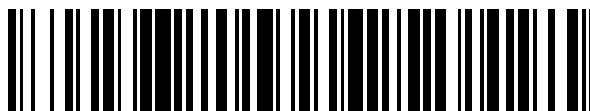


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 598 554**

51 Int. Cl.:

B05D 1/02 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.08.2011 PCT/US2011/047168**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2012 WO12021571**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2011 E 11816952 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2603325**

54 Título: **Método y sistema para aplicar un material de bloqueo a sustratos de ensayo**

30 Prioridad:

11.08.2010 US 372552 P

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

27.01.2017

73 Titular/es:

**AUSHON BIOSYSTEMS (100.0%)
43 Manning Road, 1st Floor
Billerica, MA 01821, US**

72 Inventor/es:

**OLIVER, KEVIN;
HOLWAY, TONI y
SULLIVAN, TRAVIS**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 598 554 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

Método y sistema para aplicar un material de bloqueo a sustratos de ensayo

La presente invención se refiere a la aplicación de un material de bloqueo a un sustrato de ensayo que ha sido impreso con rasgos.

5 Descripción del estado de la técnica relacionado

Un sustrato de ensayo es una superficie sobre la que se pueden realizar diversos análisis químicos y/ o biológicos. Ejemplos incluyen placas de micromatrices, portaobjetos de vidrio y placas de microtitulación. Una placa de microtitulación es una placa plana que tiene múltiples "depósitos" formados en su superficie. Cada depósito se puede utilizar como un pequeño tubo de ensayo en el que se pueden colocar diversos materiales a los efectos de la realización de un análisis químico. Un uso ilustrativo de placas de microtitulación incluye un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), que es una técnica de prueba de diagnóstico médico moderna.

En ELISA, en general, un anticuerpo de captura se imprime en el fondo de un depósito en una placa de microtitulación. El anticuerpo de captura tiene especificidad para un antígeno particular para el cual se está realizando el ensayo. Una muestra a analizar se añade al depósito que contiene el anticuerpo de captura y el anticuerpo de captura "captura" o inmoviliza el antígeno contenido en la muestra. Se añade un anticuerpo de detección entonces al depósito, que también se une y/ o forma un complejo con el antígeno. Otros materiales se añaden después al depósito los cuales provocan una señal detectable que se va a producir por el anticuerpo de detección. Por ejemplo, cuando la luz de una longitud de onda específica ilumina al depósito, el antígeno/ anticuerpo será fluorescente. La cantidad de antígeno en la muestra se puede deducir basándose en la magnitud de la fluorescencia. En otro ejemplo, se puede añadir un compuesto al depósito lo cual provoca que el anticuerpo de detección emita una luz dentro de una longitud de onda predeterminada (por ejemplo, 400-500 nm). Esta luz puede ser leída por una cámara CCD para medir el brillo óptico de la luz emitida.

Hartmann y otros, "Fabricación de micromatrices de proteínas sin contacto utilizando un procedimiento basado en la formación de puentes de líquido", *Química Analítica y Bioanalítica*, Vol. 393, No. 2, 591-598 da a conocer una técnica de deposición asistida por presión, sin contacto, para la fabricación de micromatrices.

La Patente US No. 7,455,816 da a conocer un método para el recubrimiento de una placa de soporte para llevar a cabo ensayos funcionales en células biológicas. En lugar de un proceso de pulverización, la patente '816 enseña varios otros métodos para saturar los puntos de unión no específicos, incluyendo sumergir portaobjetos de muestra en un material de bloqueo y bloquear los módulos de cultivo de células rellenando cavidades con solución de bloqueo. La patente '816 no enseña el añadir material de bloqueo utilizando una pipeta.

"Soluciones de Estabilidad de Proteínas: Una Visión General de los Productos para Aplicaciones in vitro", páginas 1-10 (2005) (disponible en <http://www.surmodics.com>) da a conocer diversas soluciones de estabilidad de proteínas para aplicaciones in vitro.

Hartmann y otros, "Aumento de robustez y sensibilidad de micromatrices de proteínas a través de microagitación y automatización", *Acta Química Analítica*, Vol. 564, No. 1, 66-73 (2006) da a conocer un sistema de ensayo automatizado que integra un dispositivo de microagitación utilizando tecnología de ondas acústicas de superficie. Hartman 2006 describe que al aplicar una capa muy delgada de un material de bloqueo tal como la capa de bloqueo se elimina fácilmente durante la rehidratación de la etapa anterior al ensayo.

