(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 000 669**

(51) Int. Cl.:

H01J 49/04 (2006.01)
G01N 33/483 (2006.01)
G01N 1/04 (2006.01)
G01N 1/28 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.12.2015 PCT/US2015/068330**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.07.2016 WO16109825**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.12.2015 E 15876373 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2024 EP 3240885**

(54) Título: **Muestras biológicas estructuradas para análisis por citometría de masas**

(30) Prioridad:

31.12.2014 US 201462098890 P
28.01.2015 US 201562108911 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.03.2025

(73) Titular/es:

FLUIDIGM CANADA INC. (100.00%)
70 Esna Park Drive
Markham, ON L3R 6E7, CA

(72) Inventor/es:

LOBODA, ALEXANDER V.

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

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

Muestras biológicas estructuradas para análisis por citometría de masas

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica la prioridad y el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos 62/108,911, presentada el 28 de enero de 2015, y de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos 62/098,890, presentada el 31 de diciembre de 2014.

CAMPO

La presente divulgación se refiere a aparatos y métodos para introducir muestras biológicas en un citómetro de masas.

ANTECEDENTES

La citometría de masas es una técnica recientemente desarrollada para el estudio de muestras biológicas. La técnica se desarrolló originalmente para estudiar poblaciones celulares en las que muestras de interés que contenían varias células biológicas se "teñían" con sondas de afinidad, como anticuerpos que están unidos a etiquetas elementales. La cantidad de sondas de afinidad de un tipo dado unidas a cada célula puede usarse para caracterizar cada célula individual. La cantidad de sonda de afinidad de cada tipo está relacionada directamente con la cantidad de la etiqueta elemental asociada. La cantidad del material de etiquetado elemental puede medirse haciendo pasar la célula por una fuente de iones de plasma acoplado inductivamente (ICP) de un citómetro de masas. La técnica de "tinción" de material biológico con sondas de afinidad con etiquetas elementales se ha extendido recientemente al campo de la imagenología de tejidos biológicos. En la citometría de masas de imagenología, un tejido de interés se "tiñe" con sondas de afinidad/etiquetas moleculares y puede usarse la ablación láser para extraer las etiquetas elementales de ubicaciones discretas (píxeles) en el tejido. La espectrometría de masas de imagenología sigue un método similar, salvo que se basa en la detección de átomos presentes de manera natural en la muestra en lugar de los átomos de etiquetado en las etiquetas elementales.

Una limitación de la citometría de masas es la eficiencia de la introducción de muestras biológicas, como células, en el citómetro de masas. La eficiencia de introducción de células de los citómetros de masas comerciales es de aproximadamente el 30%. Esto significa que más de dos tercios de las células biológicas de una muestra se pierden antes de que puedan ser registradas por el citómetro de masas.

Una limitación adicional de la citometría de masas de imagenología basada en la ablación por láser y de la espectrometría de masas de imagenología basada en la ablación por láser es la baja tasa de registro de píxeles. La tasa de registro de píxeles está limitada por el tiempo de lavado de la célula de ablación láser y los conductos de gas de conexión. Incluso las células de ablación láser más rápidas tienen un tiempo de lavado del orden de 30 ms. Esto es mucho más lento que las capacidades de registro intrínsecas del citómetro de masas o del espectrómetro de masas. En un citómetro de masas típico, el rendimiento de las células puede ser tan alto como de 1000 células por segundo; sin embargo, la dispersión del penacho de ablación láser a medida que se desplaza por el aparato de ablación láser, es decir, el tiempo de lavado, limita la tasa de píxeles a unos 30 píxeles por segundo. Además, en el proceso de ablación por láser, cada píxel de material se vaporiza y se convierte en un aerosol. El penacho de aerosol se transporta luego a la fuente de ICP a través de un conducto de gas. Uno de los problemas de este enfoque es que una fracción del penacho de aerosol puede contaminar zonas colindantes, por ejemplo, píxeles colindantes, de la muestra de tejido. Alguna fracción del penacho de aerosol también puede perderse durante el transporte a través del conducto de gas que conecta la cámara de ablación láser con la fuente de iones ICP. Además, la dispersión dinámica del gas del penacho de aerosol durante el transporte a la fuente de ICP limita aún más el tiempo de lavado. Por lo tanto, en vista de estas restricciones, es deseable evitar el método de ablación a distancia y la formación del penacho de aerosol de una muestra biológica y mejorar de este modo el rendimiento de la citometría de masas de imagenología y la espectrometría de masas de imagenología. El documento US2014/121117A1 describe un sistema de citometría de masas. El documento US2013/234015A1 describe una cámara de ablación láser, que es adecuada para su uso en una unidad convencional de microdisección asistida por láser (LMD). El documento US5894063A describe métodos y aparatos para la desorción e ionización de analitos con el propósito de su posterior análisis científico mediante métodos como, por ejemplo, espectrometría de masas o biosensores. El documento US2010/213367A1 describe un método y un sistema de desorción ablativa suave. El documento GB2340298A describe una sustancia de matriz líquida para MALDI.

SUMARIO

La invención se define en las reivindicaciones 1 y 5. Las realizaciones de la invención se definen en las reivindicaciones dependientes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los dibujos descritos a continuación tienen únicamente propósitos ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la presente divulgación.

La FIG. 1 muestra un diagrama esquemático de descripción genérica de una configuración del instrumento de citómetro de masas que funciona con muestras preestructuradas de acuerdo con ciertas realizaciones.
La FIG. 2 muestra un ejemplo de sitios de captura estructurado en patrón en un portamuestras.
La FIG. 3 muestra una interfaz líquida y un portamuestras con sitios de captura estructurados en patrón en un portamuestras para introducir muestras biológicas discretas en una corriente de gas de acuerdo con ciertas realizaciones.
La FIG. 4 muestra un ejemplo de una muestra de tejido estructurado para aplicación de imagenología y portador asociado de acuerdo con ciertas realizaciones.
La FIG. 5 muestra un ejemplo de una muestra de tejido preestructurada con espacios entre subsecciones para aplicaciones de imagenología y portador asociado de acuerdo con ciertas realizaciones.
La FIG. 6 muestra una muestra biológica estructurada y un portador asociado configurados para desorción láser de acuerdo con ciertas realizaciones. Las propiedades de la luz se eligen de tal manera que el portador sea virtualmente transparente mientras que la película de desorción en el sitio de captura adsorbe la luz y provoca el lanzamiento de la parte de muestra.
La FIG. 7 muestra una muestra biológica estructurada y un portador asociado configurados para la desorción láser de acuerdo con ciertas realizaciones. Las propiedades de la luz láser se eligen de tal manera que la luz pueda pasar a través de la parte de muestra con un daño mínimo, pero provocando depósito térmico en el sitio de captura (por ejemplo, a través de la explosión de la película de desorción).
La FIG. 8A a FIG. 8D muestra ablación y desorción para analizar una ubicación de interés en una muestra biológica.

Ahora se hace referencia en detalle a ciertas realizaciones de dispositivos, aparatos y métodos. No se pretende que las realizaciones divulgadas limiten las reivindicaciones. Por el contrario, se pretende que las reivindicaciones cubran todas las alternativas, modificaciones y equivalentes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

El material biológico estructurado se usa para introducir muestras discretas o píxeles de material biológico en una fuente de ionización, por ejemplo una fuente de ICP, de un citómetro de masas o espectrómetro de masas. El material biológico estructurado se refiere a material como células individuales, porciones de tejido u otros agregados de material biológico, dispuestos en sitios discretos y direccionables en un portador. El material biológico estructurado puede liberarse del portador e introducirse secuencialmente cada píxel de material discreto en un citómetro de masas o espectrómetro de masas para su análisis. Las ventajas de la introducción secuencial de píxeles de material discreto frente a la introducción aleatoria de muestras biológicas como en la citometría de masas o la espectrometría de masas convencionales incluyen una mayor velocidad de procesamiento de la muestra y la eliminación de multímeros como dímeros, trímeros, etc., provocados por la llegada simultánea de múltiples entidades. Al eliminar los multímeros también puede simplificarse el procesamiento y el análisis de los datos.

Un "píxel" se refiere a una porción de una muestra material que se introduce en un instante de tiempo en una fuente de ionización, por ejemplo una fuente de ICP, de un citómetro de masas o espectrómetro de masas. En ciertas realizaciones, un píxel representa una célula o grupo de células, y en ciertas realizaciones, una porción de una sección de tejido u otra muestra biológica discreta. Un píxel puede tener cualquier dimensión o forma adecuadas. Por ejemplo, un píxel puede tener dimensiones de 10 nm a 10 µm, de 100 nm a 10 µm, y en ciertas realizaciones de 1 µm a 100 µm. Los términos "píxel" y "sitio discreto" se utilizan indistintamente. El material de un píxel no se vaporiza durante la liberación de un portador o durante el tránsito a una fuente de ionización, por ejemplo una fuente de ICP.

La FIG. 1 muestra un diagrama esquemático de un instrumento de citometría de masas que funciona con una muestra estructurada. Un portador de muestra que tiene sitios discretos o píxeles que contienen material biológico sirve como fuente de material biológico. El material biológico puede ser elevado individualmente de los sitios discretos para ser arrastrado en un flujo de gas portador. El flujo de gas portador mantiene la separación del material biológico discreto para inyectar el material biológico discreto en una fuente de ionización, por ejemplo una fuente de ICP, donde el material biológico es vaporizado e ionizado y posteriormente analizado por espectrometría de masas.

En ciertas realizaciones, la superficie del portador configurada con sitios discretos está montada perpendicular o sustancialmente perpendicular a un conducto de gas portador. La entrada del conducto de gas portador puede estar situada muy cerca de la superficie del portador. El gas portador que fluye en el conducto de gas portador puede introducirse a través de la entrada y/u otras aberturas cercanas o incluidas con el conducto. La entrada del conducto puede contener uno o más separadores o elementos de forma cónica para facilitar la captura de una muestra biológica desorbida y/o dirigir la muestra desorbida al conducto de gas. A veces, la superficie del portador no tiene sitios discretos. En este caso, pueden usarse métodos particulares de ablación y desorción, como los que se analizan a continuación, para analizar porciones particulares, como células o grupos de células, de la muestra biológica

sin dividir la muestra en partes discretas de la muestra en sitios discretos.

Varios aparatos y métodos para introducir un penacho sometido a ablación de material en un flujo de gas portador para su introducción en una fuente de ionización, por ejemplo una fuente de ICP, se divulgan en la Solicitud Internacional Nº WO 2014/169394, que se incorpora por referencia en su totalidad. Pueden emplearse aparatos y métodos similares con las realizaciones proporcionadas por la presente divulgación para introducir una muestra no vaporizada de material biológico en el flujo de gas portador. Las varias realizaciones muestran una corriente de gas portador que fluye a través de la superficie del objetivo, flujos de gas dirigidos, separadores y conductos de gas dispuestos en cualquier lugar desde perpendicular a horizontal con respecto a la superficie del portador.

