

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 499**

51 Int. Cl.:

**H01J 49/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2008 PCT/EP2008/010421**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2009 WO09077106**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2008 E 08863136 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2232523**

54 Título: **Análisis de células biológicas únicas**

30 Prioridad:

**14.12.2007 DE 102007060438**

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

**06.05.2019**

73 Titular/es:

**BRUKER DALTONIK GMBH (100.0%)  
Fahrenheitstrasse 4  
28359 Bremen, DE**

72 Inventor/es:

**DEININGER, SÖREN-OLIVER**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 711 499 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****Análisis de células biológicas únicas**

La invención se refiere al análisis del tipo, estado u otros rasgos distintivos de las células individuales de fluidos corporales, frotis o tejidos.

- 5 La invención comprende las etapas de depositar las células, con una mínima superposición posible, sobre un soporte de muestra para espectrometría de masas, determinar las coordenadas de las células, cubrir el soporte de muestra con una capa de pequeños cristales de una sustancia matriz, colocar las células, dentro de un espectrómetro de masas, según sus coordenadas conocidas con un dispositivo de movimiento dentro de la posición del foco del láser, adquirir espectros de masas de las células individuales con ionización de los componentes  
10 celulares por desorción por láser asistida por matriz, y usar los espectros de masas para un análisis del tipo, estado u otros rasgos distintivos de las células.

**Técnica anterior**

- 15 La formación de imágenes por el análisis por espectrometría de masas de secciones histológicas finas u otras muestras planas con ionización de las moléculas de interés usando la desorción por láser asistida por matriz (MALDI) ha experimentado recientemente un incremento excepcional en popularidad. En general, el método se usa para medir las distribuciones de proteínas específicas que, o bien solas o en combinación con otras proteínas, pueden servir como biomarcadores para la visualización de diversos órganos y, sobre todo, para caracterizar los estados de estrés o enfermedad de las regiones individuales de la muestra plana. Actualmente otro método no puede caracterizar estos estados de estrés o enfermedad de manera tan fiable y rápida. Un método de este tipo se describe en la solicitud de patente DE 10 2004 037 512.7 (D. Suckau et al., GB 2 418 773 A, US-2006-0006315-A1).

20 La solicitud de patente GB 2 422 052 A describe la formación de imágenes de portaobjetos de tejido y células únicas por tanto microscopía de masas óptica como MALDI. Se puede conservar una correlación entre las imágenes iónicas específicas y los rasgos histológicos observados por microscopía óptica.

- 25 En estos procesos, generalmente se aplican secciones finas a portaobjetos de espécimen especiales, cuya transparencia permite la observación microscópica y los cuales están provistos de una capa conductiva de manera que después, en el espectrómetro de masas, pueden proporcionar un potencial definido para la aceleración de los iones generados en el mismo.

- 30 La muestra plana sobre el portaobjetos de espécimen se debe cubrir con una capa de pequeños cristales de la matriz de un modo especial para asegurarse que las proteínas y también otras sustancias de interés se puedan ionizar eficazmente. Un método de cubrimiento particularmente favorable se describe en la solicitud de patente DE 10 2006 059 695.1 (M. Schürenberg, GB 2 446 251 A, US 2008/0142703 A1). Este método de pulverización o nebulización está ópticamente controlado, consiguiendo de ese modo una cobertura reproducible densa con una capa de cristales de la matriz entre 20 y 50 micras de grosor. Las moléculas proteicas, en particular, se sacan de la muestra a la superficie de la capa. En combinación con perfiles del rayo láser especiales, la capa matriz sorprendentemente, y al contrario de lo que se ha creído anteriormente, demuestra una sensibilidad muy alta, de manera que se pueden analizar las proteínas más importantes de incluso regiones muy pequeñas de la sección histológica fina. El entendimiento convencional era que solamente un ion analito se formaría a partir de 10.000 moléculas de analito. Sin embargo, por razones que aún no se han entendido, la producción de iones proteicos a partir de la capa de cristales finos de la matriz parecen ser mayor que este en un factor de al menos 100, y  
40 posiblemente 1.000, cuando se usan perfiles del rayo láser especiales.

- 45 Cuando se usan perfiles del rayo láser especialmente formados, tales como aquellos presentados en la solicitud de patente DE 10 2004 044 196 A1 (A. Hase et al., GB 2 421 352 A, US 7.235.781 B2), el análisis de las proteínas se puede restringir a regiones con un diámetro de solamente aproximadamente cinco micras. El perfil del rayo láser consiste principalmente en uno o más puntos del rayo láser, cada uno con un diámetro de solamente cinco micras o menos. Debido a la ligera difusión lateral cuando se aplica la capa matriz, la resolución espacial cuando se mide la distribución de las moléculas en las muestras planas es normalmente de aproximadamente 20 micras, lo cual es perfectamente adecuado para la mayoría de las aplicaciones.