La publicación US N° 2009/137428 da a conocer un portador de sonda inmovilizada para detectar una sustancia de destino fabricada de tal manera que se evita que un punto sea contaminado con otro punto y se evita que una sonda adsorba, de forma específica, un área en segundo plano en la fabricación del portador de onda inmovilizada. La publicación '428 enseña medios para llevar a cabo el bloqueo mientras se mantiene la forma de una gotita de líquido intacta sin utilizar un compuesto de bloqueo. El publicación '428 no enseña la adición de material de bloqueo usando una pipeta.

La publicación US 2008/213481 proporciona sistemas y métodos para una ordenación de alta velocidad, hibridación, desarrollo cuantitativo, y/ o ensayo. La publicación '481 no enseña métodos de aplicación de material de bloqueo a través de un procedimiento de pulverización y después añadiendo material de bloqueo a través de una pipeta.

La publicación US 2002/064482 da a conocer métodos y sistemas para un procesamiento de alto rendimiento y cuantitativo, ensayo y desarrollo de micromatrices de ADN, proteínas y otros reactivos biológicos y químicos. La publicación '482 no enseña ni sugiere el depósito de material de bloqueo mediante una pipeta o micropipeta.

La publicación US 2008/227663 da a conocer sistemas y métodos para una ordenación de alta velocidad, hibridación, desarrollo cuantitativo y/ o ensayo. Algunos modos de realización proporcionan un formato de

ordenación basado en una malla. Algunos otros modos de realización proporcionan un formato de ordenación basado en una hoja. Algunos modos de realización utilizan un ensayo de gota sobre gota o un modo de hibridación.

Breve resumen

5 La presente invención proporciona un método que incluye el suministro de un sustrato de ensayo que tiene al menos una superficie. Una primera parte de la superficie del sustrato tiene al menos un rasgo de análisis de la misma, y una segunda parte de la superficie del sustrato carece de rasgos de análisis. El sustrato de ensayo es una placa de microtitulación, teniendo la placa de microtitulación una pluralidad de depósitos, y estando dispuesta el al menos un rasgo de análisis dentro de uno de los depósitos. El método también incluye generar un aerosol de un material de bloqueo en la proximidad de la superficie del depósito, y continuar la generación de aerosol en la proximidad de la superficie del depósito al menos hasta que la segunda parte de la superficie del sustrato está cubierta sustancialmente por el material de bloqueo y añadir material de bloqueo al al menos un depósito a través de una pipeta.

10 En un modo de realización, la pulverización del material de bloqueo es generada mediante un aerógrafo. De forma opcional, el aerógrafo genera un patrón de pulverización que tiene un eje central, y el aerógrafo está en relación con el sustrato para mantener el eje central del patrón de pulverización sustancialmente perpendicular a la al menos una superficie del sustrato.

15 En un modo de realización, el aerógrafo, durante su funcionamiento, tiene una velocidad de flujo de material de bloqueo a través del aerógrafo y una presión de suministro de aire. La velocidad de flujo a través del aerógrafo varía de aproximadamente 5 ml/min a aproximadamente 20 ml/min, y la presión de suministro de aire varía de aproximadamente 34 kPa a aproximadamente 207 kPa.

20 En otro modo de realización, la pulverización de material de bloqueo se origina en una boquilla, y la superficie del sustrato está dentro de aproximadamente 2 cm a aproximadamente 41 cm de la boquilla.

25 En un modo de realización, la pulverización de material de bloqueo se origina en una boquilla, y el método incluye además mover al menos uno de, la boquilla y el sustrato de ensayo, uno con relación al otro, para distribuir el material de bloqueo sustancialmente sobre toda la superficie del sustrato. De forma opcional, el método incluye disponer el sustrato de ensayo en un transportador, estando dispuesta una parte del transportador por debajo de la boquilla, y accionar el transportador para llevar el sustrato de ensayo dentro de la pulverización del material de bloqueo.

Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1 muestra una vista lateral en sección transversal de un único depósito en una placa de microtitulación.

Las figuras 2A a C muestran una serie de vistas laterales en sección transversal de un depósito durante un método conocido de adición de un material de bloqueo a un depósito.

La figura 3 muestra una vista superior de una serie de rasgos impresos después de la aplicación de un material de bloqueo, usando un método conocido.

35 La figura 4 muestra un método de preparación de una placa de microtitulación, de acuerdo con algunos modos de realización.

Las figuras 5A a B muestran una serie de vistas laterales en sección transversal de un depósito durante un método de adición de un material de bloqueo a un depósito, de acuerdo con algunos modos de realización.

40 La figura 5C muestra una vista lateral en sección transversal de un depósito durante una etapa opcional de un método de adición de un material de bloqueo al depósito, de acuerdo con algunos modos de realización.

La figura 6 muestra una vista superior de una serie de rasgos impresos después de la aplicación de un material de bloqueo, de acuerdo con algunos modos de realización.