El portador puede montarse en una etapa de traslación. La etapa de traslación puede ser capaz de mover la superficie del portador hacia y desde la entrada del conducto de gas. La etapa de traslación también puede estar configurada para mover el portador en direcciones perpendiculares al conducto de gas portador. La etapa de traslación está configurada para mover el portador con respecto a la entrada del conducto de gas de un sitio a otro a una velocidad rápida. Moviendo el portador de un sitio a otro y desorbiendo una muestra biológica en cada sitio, puede introducirse una corriente de paquetes discretos de material biológico en el gas portador y transportarse a una fuente de ionización, por ejemplo una fuente de ICP, de un citómetro de masas.

Portamuestras

La invención proporciona un portador que comprende: una superficie; una pluralidad de sitios discretos dispuestos en la superficie, en donde cada uno de la pluralidad de sitios discretos está configurado para retener una muestra biológica; y cada uno de la pluralidad de sitios discretos está configurado para liberar la muestra biológica tras la aplicación de un pulso de energía.

La invención también proporciona un portador que comprende: una superficie, en donde la superficie está configurada para retener una muestra biológica y la superficie está configurada para liberar la muestra biológica tras la aplicación de un pulso de energía. Los tipos de energía que pueden provocar la liberación de la muestra biológica (es decir, desorción) del portamuestras se analizan más adelante.

En algunas realizaciones, cada uno de la pluralidad de sitios discretos se caracteriza por un área de 1 µm a 100 µm de diámetro circunscrito. En algunas realizaciones, la pluralidad de sitios discretos comprende moléculas de afinidad configuradas para retener la muestra biológica.

En algunas realizaciones, el portador comprende un canal subyacente a la pluralidad de sitios discretos, en el que el canal se extiende a través de un espesor del portador; y la pluralidad de sitios discretos comprende un orificio acoplado fluidamente al canal.

En algunas realizaciones, la pluralidad de sitios discretos es direccionable individualmente.

Como se analiza con más detalle a continuación en algunas realizaciones, la pluralidad de sitios discretos comprende un material térmicamente desorbible configurado para liberar la muestra biológica. De igual manera, como se analiza con más detalle a continuación, la muestra puede ser desorbida de la muestra por energía térmica, energía mecánica, energía cinética, y una combinación de cualquiera de los anteriores. Un ejemplo es el uso de energía de radiación láser, en una técnica denominada elevación (transferencia directa inducida por láser; véase, por ejemplo, Doraiswamy et al., 2006, Applied Surface Science, 252: 4743-4747; Fernandez-Pradas, 2004, Thin Solid Films 453-454: 27-30; Kyrkis et al., en Recent Advances in Laser Processing of Materials, Eds. Perriere et al., 2006, Elsivier). Por consiguiente, el portamuestras comprende una capa de película de desorción. En otras palabras, el portamuestras tiene una capa de película en la superficie del portamuestras que es para recibir la muestra, y que ayuda a la separación de la muestra del portamuestras absorbiendo la radiación láser. La película de desorción puede absorber la radiación para provocar la liberación de la película de desorción y/o de la muestra biológica (por ejemplo, en algunos casos la película de muestra se desorbe del portamuestras junto con la muestra biológica, en otros casos, la película permanece unida al portamuestras y la muestra biológica se desorbe de la película de desorción).

En ciertas realizaciones, un portamuestras incluye una cubierta con una ventana. Una cubierta puede proteger las muestras biológicas antes de la desorción y/o puede facilitar el control del flujo de gas portador sobre la muestra. El portador puede moverse con respecto a una ventana para llevar las muestras discretas en la superficie del portador debajo de la ventana. La ventana puede tener características que faciliten la captura de una muestra biológica por el conducto de gas, como la canalización del gas portador y/o características electrostáticas. Por ejemplo, en ciertas realizaciones es deseable que el flujo de gas portador sea laminar para facilitar la capacidad de introducir sistemáticamente píxeles de la muestra biológica en el flujo de gas y posteriormente en la fuente de ionización, por ejemplo un soplete de ICP. El uso de una cubierta con una ventana puede ayudar a mantener una dinámica de gas de muestra a muestra consistente para facilitar el arrastre de píxeles discretos de material biológico en la corriente de gas.

En ciertas realizaciones, el portamuestras tiene la forma de una placa. La placa puede tener una superficie sustancialmente plana u otra topografía de superficie adecuada. En algunas realizaciones, el portador comprende una superficie definida topográficamente configurada para retener la muestra biológica. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la placa puede tener características rebajadas para retener la muestra biológica y/o características elevadas para retener la muestra biológica. La superficie de una placa puede tener canales u otras características adecuadas para controlar el flujo de gas y/o líquido que contiene las muestras a través de la superficie de la placa y/o para facilitar el arrastre de la muestra biológica desorbida en el flujo de gas portador. Por ejemplo, pueden proporcionarse postes con sitios de captura. La geometría del poste puede estar configurada para ayudar a la dinámica del gas permitiendo que el flujo del gas portador envuelva el material que se está elevando.

En ciertas realizaciones, como cuando la muestra biológica es una sección de tejido, el portamuestras puede caracterizarse por características de superficie corrugada con bordes elevados configurados para cortar y separar una sección de tejido aplicada. Cuando una sección de tejido se aplica a una superficie portadora que tiene características con bordes cortantes, la sección de tejido puede separarse en regiones individuales o píxeles que se separan físicamente entre sí.

Los sitios de captura discretos pueden tener un área adecuada según sea apropiado para capturar un material biológico particular. Por ejemplo, las células animales eucariotas tienen dimensiones de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 30 µm. Un sitio de captura discreto puede incluir propiedades que faciliten la captura y/o retención de un material biológico en el sitio discreto. La propiedad puede ser de naturaleza química, como una molécula de afinidad u otra interacción química que facilite la adsorción o adhesión. La propiedad puede ser electrostática y, en ciertas realizaciones, la propiedad puede ser física, como tener características superficiales que faciliten la adhesión, que pueden incluir una superficie de adhesión rugosa o especialmente diseñada, como tener características espinosas o en forma de gancho.

En ciertas realizaciones, un sitio discreto puede tener una estructura multicapa con capas diseñadas para diferentes propósitos. Por ejemplo, una capa exterior o superior puede estar configurada para capturar y retener una muestra biológica, una capa interior puede estar configurada para calentar el sitio discreto para desorber o liberar el material biológico del sitio discreto, y una capa inferior puede estar configurada para la adhesión al material del sustrato. En algunas realizaciones, la capa superior puede proporcionar las propiedades del sitio de captura que facilitan la captura del material biológico objetivo. Por ejemplo, la capa superior puede proporcionar la unión química preferente con el material biológico (por ejemplo, a través de moléculas de afinidad o similares). En algunas realizaciones la capa superior también puede proporcionar las fuerzas electrostáticas para atraer el material biológico y/o las características superficiales (por ejemplo, características superficiales rugosas, ganchos y/o espinas o similares).

En ciertas realizaciones, un portador puede tener otras geometrías. Las funciones del portador pueden incluir capturar una muestra biológica, retener una muestra biológica, y/o facilitar la liberación selectiva de la muestra biológica de la superficie del sustrato. Por tanto, aunque pueden usarse sustratos o placas planas, como portadores pueden emplearse otras estructuras como perlas, filamentos, tubos, varillas, mallas y otras estructuras de soporte adecuadas. Según sea apropiado para una geometría de portador particular, también puede usarse una estructura asociada para controlar el flujo de gas sobre la superficie del portador. Por ejemplo, en ciertas realizaciones un portador puede comprender un filamento o varilla dentro de un tubo circundante. El filamento sirve de soporte y el tubo circundante canaliza el flujo de gas para arrastrar la muestra biológica desorbida y su introducción en la fuente de ionización, por ejemplo un soplete de ICP.

Muestras biológicas

En ciertas realizaciones, una muestra biológica es una célula y en ciertas realizaciones, una sección de tejido.

En ciertas realizaciones, un sitio de captura discreto contiene una única célula o múltiples células.

En ciertas realizaciones, una muestra biológica puede ser un virus, una bacteria, una estructura subcelular como un núcleo o una mitocondria, o una célula vegetal eucariota.

Captura de muestras

En ciertas realizaciones, la captura y liberación de muestras puede ser un proceso dinámico, lo que significa que los procesos de captura y liberación se producen más o menos (por ejemplo, casi) simultáneamente. Por ejemplo, una muestra biológica, como una célula aislada, puede introducirse en un fluido que fluye sobre la superficie de un portador. A medida que el fluido con la muestra arrastrada fluye sobre sitios discretos, la muestra se captura en los sitios discretos. Una vez capturada la muestra, puede activarse un proceso de desorción o elevación para expulsar la muestra (por ejemplo, una célula o similar). En algunas realizaciones, puede proporcionarse un detector de captura de muestras que puede acoplarse operativamente con el mecanismo de desorción o elevación (por ejemplo, láser, mecanismo de tipo chorro de burbuja) para liberar la muestra capturada en la fase gaseosa. El detector de captura

puede, por ejemplo, basarse en información de dispersión frontal o lateral de la célula capturada. O puede basarse en la detección de una señal fluorescente de una célula teñida con un reactivo particular para producir la señal fluorescente. Además, en algunas realizaciones la apariencia de la célula puede ser detectada por una cámara CCD usando una observación al estilo de un microscopio del sitio de captura. Pueden emplearse otros métodos no ópticos, como el sondeo de la conductividad eléctrica de la solución, similar al método Coulter, o el sondeo de la solución con señales eléctricas de alta frecuencia. Por consiguiente, en algunas realizaciones, algunos sitios pueden estar capturando muestras mientras que otros sitios están liberando muestras.

Opcionalmente, puede proporcionarse un controlador de cadencia que está acoplado operativamente con los detectores de captura de muestra y el mecanismo de desorción o elevación. El controlador de cadencia puede retrasar un evento de liberación cuando se detecta la captura de una célula hasta el inicio de la siguiente ventana de tiempo en la configuración de adquisición de datos. Por consiguiente, esta configuración y método pueden convertir una llegada aleatoria de células en un flujo en eventos de liberación espaciados en el tiempo equitativamente en la fase gaseosa. Este enfoque puede reducir o eliminar de otro modo los "dobletes" y otros "multipletes" detectados comúnmente en citometría de masas cuando el sistema funciona en modo solución debido a la aleatoriedad de la llegada de células.

