

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 463**

51 Int. Cl.:

**B01L 3/00**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03253136 .0**

96 Fecha de presentación: **20.05.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1398082**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.03.2004**

54 Título: **Dispositivo y antiobstrucciones y procedimiento para aplicaciones de digestión en gel**

30 Prioridad:  
**24.05.2002 US 154550**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.10.2012**

73 Titular/es:  
**EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)  
290 CONCORD ROAD  
BILLERICA, MASSACHUSETTS 01821, US**

72 Inventor/es:  
**CLARK, PHILLIP;  
SCOTT, CHRIS A.;  
EMERICK, MARC;  
KOPACIEWICZ, WILLIAM y  
RISING, DONALD B.**

74 Agente/Representante:  
**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 389 463 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**

Dispositivo antiobstrucciones y procedimiento para aplicaciones de digestión en gel

El análisis por desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) es una herramienta útil para resolver problemas estructurales e bioquímica, inmunología, genética y biología. Las muestras se ionizan y se usa el analizador del tiempo de vuelo (TOF) para medir las masas iónicas. El análisis TOF comienza cuando se forman iones y se aceleran hasta una energía cinética constante a medida que entran en una región de flujo. Llegan a un detector siguiendo tiempos de vuelo que son proporcionales a la raíz cuadrada de sus masas. Se crea un espectro de masas porque los iones de masa diferente llegan al detector a tiempos diferentes.

La espectrometría de masas puede ser una herramienta particularmente potente en los campos del descubrimiento y desarrollo de fármacos, genotipado e investigación de proteosomas. Las tendencias actuales en la investigación son analizar números cada vez mayores de muestras usando equipos de manipulación automáticos o robots. Las cantidades de muestras individuales proceden de los niveles de nanomoles a los niveles de femtomoles. Como resultado, la instrumentación es cada vez más sensible y existe la necesidad de formatos de manipulación de muestras miniaturizados, de alta densidad y desechables.

La digestión en gel de proteínas es un procedimiento proteómico que tiene muchas etapas de preparación de la muestra antes del análisis de la muestra (tales como MALDI-TOF MS). En pocas palabras, tras la separación en el gel de electroforesis, las proteínas en una muestra se tiñen para la detección y se cortan las porciones del gel que contiene la proteína de interés. Después, la tinción se elimina de estas porciones de gel y se usa una solución enzimática para digerir de forma selectiva la muestra de proteínas para formar péptidos que migran de la porción del gel a la solución. Tras la purificación de los péptidos se lleva a cabo el análisis de la muestra.

La preparación y análisis simultáneos de múltiples muestras es a menudo deseable. Se han desarrollado placas de múltiples pocillos para ensayos simultáneos, que habitualmente consisten en 96, 384 o 1536 vasos o pocillos de reacción por placa. Sería deseable usar placas de múltiples pocillos también para manipulación y preparación de muestras, tal como la eliminación de sales no deseadas y de sustancias bioquímicas para mejorar la resolución y la selectividad del espectro de masas.

A este respecto, el documento EP 1 151 793 divulga una placa de microtitulación que tiene fondos porosos liófilos. Las piezas de gel que contienen proteínas se colocan en los pocillos de la placa y se digieren con la enzima. La enzima se retira después de las piezas de gel mediante centrifugación y se aplica a una placa transportadora de muestras MALDI para análisis.

No obstante, usando centrifugación para unir, lavar y eluir es un procedimiento que consume tiempo. Además, no es fácilmente adaptable a automatización o robótica. Sería altamente deseable usar el formato de placa de microtitulación para digestión enzimática y captura de proteínas que no requieren centrifugación y que es fácilmente adaptable a automatización.

Otra dificultad es que los tapones de gel son deformables y tienen un diámetro similar a la salida de drenaje en forma de cono de la placa. Cuando se filtran al vacío, los tapones de gel obstruyen la salida y hacen que el pocillo no drene o que rebose con múltiples adiciones de solución, contaminando de este modo los pocillos adyacentes,

Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento de preparación de muestras para desalar y purificar muestras antes de la ionización-desorción láser asistida con matriz con tiempo de vuelo (MALDI-TOF) o la espectrometría de masas por ionización con electropulverización (ESI) u otros procedimientos de análisis, que también se pueda usar para la digestión de proteínas, en particular la digestión en gel.

Es otro objeto adicional de la presente invención proporcionar un dispositivo de múltiples pocillos de alta densidad en el que varias matrices dentro del dispositivo contienen medios cromatográficos que tienen las mismas o diferentes químicas y en las que la digestión en gel de proteínas se lleva a cabo usando vacío como fuerza impulsora.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un sistema de preparación de muestras y un procedimiento que es adecuado para equipos de manipulación de líquidos robóticos automáticos.