Las figuras 7A a B muestran una serie de vista lateral es en sección transversal de un sustrato de ensayo sobre un transportador pasando por debajo de una pulverización de material de bloqueo.

45 Descripción detallada

La figura 1 muestra una ilustración de una vista lateral en sección transversal de un único depósito en una placa 100 de microtitulación. La placa 100 de microtitulación en sí no forma parte de la invención, pero esta materia se mantiene, ya que es relevante para el método de la invención, el cual es un método que implica una placa de microtitulación. La parte inferior del depósito está formada por una base 105 de poliestireno. Durante la preparación

de una placa de microtitulación para su uso en un ELISA, muchos diferentes "puntos" o "rasgos" 110 de anticuerpos de captura se imprimen en el depósito y se adhieren a la base 105 de poliestireno. Los rasgos pueden tener alrededor de 320 a 380 μm de diámetro, por ejemplo. Después de imprimir los rasgos 110 del anticuerpo de captura, se añade un material de bloqueo al depósito para bloquear los puntos 115 de unión de la placa que permanecen en la placa 100. Esto evita la unión no selectiva de los antígenos de la muestra a la base del depósito durante el ELISA, lo cual podría dar falsas lecturas.

Las figuras 2A a C muestran una serie vistas 200 laterales en sección transversal de un depósito 205 durante un procedimiento conocido de adición de un material de bloqueo a un depósito, durante la preparación de una placa de ELISA. Por lo tanto, estas figuras no forman parte de la invención, pero se mantienen para demostrar las ventajas de la invención con relación al estado de la técnica anterior. Una vez que han sido impresos los rasgos 210, una micropipeta 215 que contiene una solución de material 220 de bloqueo se utiliza para añadir aproximadamente 200 μl de la solución al depósito 205. Sin embargo, este método puede introducir efectos no deseados dentro de la placa también. Específicamente, la aplicación de una solución de material de bloqueo directamente sobre una o más de los rasgos 210 impresos puede destruir la forma del rasgo debido a la fuerza de la solución de material de bloqueo que impacta en el rasgo impreso. Por lo tanto, un enfoque típico es aplicar la solución de bloqueo a lo largo de una parte de la pared 220 del depósito 205.

Dicho enfoque puede reducir la fuerza de impacto experimentada por los rasgos 210 impresos. Sin embargo, en algunos casos, los rasgos 210 impresos pueden todavía ser "abatidas" por la solución del material de bloqueo de entrada que lava la parte superior del rasgo impreso (tal y como se muestra en la figura 2B). Los rasgos abatidos pueden formar a continuación grandes puntos 225 deformados sobre la superficie de la parte inferior de la placa de depósito (tal y como se muestra en la figura 2C).

La figura 3 muestra una vista 300 superior de una serie de rasgos impresos después de la aplicación de un material de bloqueo usando el método conocido ilustrado en las figuras 2A a 2C. Tal y como se muestra en la figura 2, varias de los rasgos han sido abatidos y distribuidas a través de porciones más grandes de la superficie inferior de la placa del depósito. Por lo tanto, estos rasgos carecen de un círculo definido claramente cuando se ve desde arriba. Estos rasgos alterados pueden ser más difíciles de detectar o "leer". Por ejemplo, un lector de ELISA automatizado puede malinterpretar un rasgo con formato incorrecto, el rasgo abatido puede interferir con un rasgo adyacente, y/ o la intensidad del rasgo puede verse afectado. Por otra parte, un usuario de una placa con rasgos con formato incorrecto puede percibir a la placa con una calidad deficiente, o el usuario puede carecer de confianza en los resultados del análisis.

La figura 4 muestra un método 400 de preparación de una placa de microtitulación de acuerdo con algunos modos de realización. El método 400 reduce o elimina el formato incorrecto y/ o el abatimiento de rasgos durante la adición del material de bloqueo a los depósitos de microtitulación. Tal como se utiliza en este documento, una "placa de destino" es una placa que se va a preparar (por ejemplo, impresa, bloqueada, y procesada para su uso posterior) para un conjunto particular de análisis. Considerando que, una "placa de origen" es una placa de microtitulación que tiene un suministro de material que va a ser impreso sobre una placa de destino. Por ejemplo, los depósitos de una placa de origen se pueden llenar con varios tipos de anticuerpos que se van a imprimir en placas de destino.

