

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 783 830**

51 Int. Cl.:

**G01N 35/00** (2006.01)

**B01L 3/06** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

**G01N 35/02** (2006.01)

**G01N 35/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2013 PCT/EP2013/077171**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14096055**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2013 E 13811205 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 2936164**

54 Título: **Automatización de incubación, procesamiento, recolección y análisis de muestras en una placa multicelda con soporte de muestra de película delgada**

30 Prioridad:

**18.12.2012 US 201261738506 P**

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

**18.09.2020**

73 Titular/es:

**EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY  
LABORATORY (EMBL) (100.0%)  
Meyerhoferstrasse 1  
69117 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**CIPRIANI, FLORENT y  
MARQUEZ, JOSE ANTONIO**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 783 830 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

Automatización de incubación, procesamiento, recolección y análisis de muestras en una placa multicelda con soporte de muestra de película delgada

### Campo de la invención

- 5 La presente invención está relacionada con una placa multicelda para incubación, procesamiento, recolección y análisis automatizados de muestras de material biológico. Es más, la presente invención está relacionada con un sistema automatizado para incubación, procesamiento, recolección y análisis de muestras de material biológico. Además, la presente invención está relacionada con un método para hacer funcionar el sistema automatizado.

### Antecedentes de la invención

- 10 Se puede usar cristalografía macromolecular en academia e industria para análisis estructural de moléculas biológicas y para ayudar en el desarrollo de moléculas terapéuticas y otras bioactivas. Para esta finalidad se mezclan muestras con soluciones que contienen componentes que probablemente inducen formación de cristales en placas multicelda. Los cristales se tienen que exponer a potentes haces de rayos X para extraer información estructural.

- 15 Las placas multicelda usadas para cristalografía macromolecular, p. ej., para cristalización de proteínas, comprenden una pluralidad de celdas. Diferentes muestras con material biológico se pueden incubar en diferentes soluciones de cristalización en las diferentes celdas o cámaras de la placa multicelda. Los cristales pueden tardar de horas a varias semanas en aparecer, tiempo durante el que las placas multicelda se almacenan a temperatura constante y se inspeccionan regularmente bajo un microscopio con luz visible o UV.

- 20 Los cristales se pueden exponer a rayos X directamente en placas multicelda. Sin embargo esto produce un alto nivel de fondo debido a interferencia producida por el material de la placa multicelda, disminuyendo la calidad de los datos. Más a menudo los cristales se extraen de la placa multicelda con una herramienta específica (un crio-bucle) que trabaja bajo un microscopio. Esto elimina la interferencia del material de placa multicelda y reduce la cantidad de solución de cristalización alrededor del cristal que también puede interferir con la medición. Los experimentos de rayos X a menudo se realizan a temperatura criogénica (100 Kelvin por ejemplo). Los cristales a menudo también se almacenan y transportan a esta temperatura. Así, a menudo puede ser necesario proporcionar a los cristales crioprotección para almacenamiento, transporte o para análisis adicionales, p. ej., por difracción de rayos X. Para esta finalidad cada muestra tiene que ser retirada de la placa e incubada con una solución que contiene un agente crioprotector.

- 25 Es más, para algunas aplicaciones puede ser necesario entregar a los cristales componentes adicionales tales como ligandos. También en este caso se extraen muestras, p. ej., cristales, de la solución en la que crecen y se transfieren a soluciones que contienen esos agentes químicos. Este proceso también se denota como empapado (empapado de ligando, empapado en átomos pesados, etc.).

- 30 Las etapas mencionadas de recolección de cristal (extracción de cristal) y procesamiento requieren una cantidad significativa de mano de obra y tiempo, especialmente cuando se tienen que probar grandes cantidades de cristales o cuando se ensayan grandes bibliotecas de compuestos en el contexto de diseño guiado por estructura de moléculas bioactivas. Es más, debido a la necesidad de varias etapas manuales los resultados del análisis son dependientes de las habilidades del operador. Además, las muestras, p. ej., material biológico cristalizado, se pueden dañar mecánicamente al retirar y desplazar desde la placa multicelda.

El documento US 2005/056205 A1 describe un aparato de formación de cristales y un método para usar el mismo.

- 40 FLORENT CIPRIANI ET AL: "CrystalDirect: a new method for automated crystal harvesting based on laser-induced photoablation of thin films", ACTA CRYSTALLOGRAPHIC A SECTION D BIOLOGICAL CRYSTALLOGRAPHY, vol. D68, n.º 10, 1 de octubre 2012 (2012-10-01), páginas 1393-1399, describe un método para recolección automatizada de cristales usando una placa multicelda según el preámbulo de la reivindicación 1.

### Compendio de la invención

- 45 Así, puede existir la necesidad de la posibilidad de reducir la interacción del operador con las muestras del material biológico.

Esas necesidades pueden ser cubiertas por la materia de asunto de las reivindicaciones independientes. Además a partir de las reivindicaciones dependientes y la siguiente descripción son evidentes realizaciones ejemplares.

- 50 Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona una placa multicelda para incubación, procesamiento, recolección y análisis automatizados de muestras de material biológico. La placa multicelda comprende un cuerpo con una pluralidad de celdas y una película de sellado para sellar las celdas en un primer lado del cuerpo. Además, la placa multicelda comprende una película de muestras para sellar las celdas en un segundo lado del cuerpo. La película de muestras se adapta para acomodar un material biológico para cristalización. Es más, la película de muestras comprende un material de copolímero de olefina cíclica como material compatible con

fotoablación inducida por láser y/o compatible con recogida de datos de rayos X, teniendo la película de muestras un grosor entre 1  $\mu\text{m}$  y 50  $\mu\text{m}$ .

5 En otras palabras, la idea de la presente invención según el primer aspecto se basa en proporcionar una placa multicelda según la reivindicación 1 con una película de muestras ultradelgada que consiste en un material cuyo grosor y composición la hacen directamente compatible con recuperación de cristal por escisión de película, en particular con fotoablación inducida por láser y con métodos de análisis de muestras tales como recogida de datos de rayos X. Además, la película de muestras es directamente compatible con técnicas de congelación. La compatibilidad con ablación láser hace posible, por un lado un corte de la película con muestra por un láser automatizado, y permite evitar la etapa de un operador que extrae el cristal manualmente con un lazo.

10 Por otro lado, la compatibilidad de la película de muestras con ablación láser permite hacer un orificio mediante un láser bajo la muestra. El orificio se puede usar para suministrar productos químicos como crioprotectores o ligandos a la muestra sin la necesidad de retirarlo de la placa multicelda. Así, de nuevo permite evitar la etapa de que un operador retire manualmente la muestra y la transfiera a una solución que contiene los productos químicos. Es más, el orificio se puede emplear para retirar excesivo fluido de muestra también denotado como solución de cristalización tras la  
15 cristalización o solución química tras la incubación. De esta manera, se reduce la dispersión de fondo durante una recogida de datos y se mejoran los resultados de un análisis. Es más, como se reduce la cantidad de material, se aumenta la tasa de criocongelación. Así, se podría aplicar directamente criocongelación, sin adición de crioprotector.

20 Es más, el material y el grosor de película de muestras hacen posible ofrecer una transparencia excepcional y una baja birrefringencia y permitir analizar el cristal con luz visible, ultravioleta y con rayos X con mínima interferencia del material. De esta manera, es posible la recogida de datos de rayos X en placa que reduce las interacciones de un operador con la muestra. Las ventajas mencionadas permiten una automatización del proceso de recolección, procesamiento y análisis de cristales.

25 Así, al emplear una película de muestras compatible con análisis de datos de rayos X y fotoablación láser que consiste en un material de copolímero de olefina cíclica para la placa multicelda, se pueden automatizar varias etapas de incubación, procesamiento, recolección y análisis de muestras y se puede evitar la interacción manual con las muestras. En esto, automatizado o automático pueden denotar que no se requiere interacción de usuario o como alternativa se minimiza la interacción de usuario. Es más, automatización también puede denotar la sustitución de interacción manual con la muestra por funcionamiento remoto de componentes de sistema.

30 Ventajas adicionales de emplear una película de muestras que consiste en material de copolímero de olefina cíclica para la placa multicelda son que es compatible con etapas posprocesamiento tales como crioaplicaciones, p. ej., congelación. Además, el copolímero de olefina cíclica tiene una barrera a humedad relativamente alta en comparación con otros polímeros claros. Al mismo tiempo el copolímero de olefina tiene una tasa de absorción de humedad relativamente baja. Estos rasgos pueden ayudar a mejorar la formación y crecimiento de cristales, y en particular permite largo tiempo de incubación sin alteración del contenido de las celdas.

35 La placa multicelda puede comprender una pluralidad de celdas. Por ejemplo, en el cuerpo de la placa multicelda se pueden incluir 24, 96 o 384 celdas. El cuerpo puede comprender un material tal como vidrio o plásticos, p. ej., copolímero de olefina cíclica (COC) o poliestireno. En el mismo, el cuerpo puede ser moldeado por inyección.

40 Una película de sellado sirve para sellar las celdas en un primer lado del cuerpo, p. ej., en una parte superior. La película de sellado puede ser cohesionada o unida al cuerpo, p. ej., mediante un adhesivo o por termofusión. La película de sellado puede ser transparente y, p. ej., comprender el mismo material que la película de muestras o un material diferente. Si la película de sellado es del mismo material que la película de muestras entonces se minimiza el fondo y la calidad de la señal se mejora aún más.

45 La película de muestras también se puede denotar como película de cristalización y se puede cohesionar o unir al cuerpo en un segundo lado, p. ej., en un lado inferior del cuerpo. La unión también puede implicar un adhesivo y/o termofusión. La película de muestras se puede disponer en paralelo a la película de sellado en el cuerpo. La película de muestras se puede hacer, p. ej., únicamente de un polímero, tal como copolímero de olefina cíclica, o como alternativa comprender una combinación de materiales. Es más, la película de muestras puede cubrir toda la pluralidad de celdas. Como alternativa, cada celda puede ser cubierta individualmente por una película de muestras separada.

50 La película de muestras se adapta para acomodar una muestra de material biológico para cristalización. El material biológico puede ser incubado sobre la película de muestras. En el mismo, el material biológico puede incluir por ejemplo proteínas o ácidos nucleicos u otras moléculas biológicas. La incubación y la cristalización se pueden hacer, p. ej., de las siguientes maneras: cierta cantidad de un material a cristalizar se puede mezclar con una cantidad de una solución de cristalización para formar una gota de cristalización. La solución de cristalización disminuye la solubilidad de la muestra y promueve la formación del material cristalino en la gota de cristalización. En un método de  
55 difusión de vapor para la formación del material cristalino, la gota de cristalización se deja equilibrar a través de una fase gaseosa de un gran volumen de un líquido de precipitado también presente en un depósito dentro de la celda.