Estos y otros objetos serán evidentes a partir de la siguiente descripción.

**Sumario de la invención**

La presente invención ha superado los problemas de la técnica anterior, cuyas características esenciales y opcionales se establecen en las reivindicaciones principales y subreivindicaciones adjuntas respectivamente. Una realización de la invención proporciona un dispositivo de preparación de muestras proteómicas integrado y un procedimiento para la digestión de proteínas y para desalar y concentrar las muestras antes del análisis posterior, tal como mediante MALDI TOF y/o espectrometría de masas con ionización por electropulverización (ESI). El dispositivo y el procedimiento de la presente invención permite la digestión, desalación y concentración de las muestras antes del análisis de EM MALDI TOF. Más específicamente, el dispositivo de acuerdo con una realización

de la presente invención incluye una pluralidad de pocillos, cada uno en comunicación fluida con una respectiva salida o abertura de drenaje, que opcionalmente contiene una estructura tridimensional que comprende una pluralidad de partículas de porción atrapadas en una matriz polimérica porosa para formar un dispositivo capaz de llevar a cabo extracción en fase sólida. En una realización preferida, los pocillos se configuran de un modo tal que previenen que un transportador de muestras, tal como una pieza de gel insertada en los pocillos obstruya la salida cuando se somete a una fuerza impulsora tal como un vacío. El dispositivo también reduce o elimina la contaminación cruzada entre pocillos en el caso de que un drenaje se obstruya.

La presente invención está dirigida también a un procedimiento de preparación de muestras usando el dispositivo de la presente invención.

10 **Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 es una vista en perspectiva de un único pocillo para un dispositivo para preparación de muestras de múltiples pocillos de acuerdo con la presente invención.

La Figura 2 es una vista en perspectiva de un único pocillo para un dispositivo para preparación de muestras de múltiples pocillos que contienen una pieza de gel de acuerdo con la presente invención.

15 La Figura 3 es una vista en sección transversal de un único pocillo para un dispositivo para preparación de muestras de múltiples pocillos que contienen una pieza de gel de acuerdo con la presente invención.

La Figura 4 es una vista en perspectiva con aumento de tamaño de un único pocillo para un dispositivo para preparación de muestras de múltiples pocillos que contienen una pieza de gel de acuerdo con la presente invención.

20 La Figura 5 es una vista en sección transversal de un único pocillo para un dispositivo para preparación de muestras de múltiples pocillos que contienen una pieza de gel (en fantasma) y una matriz que tiene propiedades de adsorción en el drenaje de acuerdo con la presente invención.

La Figura 5A es una vista desde arriba de vías de paso de fluido formadas en un pocillo de acuerdo con la presente invención.

25 La Figura 6 es una vista en perspectiva de dos pocillos adyacentes de un dispositivo para preparación de muestras de múltiples pocillos de acuerdo con la presente invención.

La Figura 7 es una vista en perspectiva de un sólido que sale del drenaje y de las vías de paso de acuerdo con la presente invención.

30 La Figura 8 es una vista en sección transversal de un único pocillo para un dispositivo para preparación de muestras de múltiples pocillos que contienen una pieza de gel (en fantasma) y una matriz que tiene propiedades de adsorción en el drenaje de acuerdo con una realización alternativa de la presente invención.

La Figura 8A es una vista desde arriba de vías de paso de fluido formadas en el pocillo de acuerdo con la realización de la Figura 8.

La Figura 9 es una vista en perspectiva de un pocillo que tiene un miembro divisor de acuerdo con una realización de la presente invención.

35 La Figura 10 es una vista en sección transversal de un pocillo que tiene protuberancias de acuerdo con una realización de la presente invención.

**Descripción detallada de la invención**

40 Materiales sustrato adecuados para el dispositivo para la preparación de muestras de la presente invención no están particularmente limitados e incluyen plásticos (tales como polietileno y polipropileno), vidrio y acero inoxidable. Los materiales sustrato no deberían interferir en la operación del dispositivo o las sustancias químicas que se van a usar en el procedimiento. Las poliolefinas, y en particular el polipropileno, son materiales preferidos.

45 Volviendo ahora a las Figuras 1 y 2, se muestra, en general, en 10 un único pocillo 12 adecuado para usar en un dispositivo para preparación de muestras de un único pocillo o de múltiples pocillos que tiene una pluralidad de pocillos. Un pocillo 12 se define por una pared lateral impermeable a los fluidos que se extiende verticalmente y una porción inferior en pendiente. Las porciones de en medio y superior del pocillo 12 tienen, preferentemente, un diámetro uniforme y son sustancialmente cilíndricos en sección transversal, aunque se contemplan otras configuraciones y dentro del alcance de la presente invención. La porción inferior del pocillo 12 se reduce gradualmente hacia abajo, en la dirección del flujo del fluido, hacia la porción inferior 12, que se inclina hacia dentro hacia un centro, teniendo de este modo una configuración frusto-cónica. La porción inferior 13 tiene un drenaje 15 que se localiza, preferentemente, centralmente en el pocillo 10.

