líquidas (incluidas, por ejemplo, de péptido, proteína y matriz absorbente de energía) en sitios diana definidos en una placa espectrométrica de masas. Puesto que los diámetros de los sitios diana generalmente son pequeños y a menudo están densamente empaquetados, se disponen sobre los sitios diana de la placa pequeñas gotitas (por ejemplo, de 0,5-2 microlitros) de las soluciones líquidas para conseguir una colocación apropiada de la muestra y evitar el solapamiento de muestras entre los sitios diana. Una vez dispuestas, se evaporan las muestras líquidas, quedando el conglomerado de cristales de la matriz que contienen moléculas del analito (por ejemplo, péptidos y proteínas) sobre los sitios diana que tienen características favorables para análisis por espectrometría de masas. Cuando se desean muestras de conglomerado mayores, se ha usado la colocación y evaporación en serie de las muestras de líquido para construir iterativamente un conglomerado.

El documento WO 03/012392 describe un procedimiento para procesar muestras líquidas químicas y biológicas que se han de recoger en sitios de recogida en un dispositivo de dianas, que comprende el asegurar de forma fiable una placa soporte de dianas al dispositivo de dianas.

En el documento US 2002/0094533 se apilan placas para obtener una estructura compuesta y se describe un procedimiento en el que se usa la evaporación para la concentración de muestras líquidas.

Los documentos US 2002/0045270 y EP 1284495 describen una platina para preparación de MALDI-TOF, en la que las manchas muestra se secan en una placa.

Puesto que las placas espectrométricas de masas generalmente son planas, se han desarrollado varias técnicas para atraer y/o mantener las muestras líquidas en los sitios diana de la placa. Por ejemplo, se han formado placas MALDI con una máscara hidrófoba, (por ejemplo politetrafluoroetileno) sobre un sustrato hidrófilo estando expuestos los sitios diana. Además, se han formado placas MALDI con rasgos de ataque químico que delimitan pocillos que abarcan los sitios diana dentro de los cuales se mantienen las muestras químicas debido a la tensión superficial. Estos enfoques son todavía limitados por el pequeño volumen (5-10 microlitros) de las soluciones líquidas que se pueden situar sobre los sitios diana de la placa para conseguir una situación apropiada de la muestra y evitar el solapamiento de muestras entre los sitios diana.

Separadamente, se han conocido placas de filtro de multipocillos con una pequeña columna de cromatografía incorporada en el fondo de cada pocillo, a usar para la preparación de muestras en espectrometría de masas. Un ejemplo típico de una placa de filtro multipocillos se comercializa bajo el nombre comercial ZipPlate®. Usando el dispositivo ZipPlate, las muestras procesadas se hacen pasar a través de las columnas de cromatografía y se depositan directamente sobre una placa MALDI jussando un sistema de vacío. A causa de que las muestras procesadas que vienen de los pocillos necesariamente se desplazan al aire una distancia corta antes de llegar a la superficie de la placa MALDI, se requiere un diseño delicado para asegurar que las soluciones de las muestras que vienen de los pocillos vecinos no se contaminen mutuamente cuando se están depositando sobre la superficie de la placa. También, dado que un escape de aire en un pocillo puede dar por resultado una presión reducida de aire en otros pocillos, se requiere un diseño delicado para asegurar que la presión de aire aplicada sobre cada muestra sea coherente de pocillo a pocillo.

La técnica anterior descrita en lo que antecede adolece de inconvenientes, incluidos el de estar formada por plásticos rígidos (por ejemplo, poliestireno o polipropileno) y el de no tener la capacidad de acoplarse a la placa diana MALDI para posibilitar la centrifugación con ella.

### Sumario de la invención

- 5 La presente invención concierne a un procedimiento para procesar muestras químicas y biológicas según se define en la reivindicación 1.

### Breve descripción de los dibujos

- Las Figs. 1(a)-1(d) muestran varias configuraciones de columnas de una placa soporte de dianas;
- las Figs. 2 y 3 muestran un conjunto de placa soporte de dianas y un dispositivo de dianas;
- 10 las Figs. 4 y 5 muestran una placa soporte de dianas que tiene una sección en rebaje delimitada para acomodar un dispositivo de dianas;
- la Fig. 6 muestra una sección transversal de un conjunto de placa de soporte de diana/dispositivo de dianas, en el que se usa una fijación mecánica para asegurar de forma liberable el dispositivo de dianas a la placa soporte de dianas;
- 15 la Fig. 7 es una vista ampliada de la sección 7 de la Fig. 6;
- la Fig. 8 es una sección transversal parcial de un conjunto de placa soporte de dianas/dispositivo de dianas, en el que se usa adhesivo para asegurar de forma liberable el dispositivo de dianas a la placa soporte de dianas;
- la Fig.9 es una sección transversal parcial de un conjunto de placa soporte de dianas/dispositivo de dianas, en el que se usa adhesivo para asegurar de forma liberable el dispositivo de dianas a la placa soporte de dianas;
- 20 la Fig. 10 muestra una representación esquemática de un procedimiento usado para preparar un dispositivo de dianas para análisis, en el que el dispositivo de dianas es una placa espectrométrica de masas (por ejemplo, una placa MALDI);
- la Figura 11 muestra un conjunto de una placa soporte de dianas y un dispositivo de dianas, en el que la placa soporte de dianas incluye un filtro y un medio de filtración y el dispositivo de dianas es una placa multipocillo;
- 25 la Fig. 12 muestra un conjunto de una primera placa soporte de dianas, que tiene un filtro y un medio filtrante dispuesto en él, una placa soporte de dianas secundaria y un dispositivo de dianas en forma de una placa espectrométrica de masas (por ejemplo, una placa MALDI) asegurada de forma que se puede liberar a la placa soporte secundaria;
- la Fig. 13 muestra una representación esquemática de un procedimiento para preparar un dispositivo de dianas para análisis usando el conjunto de la Fig. 12, en el que el dispositivo de dianas es una placa espectrométrica de masas (por ejemplo una placa MALDI), y
- 30 la Fig. 14 muestra una variación del procedimiento de la Fig. 13, en el que la muestra para análisis puede purificarse.

### Descripción detallada de la invención

- 35 Se muestran y se describen varias configuraciones de una placa soporte de dianas. Ventajosamente, con la presente invención, un dispositivo de dianas (por ejemplo, una placa multipocillo, una placa de muestras para espectrometría de masas, una placa soporte de dianas secundaria) está asegurado de forma liberable a la placa soporte de dianas para preparar muestras químicas y biológicas. Las muestras se pueden pasar eficientemente a un dispositivo de dianas habiendo sido filtradas o procesadas, y se pueden pasar sin que se requiera el uso de pipeta, u otro medio, con lo que se minimiza la contaminación por cruce.
- 40 Más específicamente, y con referencia a las Figs. 1(a)-1(d), se muestran varias configuraciones de una placa soporte 10 de diana que tienen un cuerpo 12 con las superficies de arriba 14 y del fondo 16 y una pluralidad de paredes laterales 18. Entre las superficies 14 y 16 de arriba y del fondo respectivamente y a través de ellas se extienden una o varias columnas 20. Consecuentemente, cada una de las columnas 20 incluye un extremo abierto superior 22 que se extiende a la superficie de arriba 14, y un extremo abierto inferior 24 que se extiende a la superficie 16 del fondo.
- 45 Como se aprecia fácilmente, las columnas 20 definen pasos completamente a través del cuerpo 12. El cuerpo 12 se puede hacer de cualquier material convencional usado para formar placas multipocillos, tal como polipropileno o poliestireno, a no ser que se describa lo contrario. Preferiblemente, al menos una parte de la superficie 16 del fondo es plana. La superficie 16 del fondo, que tiene los extremos abiertos 24 del fondo formados en ella, debe

configurarse para proporcionar un área superficial suficiente para cierre y prevención de la contaminación cruzada, como se describe más adelante (esto es, se ha de proporcionar un área superficial suficiente a intervalos entre los extremos abiertos 24 del fondo).