En un método de lote y microlote para la formación del material cristalino, la gota de cristalización se aísla de la fase gaseosa. El aislamiento de la gota de cristalización de la fase gaseosa se logra típicamente usando una parafina

5 líquida o un aceite que se coloca sobre la gota de cristalización sobre la película de muestras. La parafina líquida o el aceite no permiten un equilibrio contra un exceso del líquido de precipitado. Como alternativa, para la cristalización se puede aplicar un método de gota colgante. En este método la película de muestras con una gota de solución de muestra se orienta de tal manera que se ubica en la parte superior del cuerpo de la placa multicelda. Tras la cristalización, es decir, tras crecimiento de cristal las muestras pueden tener tamaños de unos pocos milímetros a un micrómetro o incluso menos.

10 La mezcla del material biológico y la solución de cristalización sobre la película de muestras puede tener lugar mientras la película de sellado no está sobre la placa multicelda. Tras la mezcla la película de sellado se puede unir a la placa. Durante o después de la cristalización la muestra puede ser procesada, p. ej., suministrando crioprotectores o ligandos a la muestra o eliminando fluido de muestra que rodea el material biológico. Es más, tras la cristalización la muestra puede ser recolectada o recuperada junto con la película de muestras o analizada directamente en la placa multicelda. El análisis puede incluir recogida de datos, p. ej., por difracción de rayos X.

15 Según la invención la película de muestras comprende un material de copolímero de olefina cíclica. El uso de COC puede ser particularmente ventajoso porque por ejemplo en un grosor de 25  $\mu\text{m}$  ofrece una transparencia excepcional y una baja birrefringencia en comparación con otros polímeros claros.

20 Según la invención la película de muestras comprende un grosor entre 1  $\mu\text{m}$  y 50  $\mu\text{m}$ . Particularmente, la película de muestras comprende un grosor entre 10 y 40  $\mu\text{m}$ . Preferiblemente, la película de muestras comprende un grosor entre 20 y 30  $\mu\text{m}$ . Cuando se usa material de COC un grosor de 25  $\mu\text{m}$  puede ser ventajoso. Este dimensionamiento ultradelgado de la película de muestras permite una buena capacidad de corte por ablación láser y asegura que se minimiza la dispersión de rayos X provocada por la película de muestras.

25 Según una realización ejemplar adicional de la invención la película de muestras puede comprender un material antiadhesivo. El material antiadhesivo puede ser por ejemplo un compuesto de silano (Silanización) o politetrafluoretileno (PTFE) u obtenido por implantación de plasma de material hidrófobo como el  $\text{SiO}_2$ . El empleo de un material antiadhesivo puede ayudar a minimizar la interacción de la película de muestras de cristal con la muestra, p. ej., con un cristal, ubicado sobre el mismo.

Según una realización ejemplar adicional de la invención la película de sellado puede ser del mismo material que la película de muestras. En este caso se minimiza el fondo y se mejora aún más la calidad de la señal.

30 Según una realización ejemplar adicional de la invención el cuerpo comprende un patrón predeterminado de marcadores para permitir posicionamiento, identificación y/o localización automatizados y muy precisos de celdas de la placa multicelda y/o de los cristales contenidos en ellas. En otras palabras, los marcadores proporcionados sobre la placa multicelda permiten por ejemplo a una unidad de identificación o una unidad de control de un sistema automatizado reconocer una celda particular de la pluralidad de celdas con alta precisión de por ejemplo 5 micrómetros. En el mismo, el patrón predeterminado de marcadores se puede almacenar, p. ej., en una memoria de la unidad de control. Es más, la posición de los cristales puede ser almacenada con precisión respecto a los marcadores o patrones predeterminados. Es más, los marcadores también pueden ayudar a localizar la posición del material biológico en la celda identificada. Esto facilita significativamente la automatización del proceso. Así, basándose en los marcadores un sistema puede incubar automáticamente en celdas definidas diferente material biológico. Es más, basándose en los marcadores un sistema puede guardar la ubicación y la identidad de ciertas celdas y/o de cristales. Además, un dispositivo de posicionamiento puede posicionar la placa multicelda automáticamente en un dispositivo de análisis para que cierta muestra sea examinada basándose en la posición conocida de los marcadores. Adicionalmente, basándose en la identificación de las diferentes celdas una unidad de fluido puede administrar diferentes cantidades de fluido a diferentes muestras.

45 Según una realización ejemplar adicional de la invención los marcadores se seleccionan del siguiente grupo de marcadores: marcadores hápticos tales como rebajes y protuberancias o marcadores ópticos. Combinaciones de los diferentes marcadores pueden ser ventajosas. Los marcadores hápticos se pueden diseñar por ejemplo como orificios o pasadores ubicados en el cuerpo de la placa multicelda. Los marcadores ópticos pueden ser por ejemplo ciertos patrones o colores ubicados en la superficie del cuerpo de la placa multicelda o sobre la película de muestras. En el mismo, los marcadores hápticos también se pueden usar como elementos de sostenimiento y posicionamiento, y los marcadores ópticos para elementos de posicionamiento. Por ejemplo, soportes o empuñaduras de un sistema robótico se pueden insertar en marcadores diseñados como orificios. De esta manera, los marcadores cumplen la funcionalidad de posicionamiento así como la funcionalidad de identificación de ciertas celdas y/o ciertos cristales. Las ubicaciones de las celdas y/o cristales con respecto a los marcadores se pueden almacenar en un sistema de posicionamiento conectado al sistema robótico. Además los marcadores hápticos definidos como orificios se pueden usar como áreas abiertas en el bastidor de la placa para definir ópticamente la posición de los pasadores para posicionamiento preciso adicional sobre la película de muestras.

55 Según un segundo aspecto de la presente invención se presenta un sistema automatizado para incubación, procesamiento, recolección y análisis de muestras de material biológico, p. ej., cristales. El sistema comprende una placa multicelda como se ha descrito anteriormente y un dispositivo de corte también denotado como dispositivo de penetración de película. El dispositivo de corte se puede usar para penetrar la película, producir aberturas en ella o

escindir secciones de la película. En otras palabras, el dispositivo de corte se puede adaptar para perforar la película. Particularmente, el dispositivo de corte se puede adaptar para penetrar o perforar localmente la película de muestras por fotoablación. Como alternativa, el dispositivo de corte puede ser un dispositivo de corte mecánico tal como, p. ej., una aguja, un escalpelo, etc.

- 5 En otras palabras, una idea de la presente invención según el segundo aspecto es, entre otras cosas, basándose en proporcionar un sistema automatizado de alto rendimiento que incluye un dispositivo de corte que se adapta para interactuar automáticamente con la placa multicelda ayudando así a evitar interacciones de operador con las muestras. Por ejemplo, el dispositivo de corte se puede emplear para cortar automáticamente la película de muestras alrededor de la muestra para permitir una recuperación de la muestra. Adicionalmente o como alternativa el dispositivo de corte se puede emplear para proporcionar orificios o aberturas en la película de muestras, p. ej., de formas y tamaños varios, para administrar un fluido a la celda, p. ej., con una unidad de entrega de solución o para extraer un fluido de la celda, p. ej., con una unidad de aspiración de solución. Es más, el orificio puede funcionar como orificio de despresurización. Así, durante incubación, procesamiento, recolección y análisis de las muestras se evitan interacciones manuales con las muestras.
- 10
- 15 El sistema automatizado puede adicionalmente comprender una unidad de fluido por ejemplo que incluye una unidad de aspiración de solución y una o múltiples unidades de entrega de solución. Además, el sistema automatizado puede comprender además un dispositivo de posicionamiento por ejemplo que incluye un dispositivo de montaje de muestra. Es más, en el sistema automatizado se puede incluir un dispositivo de criofriamiento, un dispositivo para almacenar placas multicelda y un dispositivo para almacenar cristales congelados. Los diferentes dispositivos adicionales se describen más en detalle a continuación.
- 20

Según una realización ejemplar adicional de la invención el sistema automatizado comprende además un dispositivo de identificación para identificar automáticamente cierta celda, p. ej., una primera celda, de la placa multicelda basándose en marcadores sobre la placa y/o basándose en análisis de imagen. Es más, el dispositivo de identificación se puede adaptar para identificar las muestras a través de la identificación automática de la gotitas de cristalización, dentro de la celda identificada. Es más, el dispositivo de identificación se puede adaptar para identificar las muestras, en particular los cristales, dentro de la celda identificada. En el mismo, la identificación puede incluir adquirir imágenes de las celdas mediante un microscopio o mediante una cámara y analizar las imágenes, p. ej., mediante un dispositivo de control. Tras la identificación cierta celda se puede posicionar y orientar en un soporte de celda de una unidad de fluido, de un dispositivo de corte o de un dispositivo de rayos X de tal manera que el respectivo dispositivo o unidad puede interactuar con la celda identificada y su contenido. El posicionamiento puede ser ejecutado por un dispositivo de posicionamiento.

25

30

Preferiblemente, la identificación de las muestras identificando automáticamente gotitas de cristalización en las celdas se puede emplear en diferentes sistemas de obtención de imágenes del sistema automatizado. Por ejemplo, esta identificación automática se puede emplear para incubadoras de cristalización, para el sistema de recolección y para líneas de haces para análisis de cristal en placa.

35

En el mismo, el dispositivo de posicionamiento puede comprender un brazo robótico y/o un soporte de placa que es ajustable en tres dimensiones. Además, el dispositivo de posicionamiento se puede conectar a un dispositivo de control sobre el que se almacena información en los marcadores predeterminados. El dispositivo de control se puede conectar funcionalmente al brazo robótico y/o al soporte de placa.

40 Según una realización ejemplar adicional de la invención el dispositivo de corte se diseña como láser de nanosegundo, un láser de picosegundo o un láser de femtosegundo. El láser puede ser ventajosamente un láser de alta energía de pulso adaptado para fotoablación de manera que durante el corte de la película de muestras se minimiza la transferencia de difusión de calor. El láser puede tener por ejemplo una longitud de onda de 355 nm, 515 nm o 1030 nm. Como alternativa, el dispositivo de corte se puede diseñar como dispositivo de corte mecánico tal como un pasador, una cuchilla, una aguja, una aguja hueca, un escalpelo, etc.

45

Según una realización ejemplar adicional de la invención el sistema automatizado comprende además una unidad de fluido para suministrar un fluido a una celda de la placa multicelda y/o para extraer un fluido de una celda de la placa multicelda. El dispositivo de corte se adapta para proporcionar una abertura tal como un orificio o un túnel en la película de muestras.