- 50 Para obtener una medición de buena calidad, con alta sensibilidad y buena precisión en la medición de la concentración, no es suficiente, sin embargo, registrar un espectro único basado en un único pulso de láser. Más bien, se añaden entre 20 y 500 espectros individuales para formar un espectro suma. Cuando, a continuación, se usa el término "espectro de masas", es este espectro suma el que siempre se supone. Si se aprovecha completamente la resolución espacial tomando las mediciones con una espaciado de cuadrícula de 20 micras, esto significa que 250.000 espectros de masas, compuestos de muchos millones de espectros individuales, se registrarán por cada centímetro cuadrado de sección fina. Si la velocidad de registro es un espectro de masas por  
55 segundo en base a, por ejemplo, 200 espectros individuales registrados a 200 Hz, este proceso tomará aproximadamente 70 horas por centímetro cuadrado.

Por supuesto, también se pueden elegir resoluciones espaciales inferiores; para secciones transversales tomadas por los cuerpos de, por ejemplo, ratones o ratas, espaciamentos de cuadrícula de entre 200 y 500 micras permiten una distribución muy buena de sustancias analito a través de los órganos individuales y espacios intermedios a medir. En la presente memoria solamente 2.500 o 400 espectros de masas respectivamente necesitan ser registrados por centímetro cuadrado; no obstante, estos aún pueden comprender entre cien mil y un millón de espectros individuales. En este caso de nuevo, la capacidad de registrar el espectro individual a una alta frecuencia, preferentemente más de 1.000 espectros individuales por segundo, es deseable. Sin embargo, estos espectros individuales no se deben tomar desde un punto único para evitar el sobrecalentamiento de la capa matriz en este sitio. Por lo tanto, es conveniente variar continuamente las coordenadas de registro y, en casos particularmente críticos, bajar la tasa de registro a, por ejemplo, solamente 200 espectros individuales por segundo.

Sin embargo, no es solo de interés el análisis por espectrometría de masas del estado de los tejidos de partes de secciones histológicas finas, sino también el análisis de las células individuales de frotis, fluidos corporales o tejidos. Los análisis pueden estar dirigidos a la determinación del tipo de células, o se pueden orientar hacia el estrés, enfermedad o infección de las células individuales. Incluso es interesante la determinación sencilla de rasgos distintivos, y las razones para los rasgos distintivos no tienen que ser aún conocidas.

Para dicho análisis, las células, si no están ya distribuidas en fluidos corporales, se deben dispersar, separar unas de otras, en un líquido. El equipo está comercialmente disponible específicamente para preparar las células a partir de líquidos sobre portaobjetos de espécimen. En la presente memoria, las células se aplican a una región pequeña del portaobjetos de espécimen, por ejemplo un centímetro cuadrado, mediante centrifugación suave; se aplanan sin ser dañadas, y ocupan un espacio con un diámetro de aproximadamente 20 micras. Las células de tejidos tales como médula ósea también se pueden distribuir en líquidos y, a continuación, se aplican a portaobjetos de espécimen, usando procedimientos especiales. Si el número de células en el líquido es bastante pequeño, habrá muy pocas superposiciones, y el especialista en medicina será capaz de observar las células individualmente bajo un microscopio. Un "número bastante pequeño" de células en la presente memoria significa desde unos pocos cientos hasta un máximo de aproximadamente 10.000 células por centímetro cuadrado. El óptimo para el porcentaje más bajo posible de superposiciones es alrededor de 3.000 células por centímetro cuadrado.

El propósito de dicho análisis es con frecuencia determinar la presencia de unas pocas células anormales, células tumorales por ejemplo, entre un gran número de células normales; esto es una tarea laboriosa y muy agotadora si el especialista en medicina tiene que examinar las células visualmente. Para muchos de estos casos, los métodos de tinción o bien no se conocen o con frecuencia no proporcionan contraste muy alto; la detección visual de células tumorales está afectada por un gran número de influencias subjetivas y es difícil de conseguir un análisis objetivo. Por lo tanto, se requieren métodos automatizables para esta tarea.