De conformidad con el procedimiento 400, la placa de origen se prepara para el proceso de impresión (etapa 410). Esto puede incluir el llenado de los depósitos de la placa de origen con el material deseado que va a ser impreso sobre la placa de destino. A continuación, la placa de destino está preparada para la impresión (etapa 420). Esto puede incluir el lavado y/ u otros tratamientos de superficie para permitir que el material que se va imprimir se adhiera correctamente a la superficie inferior de la placa del depósito. Las placas de origen y de destino son luego ajustadas en un aparato de impresión (por ejemplo, un matizador 2470 disponible de Aushon Biosystems, Inc. de Billerica, MA) (etapa 430). Los rasgos se imprimen en los depósitos de la placa de destino (etapa 440), se incuba la placa de destino impresa para un periodo de tiempo (etapa 450), y se seca la placa de destino (etapa 460).

A continuación, se aplica un material de bloqueo a la placa de destino a través de un proceso de pulverización (etapa 470). Las figuras 5A a B muestran una serie de vistas 500 laterales en sección transversal de un depósito 505 durante la etapa de pulverización de acuerdo con una implementación. En la implementación mostrada, un aerógrafo 510 (por ejemplo, un modelo TG0210 de Paasche Talon) se utiliza para aplicar el material 515 de bloqueo a la superficie inferior del depósito 520 de la placa. Durante la etapa de pulverización, aproximadamente 10 ml de una solución de material de bloqueo se pulverizan sobre toda la superficie de la placa. El material de bloqueo es impulsado por una fuente de aire comprimido, por ejemplo, un compresor de aire estándar que suministra aire limpio y seco, a una presión de aproximadamente 138 kPa (20 psi). La velocidad de flujo del aerógrafo se establece a aproximadamente 10 ml/min.

La boquilla del aerógrafo se coloca a alrededor de 15 cm (6 pulgadas) de la superficie de la placa, y el aerógrafo se mueve por barrido por toda la superficie, manteniendo la boquilla perpendicular a la superficie de la placa. En otras palabras, el centro del patrón 525 de pulverización es esencialmente perpendicular a la superficie de la placa. La pulverización se continúa al menos hasta que las partes de la superficie de la placa sin rasgos impresos sobre la misma son cubiertas sustancialmente de material de bloqueo. Opcionalmente, la pulverización se continúa al menos

5 hasta que el nivel de material de bloqueo en el depósito cubre los rasgos 530 impresos. Después de que se alcanza ese nivel de material de bloqueo, puede ser añadido material de bloqueo adicional continuando el proceso de pulverización, o, de forma opcional, se puede añadir material de bloqueo adicional a través de micropipeta, tal y como se describió anteriormente (etapa 480). La figura 5C muestra una vista lateral en sección transversal del depósito durante esta etapa opcional de adición de material de bloqueo al depósito a través de la pipeta.

10 La placa de destino es luego procesada por su uso o almacenamiento utilizando métodos conocidos (etapa 490). Por ejemplo, la placa de destino puede ser incubada a aproximadamente 4 °C durante la noche. De forma alternativa, el material de bloqueo en exceso (por ejemplo, el material de bloqueo que no se ha unido a la parte inferior del depósito) puede ser retirado de la placa de destino, la placa puede entonces ser secada, y la placa se puede entonces colocar en un paquete resistente a la humedad para el almacenamiento. El método descrito de la aplicación del material de bloqueo reduce o elimina el formato incorrecto y/ o el abatimiento de rasgos durante la adición de material de bloqueo a los depósitos de microtitulación. La figura 6 muestra una vista 600 superior de una serie de rasgos 605 impresos después de la aplicación de un material de bloqueo de acuerdo con algunos modos de realización. Tal y como se muestra en la figura, los rasgos 605 impresos tienen bordes circulares bien definidos y no tienen rasgos de formato incorrecto que aparecen en la placa preparada de acuerdo con los métodos conocidos. Por 15 lo tanto, las placas preparadas de acuerdo con los métodos descritos en este documento tienen una uniformidad de rasgos superior.

20 La aplicación del material de bloqueo como se describe en el presente documento puede ser aplicada a mano. En algunas implementaciones, el bloqueo se puede aplicar mediante maquinaria automatizada. Por ejemplo, después de la impresión, la incubación y el secado (etapas 440, 450, y 460), la placa se puede colocar sobre un transportador sobre el cual están montadas una o más boquillas de pulverización. La velocidad del transportador se controla para garantizar el tiempo de permanencia adecuado de las placas dentro del patrón 525 de pulverización de las una o más boquillas. Por ejemplo, si la velocidad de flujo total de todas las boquillas es de aproximadamente 10 ml/min, la velocidad del transportador puede ser controlada para permitir que al menos alguna parte de la superficie de la placa este bajo el patrón de pulverización durante 1 minuto. En otra implementación ilustrativa, la placa puede sujetar es una posición fija y un brazo automatizado puede dirigir una o más boquillas de pulverización por encima de la superficie de la placa.