50 Preferiblemente, la abertura se proporciona directamente bajo la muestra o en las inmediaciones directas de la muestra dentro de la celda identificada y seleccionada. La unidad de fluido, también denotada como unidad de tratamiento de cristal, es conectable por medio de la abertura a la celda de la placa multicelda.

La unidad de fluido puede comprender una unidad de entrega de solución que entrega productos químicos a los cristales en las celdas al depositar una gota o gotitas dentro o sobre el orificio. Esto pone en contacto la solución de cristalización que contiene el cristal y la solución que contiene el producto químico entregado por la unidad de entrega de solución de modo que el producto químico puede difundirse a través de la solución de cristalización y llegar al cristal. Este proceso puede funcionar una vez o repetirse secuencialmente para someter las muestras a múltiples tratamientos con diferentes productos químicos. Por ejemplo el tratamiento con un ligando podría ser seguido por

55

tratamiento con un agente crioprotector.

Además, la unidad de fluido puede comprender una unidad de aspiración para extraer un fluido de una celda de la placa multicelda. La unidad de aspiración puede retirar el líquido que rodea el cristal en la celda de la placa multicelda.

5 La unidad de fluido y particularmente la unidad de entrega de solución se puede adaptar para entregar volúmenes de un fluido que va de 1 pl a 10  $\mu$ l a la celda. Particularmente, la unidad de fluido se puede diseñar como sistema de dispensación de volumen pequeño. De esta manera, la unidad de fluido puede proporcionar la muestra automáticamente con la cantidad y calidad requeridas de fluido. En el mismo, el fluido puede contener una solución con diferentes productos químicos. Particularmente, diferentes productos químicos y diferentes concentraciones de productos químicos se pueden suministrar a las diferentes celdas de la placa multicelda. En una realización alternativa el fluido se puede suministrar directamente a la superficie de película de muestras de una muestra ya recolectada.

10 La unidad de fluido y el dispositivo de corte se pueden proporcionar dentro de una única máquina o dentro de dos máquinas separadas. Por ejemplo, se puede usar un recolector para perforar una abertura en una película de muestras. Posteriormente, la placa multicelda se puede mover a un sistema diferente para entrega de líquido, p. ej., a un robot estándar de pipeteo o un sistema diseñado específicamente. Como alternativa, se pueden usar sistemas completamente diferentes para perforar y entregar líquidos y mover la placa a un recolector para una recolección de cristal final. En tal ejemplo, podría ser conveniente ejercer la abertura para entrega de líquido mediante un método más simple que corte con láser, tal como, p. ej., con una aguja afilada, es decir, mediante un sistema mecánico para perforar la película de muestras.

15 Según una realización ejemplar adicional de la invención el dispositivo de corte se adapta para variar las dimensiones y las formas de la abertura dependiendo de la cantidad del fluido a suministrar a la celda o extraer de la celda. En el mismo, el dispositivo de corte puede proporcionar diferentes tamaños y formas de orificios en la misma placa multicelda. Es más, en una memoria de un dispositivo de control o en un portador de información se puede almacenar información sobre cierta cantidad de fluido a administrar para cada celda de la placa multicelda. El dispositivo de control se puede adaptar para controlar el dispositivo de corte según esta información.

20 Según una realización ejemplar adicional de la invención el dispositivo de corte se adapta para proporcionar una pequeña abertura en una celda para equilibrar la presión dentro y fuera de una celda, antes de que ocurra otra operación, p. ej., antes de una abertura en una muestra para evitar que la solución fluya fuera de la celda.

25 Según una realización ejemplar adicional de la invención la unidad de fluido se adapta para suministrar al menos uno de un crioprotector, una solución de ligando u otros agentes como sustratos, cofactores o compuestos de fase a la celda. La solución de ligando puede comprender ligandos potenciales usados en el contexto de diseño guiado por estructura de inhibidores u otras moléculas bioactivas.

30 Según una realización ejemplar adicional de la invención la unidad de fluido, y en particular la unidad de aspiración, se adapta para aplicar una presión negativa, es decir, succión o vacío, a una celda de la placa multicelda. La presión negativa se puede aplicar para extraer solución alrededor de la muestra, p. ej., alrededor de un cristal, a recolectar o analizar. Eliminando exceso de solución en la muestra, se pueden lograr mejores resultados de difracción de rayos X porque, p. ej., en este caso puede no ocurrir cambio de posición del cristal. Es más, al eliminar la solución se reduce la dispersión de fondo. Así, de esta manera se puede mejorar la ratio de señal sobre ruido. En el mismo, la abertura es producida por el dispositivo de corte de tal manera que da acceso a la solución en la que se ubica la muestra.

35 Además, al extraer la solución, se disminuye el tamaño de la muestra, lo que facilita el crioenfriamiento porque es posible una transición más rápida a la temperatura criogénica. De esta manera, también se impide formación de hielo y se mejora la calidad de la conservación de la muestra.

40 En otras palabras, se pueden preparar cristales para experimentos de difracción de rayos X eliminando la solución alrededor de ellos a través de leve aspiración mientras el cristal permanece en su soporte original, a diferencia del método comúnmente aplicado de extraer el cristal de la solución con alguna solución de cristalización remanente alrededor de él. Esto simplifica el funcionamiento, reduce la tensión mecánica a la muestra y permite una automatización completa del proceso.

45 Según una realización ejemplar adicional de la invención el sistema automatizado comprende además un dispositivo de retirada para retirar la muestra recolectada de la placa multicelda y para montarla en un soporte que facilita la manipulación y la exposición de la muestra a rayos X. El dispositivo de retirada también se puede denotar como montaje de muestra. El soporte puede ser por ejemplo un pasador metálico. Según una realización adicional el dispositivo de retirada se adapta para aplicar presión negativa a la película de muestras y el pasador se diseña para ser hueco de modo que se puede aplicar presión negativa o vacío a través de él para facilitar el contacto entre la punta del pasador y la película de muestras. Es más, el dispositivo de corte se adapta para cortar alrededor de un cristal sobre la película de muestras.

50 Según una realización adicional de la invención el dispositivo de retirada puede comprender un sistema para añadir un adhesivo a la punta del pasador para asegurar una conexión permanente de la película de muestras escindida al pasador. En el mismo, el dispositivo de retirada se adapta para llevar el pasador hueco en contacto con la película de

muestras y aplicar presión negativa a la película de muestras para asegurar el contacto entre la película, el pasador y el adhesivo.

5 Según una realización ejemplar adicional de la invención el sistema automatizado comprende además o se asocia con un dispositivo analizador tal como un dispositivo de rayos X y un dispositivo de obtención de imágenes tal como un detector de rayos X. El dispositivo analizador se puede adaptar para recogida de datos en placa o para analizar muestras recolectadas individuales.

Según una realización ejemplar adicional de la invención el sistema automatizado comprende además una unidad de congelación también denotada como estación de congelación. La unidad de congelación se adapta para proporcionar un tratamiento criogénico a muestras recolectadas individuales o a placas multicelda.

10 Según una realización ejemplar adicional de la invención el sistema automatizado comprende además una unidad de almacenamiento también denotada como estación de almacenamiento. La unidad de almacenamiento se adapta para almacenar muestras recolectadas individuales y placas multicelda antes del análisis y/o el procesamiento.

15 Según un tercer aspecto de la presente invención se presenta un método para hacer funcionar el sistema automatizado descrito anteriormente. El método comprende las siguientes etapas: identificar una celda de la placa multicelda y/o una o más muestras en la celda. Proporcionar una abertura en la película de muestras de la celda identificada por el dispositivo de corte; conectar la unidad de fluido a la celda por medio de la abertura; suministrar un fluido a la celda o extraer un fluido de la celda por la unidad de fluido. Es más, el método puede comprender variar las dimensiones, p. ej., el diámetro y la orientación, de la abertura dependiendo de la cantidad de fluido a extraer o suministrar. Esta etapa se puede ejecutar antes de conectar la unidad de fluido a la celda. Por ejemplo, la abertura se puede conectar a una 20 unidad de entrega de solución de la unidad de fluido y se pueden entregar productos químicos a las celdas o directamente a los cristales por difusión por medio de la abertura. Como alternativa, la abertura se puede conectar a una unidad de aspiración de la unidad de fluido y de la celda se puede extraer solución de muestra.

25 Según una realización ejemplar adicional de la invención la identificación de la celda tiene lugar automáticamente basándose en marcadores sobre la placa y/o basándose en análisis de imagen por el dispositivo de posicionamiento. Identificar una celda también puede incluir identificar la ubicación y la orientación de una celda, de varias celdas o de cada celda de la placa multicelda. Es más, el dispositivo de posicionamiento puede identificar la ubicación de las muestras dentro de las celdas. Como alternativa, la identificación de la celda puede ser hecha directamente por un usuario o por un usuario usando una unidad de control remoto.

30 Según una realización ejemplar adicional de la invención se puede suministrar un fluido a la celda, el fluido se adapta para influir en un proceso de cristalización de un cristal (o cristales) comprendido dentro de la celda. Por ejemplo, en la celda se puede introducir un solvente. Este solvente puede disolver entonces parcial o completamente uno o múltiples cristales pequeños comprendidos en la celda y el material disuelto puede añadirse posteriormente al crecimiento de uno o unos pocos cristales más grande con mejores propiedades de difracción dentro de la celda. El solvente puede ser, p. ej., agua o soluciones que contienen uno o múltiples reactivos de cristalización, como un tampón 35 de pH, sales, PEG, etc. u otros productos químicos. Por consiguiente, se pueden mejorar las propiedades de cristal de múltiples cristales pequeños con pobres propiedades de difracción a, p. ej., un único cristal grande, o en general a cristales con mejores propiedades de difracción.

40 Es más, el método puede comprender varias etapas adicionales. El orden de ejecución y el número de las etapas pueden variar. Por ejemplo, el método puede comprender además incubar una muestra o una pluralidad de muestras sobre la película de muestras de la placa multicelda. Además, el método puede comprender sellar la placa multicelda con la película de sellado. Es más, el método puede comprender crecimiento de cristales, p. ej., mediante cristalización por difusión de vapor. Estas etapas se pueden ejecutar antes de proporcionar una abertura en la película de muestras.

45 Además, el método puede comprender procesamiento o posprocesamiento las muestras tras el crecimiento de cristales. El procesamiento puede incluir, p. ej., suministrar fluidos con productos químicos a la celda identificada. Etapas adicionales también pueden comprender por ejemplo recolectar la película de muestras junto con la muestra de la placa multicelda cortando la película de muestras alrededor de la muestra con el dispositivo de corte. Tras esto la muestra se puede analizar. Como alternativa, las muestras se pueden analizar directamente en la placa multicelda, p. ej., mediante rayos X. Antes de analizar, las muestras recolectadas pueden ser congeladas en una unidad de congelación y almacenadas en una unidad de almacenamiento.