5 Se puede utilizar un número cualquiera de columnas 20. Además, las columnas 20 se puede ordenar en una configuración cualquiera en el cuerpo 12, incluida la de las conocidas hileras comúnmente usada con placas multipocillos (por ejemplo, hileras de 96 columnas (12 x 8), 384 columnas (16 x 24), 1.536 columnas (32 x 48) u otros múltiplos de 12).

10 Cada una de las columnas 20 incluye una pared lateral 26 de columna que puede estar formada con varias configuraciones geométricas. Por ejemplo, como se muestra en la Fig. 1(a), las paredes laterales 26 de columna generalmente pueden ser cilíndricas. Alternativamente, como se representa en la Fig. 1(b), las paredes laterales 26 de columna pueden ser troncocónicas. Preferiblemente cuando se usa una configuración troncocónica, las columnas 20 están formadas de manera que converjan hacia la superficie del fondo 16. Además, las paredes laterales 26 de las columnas pueden estar conformadas con configuraciones geométricas combinadas tales como las de la Fig. 1(c), en las que la pared lateral 26 de columna incluye una primera porción lateral de columna 26a que es cilíndrica y una segunda porción lateral de columna 26b que es troncocónica. También pueden ser cilíndricas ambas porciones primera y segunda de pared lateral de columna, 26a y 26b, pero de diámetros diferentes, tal como se representa en la Fig. 1(d), en la que en la intersección de las dos porciones de pared lateral 26a y 26b hay una superficie intermedia anular 26c. La superficie intermedia 26c puede proporcionar una superficie soporte a un vidrioado o filtro que, a su vez, puede ser soporte de un medio filtrante, según de describe más adelante.

20 Dependiendo del uso de la placa soporte de dianas 10, las paredes laterales de columna 26 pueden ser tratadas para intensificar el comportamiento en la preparación de muestras, por ejemplo, intensificando la sensibilidad de detección en la preparación de muestras para espectrometría de masas. Las paredes laterales de columna 26 se pueden modificar para proporcionar reactividad o afinidad para ciertas muestras biológicas/químicas. En otro ejemplo, las paredes laterales 26 se pueden modificar para minimizar la unión no específica de varias sustancias biológicas/químicas tales como proteínas/péptidos. Este enfoque puede coadyuvar a evitar la pérdida de muestra a las paredes laterales de columna 26. En otro ejemplo más, las paredes laterales de columna 26 se pueden modificar para unir específicamente una clase de sustancias biológicas/químicas tal como una clase particular de proteínas/péptidos/nucleótidos o una especie de moléculas pequeñas. Este enfoque es útil cuando se desea la eliminación total o parcial de una clase de sustancias biológicas/químicas de una mezcla muestra del líquido original.

25 En aplicaciones de espectrometría de masas, por ejemplo, MALDI, este enfoque será útil cuando la eliminación parcial de algunos componentes haga disminuir el fondo de la espectrometría de masas y aumentar la sensibilidad de detección de otros componentes.

30 En cuanto a las Figs. 2 y 3, se puede proporcionar un conjunto 28 de la placa soporte de dianas 10 y un dispositivo de dianas 30. La placa soporte de dianas 10 está conformada para fijarla de manera liberable al dispositivo de dianas 30. El dispositivo de dianas 30 puede ser cualquier dispositivo para recoger muestras, incluida una placa de multipocillos, una placa espectrométrica o una placa soporte de dianas secundaria.

35 El dispositivo de dianas 30 incluye una superficie superior 32 enfrentada a la superficie de fondo 16 de la placa soporte de dianas 10 estando montado el conjunto 28. Para proporcionar un área de cierre suficiente, se prefiere que al menos una parte de la superficie superior 32 tenga forma plana. En una primera variación de la presente invención, al menos la superficie de fondo 16 de la placa soporte 10 esté hecha de un material elastómero que se pueda asegurar de forma liberable a la superficie superior 32 del dispositivo de dianas 30. Se prefiere que el material elastómero incluya un polímero de silicona y, más preferiblemente, incluya poli(dimetil)siloxano (PDMS). También se puede dopar con otros polímeros para ajustar particularmente sus propiedades físicas. Con un material elastómero, las interacciones de van der Waals entre las moléculas de la superficie de la placa soporte de dianas 10 y el dispositivo de dianas 30 proporcionan un fijación liberable. La placa soporte de dianas 10 se puede asegurar presionándola sobre el dispositivo de dianas 30 y eliminar de él por peladura. Se prefiere además que el cuerpo 12 de la placa soporte de dianas 10 esté hecho totalmente del material elastómero, más preferiblemente que sea totalmente de PDMS. La naturaleza elastómera e hidrófoba del PDMS permite que se forme una unión íntima entre la placa soporte de dianas 10 y el dispositivo de dianas 30. Estando formada sólo parcialmente la placa soporte de dianas 10 por el material elastómero, las porciones restantes pueden hacerse de plástico rígido u otros materiales que impartan características favorables a las paredes laterales de columnas 26.

40 El dispositivo de dianas 30 incluye uno o varios sitios de recogida 34 para coleccionar muestras biológicas y químicas que se han de procesar según se describe más adelante. Los sitios de recogida 34 pueden ser pocillos individuales de una placa multipocillos, sitios diana de una placa espectrométrica de masas o columnas de una placa soporte de dianas secundaria. Se prefiere que las columnas 20 estén presentes en cuantía y colocación tales que se correspondan preferiblemente con los sitios de recogida 34 en una relación de 1 a 1, aunque no se requiere esta correspondencia. También se prefiere que los extremos de fondo 24 de cada una de las columnas delimiten un

diámetro D1 que es igual o mayor que el tamaño D2 de los sitios de recogida 34. De esta manera, las muestras líquidas dispuestas dentro de las columnas 20 cubrirán la totalidad de los respectivos sitios de recogida 34. Cuando se desee, el tamaño del diámetro D1 se puede hacer menor que el tamaño de D2.

5 La placa soporte de dianas 10 se puede hacer de varios tamaños y configuraciones. Para que se pueda usar la placa soporte de dianas 10 con máquinas comunes de recogida y colocación y con equipos de placas multipocillos estándar, la placa soporte de dianas 10 se puede formar con la misma huella que una placa multipocillos común (por ejemplo, la especificada en las normas de la Society for Biomolecular Screening (normas SBS-1 a SBS-5). Además, como se muestra en las Figs. 4 y 5, la placa soporte de dianas 10 puede hacerse más grande que el dispositivo de dianas 30. La superficie de fondo 16 puede estar rebajada, como se ve en la Fig. 5, con una parte en rebaje 36 delimitada en la que se puede acomodar totalmente el dispositivo de dianas 30 sin que sobresalga de la huella del cuerpo 12.

15 Además de basarse en un cierre elastómero para lograr un fijación liberable entre la placa soporte de dianas 10 y el dispositivo de dianas 30, se pueden utilizar otras configuraciones de fijación liberable. En cuanto a las Figs. 6 y 7, se da cuenta de una fijación mecánica en la que se puede proporcionar un miembro 38 de cierre mecánico que sobresale de la superficie de fondo 16 para unirse al menos parcialmente al dispositivo de dianas 30. El miembro de cierre 38 incluye un miembro de soporte 40 superior y un miembro transversal 42. El miembro de soporte 40 superior y el miembro transversal 42 están formados de manera que una parte del dispositivo de dianas 30 está interpuesta entre la superficie de acoplamiento 44, delimitada por el miembro transversal 42 y la superficie de fondo 16. El miembro transversal 42 también puede incluir un miembro 46 que sobresale y se extiende hacia atrás. El dispositivo de dianas 30 puede estar "prendido" como fijación liberable con el miembro de cierre 38, desviándose y volviendo a la posición representada en las Figs. 6 y 7. La separación del dispositivo de dianas se puede lograr desplazando hacia atrás el dispositivo que sobresale 46, lo que da por resultado la aplicación de un momento flector sobre el miembro soporte superior 40, la deflexión del miembro de cierre 38 y la separación de la superficie de acoplamiento 44 del dispositivo de dianas 30. Como se puede apreciar, la cuantía de la fuerza de mantenimiento aplicada al dispositivo de dianas 30, así como la dificultad de fijar y liberar el dispositivo de dianas 30 serán función de la resistencia del miembro de cierre 38 y la cuantía con la que el miembro de cierre 38 fija el dispositivo de dianas 30.