30 Los parámetros de funcionamiento específicos proporcionados anteriormente son meramente ilustrativos, y otros valores están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, la velocidad de flujo de material de bloqueo puede variar entre 5 a 20 ml/min, la distancia entre la boquilla de flujo del aerógrafo y la superficie de la placa puede variar entre 2 a 41 cm (1 a 16 pulgadas), y la presión de aire puede variar entre 34 a 207 kPa (5 a 30 psi). Se entiende que estos intervalos son meramente ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

35 Las figuras 7A a B muestran una serie de vistas laterales en sección transversal de una placa de microtitulación en un transportador que pasa bajo una pulverización de material de bloqueo. En la implementación mostrada, una boquilla 710 de pulverización se utiliza para aplicar el material 715 de bloqueo a la superficie de una placa de microtitulación. La placa 720 de microtitulación se coloca sobre un transportador 725, y el transportador se acciona en la dirección mostrada por la flecha 730 para mover la placa 720 de microtitulación por debajo de la pulverización del material 715 de bloqueo. Aunque no se muestra, una serie de placas de microtitulación se puede cargar en al transportador, en serie.

40 La boquilla 710 de pulverización puede ser una boquilla de pulverización de un aerógrafo, tal como se describió en más detalle anteriormente. Además, la boquilla 710 de pulverización puede ser estacionaria, o la boquilla 710 de pulverización se puede mover de lado a lado (con relación a la dirección de desplazamiento del sustrato 730) con el fin de proporcionar una cobertura uniforme de material 715 de bloqueo sobre toda la superficie de la placa 720 de microtitulación.

45

Reivindicaciones

1. Un procedimiento que comprende:

5 suministrar un sustrato de ensayo que tiene al menos una superficie, teniendo una primera parte de la superficie del sustrato al menos un rasgo de análisis de la misma, y una segunda parte de la superficie del sustrato que carece de rasgos de análisis, siendo el sustrato de ensayo una placa de microtitulación, teniendo la placa de microtitulación una pluralidad de depósitos, y estando dispuesto el al menos un rasgo de análisis dentro de uno de los depósitos;

generar una pulverización de un material de bloqueo en la proximidad de la superficie del depósito;

continuar la generación de pulverización en la proximidad de la superficie del depósito al menos hasta que la segunda parte del depósito del sustrato esté cubierta sustancialmente por el material de bloqueo; y

10 añadir material de bloqueo para el al menos un depósito a través de una pipeta.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la pulverización del material de bloqueo es generada mediante un aerógrafo.

15 3. El método de la reivindicación 2, en el que el aerógrafo que genera un patrón de pulverización tiene un eje central, y el aerógrafo está en relación con el sustrato para mantener el eje central del modelo de pulverización sustancialmente normal a la al menos una superficie del sustrato.

4. El método de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que el aerógrafo, durante su funcionamiento, tiene una velocidad de flujo de material de bloqueo a través del aerógrafo y una presión de suministro de aire, variando la velocidad de flujo a través del aerógrafo de aproximadamente 5 ml/min a aproximadamente 20 ml/min, y variando la presión de suministro de aire de aproximadamente 34 kPa a aproximadamente 207 kPa.

20 5. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que la pulverización del material de bloqueo se origina en una boquilla, estando la superficie del sustrato dentro de aproximadamente 2 cm a aproximadamente 41 cm de la boquilla.

25 6. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que la pulverización del material de bloqueo se origina en una boquilla, comprendiendo además el método mover al menos uno de, la boquilla y el sustrato de ensayo, uno con relación a otro, para distribuir el material de bloqueo sobre sustancialmente toda la superficie del sustrato.

7. El método de la reivindicación 6, que comprende además:

disponer el sustrato de ensayo en un transportador, estando dispuesta una parte del transportador por debajo de la boquilla; y

accionar el transportador para llevar el sustrato de ensayo a la pulverización de material de bloqueo.

30 8. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que se añade el material de bloqueo a lo largo de una parte de la pared del depósito.