En ciertas realizaciones, el portador puede cargarse externamente con muestra biológica, donde las células son fijadas al portador antes de la introducción del portador de muestra en la cámara de elevación celular. La muestra biológica puede cargarse pasiva o activamente. Por ejemplo, cuando se carga pasivamente, puede aplicarse una solución que contenga muestra biológica sobre la superficie del portador y dejar que la muestra biológica se adhiera a sitios discretos de la superficie del portador. Con una muestra cargada activamente, un material biológico puede depositarse en un sitio discreto. Los sitios discretos pueden tener parches de medios de unión de tal manera que las células se adhieran sólo en los sitios discretos. Por tanto, en lugar de células dispersadas aleatoriamente en el portaobjetos, las células pueden disponerse en los sitios de captura y, opcionalmente, los sitios de captura pueden espaciarse a intervalos regulares para facilitar un direccionamiento más conveniente del láser. En algunas realizaciones, los sitios de captura están configurados o dimensionados para alojar una única célula por sitio.

Los sitios discretos pueden incluir una fracción de afinidad para unirse a sitios complementarios de una muestra biológica y/o pueden caracterizarse por otras propiedades o funcionalidades químicas adecuadas para capturar una muestra biológica genérica o específica. Por ejemplo, un sitio de captura puede incluir moléculas que mejoran las interacciones iónicas o hidrofóbicas-hidrofílicas con el material biológico.

En ciertas realizaciones, la región de una superficie portadora que no contiene sitios de captura puede estar cubierta con un material al que no se adhieren las células y/o que hace que el material biológico se agregue en los sitios de captura discretos. Un ejemplo se muestra en la FIG. 2 en la que una capa "repelente" de material se dispone sobre la superficie portadora no cubierta por los sitios de captura discretos.

Un ejemplo de un enfoque para capturar células es el divulgado por Wang et al. en el que un sustrato nanoestructurado tridimensional recubierto de anticuerpo (recubierto de anti-EpCAM) que proporciona una captura mejorada de células positivas para EpCAM de una suspensión celular. Wang et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2009, 48(47), 8970-8973). La interdigitación de los componentes de la superficie celular a nanoescala y el conjunto de nanopilares de silicio mejora las interacciones topográficas locales, lo que da como resultado una mejora de la eficacia de la captura celular. Otros aparatos y métodos adecuados para capturar células se describen en Lee et al., Nano. Lett. 2012, 12(6), 2697-2704. En algunas realizaciones, los sitios de captura están configurados para capturar una célula por sitio de tal manera que puede realizarse el análisis de células individuales usando espectrometría de masas o citometría de masas. Opcionalmente, en algunas realizaciones, los sitios de captura pueden incluir uno o más anticuerpos inmovilizados que se unen a un marcador de la superficie celular de la célula o células de interés.

También pueden usarse métodos mecánicos para capturar células. La FIG. 3 muestra un ejemplo de un portador que tiene sitios de captura estructurados en patrones con cada sitio de captura acoplado a un canal que se extiende a través del espesor del portador. Cada sitio de captura incluye uno o más orificios pequeños. Una solución que contiene material biológico, como células, se hace fluir sobre la superficie del portador y cuando se aplica succión a un canal por el que pasan las células, se puede tirar de ellas hacia un sitio de captura y ser retenidas. Para liberar el material biológico de un sitio de captura, puede aplicarse presión al canal para expulsar partículas de material biológico a través del flujo de solución y hacia una corriente de gas para su inyección en una fuente de ionización, por ejemplo una fuente de ICP. Como se muestra en la FIG. 3, el material biológico puede incluir una cierta cantidad de líquido cuando se expulsa a la fase gaseosa. El aumento de presión puede ser creado por un accionador piezoeléctrico o por un calentador pulsado que crea un efecto de chorro de burbuja o por un pico de presión creado por la absorción de radiación láser cerca del material biológico.

La corriente de partículas en fase gaseosa de material biológico se asemeja en cierto modo a la corriente de una gota de un generador de gotitas a demanda (DoD). Como se sabe que los generadores DoD funcionan con una fuente de ionización, por ejemplo una fuente de iones de ICP, el vapor de partículas producido por esta realización también podría hacerse compatible con la fuente de ionización, por ejemplo la fuente de iones de ICP. Un beneficio

potencial de esta disposición sobre un generador DoD es que los sitios de captura pueden ser diseñados para que retengan sólo una partícula de material biológico, como una célula. El material biológico capturado puede liberarse a intervalos de tiempo equitativamente espaciados y minimizar de este modo la confusión provocada por el solapamiento de los transitorios de señal de cada partícula, que es un problema común cuando las células entran aleatoriamente en una fuente de ionización, por ejemplo una fuente de ICP. La función de captura del sitio de captura puede facilitarse mediante medios mecánicos sencillos, como obstrucciones en el flujo, o mediante un canal de succión de vacío opcional en el que se arrastra algo de líquido hacia abajo a medida que una célula es detenida por la restricción de diámetro en el sitio de captura. Una vez capturada la partícula, puede expulsarse al flujo de gas usando medios adecuados, como la evaporación explosiva provocada por un pulso láser dirigido al sitio de captura o la evaporación explosiva provocada por microcalentadores individualmente direccionables dispuestos bajo cada uno de los objetivos de captura. Las partículas de material biológico también pueden expulsarse mediante la aplicación de un campo eléctrico intenso. Pueden incorporarse disposiciones electrodos apropiadas en o alrededor de los sitios de captura para aplicar campos eléctricos intensos y provocar la expulsión del material capturado. Las gotitas también pueden expulsarse mediante microaccionadores basados en sistemas microelectromecánicos (MEMS). Una matriz de microespejos MEMS como la que se usa en los chips de proyección digital comerciales representa un ejemplo de microaccionadores de movimiento rápido densamente empaquetados.

En ciertas realizaciones, la preestructuración del tejido biológico en una sola dimensión puede tener lugar en una cinta o banda delgada. La cinta puede estar dispuesta en un carrete. El carrete puede disponerse de tal manera que cada vuelta de la cinta esté separada de la siguiente vuelta por un espacio para evitar manchar la muestra. La cinta puede contener puntos de captura para la preestructuración de la muestra. La muestra puede registrarse en el carrete haciendo que la muestra líquida entre en contacto con la cinta en movimiento a través de un capilar a medida que la cinta se enrolla en el carrete. El líquido puede dejarse secar mientras que el material biológico capturado permanecerá adherido a los sitios de captura.

En ciertas realizaciones, el portador no está estructurado y las muestras biológicas están distribuidas irregularmente en la superficie del portador. Por ejemplo, una solución de material biológico como células puede aplicarse a un portador. Las células pueden adherirse aleatoriamente al soporte. Usando microscopía, puede determinarse y mapearse la posición de cada una de las células depositadas. El portador puede trasladarse a una posición próxima a un conducto de gas de acuerdo con la posición mapeada de las células y las células pueden liberarse en un flujo de gas portador. Las células pueden seleccionarse basándose en imagenología funcional, separación de células adyacentes y/u otros criterios. El documento US 2014/0120550 A1 (Solicitud de Patente de Estados Unidos 14/060,125), describe métodos y sistemas para interrogar una muestra para identificar ubicaciones de células diana para la ablación específica de ubicación que pueden usarse con las realizaciones descritas en la presente. Alternativamente, la muestra en un portador no estructurado puede ser una sección de tejido, y de manera similar, pueden identificarse las regiones de interés, por ejemplo mediante microscopía. Las regiones de interés pueden desorberse usando las técnicas analizadas en la presente, como el calentamiento controlado en la región de interés, o por elevación (como cuando el portamuestras comprende una capa de película de desorción).

Tejido

En ciertas realizaciones, el material biológico es un tejido biológico como una sección de biopsia. En estas aplicaciones, una de las funciones del portador es separar el tejido en áreas discretas y retener las áreas antes de la liberación. Cuando es retenido por el portador, el tejido puede separarse en áreas discretas que tengan dimensiones, por ejemplo, de 1 µm, 2 µm, 3 µm, 4, µm, 5 µm, 6 µm, 7 µm, 8 µm, 9 µm, 10 µm, u otra dimensión adecuada.

El tejido puede ser separado por medio de crestas que tienen bordes cortantes que separan el tejido cuando el tejido se monta en la superficie del portador. En la FIG. 4 se muestra un ejemplo de portador con bordes de corte dentados entre sitios de captura discretos. Como se muestra en la FIG. 4, un corte de tejido húmedo se aplica sobre un portador estructurado. Durante la aplicación, los bordes de cuchilla de las características superficiales cortan y separan el tejido biológico, que se encoge y separa aún más durante el secado. La muestra seccionada descansa sobre sitios discretos del portamuestras, que están configurados para facilitar la liberación del material biológico del portador. En ciertas realizaciones, una muestra de tejido húmedo puede ser más gruesa que la altura de las paredes que separan las zonas adyacentes, y las paredes están ligeramente más altas o aproximadamente a la misma altura por encima de la superficie del portador que el corte de tejido seco.

Alternativamente, un tejido puede montarse en la superficie de un portador que tenga sitios de captura discretos y dividirse en áreas discretas cortando el tejido en secciones usando, por ejemplo, un rayado mecánico, eléctrico o láser.

En ciertas realizaciones, las crestas del sustrato pueden actuar para minimizar la fuga de la radiación usada para la desorción de la muestra en los píxeles o sitios discretos colindantes. Como las dimensiones de las crestas pueden estar en la escala de una longitud de onda de la luz, y debido a que el límite de energía de la luz se difumina en la escala de la longitud de onda de las crestas que tienen una escala de la longitud de onda de la luz puede desempeñar un papel importante en la prevención de la luz de píxeles colindantes irradiantes. La FIG. 5 muestra otra

realización para aplicaciones de imagenología de tejidos. Como se muestra en la FIG. 5, el tejido bajo investigación se secciona primero en subsecciones individuales en el portamuestras. A continuación, las subsecciones se expulsan secuencialmente a la fase gaseosa para su posterior análisis. Cada subsección puede separarse del tejido restante usando una variedad de herramientas. El subseccionamiento puede usarse para garantizar que cuando una subsección se lanza a la fase gaseosa no se arrastren otras subsecciones con ella. La interfaz entre la muestra de tejido y el portamuestras puede incluir una capa adhesiva para mejorar aún más la capacidad de otras subsecciones de permanecer en el portamuestras. La capa adhesiva también puede tener las propiedades del material absorbente de luz adecuadas para una longitud de onda particular.