Formadas en la porción inferior 13 del pocillo 10 hay una o más vías de paso de fluido 18. La(s) vía(s) de paso de fluido 18 modifican la superficie de otro modo relativamente lisa o uniforme de la porción inferior 13 y proporcionan

de forma eficaz un hueco o espacio entre un transportador de muestras 20, tal como una pieza de gel (Figura 2), que está contenido en el pocillo 12 y soportado por la porción inferior 13, y el drenaje 15. El transportador de muestras es un sólido, tal como un gel, una perla recubierta o una membrana. Con el fin de garantizar el flujo de fluido entre el pocillo 12 y el drenaje 15 cuando está presente el transportador 20 en el pocillo 12, la dimensión más pequeña de cada vía de paso 18 debería ser inferior a la dimensión más pequeña del transportador 20, de modo que el transportador 20 no se puede colocar en la vía de paso 18 para bloquear el flujo de fluido hacia el drenaje 15. De este modo, al menos una porción de la(s) vía(s) de paso 18 siempre está en comunicación fluida con el drenaje 15 y no puede estar bloqueada u obstruida por un transportador 20 cuando se coloca en el pocillo 12, como se pone de ejemplo mediante ilustración en las Figuras 2, 3 y 4. Cuando el transportador es una pieza de gel, se observa que los cortadores de tapones normalmente circulares en robots recolectores cortan la porción de gel de forma uniforme. No obstante, la presente invención no está limitada a transportadores de forma uniforme, ya que la(s) vía(s) de paso de fluidos 18 están configuradas para prevenir el bloqueo de fluido incluso cuando los transportadores de forma irregular se presentan en el pocillo 12. Por ejemplo, una única hendidura que es más larga que el transportador está dentro del alcance de la presente invención.

Aunque una única vía de paso 18 es suficiente para asegurar el flujo de fluido alrededor del transportador de muestras, hay, preferentemente, una pluralidad de dichas vías de paso. Al menos dos vías de paso 18, más preferentemente tres vías de paso 18, formadas simétricamente alrededor del drenaje 15 como se ve mejor en las Figuras 5A y 7, es la disposición particularmente preferida. La disposición simétrica de las vías de paso alrededor del drenaje 15 aseguran que, con independencia de la orientación del transportador 20 en el pocillo 12, la comunicación fluida entre el pocillo 12 y el drenaje 15 se mantendrá. La forma y la topología de la(s) vía(s) de paso 18 no están particularmente limitadas, siempre que no coincidan con la del transportador 20. Preferentemente, la(s) vía(s) de paso 18 son lobulares, pero un cuadrado, esquinas redondeadas, como con una protuberancia o una barra a través son configuraciones adecuadas. Como mejor se ve en la Figura 7, los lóbulos van reduciéndose de modo que son más profundos a medida que se acercan al drenaje 15.

La(s) vía(s) de paso 18 se forman, preferentemente, creando asimetría en la superficie de la porción inferior 13. Esto se puede conseguir proporcionando ranuras en la superficie y proporcionando porciones elevadas o protrusiones en o sobre la superficie, tal como una barra cruzada (Figura 9) o costillas o protuberancias 118 (Figura 10). Preferentemente, las vías de paso 18 son ranuras que tienen una profundidad de alrededor de 0,2 mm, una anchura de alrededor de 0,25 mm y una longitud de alrededor de 1 mm.

En la realización que usa protrusiones, las protrusiones están diseñadas de un modo tal que la abertura más grande en el drenaje es más pequeña que la dimensión más pequeña del transportador de muestras. El objetivo es prevenir que el transportador de muestras 20 se coloque sobre el drenaje 15 de un modo tal que bloquee el flujo de fluido hacia el drenaje 15.