50 Según un cuarto aspecto de la invención se proporciona un elemento de programa informático que se adapta, cuando es ejecutado en un ordenador, para ejecutar el método descrito anteriormente. Este elemento de programa informático puede por ejemplo ser almacenado y ejecutado en el dispositivo de control del sistema descrito anteriormente o ejecutado desde una ubicación remota. Este programa informático permite al operador grabar la posición de cristales y especificar las acciones a realizar en ellos. Estas acciones serán ejecutadas directamente o registradas y ejecutadas 55 en un momento posterior en el sistema robótico. Por ejemplo las posiciones de los cristales registrados se pueden usar para extraerlas automáticamente de las placas multicelda. Como alternativa, el operador puede decidir sobre las formas y los números de áreas de película de muestras que serán escindidas para extraer cristales de las celdas de la placa multicelda, y decidir si la unidad de entrega de solución se usa o no y qué soluciones entregar. Es más, el

operador puede decidir si la unidad de aspiración de solución será usada o no para retirar el exceso de solución de cristalización, si cristales serán congelados o no en la unidad criogénica y si se almacenarán. La posición de los cristales también se puede usar para determinar las áreas a exponer directamente a rayos X dentro de la placa multicelda. El sistema y el software permitirán identificación individual de cada uno de los cristales o grupo de cristales en la misma celda.

Según un quinto aspecto de la invención se proporciona un medio legible por ordenador sobre el que se almacena el elemento de programa informático descrito anteriormente. En otro aspecto, el software accesible a través de internet y el funcionamiento del sistema se opera de manera controlada remota.

Es más, cabe señalar que rasgos descritos en conexión con los diferentes dispositivos y métodos se pueden combinar entre sí. Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes y esclarecidos con referencia a las realizaciones descritas más adelante en esta memoria.

### Breve descripción de los dibujos

A continuación se describirán realizaciones ejemplares de la invención con referencia a los siguientes dibujos.

La figura 1 muestra una vista en perspectiva de una placa multicelda según una realización de la invención

La figura 2 muestra una representación esquemática de un sistema automatizado para incubación, procesamiento, recolección y análisis de muestras de material biológico según una realización adicional de la invención

La figura 3 muestra una representación esquemática de un sistema automatizado según una realización adicional de la invención

La figura 4 muestra un diagrama de flujo de un método para procesar la placa multicelda según una realización de la invención

La figura 5 muestra un diagrama de flujo de un método para procesar la placa multicelda según una realización adicional de la invención

La figura 6 muestra un diagrama de flujo de un método para incubación, procesamiento, recolección y análisis automatizados de muestras de material biológico según una realización de la invención

La figura 7 muestra parte de un diagrama de flujo de un método para incubación, procesamiento, recolección y análisis automatizados de muestras de material biológico según una realización adicional de la invención

Las figuras 8a/b muestran ejemplos de un dispositivo de retirada aplicable para una placa multicelda según una realización de la invención

### Descripción detallada de realizaciones

En la figura 1 se muestra una placa multicelda 1 en una vista en perspectiva. La placa multicelda 1 se muestra en una aplicación de asentamiento de gotas en la que una muestra 15 de material biológico se incuba sobre una película de muestras 11 y la placa multicelda 1 se orienta de tal manera que durante crecimiento de cristales la película de muestras 11 se ubica en la parte inferior de la placa multicelda 1. Como alternativa, la placa multicelda 1 se puede usar en una aplicación de gota colgante (no se muestra en las figuras). En la aplicación de gota colgante la placa multicelda 1 se orienta de tal manera que la muestra 15 y así la película de muestras 11 se ubica en la parte superior de la placa multicelda 1, es decir, por encima de la película de sellado 7. La placa multicelda 1 comprende un cuerpo 3 con una pluralidad de celdas 5. En el ejemplo mostrado, en cada una de las celdas 5 se ubica un depósito de precipitado 19 con un líquido de precipitado. El líquido de precipitado induce una formación de cristales desde la gota de muestra sobre la película de muestras 11 por difusión de vapor. Las celdas 5 son selladas por una película de sellado 7 en un primer lado 9 del cuerpo 3. Es más, en el segundo lado opuesto 13 del cuerpo 3 las celdas 5 son selladas por una película de muestras 11. Las celdas se pueden sellar estancas al aire por la película de sellado 7 y por la película de muestras 11.

La película de muestras 11 se hace de un material compatible con fotoablación. La película de muestras 11 se hace de un copolímero de olefina cíclica. Es más, la película de muestras 11 puede incluir además polímeros tales como poliimida. Además, la película de muestras 11 es preferiblemente cortable por ablación láser. La película de muestras 11 puede ser recubierta con un material, tal como carbono negro, que ayuda al corte de la película de muestras 11. Es más, la película de muestras 30 tiene un grosor entre 1 y 50  $\mu\text{m}$ . El material y el grosor de la película de muestras 11 se diseñan para proporcionar un mínimo de dispersión de rayos X durante un análisis de la muestra 15. Adicionalmente, la película de muestras 11 puede ser recubierta con un material antiadhesión tal como PTFE para impedir que la muestra se adhiera a la película de muestras 11. Es más, la película de muestras 11 puede ser inerte a la muestra 15, a la solución de muestra y al líquido de precipitado.

Al emplear una película de muestras 11 que consiste en copolímero de olefina cíclica para la placa multicelda 1 se pueden automatizar varias etapas de procesamiento, recolección y análisis de muestras 15 y se puede evitar la

interacción manual con las muestras. Esto se debe a las propiedades del material de copolímero de olefina cíclica, tales como compatibilidad con fotoablación que permite automatización de un proceso de recolección. Es más, el copolímero de olefina cíclica permite hacer una pequeña abertura en la película por ablación láser. La abertura se puede usar para suministrar automáticamente crioprotectores o ligandos a la muestra o para retirar la solución de muestra como se describe más adelante. Además, la alta transparencia y la baja birrefringencia del copolímero de olefina cíclica permiten la recogida de datos en placa que reduce las interacciones de operador con la muestra.

Es más, para reducir las interacciones de usuario la placa multicelda 1 comprende marcadores 17 diseñados, p. ej., como orificios, pasadores, rebajes y patrones ópticos. Los marcadores 17 se disponen preferiblemente en el cuerpo 3 de la placa multicelda 1 y se pueden usar como dispositivos de sostenimiento para un brazo robótico o para una unidad de posicionamiento tal como un soporte de placa. Basándose en las ubicaciones de los marcadores se puede determinar la orientación y la ubicación de ciertas celdas 5, y particularmente, la orientación y la ubicación de muestras 15, es decir, cristales, en las celdas 5 de la placa multicelda, proporcionando así automatización adicional de la incubación, procesamiento, recolección y análisis de las muestras.

En la figura 2 se presenta una vista esquemática de un sistema automatizado 21 para incubación, procesamiento, recolección y análisis de muestras 15 de material biológico. La funcionalidad del sistema se explica en mayor detalle con respecto a la figura 4 a 6.

El sistema automatizado 21 comprende un dispositivo de corte 23 diseñado como cortador mecánico o preferiblemente como láser de femtosegundo. El dispositivo de corte 23 puede incluir un dispositivo óptico de escaneo, p. ej., para enfocar y dirigir la haz del láser sobre una celda seleccionada 5. Además, el sistema 21 comprende un dispositivo de posicionamiento 25. El dispositivo de posicionamiento 25 puede comprender un brazo robótico 35, p. ej., para transferir la placa multicelda 1 entre diferentes unidades del sistema 21. Es más, el dispositivo de posicionamiento 25 puede comprender uno o varios soportes de placa 37. El soporte de placa puede ser, p. ej., una plataforma móvil X-Y por impulsores para posicionar y orientar la placa multicelda 1 dentro de una de las unidades del sistema 21. El dispositivo de posicionamiento 25 se puede emplear para recibir la placa multicelda 1 y para alinear la pluralidad de celdas 5 para identificación rápida y automática de las celdas 5, p. ej., inicialmente al usar la información sobre la geometría de la placa y con más precisión por un dispositivo de identificación 27 y para alinear automáticamente los cristales bajo el área de trabajo de la láser. Para esta finalidad, se pueden usar posiciones de cristal registradas respecto a los marcadores de referencia 17.

Además, el sistema 21 puede comprender un dispositivo de identificación 27 para identificar automáticamente una celda 5 de la placa multicelda 1 basándose en marcadores 17 sobre la placa multicelda 1 y/o basándose en análisis de imagen. El dispositivo de identificación 27 puede comprender un microscopio o una cámara y se puede conectar a un dispositivo de control 39 en el que se almacena las posiciones predeterminadas de los marcadores 17 o un análisis de imagen programa.

El sistema automatizado 21 puede comprender además una unidad de fluido 29 para suministrar un fluido a una celda 5 de la placa multicelda 1 y/o para extraer un fluido de una celda 5 de la placa multicelda 1. En el mismo, la unidad de fluido 29 se puede dividir en una unidad de entrega de solución para suministrar productos químicos a las muestras 15 y en una unidad de aspiración para extraer fluido de las celdas 5. La unidad de fluido 29 así como el dispositivo de corte 23 y el dispositivo de posicionamiento 25 se conectan al dispositivo de control 39.

El dispositivo de control 39 se adapta para iniciar un corte de un orificio por el dispositivo de corte 23 en la película de muestras 11 de la placa multicelda 1. Es más, la unidad de fluido 29 es conectable por medio de la abertura a una celda seleccionada 5 de la placa multicelda 1. El funcionamiento del sistema automatizado 21 se describe en detalle más adelante.

Como se muestra en un ejemplo adicional en la figura 3 el sistema automatizado puede comprender unidades y dispositivos adicionales, p. ej., también conectados al dispositivo de control 39. Por ejemplo, el sistema 21 comprende además un dispositivo de retirada 33 también denotado como dispositivo de recolección. El dispositivo de retirada 33 se puede diseñar como pasador hueco y se puede adaptar para aplicar presión negativa a la película de muestras 11 de la placa multicelda 1. Para esta finalidad el dispositivo de retirada 33 se puede conectar a la unidad de fluido 29. En el mismo, el dispositivo de retirada 33 puede retirar una muestra 15 junto con una parte de la película de muestras 11 después de que el dispositivo de corte 23 corte alrededor de la muestra 15. El dispositivo de retirada 33 puede ser móvil por el brazo robótico 35.