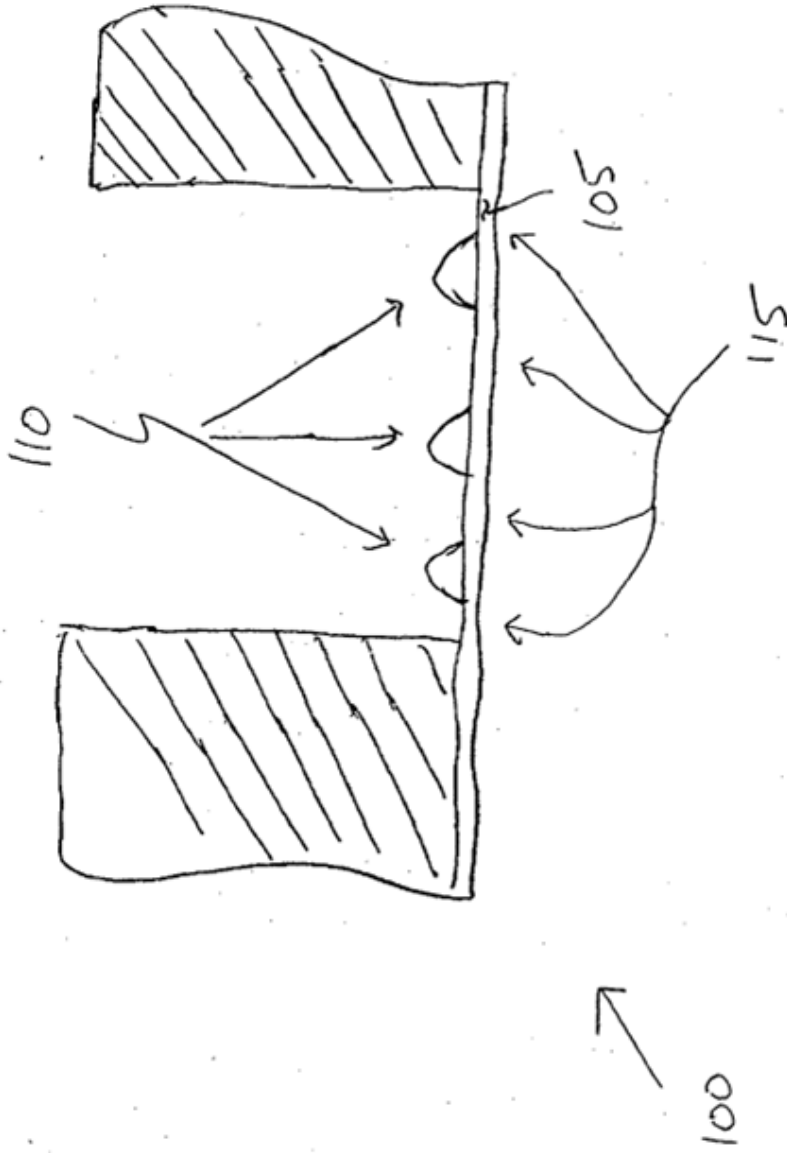


Figura 1

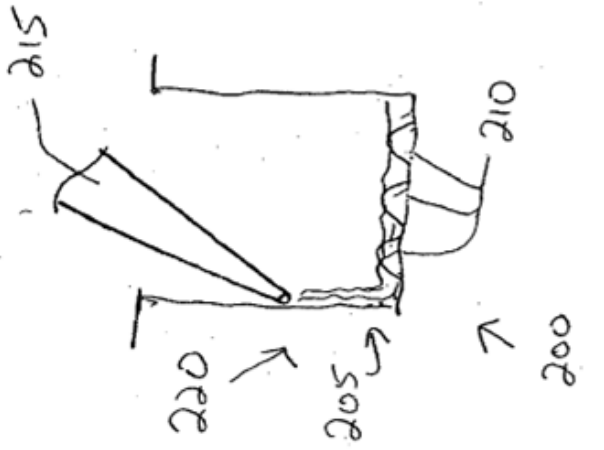


Figure 2A

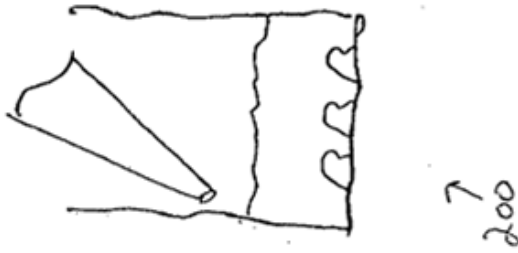