25 Como se muestra en la Fig. 8, se puede usar un adhesivo 48 para fijar de forma liberable el dispositivo de dianas 30 a la placa soporte de dianas 10. Se puede usar cualquier adhesivo que permita la liberación de la placa soporte de dianas 10 y que, sin embargo, proporcione una fuerza de unión de la placa soporte de dianas 10 que permita la preparación de los sitios de recogida 34.

30 Como se representa en la Fig. 9, entre el dispositivo de dianas 30 y la placa soporte 10 de diana se puede interponer una junta elastómera 50 para lograr entre ambos una fijación razonable. De la misma manera que la descrita antes con el cuerpo 12 de la placa soporte de dianas 10, que está hecha de un material elastómero, la junta elastómera 50 proporciona una adherencia razonable. Esta adherencia se puede lograr por interacciones de van der Waals. Preferiblemente, el material elastómero de la junta 50 incluye un polímero de silicio y, más preferiblemente, incluye poli(dimetil)siloxano (PDMS). Este material elastómero también puede ser dopado con otros polímeros para ajustar sus propiedades físicas. Se prefiere además que la junta elastómera 50 esté totalmente formada por PDMS. Si se requiere, para exponer los sitios de recogida 34 previstos, en la junta 50 se formarán unas aberturas 52. Se prefiere que cada una de las aberturas 52 tenga un diámetro mayor que o igual al de los correspondientes extremos abiertos 24 del fondo.

35 Los expertos en la técnica apreciarán que, independientemente de la manera en que se consigue una fijación razonable, se desea tener una hermeticidad por cierre suficiente entre la placa soporte de dianas 10 y el dispositivo de dianas 30 para evitar la contaminación por cruce de cualesquier muestras líquidas contenidas en las columnas 20. El cierre debe ser al menos hermético a fluidos. Además, debe tenerse en cuenta el nivel de resistencia de la fijación liberable a la vista de cualesquier etapas de procesamiento a las que haya que someter el conjunto 28. Generalmente, el cierre mediante adhesivos y elastómeros proporciona una fuerza de mantenimiento menor que una fijación mecánica y puede usarse con muestras de líquidos de volumen menor y/o dispositivos de diana ligeros; mientras que se puede usar una fijación mecánica con muestras de líquido mayores y/o dispositivos de diana más pesados. Esto es particularmente cierto cuando está previsto centrifugar el conjunto 28 o transportarlo manteniendo una fijación razonable. Por otra parte, el dispositivo de dianas 30 debe ser separado sin ser dañado. Las diversas formas de fijación liberable se pueden usar en combinaciones variables (por ejemplo, se pueden usar adhesivos en combinación con fijación mecánica).

40 En cuanto a la Fig. 10, se representa un ejemplo de procedimiento para preparar para análisis una muestra química o biológica. En particular, se prepara el conjunto 28, en el que la placa soporte de dianas 10 se fija de forma liberable al dispositivo de dianas 30 usando cualquiera de las técnicas antes mencionadas. Como se muestra en la Fig. 10, el dispositivo de dianas 30 puede ser una placa espectrométrica tal como una placa MALDI, una placa SELDI o una placa DIOS. Una vez que se ha preparado el conjunto 28, se disponen en las columnas 20 muestras líquidas 54 (que

pueden contener una matriz que absorbe energía tal como ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico, ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico o ácido 2,5-dihidroxibenzoico). Las columnas 20 delimitan pocillos colectores de fluido colectivamente con el dispositivo de dianas 30, en particular con los sitios de recogida 34 que están acoplados con las columnas 20. Las muestras 54 se evaporan como puede ser evaporación en banco o centrifugación evaporativa.

5 Después de que se ha evaporado el líquido de las muestras 54, se dejan los conglomerados 56 en los sitios de recogida 34 para posterior análisis. El dispositivo de dianas 30 se libera de la placa soporte de dianas 10 para posibilitar cualquier análisis posterior.

10 Para la preparación para la cromatografía de masas, las paredes laterales 26 de las columnas se pueden prerrevestir con moléculas de matriz y/o con patrones de espectrometría de masas que se ponen nuevamente en suspensión después de añadir las muestras líquidas 54. La matriz y/o los patrones se encontrarán en los conglomerados 56 después de la evaporación.

15 Ventajosamente, la presente invención permite usar en la preparación de muestras para análisis de espectrometría volúmenes de muestra líquida mucho mayores que los métodos de la técnica anterior. Los volúmenes de la muestra de las muestras líquidas 54 pueden estar en el intervalo de 100 a 200 microlitros, en comparación con los 1-5 microlitros usados en la técnica anterior. Como consecuencia, se puede conseguir una concentración mucho mayor de material en el conglomerado 56 que con la técnica anterior. En particular, con referencia al principio de equilibrio de masas, el producto de una primera concentración (C1) y un primer volumen (V1) de una muestra líquida es igual al producto de una segunda concentración (C2) y un segundo volumen (V2) de la misma muestra líquida. Las muestras líquidas 54 tienen, cada una de ellas, una concentración inicial C1 y un volumen inicial V1. A causa de la evaporación, el volumen resultante V2 de las muestras líquidas 54 se reduce mucho en comparación con el volumen inicial V1. Consecuentemente, la concentración C2 resultante del volumen resultante V2 es mayor que la concentración inicial C1 debido a la reducción de volumen. Aunque la presente invención es particularmente adecuada para uso con una placa MALDI, con la presente invención se pueden utilizar otras placas de diana, incluidas las no previstas para espectrometría de masas, tales como un portaobjetos de vidrio para la preparación de muestras múltiples aisladas.

25 En cuanto a la Fig. 11, el conjunto 28 se puede usar también para filtración de muestras líquidas. El conjunto 28 se prepara de cualquier manera descrita antes. La Fig. 11 muestra el dispositivo de dianas 30 como una placa multipocillos. En ella, al menos una parte de las columnas 20 de la placa soporte de dianas 10 están provistas de un vidriado o filtro 58 con un medio filtrante 60, tal como un medio de cromatografía (por ejemplo, el medio C18) que está dispuesto opcionalmente encima del filtro 58, como es conocido en la técnica. El medio filtrante 60 puede ser capaz de retener una clase particular de sustancias biológicas/químicas (por ejemplo, proteínas/péptidos/nucleótidos) o una especie de moléculas pequeñas que tienen una cierta propiedad física o química. Opcionalmente, las paredes laterales de columna 26 pueden modificarse uniendo ligandos a ellas para facilitar la filtración. Las muestras líquidas 54 que se han de filtrar se ponen en las columnas 20, y se centrifugan posteriormente, lo que hace que las muestras 54 sean forzadas a pasar por el medio de filtración 60 y el filtro 58 para coleccionarlas en los sitios de recogida 34 del dispositivo de dianas 30. Luego se puede transferir la solución filtrada 68 para posterior análisis. La filtración puede desearse para eliminar algunos componentes con el fin de disminuir el fondo de la espectrometría de masas y aumentar la sensibilidad para detectar otros componentes. Por ejemplo, corrientemente se desala una muestra líquida para el procedimiento MALDI. Análogamente, puede desearse el empobrecimiento de proteínas abundantes (por ejemplo, albúmina e inmunoglobulina) en plasma humano y suero humano para aumentar la sensibilidad de detección de proteínas poco abundantes.

35 En cuanto a la Fig. 12, se puede preparar del conjunto 28 de manera que la placa soporte de dianas 10 se fije de forma liberable a una placa soporte de dianas 62 secundaria que, a su vez, está fijada de forma liberable al dispositivo de dianas 30, tal como una placa espectrométrica de masas. Como lo apreciarán los expertos en la técnica, aunque no se contempla que al formar el conjunto 28 se hayan de usar más de dos placas soporte de diana 10 y 62, es posible que haya un conjunto así. Con el conjunto de la Fig.12, la placa soporte de dianas 10 puede estar provista del filtro 58 y el medio filtrante 60 como se ha descrito antes. Opcionalmente, la placa soporte de dianas 10 puede tener unas columnas de salida 64 para canalizar el líquido filtrado a los sitios de recogida 66 de la placa soporte de dianas 62 secundaria. Los sitios secundarios de recogida 66 delimitan colectivamente pocillos colectores de fluido con el dispositivo de dianas 30.