Las figuras 8(a) y (b) muestran ejemplos de dispositivos de retirada 33 proporcionados como pasadores huecos 34. En la figura 8(a), el dispositivo de retirada 33 comprende una punta biselada con una superficie inclinada plana 53 adyacente a una abertura extrema 55 del pasador 34. Esta superficie 53 se puede colocar encima de una película de muestras 11 que tiene muestras 15 en su superficie opuesta. Al aplicar un vacío débil al pasador hueco 34, la película de muestras 11 puede ser succionada y pegada al pasador 34 de manera que al usar el dispositivo de retirada 33 la película de muestras 11 y las muestras 15 pegadas a la misma pueden ser manejadas y, p. ej., transportadas para subsiguiente análisis.

En la figura 8(b) se muestra un ejemplo alternativo de un dispositivo de retirada 33. En este ejemplo, la superficie

- 5 inclinada 53' comprende una geometría cóncava. Al empujar el pasador 34 sobre una película de muestras flexible 11 la última puede ser deformada ligeramente y puede topar de manera sellada en la abertura extrema 55. Al aplicar un vacío débil al pasador hueco 34, la película de muestras 11 puede ser succionada y pegada al pasador 34 de manera que al usar el dispositivo de retirada 33 la película de muestras 11 y las muestras 15 pegadas a la misma pueden ser manejadas. En tal ejemplo, la película de muestras 11 se doblará ligeramente debido a la forma cóncava de la superficie 53' del pasador 34. Debido a tal flexión, la muestra 15 pegada a la película de muestras 11 puede acercarse a un eje medio 51 del pasador 34, es decir, una distancia d2 entre la muestra 15 y el eje medio 51 puede hacerse más pequeña que la respectiva distancia d1 en el ejemplo mostrado en la figura 8(a).
- 10 Además, el sistema automatizado 21 como se muestra en la figura 3 comprende además un dispositivo analizador 41 tal como un dispositivo de rayos X y un dispositivo de obtención de imágenes 43 tal como un detector de rayos X para recogida de datos. Estos dispositivos 41, 43 se pueden adaptar para recogida de datos en placa, particularmente cuando ambas de la película de muestras 11 y la película de sellado 7 de la placa multicelda 1 se diseñan para ser compatibles con recogida de datos de rayos X. Es más, los dispositivos 41, 43 se pueden adaptar para analizar muestras recolectadas individuales 15.
- 15 El sistema automatizado 21 comprende además una unidad de congelación 45 también denotado como estación de congelación. La unidad de congelación proporciona un tratamiento criogénico a muestras individuales 15. Es más, también es posible tratar una placa multicelda 1 en la unidad de congelación 45. Sin embargo, para recogida de datos en placa las placas multicelda 1 pueden ser transferidas preferiblemente directamente al dispositivo analizador 41 sin congelación.
- 20 Es más, el sistema automatizado 21 comprende además una unidad de almacenamiento 47 también denotado como estación de almacenamiento. En la unidad de almacenamiento 47 antes del análisis se pueden almacenar muestras individuales recolectadas 15 y placas multicelda 1.
- 25 En la figura 4 se describe un método para posprocesamiento o procesamiento las muestras 15 directamente en la placa multicelda 1. En particular, en la figura 4 se describe un método para suministrar un fluido a las muestras 15. El fluido puede contener productos químicos tales como posibles ligandos o crioprotectores. Este método puede ser ejecutado con el sistema automatizado mostrado en la figura 2 o la figura 3.
- 30 Tras tener lugar cristalización del material biológico en las celdas 5 de la placa multicelda 1, en la etapa S08 el dispositivo de identificación 27 del sistema automatizado 21 identifica/registra al menos la posición de un cristal 15 dentro de una celda 5. La identificación puede tener lugar automáticamente, p. ej., basándose en marcadores 17 o en análisis de imagen por un dispositivo de control 39. Como alternativa, un usuario puede identificar una celda y la posición de los cristales dentro de la celda 5 basándose en imágenes proporcionadas por el dispositivo de identificación 27. Esta etapa posterior también se puede realizar a distancia, por ejemplo a través de una interfaz de software basada en web.
- 35 En la etapa S12 en la película de muestras 11 se podría proporcionar una abertura de despresurización. En la etapa S13 el dispositivo de corte 23, p. ej., mediante fotoablación, proporciona una abertura en la película de muestras 11. En la etapa S18 la unidad de fluido 29 se conecta a la abertura. Esto puede, p. ej., tener lugar al desplazar la placa multicelda 1 a la unidad de fluido 29. Es más, en una etapa S19 la unidad de fluido 29 suministra en la abertura un fluido en una cantidad y una composición seleccionadas. Entonces, las soluciones pueden ser aspiradas a través de la abertura para retirar exceso de líquido. Entonces, se puede cortar el área de película y la película se puede montar o conectar al pasador por el dispositivo de retirada 33. Entonces, se puede congelar el cristal. Entonces, el cristal se puede almacenar o exponer directamente a rayos X. Como se muestra en la figura 6 en este método se pueden incluir etapas adicionales.
- 40 Este método puede ser aplicado particular y ventajosamente en cristalografía macromolecular que a menudo requiere tratamiento de cristales con productos químicos. Según sistemas y métodos conocidos este tratamiento puede ser un proceso manual y que consume mucho tiempo que requiere operadores cualificados. El método y el correspondiente sistema 21 de la invención permiten una automatización completa del proceso de entregar productos químicos a cristales. El sistema 21 y también el método descrito permiten que cristales crecidos sobre la película de muestras 11 dentro de una celda cerrada 5 sean puestos en contacto con el producto químico a través de una pequeña abertura hecha en la película de muestras 11. Las muestras 15 y en particular cristales tratados de esta manera pueden ser expuestos directamente a rayos X en su soporte original, es decir, en la placa multicelda 1. Como alternativa, se pueden recuperar y exponer a rayos X tras crioenfriamiento para análisis estructural.
- 45 Este método puede ser aplicado particular y ventajosamente en cristalografía macromolecular que a menudo requiere tratamiento de cristales con productos químicos. Según sistemas y métodos conocidos este tratamiento puede ser un proceso manual y que consume mucho tiempo que requiere operadores cualificados. El método y el correspondiente sistema 21 de la invención permiten una automatización completa del proceso de entregar productos químicos a cristales. El sistema 21 y también el método descrito permiten que cristales crecidos sobre la película de muestras 11 dentro de una celda cerrada 5 sean puestos en contacto con el producto químico a través de una pequeña abertura hecha en la película de muestras 11. Las muestras 15 y en particular cristales tratados de esta manera pueden ser expuestos directamente a rayos X en su soporte original, es decir, en la placa multicelda 1. Como alternativa, se pueden recuperar y exponer a rayos X tras crioenfriamiento para análisis estructural.
- 50 En la figura 5 se describe un método adicional para procesar las muestras 15 directamente en la placa multicelda 1. En particular, el método en la figura 5 es un método para extraer un fluido de las muestras 15. Los métodos mostrados en la figura 4 y la figura 5 se pueden combinar como se describe en la figura 6.
- 55 Las primeras etapas S08, S13 y S18 del método mostrado en la figura 5 pueden ser similares a las etapas mostradas en la figura 4. Sin embargo, en lugar de añadir un fluido con productos químicos a la celda 5 se extrae un fluido, p. ej., aspirado de la celda identificada 5 por la unidad de fluido 29. La abertura proporcionada en la etapa S13 da acceso a la solución en la que se ubica la muestra 15 y en particular el cristal. Durante este proceso la muestra 15 permanece

en su soporte original, es decir, en la placa multicelda 1 y se minimiza la interacción de usuario porque el cristal no tiene que ser extraído de la placa multicelda 1. El cristal puede entonces ser expuesto directamente a rayos X en su soporte original. Como alternativa, el cristal puede ser recuperado al escindir el área de película de muestras que contiene el cristal y presentarse a una criocorriente o a otros sistemas criogénicos.

- 5 La figura 6 muestra un diagrama de flujo de un método que combina varias etapas automatizadas. Algunas de las etapas mostradas en la figura 6 pueden requerir opcionalmente interacción de usuario. Además, varias etapas del método en la figura 6 se ejecutan solo opcionalmente. Las etapas descritas en conexión con la figura 4 y la figura 5 también se incluyen en el método mostrado en la figura 6.

10 En una primera etapa S01 se pone material biológico 15 sobre una película de muestras 11 de una placa multicelda 1. En una segunda etapa S02 las celdas 5 de la placa multicelda 1 son selladas por una película de sellado 7. En la etapa S03 se hacen crecer cristales en las celdas 5, p. ej., por cristalización de difusión de vapor. En la etapa S05 el dispositivo de identificación 27 del sistema 21 registra imágenes de las celdas 5 de la placa multicelda 1. También se pueden tomar imágenes en un dispositivo de obtención de imágenes externo al sistema y las imágenes pueden ser importadas al sistema a través del componente de software. En el mismo, se pueden adquirir imágenes de todas las celdas 5. Como alternativa, se pueden adquirir únicamente imágenes de ciertas áreas de la placa multicelda 1 y así únicamente imágenes de ciertas celdas 5.

20 En la etapa S07 las imágenes son tomadas por la unidad de control 39 del sistema 21 y/o por un operador. La unidad de control 39 o el operador identifican en la etapa S08 ubicaciones de uno o múltiples cristales en una celda 5. Preferiblemente, las etapas S07 y S08 se pueden realizar a través de un sistema externo y se pueden proporcionar posiciones e imágenes registradas a la unidad de control del sistema. En caso de la identificación por la unidad de control 39 esta etapa puede ser realizada automáticamente, p. ej., basándose en marcadores 17 o en análisis de imagen. Tras la identificación en la etapa S08 un operador o la unidad de control 27 pueden seleccionar cómo procesar las muestras 15 de la multiplica y qué muestras 15 se van a procesar. Estas operaciones pueden incluir etapas S08b a S08f que se muestran en la figura 7 y que pueden ser ejecutadas, p. ej., tras identificar las posiciones de los cristales en la etapa S08 y antes de transferir la placa multicelda 1 en la etapa S09. Como alternativa, las etapas S08b a S08f pueden ser realizadas tras transferir la placa multicelda 1 en la etapa S09 mediante un dispositivo de posicionamiento. En el mismo, estas etapas pueden incluir especificar un área de corte (S08b), especificar un tratamiento químico y qué soluciones y qué volúmenes se van a usar para este tratamiento (S08c). Es más, especificar una posición para hacer una abertura (S08d) y especificar si se va a aspirar líquido (S08e). Además, especificar si se van a analizar cristales en placas o recolectar con el láser y montar en un pasador y si se van a congelar o analizar sin congelación (S08f). Al menos las etapas S07, S08 y S08b a S08f pueden ser realizadas a distancia por ejemplo a través de un software basado en internet o pueden ser realizadas antes y registradas de modo que todas las operaciones se realizan en un momento posterior en el sistema.