Como se ve en las Figuras 1 y 7, el drenaje 15 es un orificio, preferentemente cilíndrico y alineado axialmente con el eje longitudinal central del pocillo 12. El drenaje 15 está en comunicación fluida con las vías de paso 18. Al menos una porción del drenaje 15 incluye, preferentemente, una estructura compuesta de adsorción 25 (Figuras 5 y 5A). Las estructuras compuestas de adsorción adecuadas son estructuras de membrana de adsorción cargadas de partículas unidas a polímero moldeadas, tales como las compuestas por perlas cromatográficas que se han adherido junto con un aglutinante y divulgado en la patente de EE.UU. Nº 6,048,457, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia. Una de estas estructuras preferidas es una estructura tridimensional que comprende una pluralidad de partículas de porción atrapadas en una matriz polimérica porosa y que tienen una razón de proporcionalidad (relación entre el diámetro medio y el espesor medio) inferior a aproximadamente 10, preferentemente inferior a aproximadamente 5. La estructura 25 es, preferentemente, adyacente al fondo del drenaje 15 y se extiende hacia el drenaje 15, preferentemente se extiende a través de toda la profundidad del drenaje 15 y se puede extender en la(s) vía(s) de paso 18 como se muestra en la Figura 5. Aunque la estructura compuesta 25 también puede llenar completamente la(s) vía(s) de paso 18, se prefiere que una porción (preferentemente la mitad superior), tal como el 50 % de la(s) vía(s) de paso 18 permanece desprovisto de la estructura 25 para asegurar que la(s) vía(s) de paso 18 no está(n) bloqueada(s) por el transportador 20.

Como se muestra en las Figuras 8 y 8A, la estructura compuesta se puede formar para que tenga una o más dimensiones que son más grandes que la dimensión más grande del transportador 20 y, por tanto, garantizar la comunicación fluida entre el pocillo y el drenaje sin la formación de una vía de paso para mantener el área de superficie para el flujo. Por ejemplo, la forma frontal de la estructura compuesta puede ser un círculo que tenga una extremidad larga 25A que se extiende desde el círculo o puede estar en la forma de un ojo, de modo que garantiza que alguna superficie de la estructura compuesta permanezca sin obstruir y disponible para el flujo, con independencia de la orientación del transportador 20.

Los dispositivos de acuerdo con la presente invención pueden incorporar una pluralidad de estructuras compuestas que tienen materiales de resina con diferentes grupos funcionales para fraccionar los analitos que varían en carga, tamaño, afinidad y/o hidrofobicidad; como alternativa, una pluralidad de dispositivos que contienen diferentes membranas funcionales individuales se pueden usar en combinación para alcanzar un resultado similar. De forma similar, una o más membranas se pueden verter en un alojamiento adecuado y la funcionalidad se puede añadir antes o después del vertido.

En una realización alternativa, el drenaje puede estar desprovisto de cualquier medio y el dispositivo se puede usar como dispositivo de procesamiento de no obstrucción que libera las proteínas digeridas a un pocillo de recolección para análisis o concentración, por ejemplo.

- 5 Después de la tinción de las proteínas y el transportador y de que las piezas pequeñas del transportador que contiene la(s) proteína(s) de interés se escindan del sitio de la tinción, cada pieza transportadora se coloca en un pocillo respectivo. Una cantidad adecuada de solución de enzima proteolítica se añade a cada pocillo, tal como mediante pipeteo. Se añade suficiente enzima para digerir con eficacia la(s) proteínas. Preferentemente se añade un exceso de enzima y en cantidad suficiente para sumergir el transportador en cada pocillo. Tras un periodo de incubación para permitir la digestión proteica y que los péptidos resultantes se difundan fuera del transportador, se aplica vacío a cada pocillo, preferentemente para crear una presión diferencial de aproximadamente 5-10 psi, para producir que los péptidos extraídos fluyan hacia el drenaje 15 donde son adsorbidos (cuando hay medios presentes) y, después, se puedan lavar de un modo convencional y liberar de tampones, sales y otros contaminantes. Los péptidos concentrados se pueden eluir y liberar a una diana adecuada o dispositivo de presentación para análisis, tal como mediante EM MALDI TOF.
- 10
- 15 Durante un procedimiento de multiadición automático, existe la posibilidad de que los pocillos puedan rebosar si se bloquean. La presente invención reduce o elimina la posibilidad de contaminación de otros pocillos como resultado del rebosamiento incorporando una característica de control del rebosamiento en el dispositivo de la presente invención. Específicamente, con referencia a la Figura 6, rodeando al menos una porción de cada pocillo 12 hay una rebaba 30. La rebaba está formada, preferentemente, a partir de la superficie superior 29 de cada pocillo 12, que generalmente corresponde a la superficie superior 32 de la bandeja 35 y se extiende hacia abajo (hacia el drenaje 15) aproximadamente el 50 % de la longitud del pocillo 12, donde termina en la pared inferior 34. La profundidad de la rebaba no es crucial, siempre que sea suficiente para contener el volumen de rebosamiento de al menos un pocillo.
- 20

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de preparación de muestra de muestra(s) que contiene(n) proteína para su análisis posterior, que comprende:

proporcionar un vehículo sólido que contiene dicha muestra;