Las áreas de tejido con células anormales, células tumorales por ejemplo, en secciones finas pueden, en principio, ser reconocidas como tales en base a sus espectros de masas, aunque estas regiones de tejido normalmente se mezclan con una gran proporción, con frecuencia hasta 80%, de las células sanas. Una solución obvia es cubrir el portaobjetos de espécimen, al cual se han aplicado las células, con material matriz, del mismo modo que las secciones finas y, a continuación, escanearlo en un espectrómetro de masas sobre un patrón de cuadrícula para obtener espectros de masas de las células individuales. Si todas las células individuales, sin excepción, son para ser analizadas, el espaciamento de cuadrícula debe ser denso, teniendo una afinación de como máximo 20 micras. Un área de un centímetro cuadrado, esto conduce al número, mencionado anteriormente, de 250.000 espectros de masa, incorporando millones de espectros de masas, y al tiempo, también mencionado anteriormente, de 70 horas, aunque puedan haber solamente aproximadamente 1.000 a 10.000 células sobre la superficie. La gran mayoría de los espectros de masas están vacíos.

Los métodos de esta clase son solamente posibles si se usan láseres de estado sólido. Los láseres de nitrógeno en su mayoría usados hasta ahora tienen un tiempo de vida de solamente aproximadamente un millón de pulsos de láser. Los láseres de estado sólido tienen un tiempo de vida considerablemente mayor, pero requieren de medidas de formación de rayo especiales, las cuales pueden, sin embargo, estar diseñadas de un modo que es ventajoso al análisis. Los espectros de masas que funcionan con láseres de estado sólido ya están comercialmente disponibles.

Cuando en la presente memoria se refiere al "estado de las células", esto se debería entender en el sentido de un estrés, un cambio patológico, una infección u otro cambio desde un estado metabólico normal del mismo tipo de célula. Como ya se ha explicado, las células tumorales son de particular significancia para este método; el tejido tumoral se puede distinguir claramente del tejido sano por espectrometría de masas. En términos generales, debe ser posible reconocer el estado a partir del patrón de concentraciones de sustancia que se pueden detectar en la célula por espectrometría de masas. Las sustancias pueden ser péptidos o proteínas que se subexpresan o sobreexpresan, para crear un patrón característico. Sin embargo, también pueden ser modificaciones postraducción de proteínas o productos de descomposición (metabolitos), o acumulaciones de otras sustancias, tales como lípidos en el tejido.

**Objetivo de la invención**

El objetivo de la invención es analizar el tipo y el estado de las células individuales con un máximo grado posible de automatización.

**Breve descripción de la invención**

5 La invención aprovecha el reconocimiento sorprendente de que las células individuales pueden en realidad ser analizadas por espectrometría de masas. Usando las medidas anteriormente descritas, la sensibilidad de la detección por espectrometría de masas se puede incrementar a un punto en el que los espectros de masas evaluables se pueden obtener a partir de más de  $10^8$  moléculas proteicas en una célula, con aproximadamente  $10^7$  moléculas para la proteína más común y solamente aproximadamente  $10^5$  moléculas para una proteína a un límite deseado de detección.

10 La invención comprende las etapas según la reivindicación 1.

Los espectros de masas de las células individuales en diferentes estados difieren más claramente unos de otros que los espectros de masas de regiones de tejido en secciones finas, puesto que estas últimas en general contienen espectros mezclados. Por tanto, los espectros de masas de células tumorosas aisladas y de individuo sano difieren incluso más profundamente que las regiones de tejido equivalentes en secciones finas.

15 A través de la formación favorable del rayo, el tiempo de registro para 3.000 espectros suma de 3.000 células, a una tasa de registro de solamente 200 espectros únicos por segundo, se puede mantener a 20 minutos; a tasa de pulso de láser mayores, los tiempos son incluso más cortos.

20 Las células se pueden cualquiera aplicar a la placa de soporte mediante centrifugación suave, los dispositivos para dicho propósito están comercialmente disponibles. Los portaobjetos de espécimen especialmente preparados se pueden usar, por ejemplo, como placa de soporte. Las células se pueden aplicar alternativamente haciendo un frotis o por sedimentación. Para determinar las coordenadas de posición, los registros microscópicos o las fotos por contacto digitales según la técnica anterior son particularmente adecuadas; en la presente memoria de nuevo, los dispositivos técnicos simples están en el mercado. El contraste se puede destacar por tinción, o en el caso de los registros microscópicos, por iluminación de campo oscuro o contraste de fase. Las técnicas de tinción y los agentes que no interfieren con MALDI son conocidos. Los programas de análisis de imagen para este propósito pueden determinar no solamente las coordenadas de posición de los centros celulares, sino también otros parámetros tales como diámetro o parámetros de superposición. Los programas de evaluación de imagen incluso pueden diferenciar ente relativamente pocas células de interés y una gran mayoría de otras células, o bien por tamaño, color o forma, para acelerar el proceso de diagnóstico. Los dispositivos comerciales están disponibles para aplicar la capa matriz; sin embargo, dependiendo de los métodos usados, los dispositivos dan diferentes sensibilidades como resultado producciones de ionización distintos. Los espectrómetros de masas MALDI también están comercialmente disponibles los cuales ofrecen suficiente precisión para el movimiento del portaobjetos de espécimen y también una velocidad bastante alta para registrar los espectros de masas.