35 Como se muestra en la figura 6 tras el crecimiento de cristales la placa multicelda 1 puede ser transferida al sistema (S09) y las operaciones S08 a S08f ejecutadas a través del componente de software del sistema. Como alternativa, las etapas S08 a S08f pueden ser introducidas (ya sea a través del software de sistema o a través de otro software por ejemplo un software basado en web para operación remota) y registradas. En un punto posterior esta información es transferida al sistema (S17) y la placa multicelda se coloca en el sistema (S09) de modo que puede iniciarse el procesamiento.

40 Una vez la placa está en el sistema y según el protocolo seleccionado a través de las etapas S08 a S08f la muestra 11 puede ser procesada de maneras diferentes. Por ejemplo, la placa se coloca en el sistema y el cristal se alinea con el área de trabajo (S09), entonces se hace una abertura (S13), entonces se aspira solución (S23), entonces la muestra puede ser recolectada por un dispositivo de retirada 33 en la etapa S25. Para esta finalidad el área de película alrededor del cristal se escinde con el sistema láser (S25a), entonces el área de película que contiene el cristal se monta en un pasador (S25b) y el cristal recolectado se congela (S27) en la unidad de congelación o es analizado directamente en el sistema de análisis de rayos X (S33). En el mismo, las etapas S25a y las etapas S25b no se muestran en las figuras. Para realizar la etapa S33 se transfieren posiciones precisas de cristal desde el sistema al dispositivo de análisis de rayos X en la etapa S31b (no se muestra en las figuras). Si los cristales recolectados (S09, S13, S13, S15b, S25a) se congelan (S27) en la unidad de congelación pueden ser analizados directamente con rayos X (S31b, S33), o almacenados (S29) en la unidad de almacenamiento y analizados más tarde (S31b, S33).

55 Son posibles múltiples variaciones a este protocolo, como se indica en la figura 7. Por ejemplo, tras hacer una abertura, se pueden entregar productos químicos a cristales (S18) con la unidad de entrega de solución de la unidad de fluido, entonces se pueden aspirar líquidos (S23) y el proceso continúa como se muestra en la figura 6 y descrito anteriormente. La entrega de solución en la etapa S18 y la aspiración en la etapa S23 puede ser repetida cualquier número de veces, por ejemplo para entregar múltiples soluciones de las mismas o diferentes composiciones secuencialmente antes de proceder a las etapas S25 y adicionales.

60 En otro ejemplo, se pueden recolectar cristales sin ningún tratamiento. Esto implicaría S09, S25a, S25b, S27 (opcionalmente), S29 (opcionalmente) y S33 (opcionalmente, también que incluye (S31b) en este caso). En otro ejemplo, se pueden analizar cristales directamente en las placas multicelda. Esto implica la identificación de las posiciones de cristal (S08), transferencia de las posiciones de cristal respecto a los marcadores 17 a un dispositivo de

análisis de rayos X (S31b) y transferencia de placas multicelda al dispositivo de análisis de rayos X y análisis por rayos X (S31). Los resultados de la recogida de datos en placa se mejoran mediante el uso de una película de muestras 11 como se ha descrito anteriormente. También es posible retirar el líquido sin retirar el cristal y analizar el cristal dentro de la placa (S08, S09, S13, S18, S31b, S31). Otro posible procesamiento de cristal y protocolos de análisis se indican en la figura 7.

Más en detalle, con referencia a la figura 6 de nuevo, tras el crecimiento de cristales, la placa multicelda 1 puede ser transferida a una unidad de congelación 45 y congelarse, es decir, ser crioprocésada en la etapa S27. Es más, la placa multicelda 1 puede ser transferida a una unidad de almacenamiento 47 y almacenada en la etapa S29. Estas etapas son opcionales. Tras el criotratamiento y almacenamiento o en lugar de estas etapas la placa multicelda 1 puede ser transferida directamente a un dispositivo analizador 41 tal como un dispositivo de rayos X en la etapa S31. En este caso, la recogida de datos en placa tiene lugar mediante un dispositivo de obtención de imágenes 43 en la etapa S33. Por ejemplo, la muestra 15 de cierta celda 5 es analizada por difracción de rayos X.

Como alternativa, una muestra seleccionada 15 puede ser recolectada por un dispositivo de retirada 33 en la etapa S25 antes del análisis. En una alternativa adicional (no se muestra en las figuras) la muestra 15 puede ser recolectada antes de la congelación S27 y antes del almacenamiento S29. Para recolectar la placa multicelda 1 puede ser llevada a la posición por una placa de posicionamiento 37, p. ej., por encima de un dispositivo de corte 23. En el mismo, el dispositivo de retirada 33 se puede diseñar como pasador hueco como se muestra en la figura 3. Mientras el dispositivo de corte 23 corta la película de muestras 11 alrededor de la muestra seleccionada 15 a la película de muestras 11 se aplica una presión negativa por debajo la muestra 15. Además de la presión negativa, en la punta del dispositivo de retirada 33 se puede aplicar un adhesivo, p. ej., un pegamento, para asegurar una conexión segura de la muestra 15 al dispositivo de retirada 33. Tras la recolección la muestra 15 puede ser almacenada, congelada y/o analizada.

Tras el crecimiento de cristales y antes de las etapas S25 a S33 las muestras 15 pueden ser procesadas en su soporte original, es decir, en la placa multicelda 1. En la etapa S09 la placa multicelda 1 puede ser transferida por el dispositivo de posicionamiento 25 a diferentes unidades y dispositivos del sistema 21. Por ejemplo, el dispositivo de posicionamiento 25 puede llevar la placa multicelda 1 a posición y orientación correctas por encima del dispositivo de corte 23 o transferir la placa multicelda 1 a la unidad de fluido 29. Es más, etapas similares a las etapas descritas en relación a la figura 4 y la figura 5 pueden seguir a la etapa S09.

En la etapa S11 se selecciona una posición, una forma y un tamaño de una abertura a proporcionar por el dispositivo de corte 23 en una celda identificada 5. La selección puede tener lugar automáticamente por el dispositivo de control 39 o por un operador. En la etapa S13 la abertura en la película de muestras 11 es proporcionada por el dispositivo de corte 23, p. ej., por debajo de la muestra 25. A través de la abertura se pueden administrar productos químicos a la muestra 15. Es más, un fluido tal como la solución de muestra puede ser extraído a través de la abertura. En la etapa S15 se selecciona la composición del fluido a suministrar a cierta celda 5. En la etapa S17 la información seleccionada es transferida a la unidad de fluido 29. Es más, en la etapa S18 la unidad de fluido 29 se conecta a la abertura y un fluido en una cantidad y una composición seleccionadas es suministrado en la abertura por la unidad de fluido 29 en la etapa S19. Este proceso, es decir, etapas S09 a S19, puede ser repetido en la etapa S21 con diferentes productos químicos tales como diferentes ligandos potenciales y finalmente con un crioprotector.

Como alternativa, tras proporcionar la abertura en la película de muestras 11 en la etapa S13 un fluido puede ser extraído de la celda 5 aplicando succión por medio de la unidad de fluido 29 en la etapa S23 como se explica en la figura 5. Como se muestra en la figura 6 la etapa S23 puede ser ejecutada opcionalmente después de suministrar productos químicos a la muestra 15 en la etapa S19. Posteriormente a suministrar fluidos a la celda 5 y/o extraer fluidos de la celda 5, se pueden ejecutar las etapas S25 a S33.

Cabe señalar que realizaciones de la invención se describen con referencia a diferentes materias de asunto. En particular, algunas realizaciones se describen con referencia a reivindicaciones tipo método mientras que otras realizaciones se describen con referencia a las reivindicaciones tipo dispositivo o sistema. Sin embargo, un experto en la técnica reunirá a partir de la descripción anterior y lo siguiente que, a menos que se señale de otro modo, además de cualquier combinación de rasgos pertenecientes a un tipo de materia de asunto también cualquier combinación entre rasgos relacionados con diferentes materias de asunto se considera descrita con esta solicitud. Sin embargo, todos los rasgos se pueden combinar proporcionando efectos sinérgicos que son más que la simple suma de los rasgos.

Si bien la invención ha sido ilustrada y descrita en detalle en los dibujos y en la descripción anterior, dicha ilustración y descripción se deben considerar ilustrativas o ejemplares y no restrictivas. La invención no se limita a las realizaciones descritas. Otras variaciones a las realizaciones descritas se pueden entender y ser efectuadas por los expertos en la técnica al poner en práctica la invención reivindicada, a partir un estudio de los dibujos, la descripción y las reivindicaciones dependientes.

Es más, el término "que comprende" no excluye otros elementos o etapas, y el artículo indefinido "un" o "una" no excluyen una pluralidad. El mero hecho de que se nombren ciertas medidas en mutuamente diferentes reivindicaciones dependientes no indica que no se pueda usar con ventaja una combinación de estas medidas. Cualquier signo de referencia en las reivindicaciones no debe interpretarse como limitativo del alcance.