5 proporcionar al menos un pocillo que tiene una entrada, una superficie inferior y un drenaje en dicha superficie inferior, en la que dicho al menos un pocillo tienen al menos una vía de paso formada en dicha superficie inferior alrededor de dicho drenaje y que tiene una dimensión mayor más pequeña que la dimensión más pequeña de dicho vehículo;

10 soportar dicho vehículo en dicha superficie inferior al tiempo que se retienen la comunicación fluida entre dicha superficie inferior y dicho drenaje a través de dicha al menos una vía de paso;

digerir dicha proteína en dicha muestra en dicho vehículo añadiendo la solución enzimática;

eluir los péptidos de dicho vehículo añadiendo una solución a dicho pocillo;

**que se caracteriza porque**

15 dicha solución enzimática se añade en una cantidad en exceso suficiente para sumergir el vehículo en dicho pocillo;

se aplica vacío a dicho pocillo, haciendo que dichos péptidos eluidos fluyan hacia dicho drenaje a través de dicha al menos una vía de paso.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que

a) hay tres vías de paso dispuestas de forma simétrica alrededor de dicho drenaje, y/o

20 b) dichos péptidos se absorben en dicho drenaje mediante una estructura de adsorción colocada en dicho drenaje y, opcionalmente, dicha estructura comprende una pluralidad de partículas de porción atrapadas en una matriz porosa y/o

c) dicho vehículo comprende un gel y/o

d) dicho vehículo comprende una membrana.

25 3. Un procedimiento de preparación de muestra de muestra(s) que contiene(n) proteína para su análisis posterior, que comprende:

proporcionar una pluralidad de vehículos sólidos que contienen dicha muestra;

30 proporcionar una matriz de pocillos, teniendo cada pocillo una entrada, una superficie inferior y un drenaje en dicha superficie inferior, en la que cada pocillo tienen al menos una vía de paso formada en dicha superficie inferior alrededor de dicho drenaje y que tiene una dimensión más pequeña que la dimensión más pequeña de uno de dicha pluralidad de vehículos;

soportar un correspondiente uno de dicha pluralidad de vehículos en dicha superficie inferior de cada uno de dichos pocillos, al tiempo que se retienen la comunicación fluida entre dicha superficie inferior y dicho drenaje a través de dicha al menos una vía de paso;

35 digerir dicha proteína en dicha muestra en cada uno de dichos vehículos añadiendo la solución enzimática;

eluir los péptidos de cada uno de dichos vehículos añadiendo una solución a cada uno de dichos pocillos;

**que se caracteriza porque**

40 dicha solución enzimática se añade en una cantidad en exceso en cada pocillo, suficiente para sumergir el vehículo en el mismo;

simultáneamente se aplica vacío a cada uno de dichos pocillo, haciendo que dichos péptidos eluidos fluyan desde dicho vehículo hacia dicho drenaje a través de dicha al menos una vía de paso en cada uno de dichos pocillos.

4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho vehículo comprende un gel.