35 Los programas adecuados también están disponibles para determinar el estado de las células y otros rasgos distintivos en base a los datos espectrales. El estado finalmente se puede leer a partir de un valor de estado o vector de estado sobre una escala de estado unidimensional o multidimensional; el cálculo del valor o vector de estado se basa en la presencia o ausencia de las señales para proteínas individuales, y a partir de las relaciones de intensidad entre las señales. El cálculo de un valor de estado puede emplear expresiones bastantes complicadas que implican las intensidades de señal  $I(m)$ , en donde  $I$  representa la intensidad y  $m$  la masa de los iones asociados con esa señal.

45 El método por el cual se calcula el valor de estado se puede especificar como una fórmula parametrizada, pero por otra lado se puede usar un análisis matemático-estadístico de generación de clase, con o sin instrucción inicial (programas de enseñanza supervisados o no supervisados). Los valores de estado o vectores de estado se pueden usar para representar los estados en color falso sobre una imagen microscópica.

**Breve descripción de las ilustraciones**

50 La Figura 1 muestra un detalle de una placa de soporte con células que se han aplicado mediante centrifugación suave. Cada una de las células aplanadas, casi circulares, tiene un núcleo localizado cerca del centro de la célula. En esta figura, las células tienen una forma muy uniforme, en otros casos, las células pueden tener formas, colores o tamaños bastantes diferentes.

**Las mejores realizaciones**

55 La invención puede estar dirigida principalmente a la determinación del tipo o la identidad de las células, que significa el tipo de órgano o tejido del cual viene. Los espectros de masas de las células normalmente revelan su origen, lo cual con frecuencia se pueden limitar muy precisamente a una subregión particular u orgánulo de un órgano.

Además, la invención pueden servir para determinar el estado de una célula individual, causado por una edad de crecimiento particular, nutriente, estrés químico o físico, degeneración por una enfermedad, o infección. El estrés químico, por ejemplo, se puede generar por fármacos, y el estrés físico por el efecto de la temperatura o la radiación; ambas pueden conducir a daño celular importante.

- 5 La invención se puede usar para investigar un gran número de células individuales para diferencias conocidas o desconocidas, todavía previamente no descubiertas, entre diferentes clases de célula. Las diferencias entre las clases se pueden identificar automáticamente por programas estadísticos en base a diversos rasgos que aparecen en los espectros de masas. Las diferencias en estos rasgos se pueden atribuir a diversas subespecies de las células de un tejido u órgano, a diferencias en su función, o a otras diferencias en el estado celular, tal como aquellas resultantes de diferente dieta o estrés.

Los tipos de células y muchos de sus estados y otras características se reflejan en la composición cuantitativa, o incluso cualitativa, de las sustancias en el interior de las células, de manera que en casi todos los casos estas diferencias se pueden detectar en los espectros de masas de MALDI.

- 15 La invención es, por ejemplo, de particular importancia para la detección automatizada de células tumorales, particularmente la detección de un número muy pequeño de células tumorales entre una gran mayoría de células sanas. Es sorprendente que a partir de los constituyentes de una célula única, en particular las proteínas, la ionización por desorción por láser asistida por matriz puede producir espectros de masas que ofrecen procedimientos de análisis tan eficaces que se puede lograr un tarea de esta naturaleza.

- 20 La invención básicamente consiste en analizar individualmente un gran número de células biológicas, comprendiendo las siguientes etapas:

a) aplicar las células a una placa de soporte;

b) determinar las coordenadas de posición de las células;

c) aplicar una capa de cristales del material matriz

- 25 d) adquirir los espectros de masas individuales de al menos una proporción de las células individuales utilizando las coordenadas de posición, con ionización de los constituyentes celulares por desorción por láser asistida por matriz; y

e) evaluar los espectros de masas para determinar el tipo, estado u otros rasgos característicos de las células.

- 30 En la etapa a) las células se aplican, tan aisladas como sea posible unas de otras, a una placa de soporte tal como un portaobjetos de espécimen que también se puede usar como un soporte de muestra para espectrometría de masas. Para proporcionar un potencial eléctrico definido en los espectrómetros de masas, la superficie de la placa de soporte debería ser eléctricamente conductiva. Pero la placa de soporte no tiene que ser transparente; otras placas de soporte, tales como las placas de metal, se pueden usar, siempre que sea posible conseguir imágenes suficientemente buenas de las células aplicadas.