Figure 2B

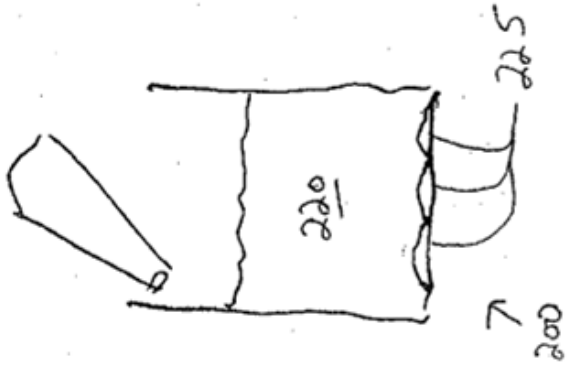


Figure 2C



Figure 3

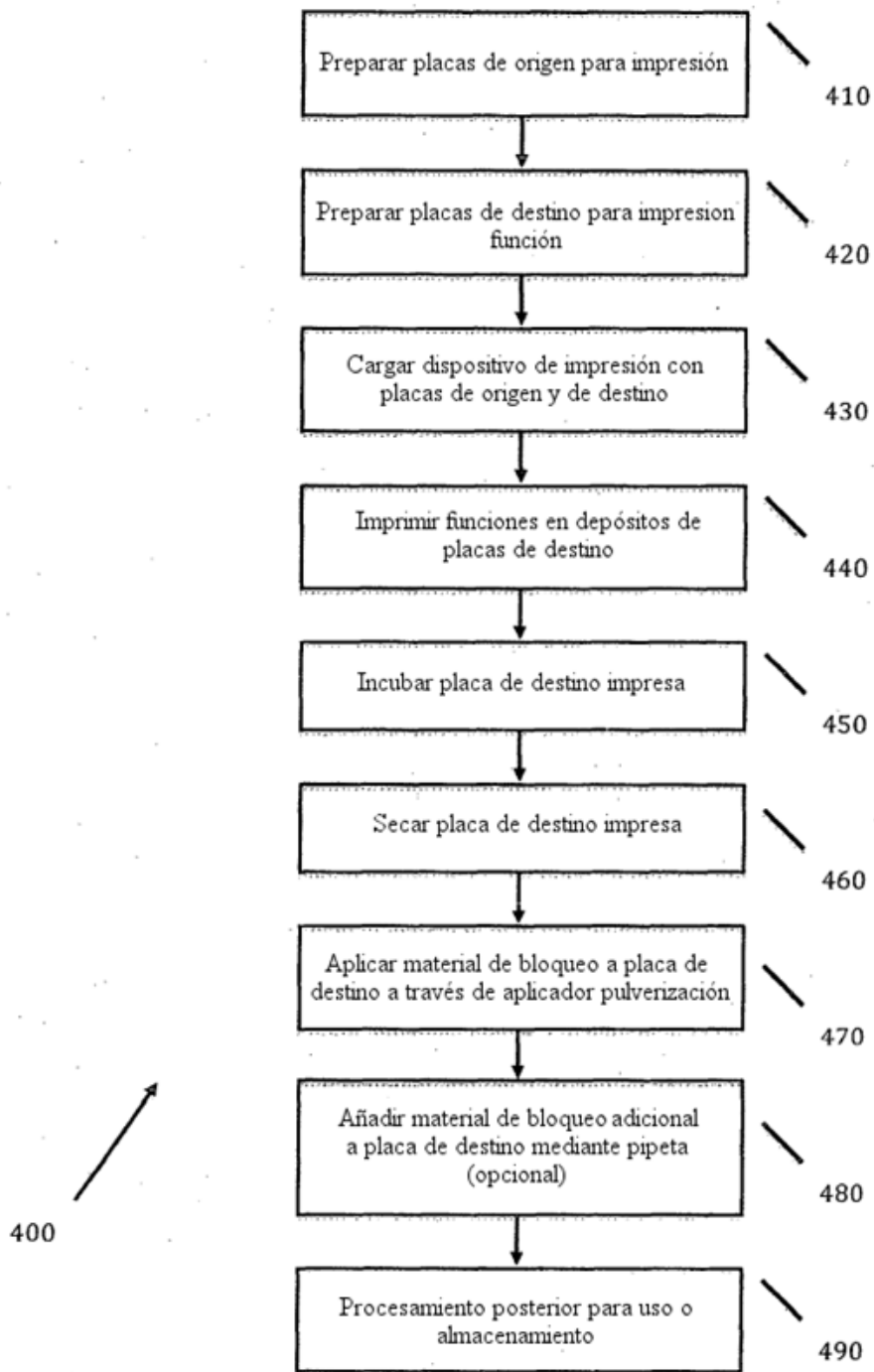
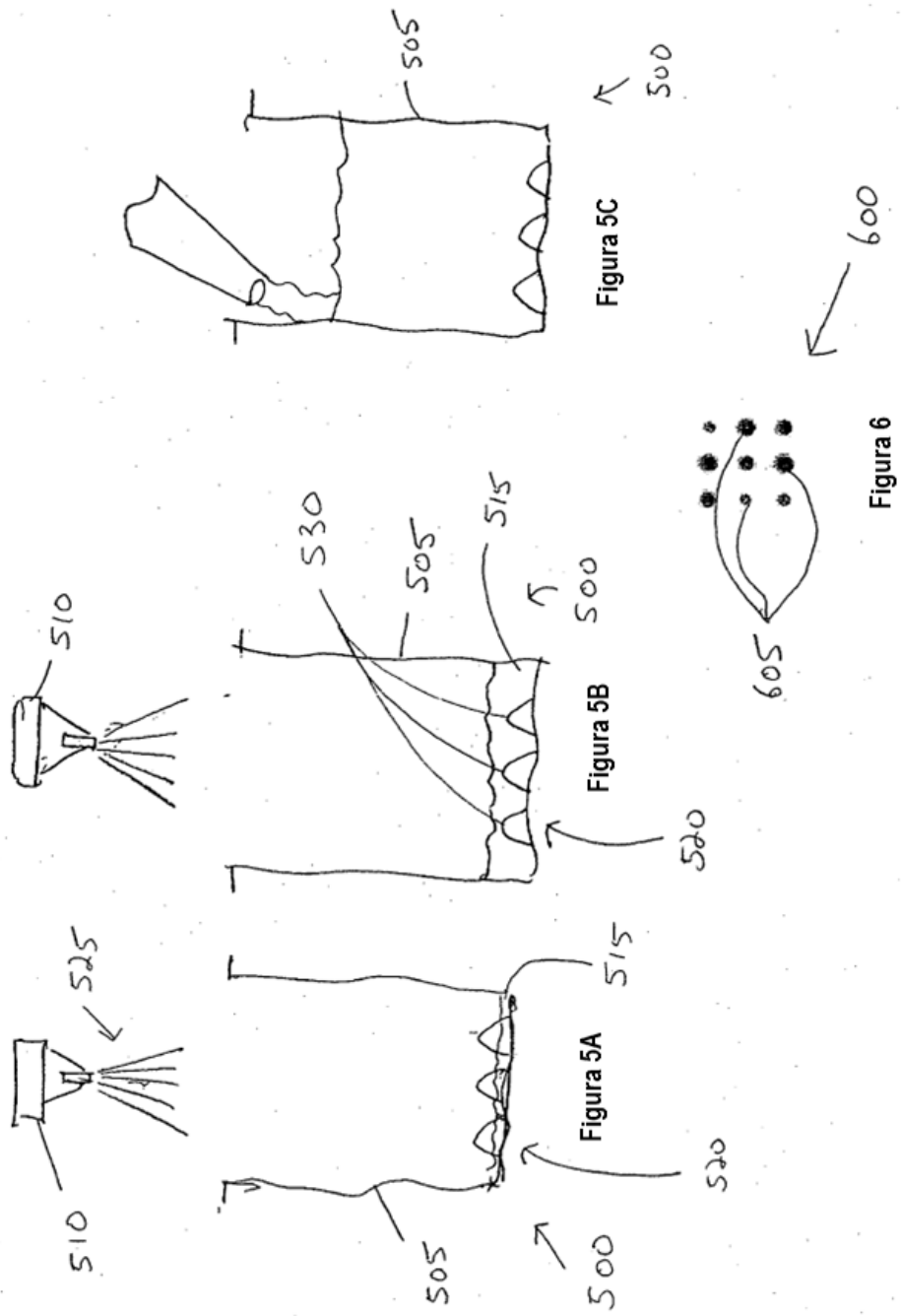