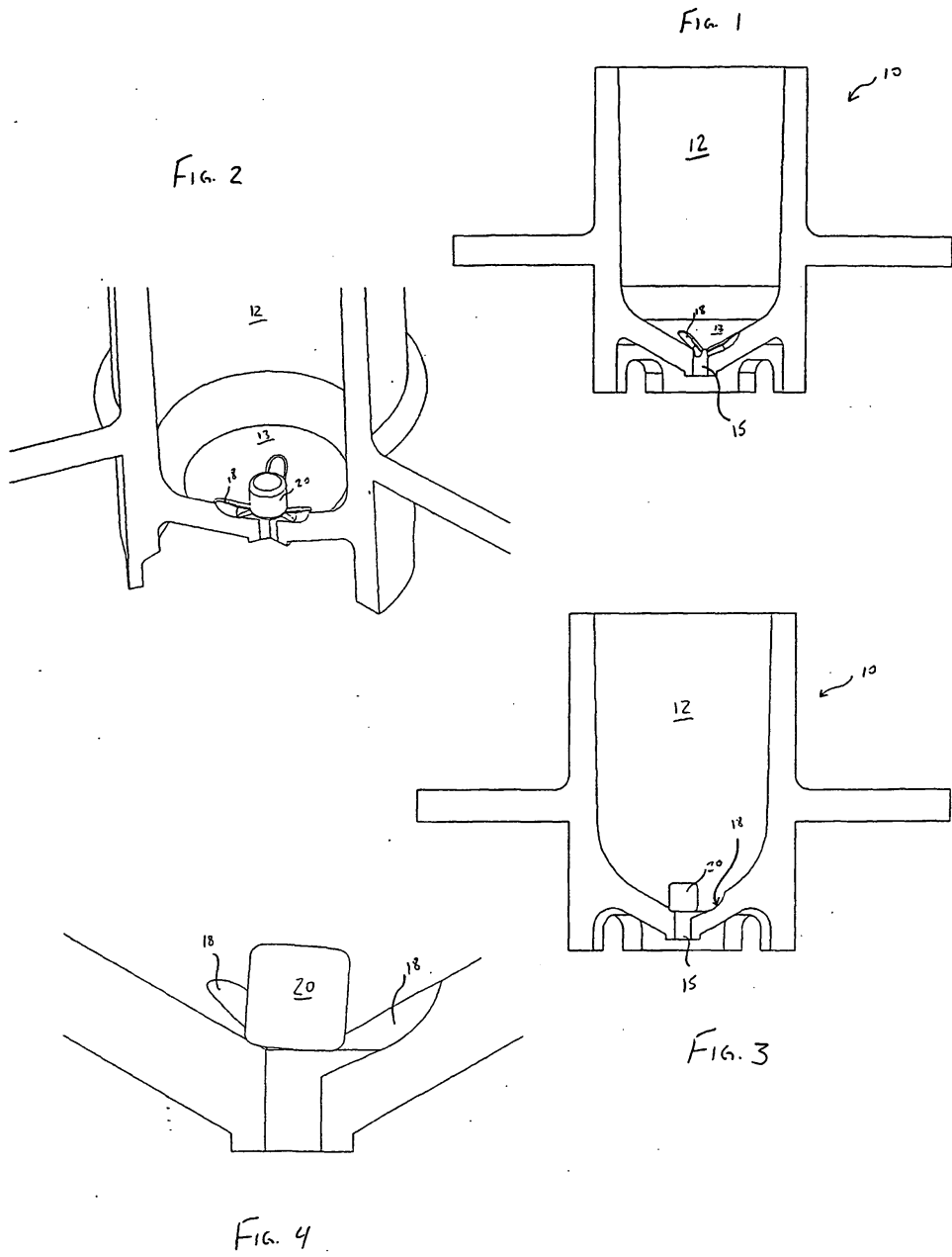
45 5. Un montaje de la preparación de muestras, que comprende:

un dispositivo de preparación de muestras que comprende al menos un pocillo adaptado para contener

un vehículo de muestras, teniendo dicho al menos un pocillo una entrada, una superficie inferior y un drenaje en dicha superficie inferior, en el que dicho al menos un pocillo tiene al menos una vía de paso formada en dicha superficie inferior alrededor de dicho drenaje;

**que se caracteriza por** una fuente de vacío en comunicación fluida con dicho pocillo.

- 5 6. El ensamblaje de la reivindicación 5, en el que dicha al menos una vía de paso que tiene una dimensión menor de 1,0 mm.
7. El ensamblaje de la reivindicación 5 o 6, en el que hay tres vías de paso dispuestas simétricamente alrededor de dicho drenaje.
- 10 8. El ensamblaje de la reivindicación 5, 6 o 7, en el que una estructura de adsorción se coloca en dicho drenaje y, opcionalmente, dicha estructura comprende una pluralidad de partículas de sorción atrapadas en una matriz porosa.
9. El ensamblaje de la reivindicación 5, 6, 7 u 8, en el que hay una pluralidad de dichos pocillos.
10. El ensamblaje de la reivindicación 9, en el que dicha pluralidad de pocillos está rodeada por un rebajo.
11. El ensamblaje de la reivindicación 5, 6, 7, 8, 9 o 10, en el que dicha al menos vía de paso está formada por al menos una protuberancia en la superficie inferior de dicho pocillo.
- 15 12. Un ensamblaje de preparación de muestras, que comprende:
- un dispositivo de preparación de muestras que comprende una pluralidad de pocillos adaptados para contener un transportador de muestras, teniendo cada pocillo una entrada, una superficie inferior y un drenaje en dicha superficie inferior en el que cada pocillo tiene al menos dos vías de paso formadas en dicha superficie inferior alrededor de dicho drenaje;
- 20 **que se caracteriza por** una fuente de vacío en comunicación fluida con cada uno de dichos pocillos.