- 35 Las células se pueden aplicar en la etapa a) usando un método tal como centrifugación moderada de un líquido; directamente del fluido corporal, por ejemplo. En esta fase es necesario asegurarse de que no más de aproximadamente 10.000 células se aplican a cada centímetro cuadrado para mantener el número de superposiciones pequeño. Una figura de alrededor de 3.000 células por centímetro cuadrado es favorable, pero también hay otras aplicaciones diagnósticas útiles o de investigación en las que se aplican solamente aproximadamente cien o menos células. Las células pueden estar ya contenidas en el fluido cuando se separan del cuerpo, o se pueden añadir al fluido como células de tejido separadas, como en el caso de las células de biopsias de médula ósea. Las células de tejido se pueden separar disolviendo los enlaces intercelulares, por ejemplo, por separación enzimática. Además, las células se pueden seleccionar usando un clasificador celular, aunque esto no es necesario. La centrifugación suave aplanan las células sobre el soporte sin dañarlas; así adoptan una forma casi circular con un diámetro de aproximadamente 10 a 25 micras, con el núcleo celular casi exactamente en el centro de la célula. A continuación, las células aplicadas normalmente se secan, como resultado de lo cual se unen firmemente a la placa de soporte.

En la etapa a) las células también se pueden aplicar usando otros métodos tales como la realización de un frotis, sedimentación sencilla de un fluido con posterior decantación y secado, o por microdissección asistida por láser. En la presente memoria también, el secado causa que las células inicialmente perdidas se encojan, aplanen y adhieran al soporte.

- 50 Una vez que las células se han aplicado a la placa de soporte, se pueden observar con medios ópticos, tales como un microscopio. En la Figura 1 se muestra una foto esquemática de células muy uniformes sobre un soporte de muestra; sin embargo, las células no podrían ser así de uniformes en otros casos. Se pueden aplicar colorantes para aumentar el contraste; se sabe que los agentes de tinción no interfieren con los registros de espectrometría de masas tomados con MALDI. Un microscopio con iluminación de campo oscuro, la cual muestra las células brillantes frente a un fondo oscuro, es particularmente favorable. Las imágenes digitales se pueden producir por fotografía

microscópica, o tomar por contacto directo en dispositivos relativamente sencillos; preferiblemente se debería alcanzar una resolución de aproximadamente dos micras. Dichas imágenes digitales se pueden emplear para determinar las coordenadas de posición de las células.

5 Los programas de ordenador evaluadores de imágenes son conocidos y ampliamente usados. Se pueden usar para determinar el centro de las células circulares así como otros parámetros tales como el diámetro, no circularidad, y el grado y dirección de la superposición. Las coordenadas de posición y algún otro parámetro asociado se almacenan en un listado informatizado, el cual más tarde se usa como la base para la medir los espectros de masas. Las coordenadas de posición se refieren a puntos de marcación especiales sobre la placa de soporte, los cuales también se pueden detectar durante la posterior medición por espectrometría de masas.

10 La evaluación de imágenes también se puede usar para buscar, seleccionar y marcar subgrupos particularmente de interés de células entre grandes números de células "normales", si estas son visualmente reconocibles. La marcación de las células de interés puede acortar considerablemente el análisis por espectrometría de masas. La selección se puede referir al tamaño, forma o color de las células, posiblemente después de la tinción. Un ejemplo puede ser la selección del subgrupo de un tipo particular de leucocitos teñibles en sangre que consiste  
15 principalmente en una mayoría aplastante de eritrocitos.

Una vez que se ha creado el listado de las coordenadas de posición, la placa de soporte, con las células aplicadas a ella, se cubre de un modo apropiado en la etapa c) con una capa de cristales pequeños de la matriz. El método se describe en la solicitud de patente DE 10 2006 059 695.1 (M. Schürenberg), citada anteriormente. En la presente memoria, las nubes de gotas de vaho separadas de la solución matriz se depositan sobre la placa de soporte, a  
20 partir de lo cual se forman cristales de la matriz extremadamente finos durante el proceso de secado, y cada capa se seca casi completamente. El proceso se controla midiendo la luz de dispersión. La aplicación repetida de las capas de gotas de vaho separadas causa que las proteínas se extraigan de las células y, así parece, se transportan en una forma muy purificada a la superficie de la capa de cristal, como resultado de lo cual la ionización en el proceso de MALDI produce una producción extremadamente alta de iones proteicos. Al final, la placa de soporte parece similar  
25 a un paisaje cubierto con escarcha fina; las células ya no son visibles. El grosor de la capa depende de la producción de ionización óptima y, sorprendentemente, es relativamente gruesa, a aproximadamente 20 a 50 micras. La difusión lateral de las proteínas es relativamente baja, siendo menos de 15 micras.