El seccionamiento de cada subsección del tejido puede lograrse mediante herramientas mecánicas como cuchillas o sellos. Alternativamente, el material entre las subsecciones puede eliminarse mediante ablación láser en una configuración de preparación de muestra separada. En ciertas realizaciones, el material puede eliminarse mediante una configuración que emplea uno haz de iones o electrones enfocado. El haz de electrones o iones focalizado puede dar lugar a cortes particularmente estrechos (potencialmente en la escala de 10 nm) entre las subsecciones que llevan a un tamaño de píxel del orden de 1 µm o, en ciertas realizaciones, 100 nm.

Otras realizaciones incluyen la combinación de las funciones de la configuración de seccionamiento en la misma cámara que la configuración de expulsión. Por ejemplo, el sistema puede incluir un láser que proporcione luz sobre las muestras conformadas para cortar huecos entre subsecciones mediante la interacción y desorción de material tisular en los huecos, y luego puede usarse un segundo láser para interactuar con material absorbente de luz bajo cada subsección para lanzar el píxel de material biológico a la fase gaseosa. La ventaja de este tipo de diseños radica en que se comparte una gran parte de la trayectoria óptica. Opcionalmente, puede proporcionarse una capa de amortiguación entre el material biológico y el material absorbente de luz/sacrificial. La capa de amortiguación puede proporcionarse para proteger el material biológico durante la ablación de la capa absorbente de luz/sacrificial.

Como se muestra en las figuras, la estructuración del portador en sitios discretos es a menudo periódica por naturaleza. Sin embargo, en ciertas aplicaciones puede ser deseable centrar el análisis en una o más áreas específicas de un tejido o un frotis celular o dirigirse a células individuales de una muestra celular aplicada como una capa fina. Además, un usuario también puede desear obtener una imagen óptica o de otro tipo del tejido o de un frotis celular o de las células extendidas sobre el portador antes del análisis por citometría de masas de imagenología o espectrometría de masas de imagenología, con el fin, por ejemplo, de correlacionar los resultados de la citometría de masas o de la espectrometría de masas con la estructura celular o morfológica. Además, al tomar la imagen óptica se podrá registrar rápidamente una imagen de un área extensa y, a continuación, identificar las áreas de interés que requieren una caracterización en profundidad mediante citometría de masas de imagenología o espectrometría de masas de imagenología. Usando estos métodos, el muestreo de los píxeles o sitios discretos no seguirá necesariamente un patrón periódico regular, sino que será detallado en ciertas zonas.

Para implementar el análisis estratégico de la muestra, puede primero obtenerse imágenes y mapear la muestra de tejido seccionada. El mapeo puede representar un análisis visual. Alternativamente, el mapeo puede basarse en la distribución de un material de tinción, que puede ser o no el mismo material de tinción usado para el análisis de citometría de masas. Por ejemplo, el material de tinción puede ser un fluoróforo. Alternativamente, el material de tinción puede ser una etiqueta de elemento, de la que se obtienen imágenes usando, por ejemplo, radiografía. Las regiones de interés para un análisis más detallado mediante citometría de masas o espectrometría de masas pueden seleccionarse basándose en el mapeo.

Otra disposición para aplicaciones de imagenología implica cortar una muestra bidimensional en tiras estrechas (primer paso de preestructuración) y luego alimentar las tiras a un dispositivo que corta aún más la tira en subsecciones (segundo paso de preestructuración) y transferir estas subsecciones a la fase gaseosa para su análisis mediante citómetro de masas o espectrómetro de masas. En ciertas realizaciones, el corte de una muestra de tejido en subsecciones implica corte por láser o corte mecánico. En ciertas realizaciones es deseable hacer cortes mecánicos manejando una rueda de corte rotatoria con múltiples zonas de corte a lo largo de la circunferencia. Por ejemplo, una rueda de corte puede rotar a una velocidad rotacional de 50 revoluciones por segundo (3000 rpm) y si la propia rueda tiene 20 zonas de corte igualmente espaciadas, la velocidad de subseccionamiento de la tira será de 1000 subsecciones (píxeles) por segundo, que es una velocidad que coincide con el rendimiento de análisis de un citómetro de masas o un espectrómetro de masas.

En algunas realizaciones, un portamuestras puede estirarse después de que se hayan precortado las subsecciones. Esto puede permitir evitar la limitación de la dimensión mínima de píxel impuesta por la difracción de la luz en sistemas que utilizan rayos láser enfocados para la eyección de píxeles. El precortado con un haz de iones o un haz de electrones puede proporcionar una resolución espacial muy por debajo de un micrómetro, lo que permite el análisis por imagenología a escala submicrométrica. Para proporcionar la función de estiramiento puede usarse material biológico plegado. Este enfoque puede ser especialmente sencillo en el caso de un portamuestras lineal (prácticamente unidimensional). Puede plegarse una cinta para formar un portamuestras inicial. A continuación, la muestra biológica puede adherirse a la parte superior de la cinta plegada y precortarse en las uniones de cada pliegue. Después de eso, la cinta puede desplegarse para proporcionar una muestra biológica preestructurada con cada píxel

de muestra separado en el espacio por una distancia significativa determinada por la longitud de cada paso de plegado.

En funcionamiento, no es necesario evitar un solapamiento completo de las señales producidas en el detector por material procedente de píxeles adyacentes. Por ejemplo, puede ser deseable operar el instrumento con una tasa de eyección de píxeles más alta, de tal manera que el orden de eyección de las subsecciones de píxeles se mezcle durante el transporte a la fase gaseosa. Si esta operación da como resultado sólo unos pocos píxeles fuera de secuencia, pueden usarse algoritmos de software para restaurar el orden correcto basándose en la interpolación con el resto de la imagen. Como puede apreciarse, el aparato y los métodos son adecuados para su uso en aplicaciones de citometría de imagenología. Los métodos divulgados anteriormente que usan la ablación por láser de una sección transversal de tejido pueden llevar mucho tiempo y, como se divulga en la presente, la velocidad de introducción de la muestra puede estar limitada por la propagación del plasma de aerosol. En los métodos proporcionados por la presente divulgación, puede prepararse una muestra de tejido en el soporte estructurado y almacenarse para su posterior análisis por citometría de masas de imagenología o espectrometría de masas de imagenología. Además, antes del análisis IMC, la muestra puede evaluarse usando microscopía óptica, de fluorescencia o de otro tipo para identificar áreas específicas de interés para el posterior análisis IMC.

Desorción de la muestra

En ciertas realizaciones, el portamuestras no se mueve con respecto a otros elementos del aparato de introducción de muestras, como por ejemplo con respecto a una fuente de desorción o al flujo de gas. El movimiento mecánico del portamuestras, como por ejemplo con una etapa de traslación, puede reducir la velocidad a la que se pueden generar píxeles individuales y, por lo tanto, reducir el sistema por completo. Como se analiza más adelante, la desorción puede lograrse mediante una variedad de técnicas, incluida la elevación.

Los términos desorber y desorción se usan de manera general para referirse a la liberación de una muestra biológica para sitios discretos en una superficie portadora, sin vaporización sustancial (por ejemplo, una mayoría de la muestra no se vaporiza). Los términos incluyen cualquier método adecuado, como térmico, fotolítico, químico o físico. Desorber y desorción se distinguen de la ablación y otros procesos en los que una muestra de material biológico se vaporiza sustancialmente en el momento en que se libera de un sustrato.

En ciertas realizaciones, una muestra biológica puede ser liberada de la muestra por mecanismos térmicos. En tales realizaciones, la superficie del sitio discreto se calienta lo suficiente para desorber el material biológico. El calor puede ser proporcionado por una fuente radiactiva como un láser. La energía aplicada a la superficie es suficiente para desorber el material biológico, preferiblemente sin alterar la muestra biológica. Puede usarse cualquier longitud de onda de radiación adecuada, que puede depender en parte de las propiedades de absorción de una superficie. En ciertas realizaciones, una superficie o capa de un sitio discreto puede estar recubierta o incluir un absorbente que absorbe la radiación incidente para convertirla en calor. La radiación puede suministrarse a una superficie superior de un sitio discreto o a una superficie inferior de un sitio discreto a través del espesor del portador. La superficie calentada puede ser una capa superficial o puede ser una capa interna de una estructura multicapa de un sitio discreto. La desorción por calentamiento puede tener lugar en una escala de tiempo de nanosegundos. Además, la vaporización de la capa de soporte puede producirse en una escala de tiempo de picosegundos cuando se usan pulsos láser de picosegundos.

En ciertas realizaciones, un sitio discreto puede incluir una capa de un conductor eléctrico que se calienta tras la aplicación de una corriente. En tales casos, los sitios discretos están conectados eléctricamente a electrodos y los sitios discretos son direccionables individualmente.

En ciertas realizaciones, una muestra biológica puede estar unida a un sitio discreto con una fracción fotorreactiva escindible. Al irradiar la fracción fotorreactiva escindible con una fuente de luz adecuada, la fracción fotorreactiva puede escindirse para liberar la muestra biológica.

En ciertas realizaciones, un sitio discreto puede incluir un recubrimiento o capa de una especie químicamente reactiva que imparte energía cinética a la muestra biológica para liberar la muestra de la superficie. Por ejemplo, una especie químicamente reactiva puede liberar un gas como, por ejemplo, H_2, CO_2, N_2 o hidroclorofluorocarbonos. Ejemplos de tales compuestos son los agentes de soplado y espumantes, que liberan gas al calentarse. La generación de gas puede usarse para impartir energía cinética a una muestra biológica desorbente que puede mejorar la reproducibilidad y la dirección de liberación de las muestras biológicas de los sitios discretos.

En ciertas realizaciones, un sitio discreto puede tener reactantes químicos fotoiniciados que experimentan una reacción exotérmica para generar calor para desorber un material biológico.

En ciertas realizaciones, los sitios discretos pueden montarse y/o acoplarse a dispositivos MEMS configurados para facilitar la liberación de un material biológico desde los sitios discretos en un portador.

Opcionalmente, un láser puede enfocarse a una ubicación adyacente a la muestra que se está levantando,

en lugar de a la ubicación de la muestra. Por ejemplo, el láser puede enfocarse en el orden de unos pocos micrómetros adyacentes a la muestra que se está elevando. La ablación por elevación será bastante violenta (como todas las ablaciones), pero al separar la ablación de la célula, la elevación puede ser más suave. Dicho de otro modo, la separación de la ubicación de la ablación láser de la ubicación de la muestra de unas pocas micras (por ejemplo, menos de 10 micras, menos de 5 micras, menos de 3 micras, o similares) proporciona una amortiguación y el medio de acción que eleva la célula puede ser una onda de compresión generada por la ablación cercana. La ablación del material adyacente a la muestra puede elevar la muestra de la superficie de soporte y hacia la fase gaseosa.