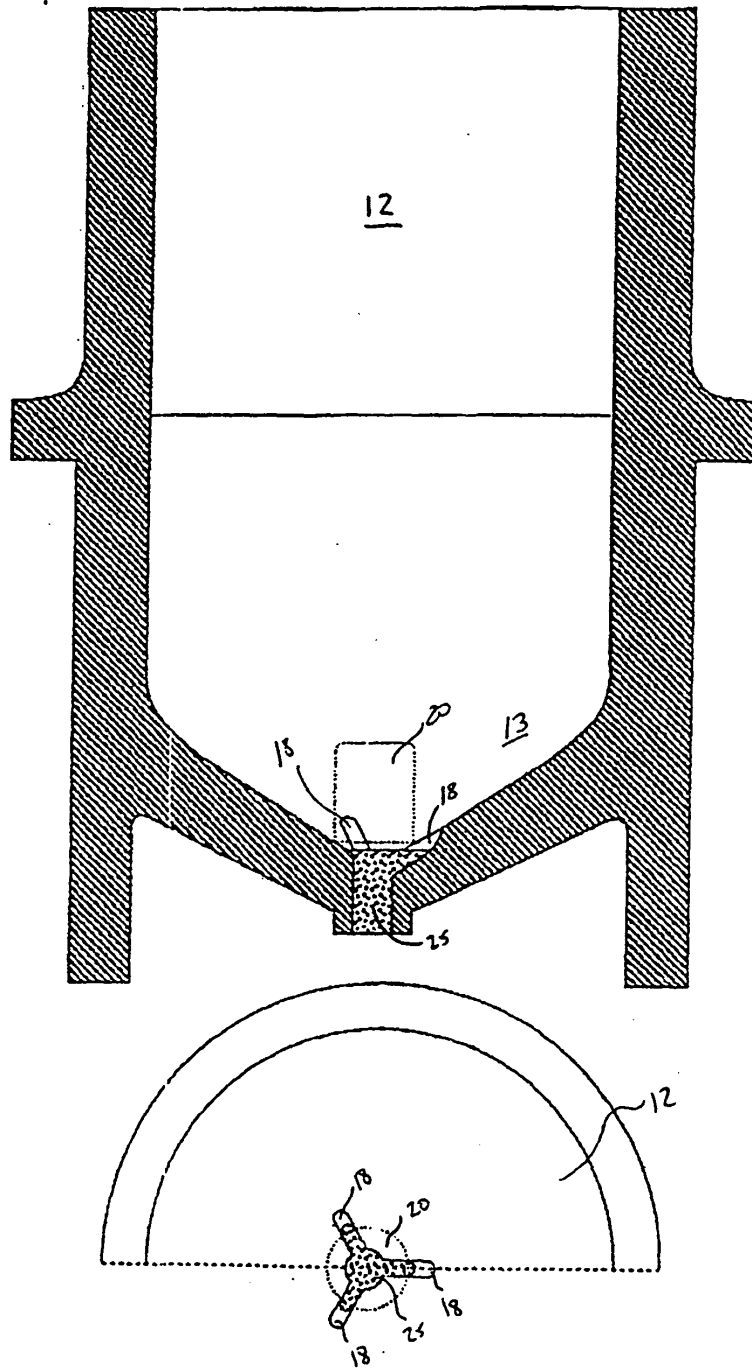


Fig. 5A

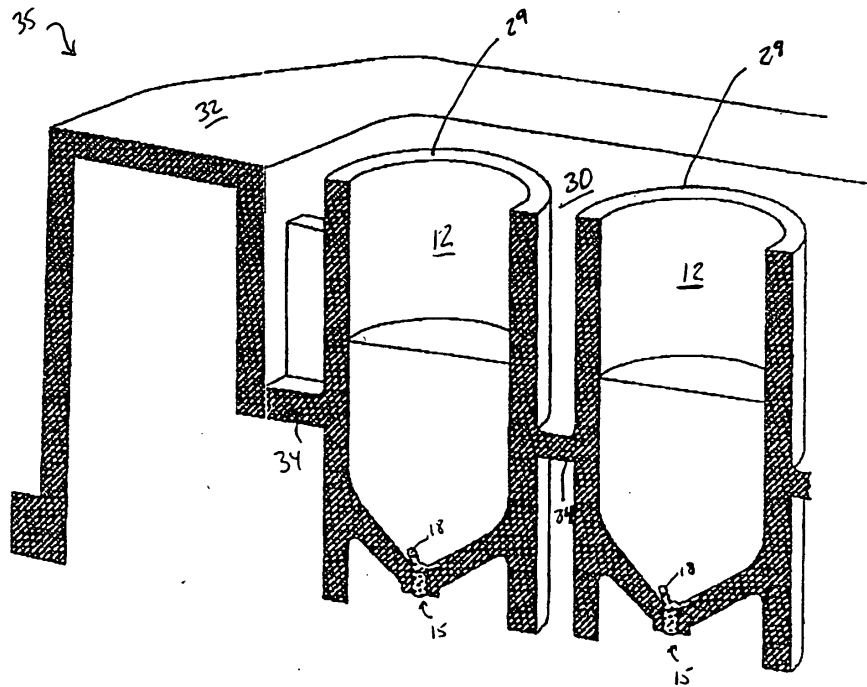


Fig. 6

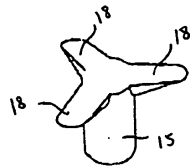


Fig. 7