La medición por espectrometría de masas de los perfiles proteicos se lleva a cabo favorablemente en el vacío del espectrómetro de masas, aunque los ensayos razonablemente exitosos han generado iones fuera del espectrómetro  
30 de masas en el gas ambiente que usa MALDI. Los espectrómetros de masas con tiempo de vuelo MALDI en vacío están normalmente equipados con dispositivos de movimiento suficientemente precisos para las placas de soporte.

Las células individuales, cuyas coordenadas de posición son conocidas, se mueven por el dispositivo de movimiento de la fuente de iones del espectrómetro de masas a la localización del foco del láser de UV pulsado firmemente montado. Se puede realizar una elección entre solamente medir las células completamente aisladas o también medir  
35 las células que se superponen por no más de un umbral dado. En el caso de células que se superponen, la difusión lateral de las moléculas proteicas fácilmente pueden dar como resultado espectros mezclados, los cuales no pueden administrar ningún descubrimiento concluyente. Cuando las células se superponen, es posible acercar las células de manera descentralizada de tal modo que se eviten esos espectros mezclados tanto como sea posible. Con células muy grandes se ha mostrado favorable para evitar el movimiento al centro de la célula, ya que este es donde el núcleo se localiza en la gran mayoría de los casos; las señales del núcleo puede enmascarar las proteínas de la célula.  
40

Los láseres UV pulsados con duraciones de pulso de entre 0,1 y 10 nanosegundos se usan para la ionización. Los pulsos de láser cortos por debajo de un nanosegundo son preferidos debido a que incrementan la producción iónica. Las lentes especiales permiten diámetros del foco del láser de 5 micras o menos; también es posible generar o bien  
45 uno o varios puntos focales que se dan simultáneamente. Para la presente tarea es, por ejemplo, favorable usar tres o cuatro puntos focales dispuestos como un triángulo o cuadrado, con sus puntos centro aproximadamente 10 micras aparte, puesto que el número absoluto de iones formados se aumenta con el número de puntos focales. Por otro lado, no se deberían usar más puntos focales que este ya que luego ya no es posible apuntar a una única célula. Cada uno de los puntos focales del láser se deberían mover un poco desde un pulso al próximo, de manera  
50 que no se mezcle el conglomerado de cristales de la matriz. Los cristales de la matriz tienen diámetros de casi una micra. Se debería generar un tipo de movimiento que preferiblemente barra el área de la célula uniformemente en pulsos de láser consecutivos, por ejemplo, un movimiento cicloidal circulante.

El uso de cuatro puntos focales permite que el número de espectros individuales necesario para generar un espectro de masas bien evaluable se reduzca a alrededor de 50 disparos de láser. A una tasa de pulso de láser de 200 Hz,  
55 por lo tanto, es posible registrar aproximadamente tres espectros de masas, que pertenecen a tres células, cada segundo, incluyendo los tiempos de tránsito de la placa de soporte de muestra. Por lo tanto, si 3.000 células se aplican a una placa de soporte, se requieren aproximadamente 20 minutos para registrar los espectros de masas de todas las células. Estos son tiempos muy aceptables que hacen que la aplicación rutinaria del método valga la pena recomendar. Los tiempos como este pueden competir con la inspección visual, además de lo cual el método es

menos agotador. Sobre todo, el método es más objetivo y es enteramente reproducible. La probabilidad de una falsa determinación se reduce significativamente. Ya no hay ninguna cuestión de decisiones intencionadas.

Se han desarrollado programas para evaluar los espectros de masas que hasta ahora se han usado para la formación de imágenes por espectrometría de masas sobre secciones de tejido finas. Por tanto, estos programas corresponden a la técnica anterior, y son familiares para los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden caracterizar ciertos estados de las células de un tejido usando la escala de valor de los valores de estado o, en el caso de evaluación multidimensional, la escala de valor de los vectores de estado; los valores de estado se calculan como expresiones matemáticas, las cuales se pueden componer de cualquier medio deseado a partir de las señales  $I(m)$ . Los valores de estado pueden ser unidimensionales o, como los vectores de estado, también pueden ser multidimensionales, lo cual permite la asignación a diversas clases de tipo y estado. La forma más favorable de las expresiones matemáticas para calcular los valores de estado se pueden obtener de un análisis matemático-estadístico de espectros de masas obtenidos a partir de células precisamente caracterizadas de diferentes tipos o estados.

Los programas para evaluar los espectros de masas también pueden usar rutinas matemáticas/estadísticas que son independientemente capaces de determinar las clases en base a diversos rasgos de caracterización, calcular las expresiones de generación de clase para los rasgos distintivos. En la presente memoria es posible especificar las clases, por ejemplo, marcando las células de interés sobre la imagen presentada digitalmente ("programas de aprendizaje supervisado"). Otros programas forman clases automáticamente ("programas de aprendizaje no supervisado", "análisis de conglomerados ("análisis cluster)"). Estos métodos también pertenecen a la técnica anterior.