En algunas realizaciones, la muestra puede estar soportada por una parte de una película de soporte. La película puede estar adherida al sustrato. Puede enfocarse un láser alrededor del borde de la muestra biológica para separar la parte de la película de soporte del resto de la película de soporte. A continuación, la parte de la película de soporte que sostiene la muestra puede calentarse suavemente (por ejemplo, usando el mismo láser o uno diferente) para elevar la muestra a la fase gaseosa. Este enfoque de corte y separación en dos pasos puede reducir la cantidad de energía necesaria para elevar la célula y puede hacer que la elevación sea menos violenta para reducir las posibilidades de dañar la célula durante la elevación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, puede usarse un láser IR para cortar alrededor de un área de interés, mientras que puede usarse un láser UV para empujar la célula y la película fuera del sustrato (si se usa un sustrato - a veces la muestra puede residir simplemente en la película).

Esto puede ser ventajoso cuando la muestra se captura irregular o aleatoriamente. En algunas realizaciones, los sistemas de análisis pueden incluir componentes de dirección láser para dirigir el punto focal con respecto a la muestra con el fin de separar la parte de la película de soporte del resto de la película. Además, como se ha analizado anteriormente, las células pueden seleccionarse basándose en técnicas de imagenología y/u otros criterios. Por ejemplo, el documento US 2014/0120550 A1 (Solicitud de Patente de Estados Unidos 14/060,125) describe métodos y sistemas para interrogar a una muestra (por ejemplo, microscopía de fluorescencia) para identificar ubicaciones de células diana para el análisis de ubicación específica que puede usarse con las realizaciones descritas en la presente. Tales métodos y sistemas pueden ser particularmente ventajosos cuando el material biológico tiene una disposición irregular o aleatoria en el soporte de la muestra.

El análisis de células individuales por citometría de masas está limitado por la velocidad de introducción y actualmente es mucho menor que en los sistemas de citometría de flujo fluorescente. Los citómetros de flujo fluorescentes son capaces de analizar alrededor de 30.000 células/seg en comparación con las aproximadamente 1.000 células/seg de los citómetros de masas actuales. Las limitaciones asociadas con la propagación del penacho de aerosol de la muestra biológica en la cámara de ablación láser y durante el transporte a la fuente de ionización, por ejemplo una fuente de ICP, limita aún más la capacidad de aislar muestras discretas de material biológico. Se han desarrollado métodos para introducir material biológico, como gotitas que contienen células individuales, directamente en una fuente de ionización, por ejemplo una fuente de ICP, usando microfluidos. Verboket et al., Anal. Chem. 2014, 86, 6012-6018. Sin embargo, tales métodos parecen estar limitados a velocidades de introducción de muestras de alrededor de 300 células/segundo y estos métodos no evitan los casos en los que se agregan múltiples células en una gotita.

Usando el aparato y los métodos proporcionados por la presente divulgación se anticipa que son posibles tasas de introducción de muestras de 1.000 células/seg a 5.000 células/seg con la ventaja de la predictibilidad de la cadencia de llegada de las células así como la eliminación de los casos en que múltiples células llegan simultáneamente.

La FIG. 6 muestra un ejemplo de un portamuestras con sitios de muestra discretos dispuestos en una superficie del portador. Cada uno de los sitios de muestra incluye una capa de captura y una película de desorción subyacente a la capa de captura. El material biológico está situado sobre la capa de captura. La capa de captura puede configurarse para capturar el material biológico en cualquiera de los métodos descritos anteriormente (por ejemplo, mecánicamente, químicamente, electrostáticamente, interacciones hidrofílicas y/o hidrofóbicas, combinaciones de las mismas, o similares). En esta realización, el portador es transparente a cierta radiación, de tal manera que, por ejemplo, la radiación láser enfocada desde la parte posterior del portador sobre la película de desorción hace que la muestra se libere en el flujo de gas portador y en el conducto de gas. La película de desorción puede absorber la radiación para provocar la liberación de la película de desorción y/o de la muestra biológica. En algunas realizaciones, la película de desorción es delgada. En algunas realizaciones, la película de desorción puede tener un espesor de 100 nm, o puede tener un espesor de hasta 1 micrómetro. Las propiedades de la luz láser (longitud de onda, duración del pulso) pueden seleccionarse para proporcionar la absorción de una gran parte de la energía láser en la película. La película puede hacerse lo más fina posible para minimizar la energía necesaria para la ablación de la película. Algunos materiales y parámetros láser pueden permitir la absorción de la energía en capas incluso más finas, como de 10 nm o 30 nm. La película de desorción puede ser de varias formas de plásticos (como PEN, PMMA, Kapton, etc.) y puede estar configurada para absorber energía de láseres UV. Opcionalmente, la película de desorción puede ser de polímero de triazeno o capas metálicas. En realizaciones adicionales, la película de desorción puede estar precortada de tal manera que la película de desorción esté separada de las películas de desorción adyacentes asociadas con un píxel adyacente. En algunas realizaciones, la película de desorción puede precortarse antes de la elevación de la muestra usando un láser, que puede ser distinto o el mismo láser que el láser usado para calentar o

realizar ablación de la capa de desorción durante la elevación de la muestra. La película de desorción precortada puede reducir la cantidad de energía necesaria para elevar la muestra a la fase gaseosa y puede reducir de este modo la posibilidad de vaporizar o dañar la muestra durante la elevación (por ejemplo, mediante la ablación con láser o el calentamiento de la película de desorción). Además, aunque no se muestra, puede disponerse una capa de amortiguación entre la capa de desorción y la capa de captura. Por ejemplo, puede depositarse una capa más gruesa de plástico sobre la capa de desorción/ablación. La capa de amortiguación puede tener un espesor de 1 micrómetro, mientras que la capa de ablación puede tener 100 nm. En este caso, la velocidad y la aceleración de la capa de ablación se reducirán (amortiguarán) en aproximadamente 10x cuando se propague al material biológico debido a la inercia de la capa de amortiguación. Con la capa de amortiguación puede ser deseable hacerla de tal manera que el área que está siendo elevada se separe fácilmente de la mayor parte o el resto de la capa de amortiguación. Puede ser útil cortar o estructurar en patrones previamente la capa de amortiguación.

La capa de amortiguación puede proporcionarse para proteger aún más la muestra biológica durante la elevación de la muestra biológica. Por ejemplo, si la capa de desorción se extirpa para expulsar la muestra biológica del soporte, la capa de amortiguación puede estar configurada para absorber el exceso de energía de la ablación para proteger la muestra biológica durante la expulsión.

La FIG. 7 muestra una configuración alternativa en la que la radiación, como la radiación láser, se dirige a la parte delantera de la muestra. La radiación láser penetra en la muestra biológica y es absorbida por la película de desorción, provocando de este modo que la muestra se libere del sitio de captura. Las propiedades de la radiación láser se seleccionan de tal manera que la muestra biológica permanezca intacta y no sea vaporizada o sometida a ablación por la radiación láser.

En ciertas realizaciones, una muestra biológica puede ser liberada o desorbida de un sitio discreto usando nano-calentadores, chorros de burbujas, piezoeléctricos, ultrasónicos, electrostáticos, o una combinación de cualquiera de los anteriores.

Cada una de estas técnicas, o una combinación de las mismas, permite el desprendimiento ordenado del material de muestra del portamuestras. Sin embargo, a menudo, la ubicación en la muestra que es de interés no representa una entidad discreta, como una célula solitaria, en un sitio discreto que puede ser fácilmente elevado de forma aislada. En su lugar, la célula de interés puede estar rodeada de otras células o material cuyo análisis no se requiere o no se desea. Intentar realizar la desorción (por ejemplo, la elevación) de la ubicación de interés puede, por lo tanto, desorber tanto la célula de interés como el material circundante juntos. Los átomos, como los átomos de marcado que se usan en las etiquetas elementales (véase el análisis a continuación), de la zona circundante de la muestra (por ejemplo, de otras células que han sido marcadas) que se transportan en un fragmento de material desorbido, además de la ubicación específica (por ejemplo, la célula) de interés, podrían por lo tanto contaminar la lectura de la ubicación de interés.

La invención proporciona una solución a este problema mediante la cual las técnicas de ablación y desorción (como por elevación) pueden combinarse en un único método. Por ejemplo, para realizar una desorción precisa de una ubicación (por ejemplo, célula) de interés en una muestra biológica, por ejemplo, una muestra de sección de tejido o dispersión de suspensión celular, en el portamuestras, puede usarse ablación por láser para realizar ablación del área alrededor de la célula de interés para limpiarla de otro material. Después de limpiar el área circundante por ablación, la ubicación de interés puede desorberse del portamuestras, ionizarse y analizarse por espectrometría de masas de acuerdo con los procedimientos estándar de citometría de masas o espectrometría de masas. En sintonía con el análisis anterior, pueden usarse técnicas térmicas, fotolíticas, químicas o físicas para desorber el material de una ubicación de interés, opcionalmente después de que se haya usado la ablación para limpiar el área que rodea la ubicación que será desorbida. A menudo, se empleará la elevación para separar el fragmento de material del portamuestras (por ejemplo, un portamuestras que haya sido recubierto con una película de desorción para facilitar el procedimiento de elevación, como se ha analizado anteriormente en relación con la desorción de lugares discretos). El fragmento desorbido de la muestra, por ejemplo después de la limpieza, es similar al "píxel" analizado en otra parte de la presente con respecto al material desorbido de sitios discretos en portamuestras estructurados.

La Figura 8 es un esquema de los pasos del método combinado de ablación y elevación. En la Figura 8A, se dirige una primera radiación láser (A) sobre la muestra (B), que somete a ablación esa parte de la muestra (como se indica por el hueco entre los fragmentos de muestra (C) y el fragmento de material a analizar (D), en las Figuras 8B y 8C). La muestra (B) está en un portamuestras (E) y entre la muestra y el portador hay una capa funcionalizada (F) del tipo analizado en los párrafos anteriores, como un revestimiento de película de desorción, que ayuda a la desorción del material de la muestra de la superficie del portador. Las Figuras 8B y 8C ilustran el mismo paso: la irradiación de la capa funcionalizada (F) con radiación láser (G). Las Figuras 8B y 8C son modos alternativos de irradiación. La 8B muestra la irradiación de la capa funcionalizada (F) a través del portamuestras (E), mientras que la 4C muestra la irradiación de la capa funcionalizada (F) a través del material de muestra que se va a desorber (D). La Figura 8D ilustra la producción de un gas (H) por la capa funcionalizada (F) después de la irradiación que expulsa el fragmento de material de muestra (D) a la fase gaseosa, en donde es transportado por el flujo de gas (I) al conducto (J) que lleva al sistema de ionización. En algunos casos, la capa funcionalizada no produce gas para expulsar el material de muestra,

sino que cuando la capa funcionalizada, como una película de desorción, absorbe la radiación láser se produce otro tipo de desorción inducida por láser.