45 Como se muestra en la Fig. 13, el conjunto de la Fig. 12 se puede usar para preparar muestras químicas o biológicas para análisis, pudiendo filtrarse inicialmente muestras líquidas 54 bajo centrifugación y recogerlas en los sitios secundarios de recogida 66 de la placa soporte de dianas secundaria 62. Posteriormente se puede separar la placa soporte de dianas 10 de la placa soporte de dianas secundaria 62. El líquido filtrado secundario 68 recogido en los sitios secundarios de recogida 66 se puede evaporar luego formando los conglomerados 56 en los sitios de recogida 34 del dispositivo de dianas 30 para posibilitar el análisis de los conglomerados 56.

50 En cuanto a la Fig. 14, y como variación del procedimiento de la Fig. 13, usando la presente invención se puede

realizar un procedimiento de purificación. Inicialmente, la placa soporte de dianas 10 se fija de forma liberable a una placa 70 de multipocillos formando un conjunto inicial 72 de filtración de acuerdo con cualquiera de las maneras descritas en lo anterior. Las muestras líquidas 54 se filtran bajo centrifugación a través del medio filtrante 60 para forzar el líquido de desecho 68 a los sitios de recogida 74 de la placa 70 de multipocillos. Sin embargo, el material de interés es retenido en el medio filtrante 60. Se puede hacer fluir a través del medio filtrante 60 soluciones tampón de lavado (no representadas) para disociar y eliminar por lavado componentes unidos no específicamente en el medio filtrante 60. Después del lavado, la placa soporte de dianas 60 es separada de la placa multipocillos 70 y es unida a la placa soporte de dianas secundaria 62 formando el conjunto de la Fig. 12. Luego se hacen fluir tampones de elución 76 (por ejemplo, disolventes orgánicos tales como acetonitrilo o metanol) a través del medio filtrante bajo centrifugación. El material de interés unido en el medio filtrante 60 se eluye a los sitios de recogida secundarios 66 de la placa soporte de dianas secundaria 62. Luego se separa la placa soporte de dianas 10 de la placa soporte de dianas secundaria 62. Se deja que se evapore el líquido eluido 78 recogido en la placa soporte de dianas secundaria 62, quedando conglomerados 56 colectados en los sitios de recogida 34 del dispositivo de dianas 30. Para posibilitar el análisis, la placa soporte de dianas secundaria 62 se separa del dispositivo de dianas 30.

Este procedimiento es útil cuando se desea el depósito de una muestra purificada. Por ejemplo, las resinas de fase inversa, tales como C18, pueden usarse para purificar muestras de proteína/péptido antes de su depósito como los conglomerados 56. También se pueden usar como medio filtrante 60 otras matrices de afinidad, tales como matrices de cromatografía de afinidad inmovilizadas de ion metálico (IMAC) para péptidos fosforilados/proteínas o péptidos/proteínas poli(histidina) condensadas, matrices de afinidad de biotina para péptidos/proteínas biotiniladas y matrices de cromatografía de intercambio tiol-disulfuro para péptidos/proteínas condensadas con glutatona-5-transferasa (GST).

Como reconocerán los expertos en la técnica, sobre la superficie superior 14 de la placa soporte de dianas 10 se pueden disponer cierres impermeables a líquidos de manera que la placa soporte de dianas 10, con el dispositivo de dianas 30 a la que soporta, se pueda usar para almacenamiento y/o a fines de ensayo. También se pueden preparar partes de la placa soporte de dianas 10 para captura por afinidad o agotamiento (mediante revestimiento, una membrana o una preparación de la resina constitutiva con agentes adecuados). También se pueden depositar ligandos y/o proteínas en la placa soporte de dianas 10 antes de la introducción de las muestras líquidas 54.

La presente invención tiene varias ventajas sobre la técnica anterior. Por ejemplo, en los sitios de recogida se pueden proporcionar muestras líquidas mayores que, cuando se evaporan, proporcionan depósitos de masas mayores para análisis. También, ciertos disolventes orgánicos (por ejemplo acetona) que han sido difíciles de usar con dispositivos de la técnica anterior debido a que es difícil contenerlos, se pueden utilizar con la presente invención y contenerlos dentro de las columnas de la capa soporte de dianas sin escapes. Además, los extremos abiertos del fondo de la placa soporte se pueden usar para definir el tamaño de los conglomerados resultantes, con lo que se evitan formaciones inconsistentes de tamaño inapropiado.

En la presente invención se pueden hacer diversos cambios y modificaciones. Se considera que todos estos cambios y modificaciones están comprendidos en el alcance de la invención según se establece en las reivindicaciones siguientes.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para procesar muestras químicas y biológicas (54) que se han de coleccionar en sitios de recogida (34) en un dispositivo de dianas (30), procedimiento que comprende:
- 5 fijar de forma liberable una placa soporte de dianas (10) a un dispositivo de dianas (30) poniendo en contacto a presión una porción elastómera de la mencionada placa soporte de dianas (10) con el dispositivo de dianas (30) o interponiendo una junta elastómera (50) entre la mencionada placa soporte de dianas (10) y el dispositivo de dianas (30), teniendo la mencionada placa soporte de dianas (10) superficies superior y de fondo (14, 16) distanciadas, una pluralidad de columnas (20) que se extienden entre y a través de las mencionadas superficies superior y de fondo (14, 16), en el que la mencionada placa soporte de dianas (10) está fijada de forma liberable al dispositivo de dianas (30) de manera que las mencionadas columnas (20) se acoplan al menos parcialmente con los sitios de recogida (34) del dispositivo de dianas (30);
- 10 depositar las muestras líquidas (54) en al menos una porción de las mencionadas columnas (20);
- liberar el dispositivo de dianas (30) de la placa soporte de dianas (10) con los mencionados conglomerados (56) en los sitios de recogida (34), caracterizado por
- 15 evaporar centrifugando la muestras líquidas depositadas (54) de manera que se formen conglomerados (56) en los sitios de recogida (34).
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la fijación liberable incluye adherir la mencionada placa soporte de dianas (10) al dispositivo de dianas (30) con adhesivo (48).
3. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el dispositivo de dianas es una placa multipocillos, preferiblemente una placa espectrométrica de masas.
- 20 4. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el dispositivo de dianas (30) es una placa soporte de dianas secundaria que tiene las superficies superior y de fondo distanciadas, una pluralidad de columnas que se extienden entre y a través de las mencionadas superficies superior y de fondo, definiendo las mencionadas columnas de la mencionada placa soporte de dianas secundaria los sitios de recogida (34).
- 25 5. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la fijación de forma liberable incluye delimitar al menos cierres impermeables a fluidos entre la mencionada placa soporte de dianas (10) y el dispositivo de dianas (30) en posiciones entre los sitios de recogida (34) de manera que se evite la contaminación por cruce en los sitios de recogida (34).
- 30 6. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la mencionada placa soporte de dianas (10) está formada totalmente de un material elastómero.
7. Un procedimiento según las reivindicación es 1 o 6, en el que el mencionado material elastómero incluye un polímero de silicona, preferiblemente poli(dimetil)siloxano.
- 35 8. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que al menos una porción de cada una de las mencionadas columnas (20) tiene forma cilíndrica, con una forma troncocónica, convergente hacia la mencionada superficie del fondo (16), y/o con secciones transversales no constantes.
9. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la mencionada superficie del fondo (16) de la mencionada placa soporte de dianas (10) está rebajada.
- 40 10. Un procedimiento según la reivindicación 9, en el que la mencionada superficie del fondo (16) delimita una sección rebajada situada dentro de la mencionada placa soporte de dianas (10), sección rebajada (36) que está conformada para acomodar el mencionado dispositivo de dianas (30) dentro de la base de la mencionada placa soporte de dianas (10).
- 45 11. Un procedimiento según la reivindicación 3, en el que la mencionada espectrometría de masas es para una finalidad seleccionada entre el grupo constituido por espectrometría de masas MALDI (ionización por desorción con láser asistida por matriz), espectrometría de masas SELDI (ionización/desorción con láser intensificada en la superficie) y espectrometría de masas DIOS (desorción/ionización sobre silicio poroso).
- 50 12. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que al menos una porción de las mencionadas columnas (20) está provista de un filtro (58), con un medio filtrante (60), está modificada químicamente, está modificada para proporcionar reactividad para ciertas moléculas biológicas/químicas, está modificada por unión a ella de entidades biológicas/médicas, está modificada para minimizar la unión específica de varias sustancias biológicas/químicas y/o está modificada para unir específicamente una clase de sustancias biológicas/químicas.