El término "espectro de masas" con frecuencia se usa en la presente memoria para referirse a un perfil proteico. Sin embargo, se debería indicar que los perfiles pueden relacionarse con sustancias que no son proteínas, o que incluyen otras sustancias además de proteínas. Con frecuencia se encuentran lípidos, por ejemplo, y también se sabe que estos proporcionan un patrón característico para el material tumoral. Por lo tanto, los términos "perfil proteico" y "proteínas de la célula", se deberían siempre entender como que potencialmente incluyen otras sustancias.

Sin embargo, la determinación del estado de las células individuales no está restringida al descubrimiento de células tumorosas. También se pueden encontrar células infectadas, tales como aquellas infectadas por virus, *Chlamydiae* o *Rickettsia*. Las células que han muerto también se pueden detectar y en muchos casos es incluso posible determinar la razón de la muerte de la célula.

El método según la invención permite que se investigue el tipo, origen o estado de una célula individual; los estados más importantes de interés son anormalidades patológicas o infecciosas, la mayoría particularmente anormalidades tipo tumor. La ventaja cae en la valoración objetiva, no implicando el espacio normal para la opinión subjetiva. Las células tumorosas, en casi todos los casos, se pueden detectar muy claramente en base a sus espectros de masas, incluso más claramente que ha sido hasta ahora el caso para regiones en secciones finas, puesto que estas regiones también siempre contienen células sanas, y por lo tanto, administran espectros mezclados.

El método se abre a otra perspectiva: los portaobjetos de espécimen a los cuales se han aplicado las células se pueden lavar cuidadosamente con disolvente para separar la capa de cristales de la matriz. A continuación, a pesar del registro de los espectros de masas que ha tenido lugar mientras tanto, se restaura una condición muy cercana al original. El daño a las células, y la extracción de parte de sus constituyentes, es prácticamente indetectable. Este espécimen ya se puede teñir por cualquier método de tinción apropiado y, a continuación, está disponible para los chequeos visuales, o para propósitos de enseñanza o estudio. Los chequeos visuales ya se pueden hacer en el conocimiento de las investigaciones por espectrometría de masas. Es, en particular, posible estudiar la apariencia visual de diferentes estados celulares.

Un registro de esta imagen, como la imagen original de las células que se usó para determinar las coordenadas de posición, se puede cubrir con una imagen en color falso, reflejando los tipos u estados de las células, como es habitual para las secciones finas. En particular, las células, o bien en la imagen que se ha obtenido después de la espectrometría de masas o en la imagen original, se pueden colorear con colores falsos según su tipo o estado, haciendo así visibles los tipos o estados de las células. Estas imágenes se pueden, en particular, mostrar muy impresionantemente sobre las pantallas de ordenador, por ejemplo, sobre la pantalla del ordenador que también calcula la asignación de los tipos o estados.

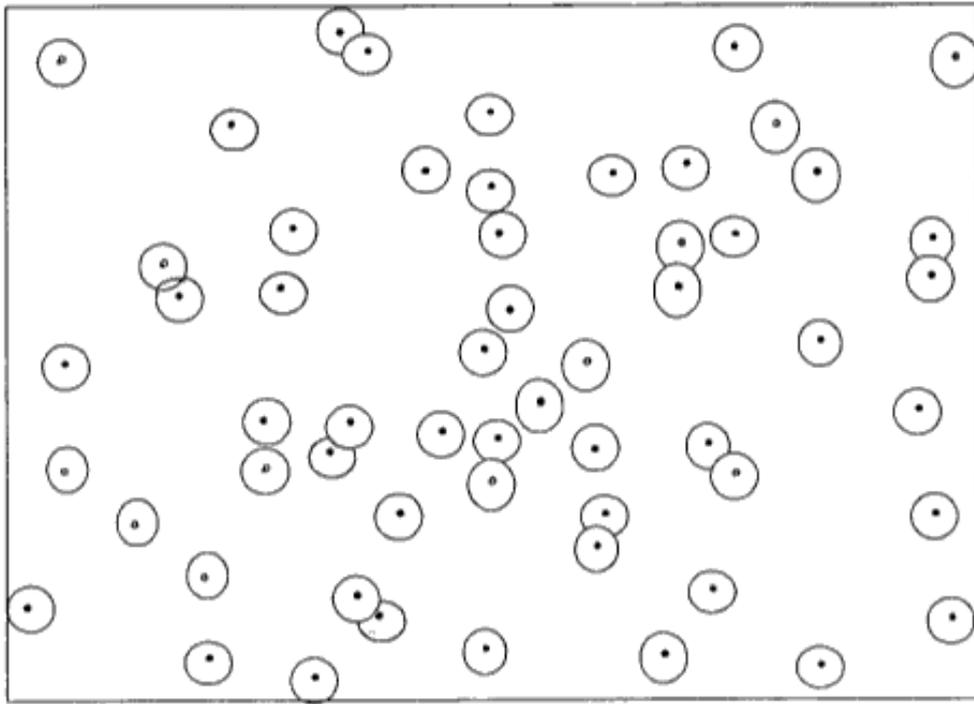
El método tiene el potencial de desarrollarse dentro de un procedimiento convencional para el examen de células individuales.