Por consiguiente, la invención proporciona un método de análisis de una muestra que comprende:

(i) realizar la ablación por láser de una muestra usando radiación láser;
(ii) desorber un fragmento de material de muestra usando radiación láser; y
(iii) ionizar la muestra de material y detección de átomos en la muestra por espectrometría de masas.

En algunas realizaciones, la ablación de la muestra genera uno o más penachos de material de muestra producido, y en donde los penachos se ionizan individualmente y los átomos del penacho se detectan por espectrometría de masas. En algunas realizaciones, la muestra se encuentra en un portamuestras que comprende una capa funcionalizada, y la radiación láser se dirige a la capa funcional, de la clase analizada anteriormente (como una película de desorción), con el fin de provocar la desorción del penacho de material de muestra que lo separa de la muestra (es decir, la elevación).

En algunas realizaciones de la invención, las partes de la muestra que se eliminan por desorción y por ablación pueden ser diferentes. Por ejemplo, cuando hay un grupo de células, puede realizarse la ablación (como con resolución subcelular), para permitir la imagenología de todas las células en el grupo (por ejemplo, cuando la desorción del material de muestra podría eliminar múltiples células a la vez, lo que puede no ser deseado cuando se requiere el análisis célula por célula). En la misma muestra, sin embargo, puede haber células que están separadas de las otras células, y por lo tanto pueden ser elevadas. En algunas realizaciones, el paso (ii) se realiza antes del paso (i).

En algunas realizaciones, la muestra es una muestra biológica, como una sección de tejido, o una solución celular dispersa en el portaobjetos (y opcionalmente fijada). En algunas realizaciones, antes del paso (i), el método comprende el paso adicional de marcar una pluralidad de moléculas diana diferentes en la muestra con uno o más átomos de marcado diferentes, para proporcionar una muestra marcada. El paso de marcado permite de este modo la citometría de masas de imagenología, además de la espectrometría de masas de imagenología.

En algunas realizaciones, la ablación por láser se usa para realizar ablación del material alrededor de una ubicación de interés para limpiar el área circundante antes de que el material de muestra en la ubicación de interés se desorba como un fragmento de material (por ejemplo, por elevación). Este fragmento de material se analiza a continuación, por ejemplo, de la misma manera que los píxeles analizados en otra parte en la presente, generados cuando se emplean portamuestras estructurados.

La ubicación de interés puede identificarse mediante otra técnica antes de realizar la ablación y desorción por láser (por ejemplo, mediante elevación). Una forma de permitir estas técnicas es la inclusión de una cámara (como una cámara basada en un sensor de imagen de dispositivo acoplado cargado (CCD) o una cámara CMOS o una cámara basada en un sensor de píxel activo), o cualquier otro medio de detección de luz en un espectrómetro de masas de imagenología como el descrito en las secciones anteriores. La cámara puede usarse para escanear la muestra para identificar células de interés particular o ubicaciones de interés particular (por ejemplo, células de una morfología particular). Una vez que se han identificado tales ubicaciones, éstas pueden elevarse después de haber dirigido pulsos láser al área alrededor de la ubicación de interés para eliminar otro material por ablación antes de elevar la ubicación (por ejemplo, la célula). Este proceso puede ser automatizado (donde el sistema identifica, somete a ablación y eleva la ubicación o ubicaciones de interés) o semiautomatizado (en donde el usuario del sistema, por ejemplo un patólogo clínico, identifica la ubicación o ubicaciones de interés, tras lo cual el sistema realiza la ablación y la elevación de manera automatizada). Esto permite aumentar considerablemente la velocidad a la que pueden realizarse los análisis, ya que en lugar de tener que realizar ablación de toda la muestra para analizar células particulares, puede realizarse la ablación de específicamente las células de interés.

La cámara puede grabar la imagen de un microscopio confocal. La identificación puede realizarse mediante microscopía óptica, por ejemplo examinando la morfología celular o el tamaño de las células. A veces, la muestra puede marcarse específicamente para identificar la ubicación o ubicaciones (por ejemplo, célula o células) de interés.

A menudo, se usan marcadores fluorescentes para teñir específicamente las células de interés (por ejemplo, usando anticuerpos marcados o ácidos nucleicos marcados). Estos marcadores fluorescentes pueden usarse para teñir poblaciones celulares específicas (por ejemplo, que expresen ciertos genes y/o proteínas) o características morfológicas específicas en las células (como el núcleo, o las mitocondrias) y cuando se iluminan con una longitud de onda de luz adecuada, estas regiones de la muestra son específicamente identificables. En algunos casos, puede ser característica la ausencia de un tipo particular de fluorescencia en una zona particular. Por ejemplo, puede usarse un primer marcador fluorescente dirigido a una proteína de la membrana celular para identificar células en general, pero un segundo marcador fluorescente dirigido al antígeno ki67 (codificado por el gen MKI67) puede distinguir entre células proliferantes y no proliferantes. Así, al dirigirse a las células que carecen de fluorescencia del segundo marcador fluorescente, se puede apuntar específicamente a células no replicantes para su análisis. En algunas realizaciones, los sistemas descritos en la presente pueden comprender por lo tanto un láser para excitar los fluoróforos de los

marcadores usados para marcar la muestra. Alternativamente, para excitar los fluoróforo puede usarse una fuente de luz LED s. También puede usarse la microscopía fluorescente no confocal (por ejemplo, de campo amplio) para identificar ciertas regiones de la muestra biológica, pero con menor resolución que la microscopía confocal.

Cuando se usa un láser para excitar fluoróforos para microscopía de fluorescencia, en algunas realizaciones este láser es el mismo láser que genera la radiación láser usada para la ablación de material de la muestra biológica y para la elevación (desorción), pero usado a una fluencia que no es suficiente para provocar ablación o desorción de material de la muestra. En algunas realizaciones, los fluoróforos son excitados por una longitud de onda de radiación láser que se usa para la desorción de la muestra. La radiación láser que excita los fluoróforos puede ser proporcionada por una fuente láser diferente de la fuente o fuentes láser de ablación y/o elevación.

Mediante el uso de un sensor de imagen (como un detector CCD o un sensor de píxel activo, por ejemplo, un sensor CMOS), es posible automatizar completamente el proceso de identificación de las regiones de interés y su posterior ablación, mediante el uso de un módulo de control (como un ordenador o un chip programado) que correlaciona la ubicación de la fluorescencia con las coordenadas x,y de la muestra y, a continuación, dirige la radiación láser de ablación a la zona que rodea esa ubicación antes de elevar la célula en la ubicación. Como parte de este proceso, en algunas realizaciones, la primera imagen tomada por el sensor de imagen tiene un bajo aumento de la lente objetivo (baja apertura numérica), lo que permite estudiar una gran área de la muestra. A continuación, puede cambiarse a un objetivo de mayor aumento para centrarse en las características particulares de interés que se ha determinado que presentan fluorescencia mediante imagenología óptica de mayor aumento. Luego pueden elevarse estas características que presentan fluorescencia. Usar primero un objetivo de menor apertura numérica tiene la ventaja adicional de que se aumenta la profundidad de campo, lo que significa que las características enterradas dentro de la muestra pueden detectarse con mayor sensibilidad que el cribado con una lente de mayor apertura numérica desde el principio.

En los métodos y sistemas en los que se usa imagenología fluorescente, la ruta de emisión de luz fluorescente desde la muestra hasta la cámara puede incluir una o más lentes y/o uno o más filtros ópticos. Al incluir un filtro óptico adaptado para pasar un ancho de banda espectral seleccionado de uno o más de los marcadores fluorescentes, el sistema está adaptado para manejar las aberraciones cromáticas asociadas con las emisiones de los marcadores fluorescentes. Las aberraciones cromáticas son el resultado de la incapacidad de las lentes para enfocar la luz de diferentes longitudes de onda en el mismo punto focal. Por consiguiente, al incluir un filtro óptico, se reduce el fondo en el sistema óptico, y la imagen óptica resultante es de mayor resolución. Otra manera de minimizar la cantidad de luz emitida de longitudes de onda no deseadas que llega a la cámara consiste en explotar deliberadamente la aberración cromática de las lentes usando una serie de lentes diseñadas para la transmisión y el enfoque de la luz en la longitud de onda transmitida por el filtro óptico, de manera similar al sistema explicado en el documento WO 2005/121864.

En este acoplamiento de técnicas ópticas y de elevación es ventajosa una imagen óptica de mayor resolución, porque la precisión de la imagen óptica determina entonces la precisión con la que puede ser dirigida la fuente láser de ablación para realizar la ablación del área que rodea la célula de interés.

Por consiguiente, la invención proporciona un método para realizar citometría de masas en una muestra que comprende una pluralidad de células, el método comprende los pasos de: (i) marcar una pluralidad de moléculas diana diferentes en la muestra con uno o más átomos de marcado diferentes, para proporcionar una muestra marcada; (ii) iluminar la muestra con luz para identificar una o más ubicaciones de interés; (iii) registrar información de ubicación de la una o más ubicaciones de interés en la muestra; (iv) usar la información de ubicación de las ubicaciones de interés para desorber un fragmento de material de muestra de una ubicación de interés, lo que comprende realizar primero una ablación por láser para eliminar el material de muestra que rodea la ubicación de interés, antes de desorber el fragmento de material de muestra de la ubicación usando radiación láser; v) ionizar el fragmento desorbido de material de muestra; y vi) someter el material de muestra ionizado a espectrometría de masas, para la detección de átomos de marcado en el material de muestra.

La invención también proporciona un método para realizar citometría de masas en una muestra que comprende una pluralidad de células, el método comprendiendo los pasos de: (i) marcar una pluralidad de moléculas diana diferentes en la muestra con uno o más átomos de marcado diferentes y uno o más marcadores fluorescentes, para proporcionar una muestra marcada; (ii) iluminar la muestra con luz para excitar el uno o más marcadores fluorescentes; (iii) registrar información de ubicación de una o más ubicaciones de la muestra basándose en el patrón de fluorescencia; (iv) usar la información de ubicación basada en el patrón de fluorescencia para desorber un fragmento de material de muestra de una ubicación de interés, lo que comprende realizar primero una ablación por láser para eliminar el material de muestra que rodea la ubicación de interés, antes de desorber el fragmento de material de muestra de la ubicación; (v) ionizar el fragmento desorbido de material de muestra; y (vi) someter el material de muestra ionizado a espectrometría de masas, para la detección de átomos de marcado en el material de muestra.