FIG. 1a

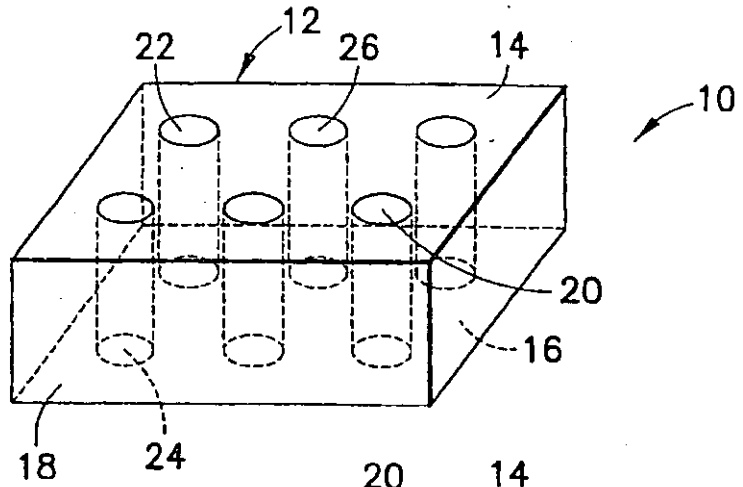


FIG. 1b

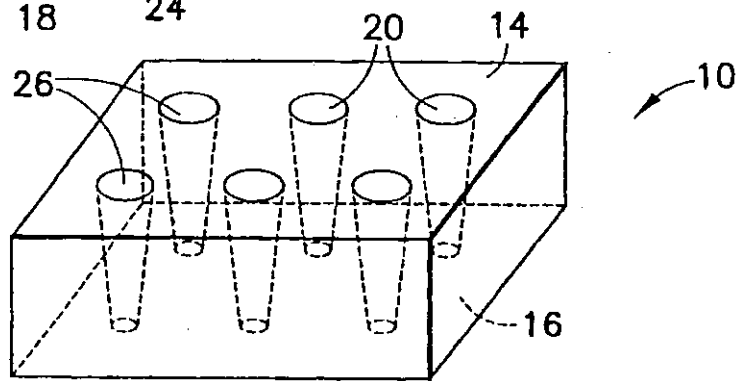


FIG. 1c

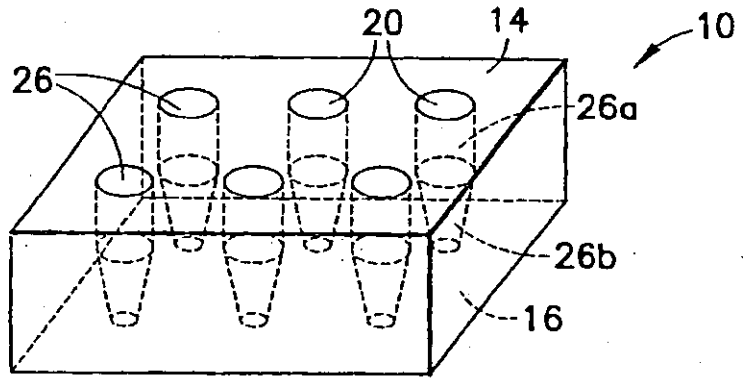
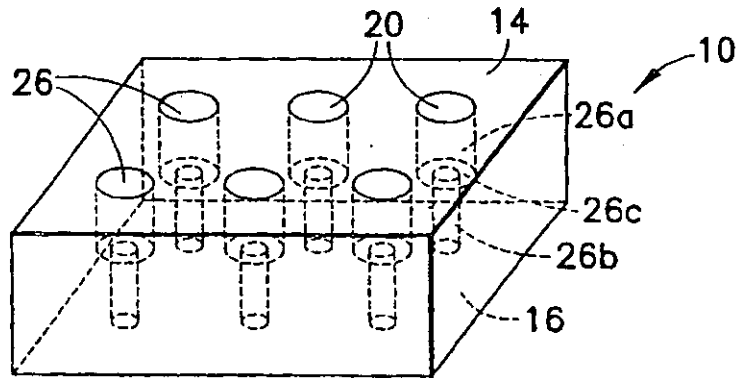