Figura 4



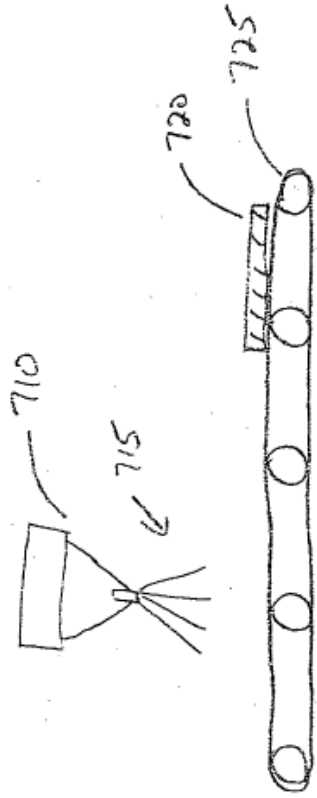


Figure 7A

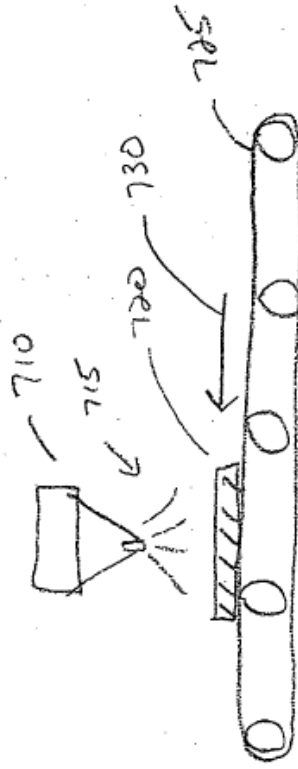


Figure 7B