En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, la muestra se encuentra en un portamuestras (por ejemplo, un portaobjetos de microscopio u otra plataforma sólida apropiada de la que la muestra

puede ser sometida a ablación o desorbida, típicamente sin eliminación significativa de átomos del portamuestras). En algunas realizaciones, la radiación láser usada para desorber el material de la muestra se dirige al material de la muestra a través del portamuestras. En algunas realizaciones, el fragmento de material de muestra se desorbe mediante elevación. En algunas realizaciones, la muestra está en un portamuestras que comprende una capa que absorbe la radiación láser para ayudar a elevar el material de la muestra. Los ejemplos de capas adecuadas, que pueden ser una película de desorción recubierta sobre la superficie del portamuestras, incluyen el polímero de triazeno, como el que se muestra en la Figura 1 de Doraiswamy et al., 2006, Applied Surface Science, 252: 4743-4747, u otros polímeros que se evaporan con la radiación láser.

En algunas realizaciones, no se registran datos de la ablación realizada para limpiar el área alrededor de la ubicación que se va desorber (por ejemplo, la célula de interés). En algunas realizaciones, se registran datos de la ablación del área circundante. La información útil que puede obtenerse del área circundante incluye qué moléculas diana, como proteínas y transcritos de ARN, están presentes en las células circundantes y en el medio intercelular. Esto puede ser de particular interés cuando se obtienen imágenes de muestras de tejido sólido, donde las interacciones directas célula-célula son comunes, y qué proteínas, etc. se expresan en las células circundantes puede ser informativo sobre el estado de la célula de interés.

La invención también proporciona un espectrómetro de masas de imagenología o citómetro de masas de imagenología, que comprende un módulo de control programado para realizar los métodos expuestos en esta sección.

Conducto de gas

Después de la desorción (por ejemplo, por elevación) de una muestra biológica del portador, la muestra biológica puede inyectarse en una corriente de gas y posteriormente introducirse en una fuente de ionización, por ejemplo un soplete de ICP, donde la muestra biológica se ioniza y los iones se registran posteriormente por métodos adecuados de espectrometría de masas.

El gas portador puede ser cualquier gas adecuado para su uso en citometría de masas o espectrometría de masas, incluyendo gases inertes como argón, helio o una combinación de los mismos.

El gas portador puede fluir a través de la superficie de un portador y confinarse en un extremo en un tubo o canal de flujo estrecho. De manera muy parecida a un citómetro de flujo fluídico, el gas portador y la muestra biológica arrastrada pueden enfocarse dinámicamente de tal manera que los píxeles individuales entren en la fuente de ionización, por ejemplo una antorcha de ICP, de uno en uno.

La longitud del conducto de gas puede ser cualquier longitud adecuada con el objetivo de administrar la muestra biológica desorbida desde el portador a la fuente de ionización, por ejemplo una fuente de ICP, de un citómetro de masas o espectrómetro de masas. Basándose en gran medida en consideraciones prácticas, la longitud del conducto de gas puede ser de aproximadamente 10 cm a aproximadamente 40 cm.

El diámetro del conducto de gas puede ser cualquier diámetro adecuado, de nuevo con el objetivo de suministrar la muestra biológica desorbida desde el portador a la fuente de ionización, por ejemplo una fuente de ICP, de un citómetro de masas o espectrómetro de masas. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un conducto de gas puede tener un diámetro interior de aproximadamente 0,2 mm a aproximadamente 3 mm. Es deseable que el diámetro interior del conducto de gas sea suficientemente grande para minimizar las obstrucciones. El conducto puede tener un diámetro determinado a lo largo de la mayor parte de su longitud, pero también puede ahusarse a un diámetro menor cerca de la antorcha de ICP, como se practica comúnmente para los inyectores de antorcha de ICP. De nuevo, la dinámica a lo largo del conducto de gas se establece y se manipula para facilitar una corriente continua de píxeles de material discreto hacia la fuente de ICP. Lo ideal es que los píxeles estén situados hacia el centro del conducto de gas, donde la velocidad del gas es máxima y el cambio de velocidad con la posición es mínimo. En ciertas realizaciones, el flujo de gas portador a través del conducto se caracteriza por un flujo de gas laminar con un centro de perfil parabólico a lo largo del eje del conducto de gas.

Análisis por citometría de masas

En ciertas realizaciones, una muestra biológica se marca con una etiqueta de elemento. Las etiquetas de elementos que comprenden conjugados de polímeros metálicos pueden proporcionar ensayos sensibles altamente multiplexados para material biológico; los átomos metálicos también se denominan átomos de marcado. Las etiquetas de elementos pueden conjugarse con moléculas de afinidad, como anticuerpos, que pueden usarse para la proteómica cuantitativa y la genómica de muestras biológicas. Las etiquetas de elementos se describen, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Estados Unidos Nº 2008/0003616. El análisis de material biológico usando etiquetas de elementos se describe, por ejemplo, en las Publicaciones de Solicitud de Estados Unidos N 2010/0144056, 2012/0061561, 2014/0120550 y 2014/0121117, y en la WO 2014/169294. En general, los materiales y métodos divulgados en estas publicaciones pueden aplicarse a las realizaciones proporcionadas por la presente divulgación, siendo la diferencia principal que en las publicaciones, el material biológico se somete a ablación o vaporiza y se

transfiere como un penacho de vapor desde el portamuestras a la fuente de ionización, por ejemplo una fuente de ICP. Por el contrario, en las realizaciones proporcionadas por la presente divulgación, el material biológico se desorbe (por ejemplo, se eleva, se libera o se expulsa) de la superficie del portador como un píxel de material no vaporizado, que se arrastra en un flujo de gas portador para llevar la muestra de material a la fuente de ionización, por ejemplo una fuente de ICP.

Marcado de la muestra biológica

En algunas realizaciones, como se ha descrito anteriormente, el aparato y los métodos de la invención detectan átomos que se han añadido a una muestra (es decir, que normalmente no están presentes). Como se ha indicado anteriormente, dichos átomos se denominan átomos de marcado. La muestra es típicamente una muestra biológica que comprende células, y los átomos de marcado se usan para marcar moléculas diana en las células/en la superficie celular. En algunas realizaciones, se permite la detección simultánea de mucho más que un átomo de marcado, lo que permite la detección de marcado multiplex, por ejemplo, por lo menos 3, 4, 5, 10, 20, 30, 32, 40, 50 o incluso 100 átomos de marcado diferentes. Los átomos de marcado también pueden usarse de manera combinatoria para aumentar aún más el número de marcadores distinguibles. Al marcar diferentes dianas con diferentes átomos de marcado es posible determinar la presencia de múltiples dianas en una única célula.

Los átomos de marcado que pueden usarse con la invención incluyen cualquier especie que sea detectable por MS y que esté sustancialmente ausente de la muestra no marcada. Así, por ejemplo, los átomos de ^{12}C (carbono 12) no serían adecuados como átomos de marcado porque son abundantes de manera natural, mientras que ^{11}C podría usarse en teoría porque es un isótopo artificial que no se produce de manera natural. Sin embargo, en las realizaciones preferidas, los átomos de marcado son metales de transición, como los metales de tierras raras (los 15 lantánidos, más el escandio y el itrio). Estos 17 elementos proporcionan muchos isótopos diferentes que pueden distinguirse fácilmente por MS. Una amplia variedad de estos elementos están disponibles en forma de isótopos enriquecidos, por ejemplo, el samario tiene 6 isótopos estables, y el neodimio tiene 7 isótopos estables, todos los cuales están disponibles en forma enriquecida. Los 15 elementos lantánidos proporcionan por lo menos 37 isótopos que tienen masas únicas no redundantes. Los ejemplos de elementos que son adecuados para su uso como átomos de marcado incluyen el lantano (La), el cerio (Ce), el praseodimio (Pr), el neodimio (Nd), el prometio (Pm), el samario (Sm), el europio (Eu), el gadolinio (Gd), el terbio (Tb), el disprosio (Dy), el holmio (Ho), el erbio (Er), el tulio (Tm), el iterbio (Yb), el lutecio (Lu), el escandio (Sc) y el itrio (Y). Además de los metales de las tierras raras, otros átomos metálicos son adecuados para la detección por MS, por ejemplo, el oro (Au), el platino (Pt), el iridio (Ir), el rodio (Rh), el bismuto (Bi), etc. No se prefiere el uso de isótopos radiactivos, ya que son menos fáciles de manejar y son inestables, por ejemplo, el Pm no es un átomo de marcado preferido entre los lantánidos.

ara facilitar el análisis del tiempo de vuelo es útil usar átomos de marcado con una masa atómica dentro del intervalo de 80-250, por ejemplo dentro del intervalo de 80-210, o dentro del intervalo de 100-200. Este intervalo incluye todos los lantánidos, pero excluye el Sc y el Y. El intervalo de 100-200 permite el análisis teórico de 101-plex usando diferentes átomos de marcado, a la vez que permite a la invención aprovechar la alta velocidad de exploración espectral de la TOF MS. Como se ha mencionado anteriormente, si se eligen átomos de marcado cuyas masas se sitúen en una ventana por encima de las observadas en una muestra no marcada (por ejemplo, dentro del intervalo de 100-200), puede usarse la detección TOF para proporcionar análisis rápidos a niveles biológicamente significativos.

El marcado de las partículas generalmente requiere que los átomos de marcado se unan a un miembro de un par de unión específico (sbp). Este sbp marcado se pone en contacto con una muestra de tal manera que pueda interactuar con el otro miembro del sbp (el miembro del sbp diana) si está presente, localizando de este modo el átomo de marcado a una molécula diana en la muestra. El método de la invención detecta entonces la presencia del átomo de marcado en una partícula cuando se analiza por el citómetro de masas. Los metales de tierras raras y otros átomos de marcado pueden conjugarse con miembros de sbp mediante técnicas conocidas, por ejemplo, Briickner et al. (2013) Anal. Chem. 86:585-91 describe la unión de átomos de lantánido a sondas de oligonucleótidos para la detección por MS, Gao & Yu (2007) Biosensor Bioelectronics 22:933-40 describe el uso de rutenio para marcar oligonucleótidos, y Fluidigm Canada vende los kits de marcado de metales MaxPar™ que pueden usarse para conjugar más de 30 átomos de marcado diferentes a proteínas (incluyendo anticuerpos).