FIG. 1d



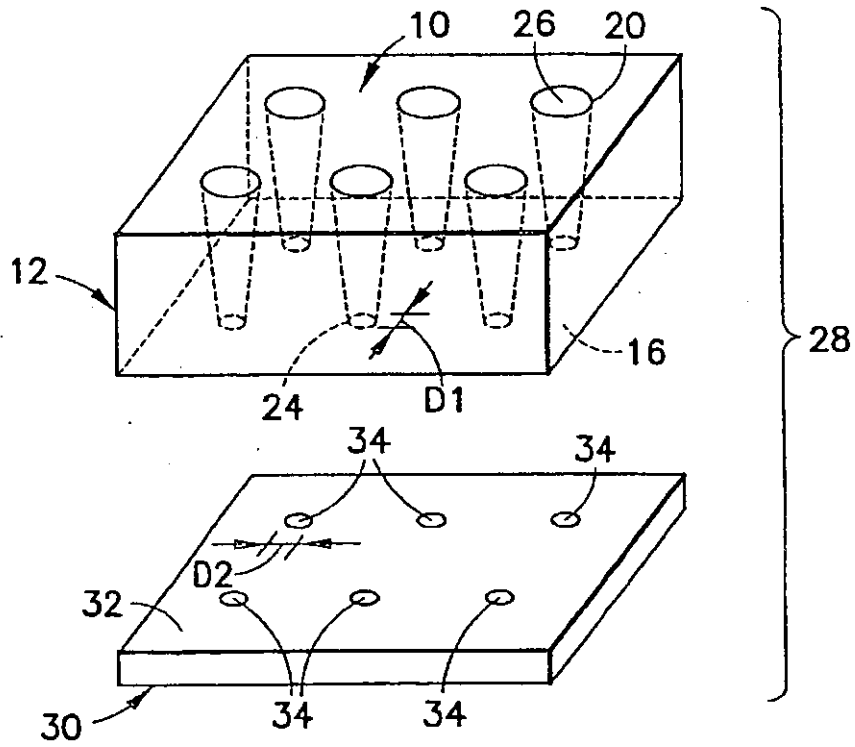


FIG. 2

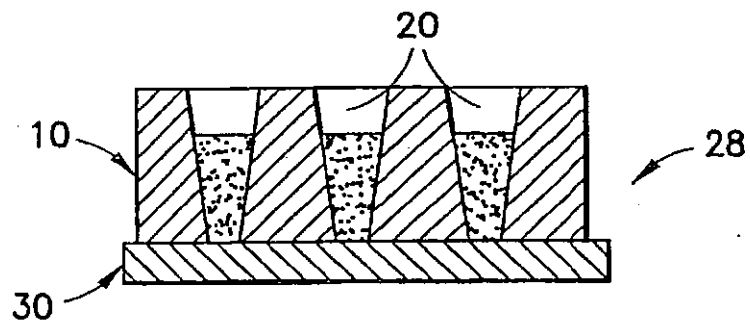


FIG. 3

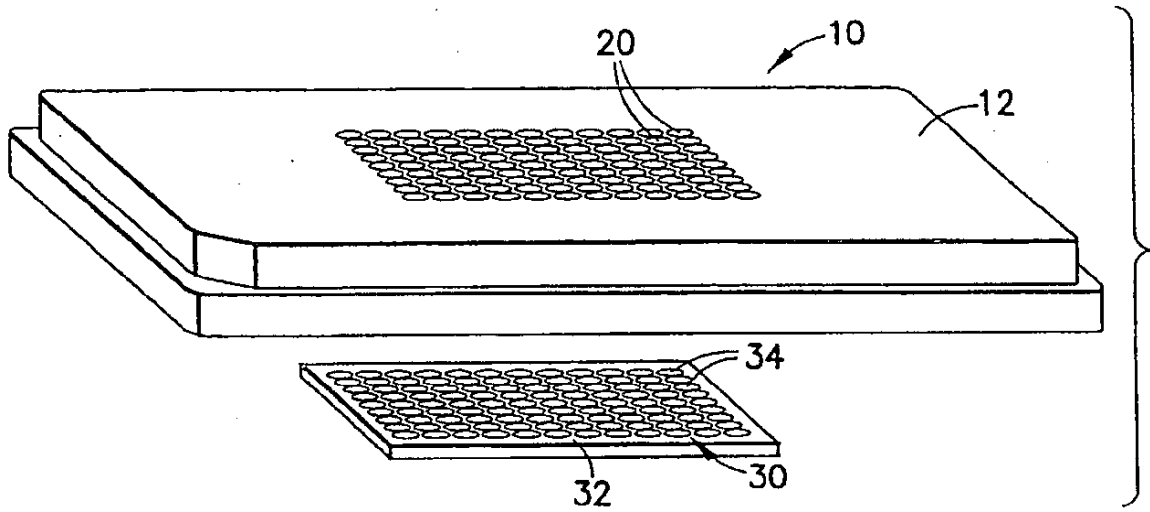


FIG. 4

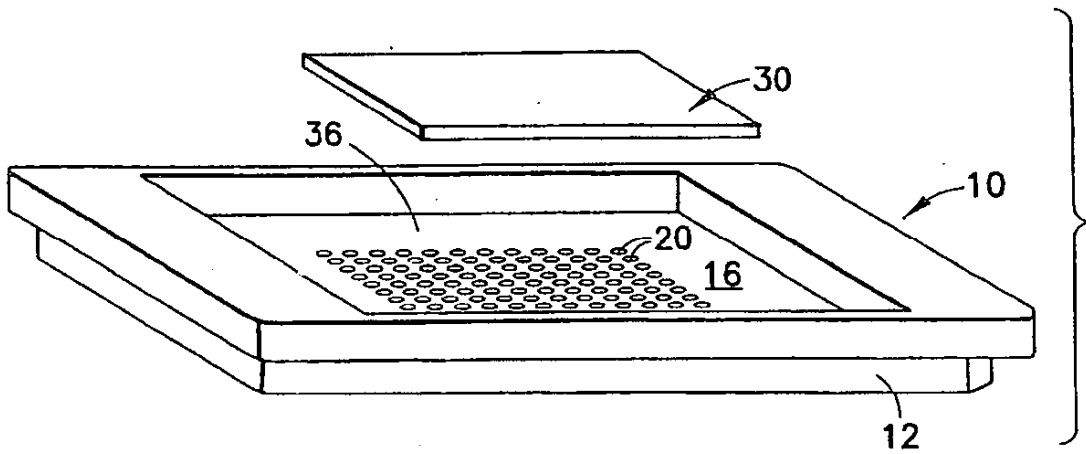


FIG. 5