El método indicado en la presente memoria puede ser modificado de muchos modos por un experto en la técnica que tiene el conocimiento de la invención. Algunas de estas modificaciones ya se han indicado anteriormente; sin embargo, ciertamente hay otras variaciones que pueden generar los espectros de masas ricos en información deseados para las células individuales que se requiere identificar su tipo o su estado sobre la base fundamental de

su disposición separada seguido de la determinación de las coordenadas de posición. Estos métodos modificados están incluidos en la invención.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para el análisis de células biológicas individuales, que comprenden las etapas:
  - a) aplicar las células a una placa de soporte mediante centrifugación suave, realización de un frotis o sedimentación;
  - b) registrar una imagen de las células aplicadas por medios ópticos y determinar las coordenadas de posición de las células a partir de la imagen;
  - c) cubrir la placa de soporte con una capa de cristales del material matriz depositando y secando un vaho de solución matriz después de lo cual las células ya no son visibles;
  - d) adquirir espectros de masas individuales de al menos una proporción de las células individuales utilizando las coordenadas de posición, con ionización de los constituyentes celulares por desorción por láser asistido por matriz; y
  - e) evaluar los espectros de masas para determinar los tipos, estados u otros rasgos característicos de las células individuales.
2. Un método según la reivindicación 1, en donde las placas de soporte son portaobjetos de espécimen.
3. Un método según la reivindicación 1, en donde las células sobre la placa de soporte se tiñen.
4. Un método según la reivindicación 1, en donde las coordenadas de posición determinadas están relacionadas con las posiciones de referencia que también se pueden detectar en el espectrómetro de masas.
5. Un método según la reivindicación 1, en donde la imagen óptica se obtiene con un microscopio.
6. Un método según la reivindicación 5, en donde la iluminación del campo oscuro o el contraste de fase se usa en el microscopio.
7. Un método según la reivindicación 1, en donde los subgrupos de células se seleccionan de la imagen según su tamaño, forma, o color, y se marcan para el análisis por espectrometría de masas.
8. Un método según la reivindicación 1, en donde la ionización de los constituyentes de una célula se consigue por desorción por láser asistida por matriz usando un láser de estado sólido de UV pulsado con un perfil de rayo con forma.
9. Un método según la reivindicación 8, en donde el perfil del rayo contiene un número de puntos focales finos adyacentes.
10. Un método según la reivindicación 1, en donde el espectro de masas de una célula consiste en la suma de entre 20 y 500 espectros de masas individualmente adquiridos de la célula.
11. Un método según la reivindicación 10, en donde un valor de estado o vector de estado que caracteriza el tipo, estado u otros rasgos distintivos de la célula se calcula a partir del espectro de masas de cada célula.
12. Un método según la reivindicación 1, en donde después del análisis por espectrometría de masas de alguna o todas las células, la capa de cristales de la matriz se separa de la placa de soporte, de manera que las células, posiblemente después de teñirse, están disponibles para el examen visual en el conocimiento de los resultados de la espectrometría de masas.
13. Un método según la reivindicación 1, en donde las células sobre una imagen de las células sobre la placa de soporte se dan por coloración falsa según su tipo o estado, haciendo así visibles los tipos o estados de las células.
14. Un método según la reivindicación 1, en donde el análisis de los espectros de masas en la etapa e) también incluye la determinación de clases celulares coherentes conocidas o anteriormente desconocidas.
15. Un método según una de las reivindicaciones 1 a 14, en donde las células biológicas individuales son de un fluido corporal, un frotis o tejido de médula ósea proporcionadas como células separadas en un fluido.
16. Un método según una de las reivindicaciones 1 a 15, en donde no más de aproximadamente 10.000 células se aplican a la placa de soporte por centímetro cuadrado.
17. Un método según una de las reivindicaciones 1 a 16, en donde las células se colocan con un dispositivo de movimiento dentro de la posición del foco del láser según sus coordenadas de posición determinadas.



**Figura 1**