**LISTA DE SIGNOS DE REFERENCIA**

1	placa multicelda
3	cuerpo
5	celda
7	película de sellado
9	primer lado de cuerpo
11	película de muestras
13	segundo lado de cuerpo
15	muestra / material biológico para cristalización
17	marcador
19	depósito de precipitado
21	sistema automatizado
23	dispositivo de corte
25	dispositivo de posicionamiento
27	dispositivo de identificación
29	unidad de fluido
31	fluido con productos químicos
33	dispositivo de retirada / unidad de montaje
34	pasador
35	brazo robótico
37	soporte de placa
39	dispositivo de control
41	dispositivo de análisis
43	dispositivo de obtención de imágenes
45	unidad de congelación
47	unidad de almacenamiento
49	eje a través de muestra
51	eje medio de pasador
S01	Incubar material biológico sobre una película de muestras de una placa multicelda
S02	Sellar las celdas de la placa multicelda mediante una película de sellado
S03	Cristales en crecimiento
S05	Registrar imágenes de las celdas de la placa multicelda por el dispositivo de identificación
S07	Proporcionar las imágenes a una unidad de control y/o a un operador
S08	Identificar posiciones de cristales en una celda, p. ej., basándose en marcadores o en análisis de imagen por el dispositivo de identificación
S08b	Especificar un área a cortar el dispositivo de corte, particularmente mediante un láser

## ES 2 783 830 T3

- S08c Especificar si se van a entregar productos químicos (con la unidad de entrega de solución), cuáles y en qué cantidades
- S08d Especificar una posición de la abertura
- S08e Especificar si se va a aspirar líquido
- S08f Especificar si se van a analizar cristales en placas o recolectar con el láser y montar en un pasador y si se van a congelar o analizar sin congelación
- S09 Trasferir la placa multicelda mediante un dispositivo de posicionamiento
- S11 Seleccionar una posición, forma y tamaño de la abertura a proporcionar por el dispositivo de corte en una primera celda (si no se ha hecho ya en S08d)
- S12 proporcionar una abertura de despresurización en la película de muestras
- S13 Proporcionar la abertura en la película de muestras mediante el dispositivo de corte
- S15 Seleccionar la composición del fluido a suministrar a la primera celda (si no se ha hecho ya en S08c)
- S17 Transmitir la información seleccionada al sistema
- S18 Conectar la unidad de fluido a la abertura
- S19 Suministrar un fluido en una cantidad y una composición seleccionadas en la abertura por la unidad de fluido
- S21 Repetir las etapas S09 a S19
- S23 Extraer fluido de la celda aplicando succión por medio de la unidad de aspiración de la unidad de fluido
- S25 Recolectar la muestra mediante un dispositivo de retirada
- S25a Cortar un área de película de muestras alrededor de un cristal o alrededor de un grupo de cristales
- S25b Montar el área de película sobre un pasador con el dispositivo de retirada
- S27 Trasferir la placa multicelda o el cristal montado a una unidad de congelación y congelar
- S29 Trasferir la placa multicelda o el cristal montado a una unidad de almacenamiento y almacenar
- S31 Trasferir la placa multicelda a un dispositivo de análisis
- S31b Trasferir posiciones de cristal a un dispositivo de análisis por rayos X
- S33 Recogida de datos/Analizar la muestra mediante un dispositivo de obtención de imágenes

**REIVINDICACIONES**

1. Placa multicelda (1) para incubación automatizada, procesado, recolección y análisis de muestras (15) de material biológico, la placa multicelda (1) comprende  
un cuerpo (3) con una pluralidad de celdas (5);  
una película de sellado (7) para sellar las celdas (5) en un primer lado (9) del cuerpo (3);  
una película de muestras (11) para sellar las celdas (5) en un segundo lado (13) del cuerpo (3);  
en donde la película de muestras (11) se adapta para acomodar un material biológico para cristalización;  
en donde  
la película de muestras (11) comprende un grosor entre 1  $\mu\text{m}$  y 50  $\mu\text{m}$ ;  
la placa multicelda se caracteriza por que la película de muestras comprende un material de copolímero de olefina cíclica como material compatible con fotoablación inducida por láser y/o compatible con recogida de datos de rayos X.
2. Placa multicelda (1) según la reivindicación 1,  
en donde la película de muestras (11) comprende un material antiadhesivo.
3. Placa multicelda (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2,  
en donde el cuerpo (3) comprende un patrón predeterminado de marcadores (17) para permitir un posicionamiento, identificación y/o localización automatizados de celdas (5) y/o muestras (15),  
en donde los marcadores (17) se seleccionan del siguiente grupo de marcadores: rebaje, protuberancia y marcador óptico.
4. Sistema automatizado (21) para incubación, procesamiento, recolección y análisis de muestras (15) de material biológico, el sistema comprende  
una placa multicelda (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;  
un dispositivo de corte (23);  
en donde el dispositivo de corte (23) se adapta para penetrar la película de muestras (11).
5. Sistema automatizado (21) según la reivindicación 4, en donde el dispositivo de corte (23) se adapta para penetrar la película de muestras (11) por fotoablación.
6. Sistema automatizado (21) según la reivindicación 4 o 5, que comprende además  
un dispositivo de identificación (27) para identificar automáticamente una celda (5) y/o la posición de un cristal en una celda (5) de la placa multicelda (1) basándose en marcadores (17) sobre la placa multicelda (1) y/o basándose en análisis de imagen.
7. Sistema automatizado (21) según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6,  
en donde el dispositivo de corte (23) se diseña como uno de un láser de nanosegundo, un láser de picosegundo y un láser de femtosegundo.
8. Sistema automatizado (21) según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, que comprende además  
una unidad de fluido (29) para suministrar un fluido a una celda (5) y/o a un cristal en la celda (5) de la placa multicelda (1) y/o para extraer un fluido de una celda (5) de la placa multicelda (1);  
en donde el dispositivo de corte (23) se adapta para proporcionar una abertura en la película de muestras (11);  
en donde la unidad de fluido (29) es conectable por medio de la abertura a la celda (5) de la placa multicelda (1).
9. Sistema automatizado (21) según la reivindicación 8,  
en donde el dispositivo de corte (23) se adapta para variar las dimensiones y/o la forma de la abertura automáticamente dependiendo de la cantidad del fluido a suministrar o extraer.
10. Sistema automatizado (21) según cualquiera de las reivindicaciones 8 y 9,

en donde la unidad de fluido se adapta para suministrar al menos uno de un crioprotector y una solución de ligando a una celda de la placa multicelda (1).

11. Sistema automatizado (21) según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10,

en donde la unidad de fluido (29) se adapta para aplicar una presión negativa a una celda (5) de la placa multicelda (1).

12. Sistema automatizado (21) según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, que comprende además un dispositivo de retirada (33) para retirar la muestra (15) de la placa multicelda (1);

en donde el dispositivo de retirada (33) se adapta para aplicar presión negativa a la película de muestras (11);

en donde el dispositivo de corte (23) se adapta para cortar alrededor de una muestra (15) sobre la película de muestras (11).

13. Método para hacer funcionar el sistema automatizado (21) según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 12, el método comprende las siguientes etapas

identificar (S08) una celda (5) y/o la posición de cristales en una celda (5) de la placa multicelda (1) según una de las reivindicaciones 1 a 3;

proporcionar (S13) una abertura en la película de muestras (11) de la celda identificada (5) por un dispositivo de corte (23);

conectar (S18) una unidad de fluido (29) a la celda (5) por medio de la abertura;

suministrar (S19) un fluido a la celda (5) o extraer (S23) un fluido de la celda (5) por la unidad de fluido (29).

14. Método según la reivindicación 13, que comprende además

en donde la identificación tiene lugar automáticamente basándose en marcadores (17) sobre la placa multicelda (1) y/o basándose en análisis de imagen por el dispositivo de identificación (27).

15. Método según la reivindicación 13 o 14, en donde un fluido se suministra a la celda (5), el fluido se adapta para influir en un proceso de cristalización de un cristal comprendido dentro de la celda (5).