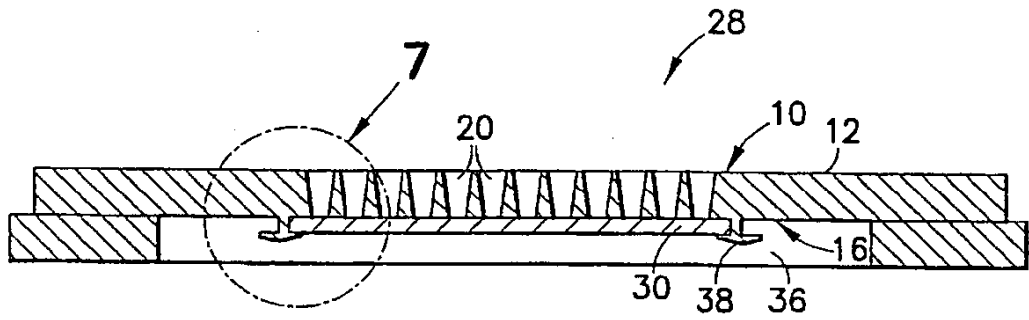


FIG. 6

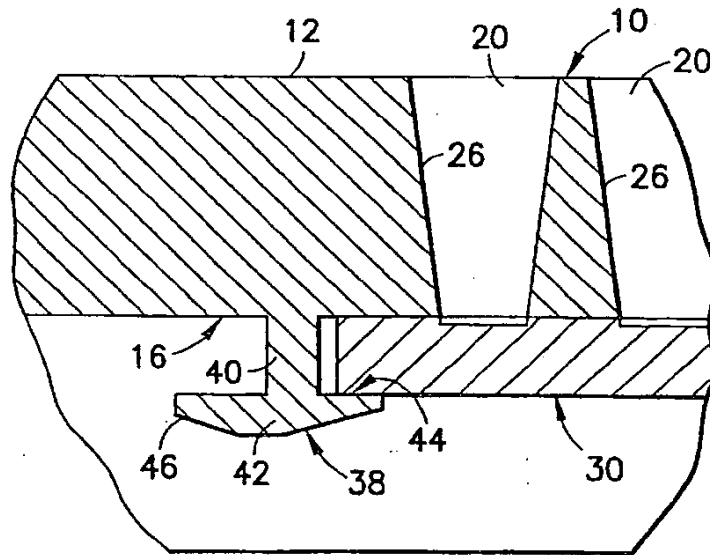


FIG. 7

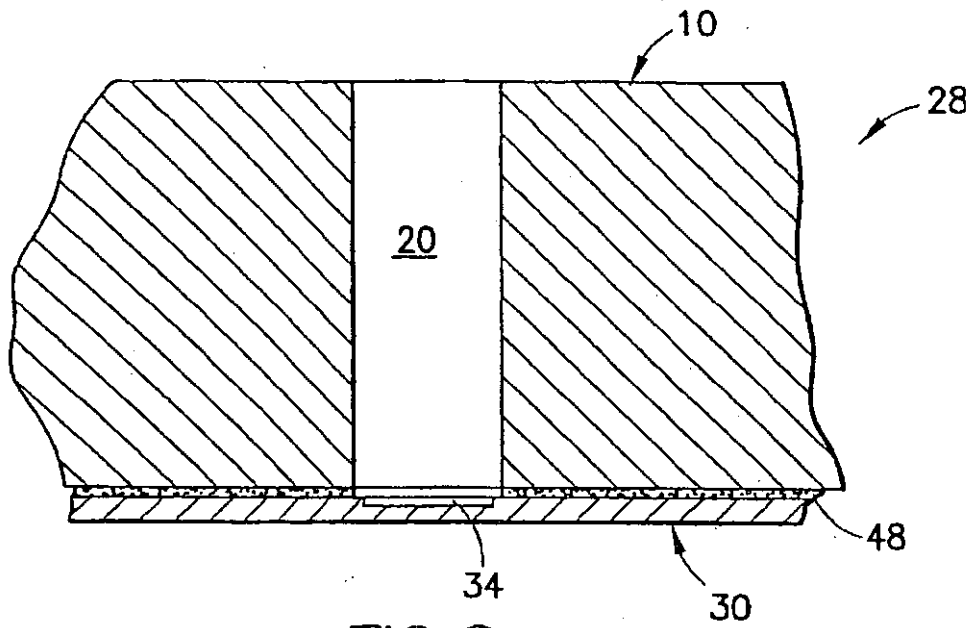


FIG.8

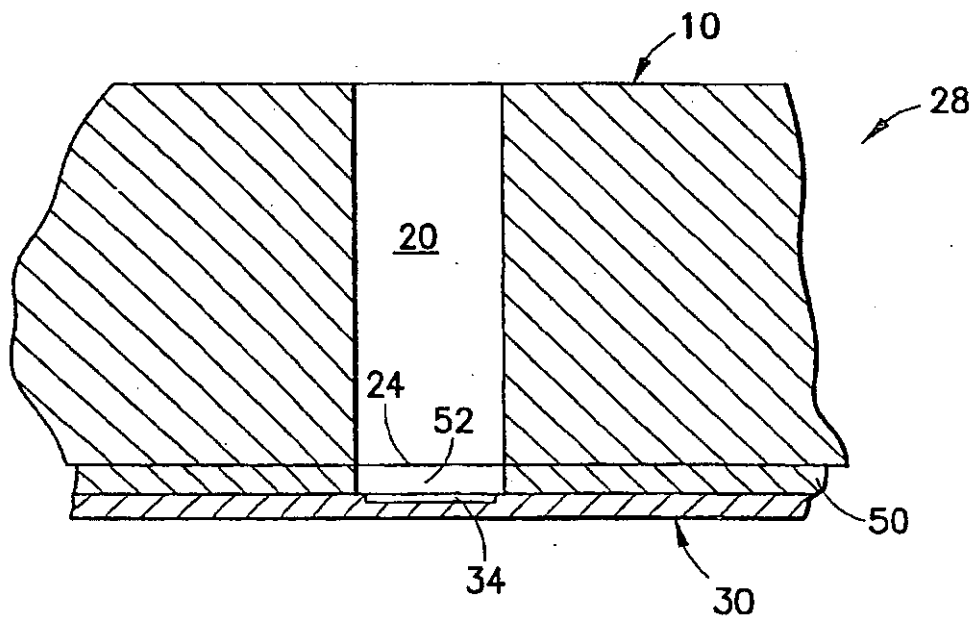


FIG.9

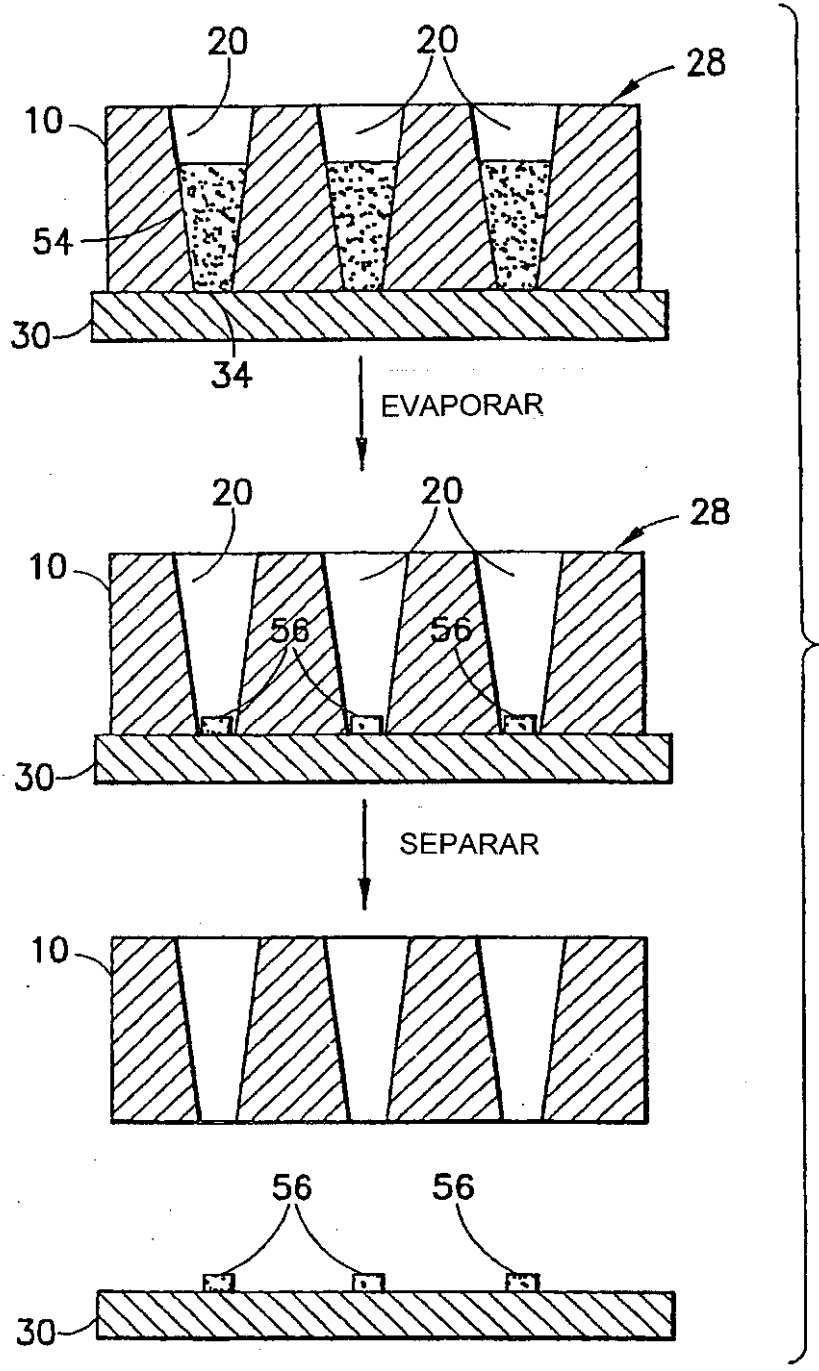