Fig. 8

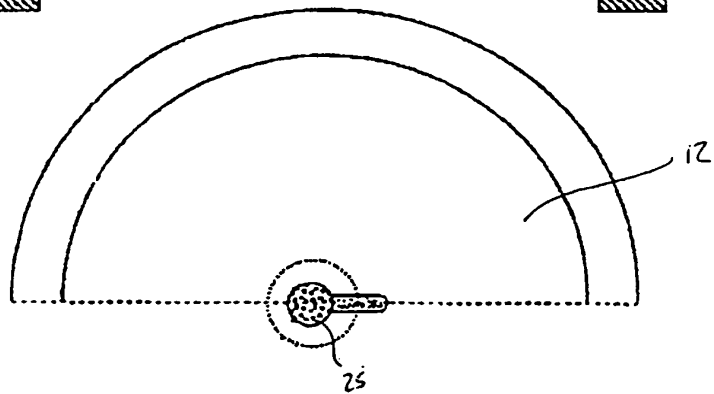
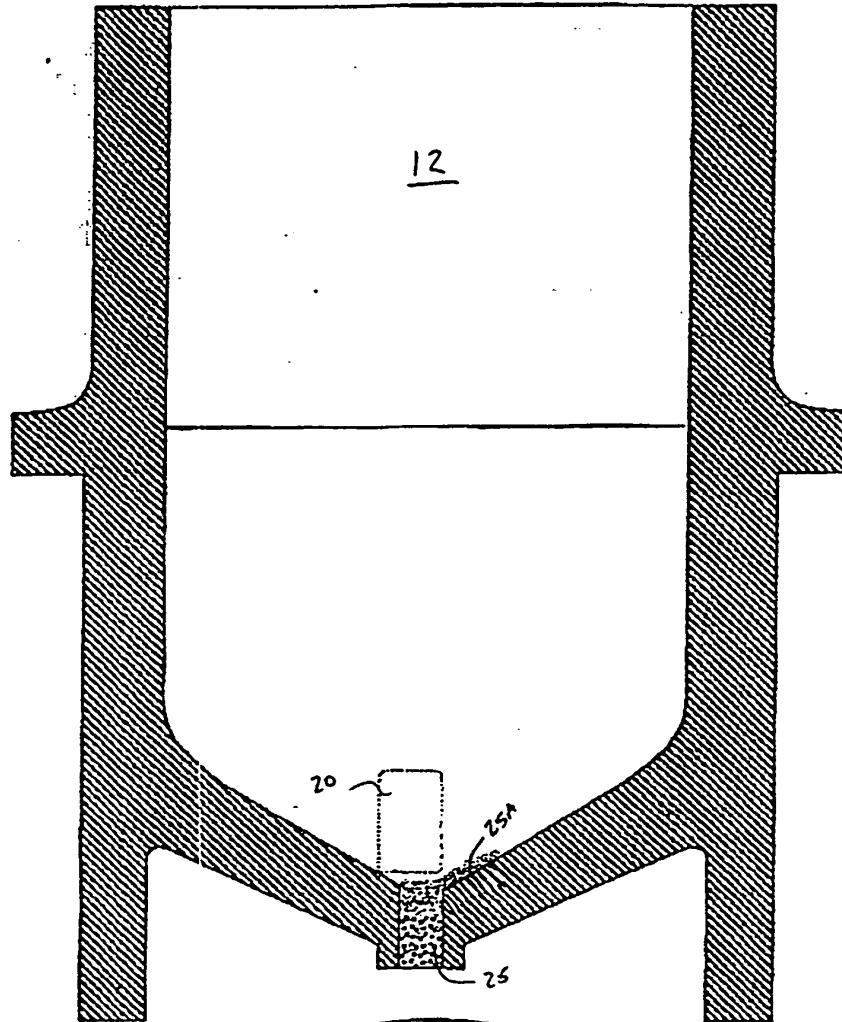


Fig. 8A

Fig. 9

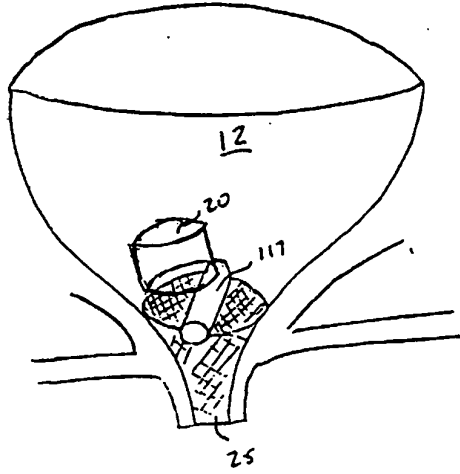


FIG. 10