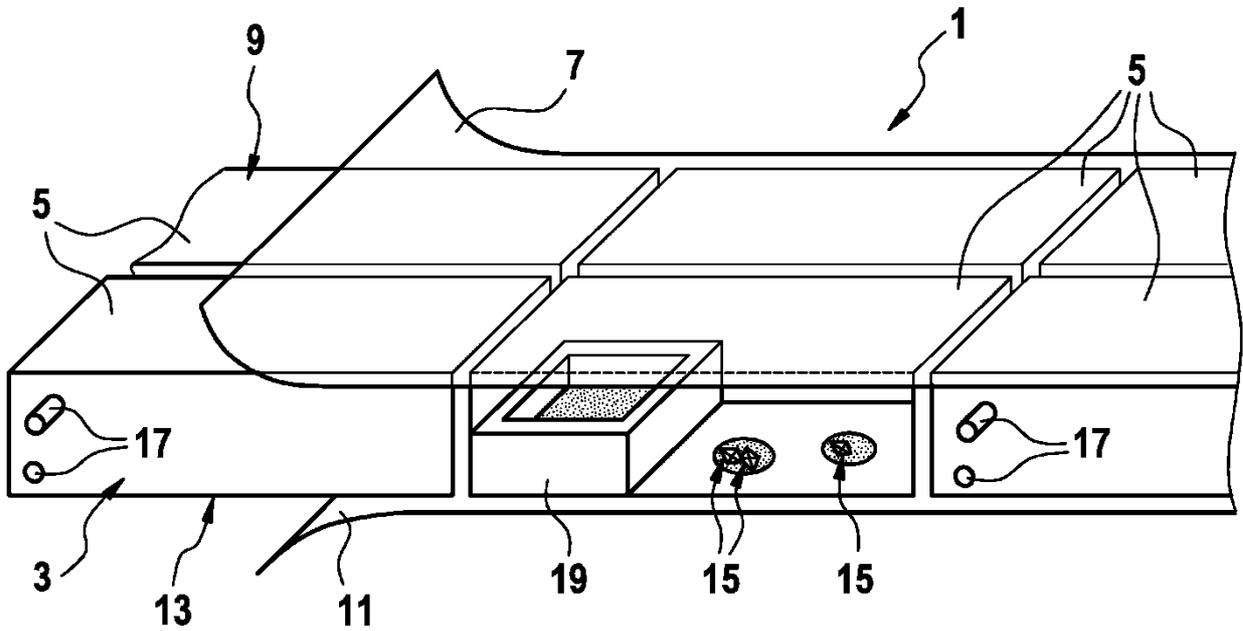


FIG. 1

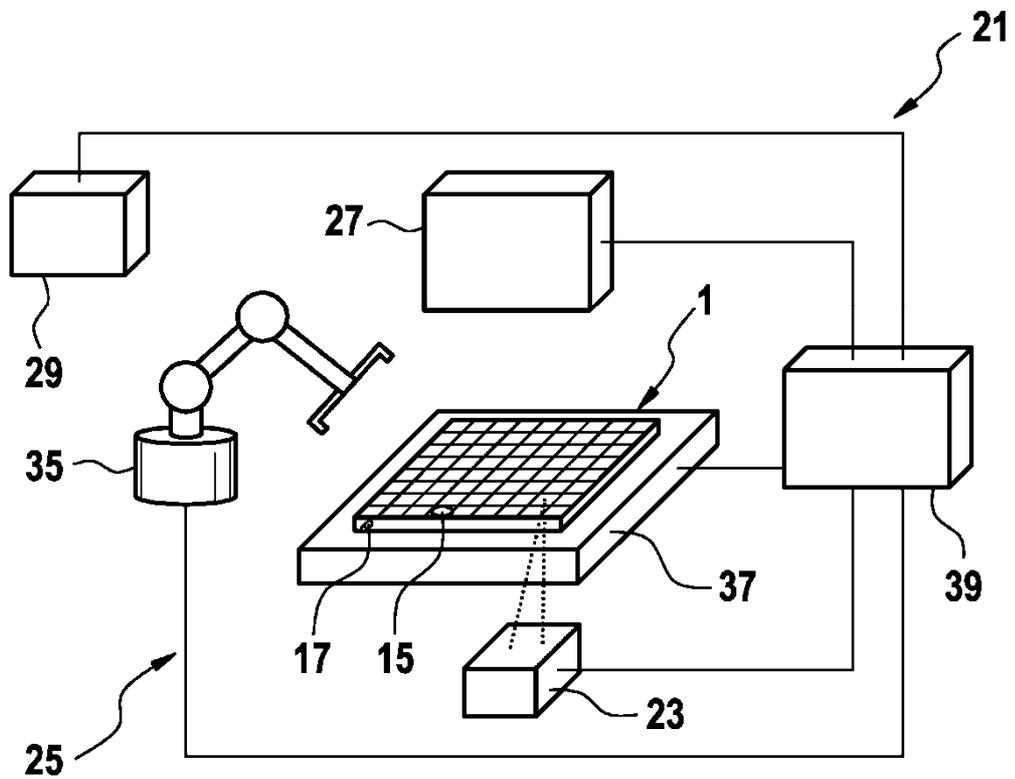


FIG. 2

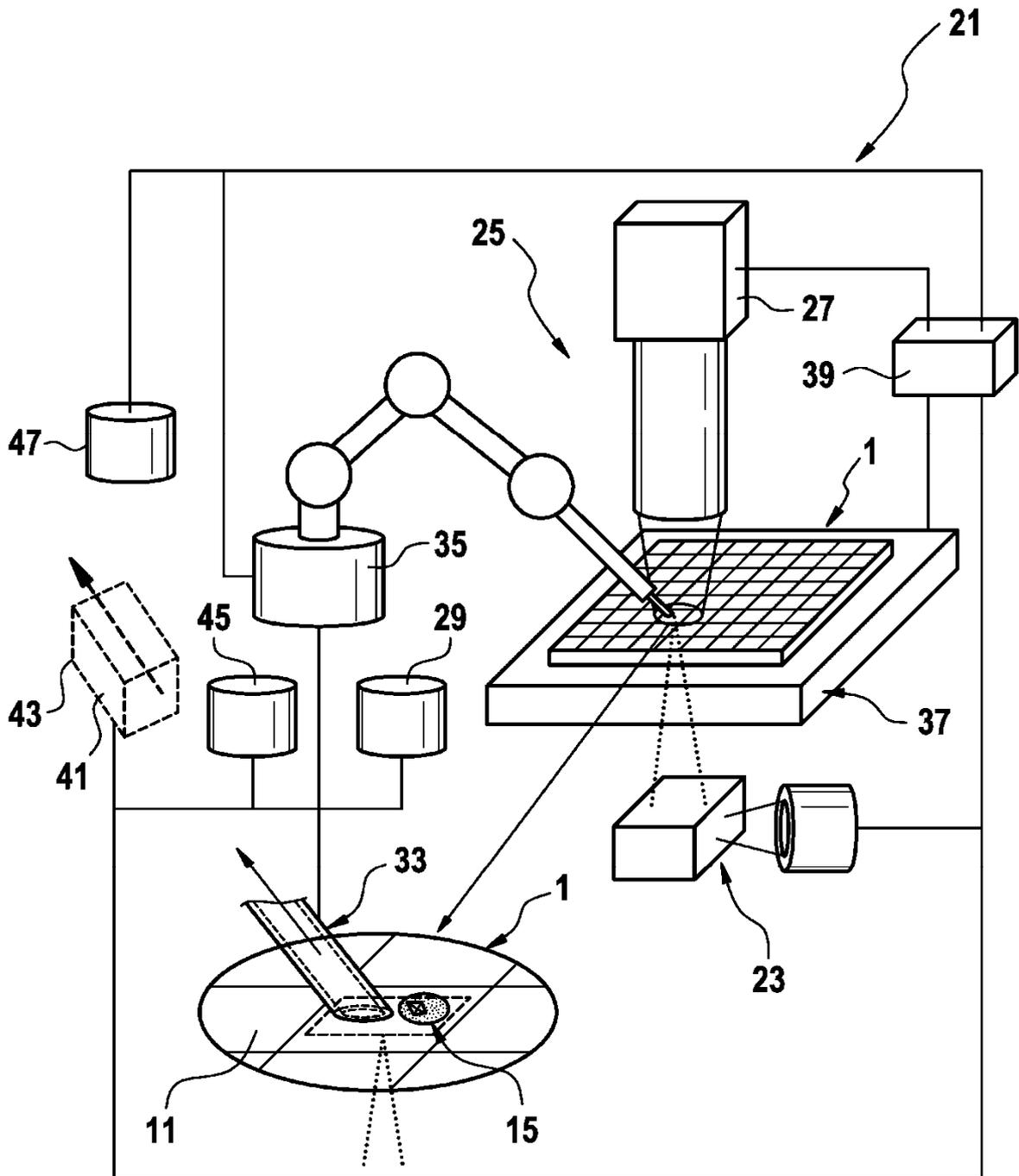
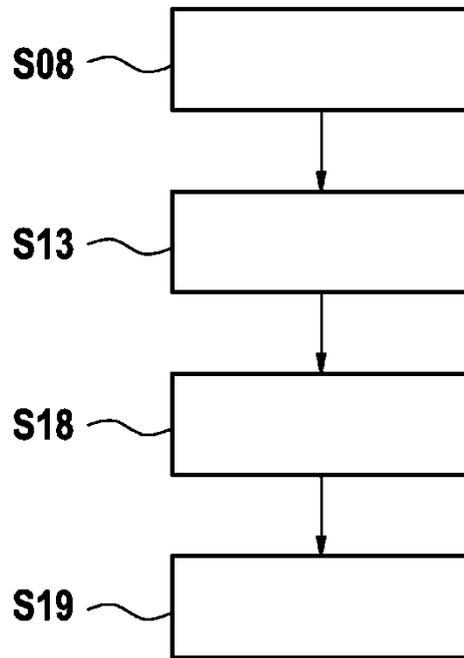
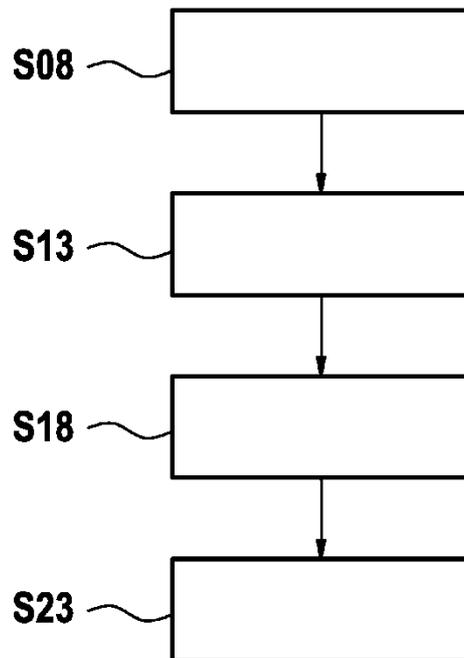


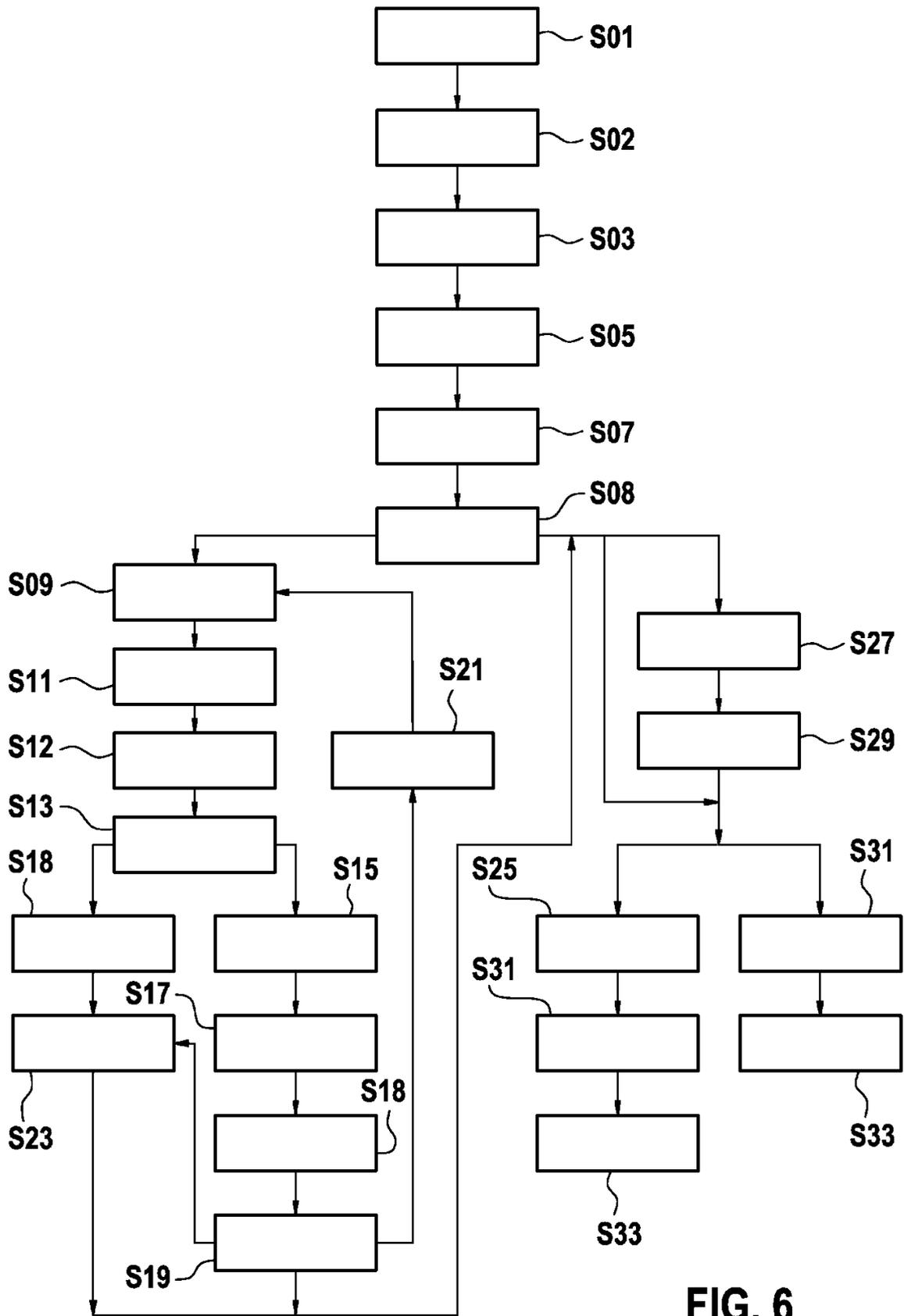
FIG. 3



**FIG. 4**



**FIG. 5**



**FIG. 6**