FIG.10

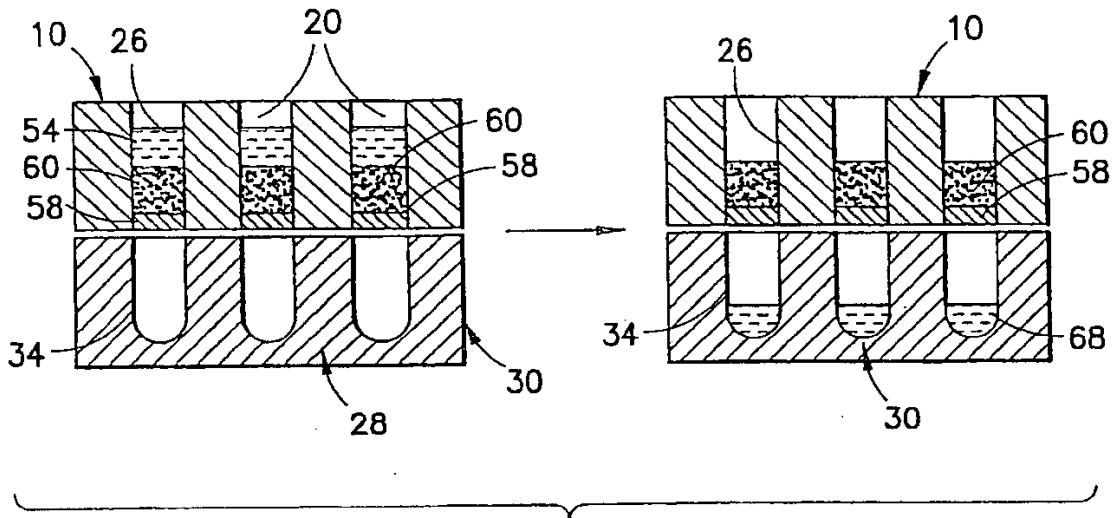


FIG. 11

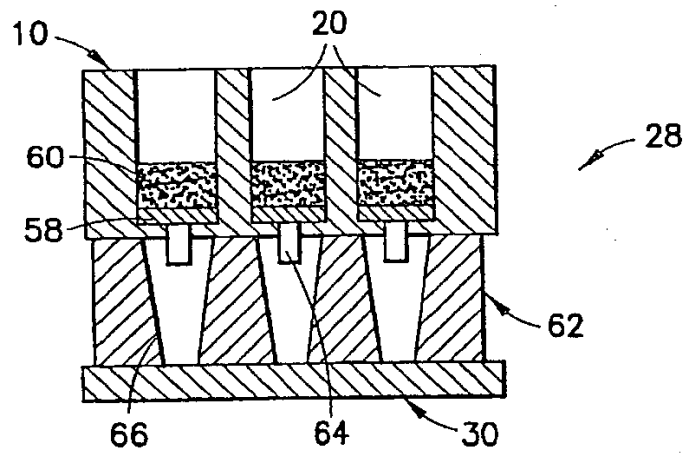


FIG. 12

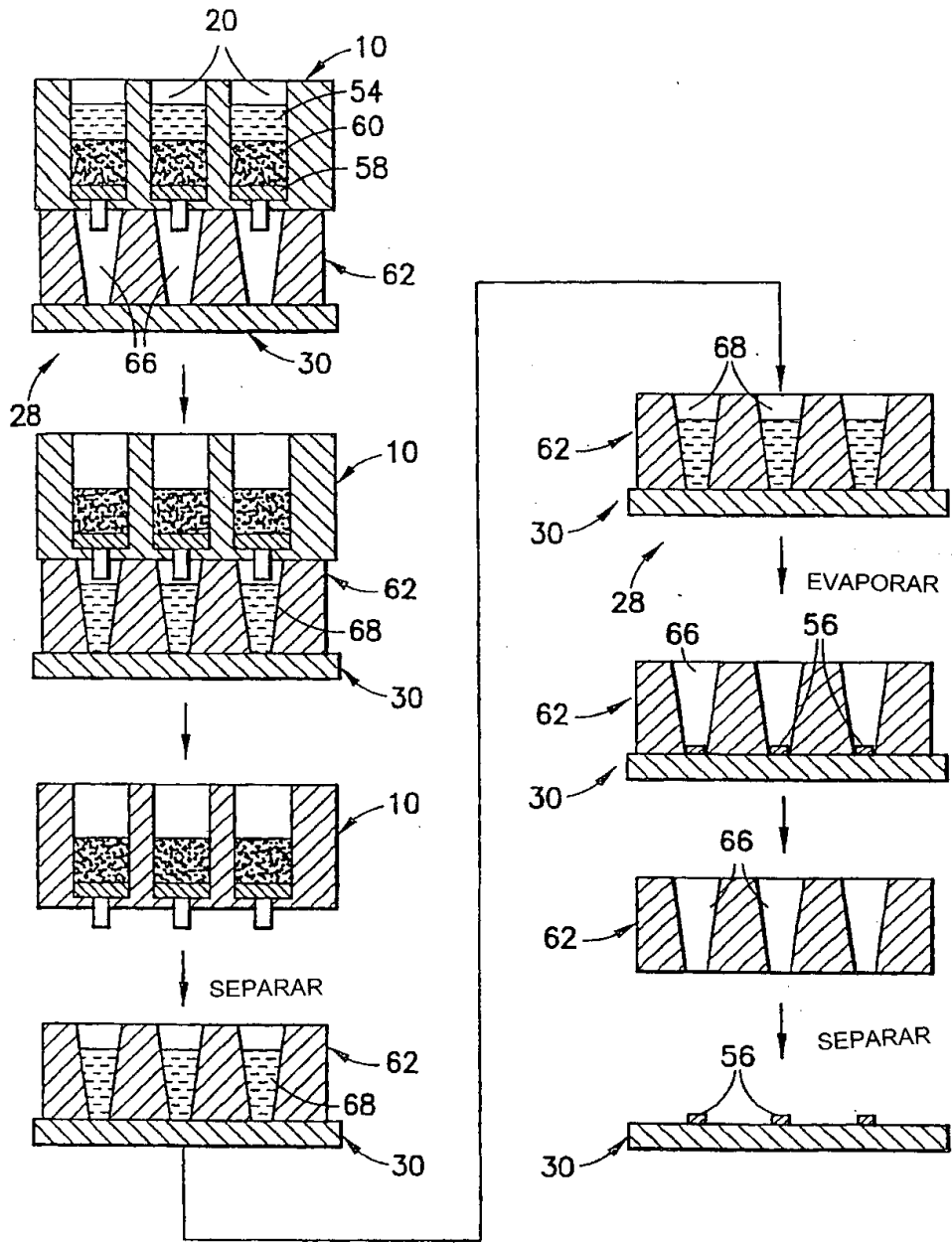


FIG.13



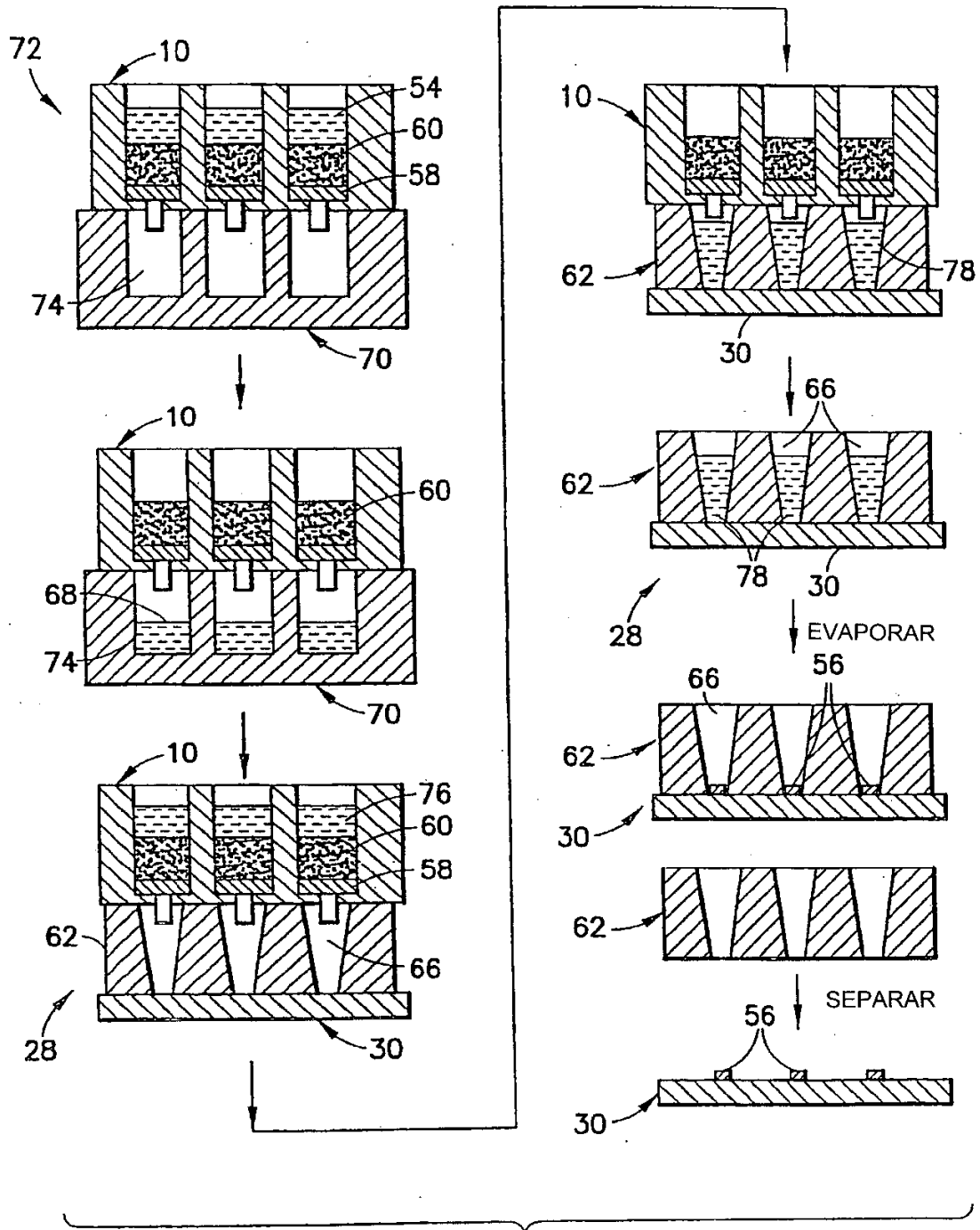


FIG.14