Varios números de átomos de marcado pueden unirse a un solo miembro de sbp, y puede lograrse una mayor sensibilidad cuando se unen más átomos de marcado a cualquier miembro de sbp. Por ejemplo, a un miembro de sbp pueden unirse más de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 átomos de marcado. Por ejemplo, pueden usarse polímeros monodispersos que contengan múltiples unidades monoméricas, cada una de las cuales contiene un quelante como DTPA. El DTPA, por ejemplo, une iones lantánidos 3+ con una constante de disociación de aproximadamente 10^{-6} M. Estos polímeros pueden terminar en un grupo reactivo a tiol (por ejemplo, maleimida) que puede usarse para unirse a un miembro de sbp. Por ejemplo, el grupo reactivo a tiol puede unirse a la región Fc de un anticuerpo. Para la conjugación de estos polímeros también pueden usarse otros grupos funcionales, por ejemplo, grupos reactivos a amino como ésteres de N-hidroxi succinimida, o grupos reactivos contra carboxilos o contra la glicosilación de un anticuerpo. A cada miembro de sbp puede unirse cualquier número de polímeros. Ejemplos específicos de polímeros que pueden usarse incluyen polímeros de cadena lineal ("X8") o polímeros dendríticos de

tercera generación ("DN3"), ambos disponibles como reactivos MaxPar™. También pueden usarse nanopartículas metálicas para aumentar el número de átomos de un marcador.

Como se ha mencionado anteriormente, los átomos de marcado se unen a un miembro de sbp, y este miembro de sbp marcado se pone en contacto con la muestra donde puede encontrar el miembro de sbp objetivo (si lo hay), formando de este modo un sbp marcado. El miembro de sbp marcado puede comprender cualquier estructura química que sea adecuada para unirse a un átomo de marcado y luego para la detección de acuerdo con la invención.

En términos generales, los métodos de la invención pueden basarse en cualquier sbp que ya se conozca para su uso en la determinación de la presencia de moléculas diana en muestras (por ejemplo, como las usadas en IHC o hibridación fluorescente in situ, FISH) o citometría de flujo basada en fluorescencia, pero el miembro del sbp que se pone en contacto con la muestra llevará un átomo de marcado detectable por MS. Por tanto, la invención puede ponerse en práctica fácilmente usando reactivos disponibles de la citometría de flujo, simplemente modificando los marcadores que se han usado previamente, por ejemplo, para modificar una sonda de FISH para que lleve un marcador que pueda detectarse por MS.

El sbp puede comprender cualquiera de los siguientes: un dúplex de ácido nucleico; un complejo anticuerpo/antígeno; un par receptor/ligando; o un par aptámero/diana. Así, un átomo de marcado puede unirse a una sonda de ácido nucleico que luego se pone en contacto con una muestra para que la sonda pueda hibridarse con ácido o ácidos nucleicos complementarios en la misma, por ejemplo, para formar un dúplex ADN/ADN, un dúplex ADN/ARN o un dúplex ARN/ARN. De manera similar, puede unirse un átomo de marcado a un anticuerpo que se pone en contacto con una muestra para que se una a su antígeno. Un átomo de marcado puede unirse a un ligando que se pone luego en contacto con una muestra para que se una a su receptor. Un átomo de marcado puede unirse a un ligando aptámero que luego se pone en contacto con una muestra para que se una a su diana. Por tanto, los miembros de sbp marcados pueden usarse para detectar una variedad de moléculas diana en una muestra, incluyendo secuencias de ADN, secuencias de ARN, proteínas, azúcares, lípidos o metabolitos.

En una realización típica de la invención, el miembro de sbp marcado es un anticuerpo. El marcado del anticuerpo puede lograrse mediante la conjugación de una o más moléculas de unión de átomos de marcado al anticuerpo, por ejemplo usando el kit de conjugación MaxPar™ como se ha descrito anteriormente. La molécula diana de un anticuerpo se denomina antígeno, y puede ser una proteína, hidrato de carbono, ácido nucleico, etc. Los anticuerpos que reconocen proteínas celulares que son útiles para la citometría de masas ya están ampliamente disponibles para su uso en IHC, y mediante el uso de átomos de marcado en lugar de las técnicas de marcado actuales (por ejemplo, fluorescencia) estos anticuerpos conocidos pueden adaptarse fácilmente para su uso en métodos de la invención, pero con el beneficio de aumentar la capacidad de multiplexación. Los anticuerpos usados con la invención pueden reconocer dianas en la superficie celular o dianas dentro de una célula. Los anticuerpos pueden reconocer una variedad de dianas, por ejemplo, pueden reconocer específicamente proteínas individuales, o pueden reconocer múltiples proteínas relacionadas que comparten epítopos comunes, o pueden reconocer modificaciones postraduccionales específicas en proteínas (por ejemplo, para distinguir entre tirosina y fosfo-tirosina en una proteína de interés, para distinguir entre lisina y acetil-lisina, para detectar ubiquitinación, etc.). Después de la unión a su diana, el átomo o átomos de marcado conjugados con un anticuerpo pueden detectarse para revelar la presencia de esa diana en una muestra.

El miembro de sbp marcado habitualmente interactúa directamente con un miembro de sbp diana en la muestra. En algunas realizaciones, sin embargo, es posible que el miembro de sbp marcado interactúe con un miembro de sbp diana indirectamente, por ejemplo, un anticuerpo primario puede unirse al miembro de sbp diana, y entonces puede unirse un anticuerpo secundario marcado al anticuerpo primario, a la manera de un ensayo sándwich. Habitualmente, sin embargo, la invención se basa en interacciones directas, ya que esto puede lograrse más fácilmente y permite una mayor multiplexación. En ambos casos, sin embargo, una muestra se pone en contacto con un miembro de sbp que puede unirse a un miembro de sbp diana en la muestra, y en una etapa posterior se detecta el marcador unido al miembro sbp diana.

Una característica de la invención es su capacidad para detectar múltiples (por ejemplo, 10 o más, e incluso hasta 100 o más) miembros de sbp diana diferentes en una muestra, por ejemplo, para detectar múltiples proteínas diferentes y/o múltiples secuencias de ácido nucleico diferentes en partículas como células o perlas. Para permitir la detección diferencial de estos miembros de sbp diana, sus respectivos miembros de sbp deben llevar diferentes átomos de marcado, de tal manera que sus señales puedan distinguirse mediante MS. Por ejemplo, cuando se detectan diez proteínas diferentes, pueden usarse diez anticuerpos diferentes (cada uno específico para una proteína diana diferente), cada uno de los cuales lleva un marcador único, de tal manera que puedan distinguirse las señales de los diferentes anticuerpos. En algunas realizaciones, es deseable usar varios anticuerpos diferentes contra una única diana, por ejemplo, que reconozcan diferentes epítopos de la misma proteína. Por tanto, un método puede usar más anticuerpos que dianas debido a redundancias de este tipo. En general, sin embargo, la invención usará una pluralidad de átomos de marcado diferentes para detectar una pluralidad de dianas diferentes.

Si s con la invención e usa más de un anticuerpo marcado, es preferible que los anticuerpos tengan afinidades

similares por sus antígenos respectivos, ya que esto ayuda a asegurar que la relación entre la cantidad de átomos marcados detectados por Ms y la abundancia del antígeno diana será más consistente a través de diferentes sbps (particularmente a altas frecuencias de barrido).

Si un miembro de sbp diana está localizado intracelularmente, típicamente será necesario permeabilizar las membranas celulares antes o durante el contacto de la muestra con los marcadores. Por ejemplo, cuando la diana es una secuencia de ADN pero el miembro de sbp marcado no puede penetrar las membranas de células vivas, pueden fijarse y permeabilizarse las células de la muestra. El miembro de sbp marcado puede entonces introducirse en la célula y formar un sbp con el miembro de sbp diana.

Habitualmente, un método de la invención detectará por lo menos una diana intracelular y por lo menos una diana de superficie celular. En algunas realizaciones, sin embargo, la invención puede usarse para detectar una pluralidad de dianas de superficie celular ignorando las dianas intracelulares. En general, la elección de las dianas vendrá determinada por la información que se desee obtener del método.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, los métodos de análisis descritos anteriormente comprenden el paso de marcar una muestra con por lo menos un átomo de marcado. Este átomo puede detectarse luego usando los métodos descritos anteriormente.

Finalmente, debe tenerse en cuenta que hay formas alternativas de implementar las realizaciones divulgadas en la presente. Por consiguiente, las presentes realizaciones deben considerarse ilustrativas y no restrictivas. El alcance de la solicitud está definido por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para suministrar una muestra biológica en un sistema de citometría de masas, el método comprendiendo:
enfocar un primer punto láser sobre una película que soporta la muestra biológica para calentar la película, en donde el calentamiento de la película eleva la muestra biológica a una fase gaseosa sin vaporización completa de la muestra biológica elevada, la fase gaseosa configurada para suministrar la muestra biológica al sistema de citometría de masas.

2. El método de la reivindicación 1, en donde la película se acopla a un sustrato, y en donde la película comprende una pluralidad de porciones separadas de película en sitios discretos espaciados en el sustrato; opcionalmente, en donde:

a) la pluralidad de porciones separadas de película definen una pluralidad de sitios de captura celular, en donde los sitios de captura celular están configurados para capturar una única célula; y/o
b) una superficie de huecos entre la pluralidad de porciones separadas de película se modifican para repeler la muestra biológica.

3. El método de la reivindicación 1, en donde el primer punto láser se enfoca sobre la película que soporta la muestra biológica para realizar ablación de la película, opcionalmente en donde

entre la muestra biológica y la película se dispone una capa de amortiguación, la capa de amortiguación configurada para absorber energía de la ablación de la película para limitar el daño a la muestra biológica por la ablación de la película; además, opcionalmente, en donde
una superficie de la capa de amortiguación se modifica para capturar preferentemente una muestra biológica diana.

4. El método de la reivindicación 1, que comprende además enfocar un punto láser de corte sobre la película para cortar alrededor de la muestra biológica y separar la parte de la película que soporta la muestra biológica de la mayor parte de la película; opcionalmente, en donde el punto láser de corte es de un primer láser, y en donde el primer punto láser es de un segundo láser diferente del primer láser.

5. Un portador que comprende:

una superficie;
una pluralidad de sitios discretos dispuestos sobre la superficie, en donde,
cada uno de la pluralidad de sitios discretos está configurado para retener una muestra biológica y
cada uno de la pluralidad de sitios discretos comprende una película configurada para soportar la muestra biológica y para absorber la radiación láser para elevar la muestra biológica a una fase gaseosa sin vaporización completa de la muestra biológica elevada.

6. El portador de la reivindicación 5, en donde:

a) la muestra biológica comprende una célula; o
b) la muestra biológica comprende un tejido.

7. El portador de la reivindicación 5 o 6, en donde

a) cada uno de la pluralidad de sitios discretos **se caracteriza por** un área de 1 µm a 10 µm de diámetro circunscrito;
b) la pluralidad de sitios discretos comprende una superficie topográficamente definida configurada para retener la muestra biológica;
c) la pluralidad de sitios discretos comprende moléculas de afinidad configuradas para retener la muestra biológica;
d) el portador comprende un canal subyacente a la pluralidad de sitios discretos, en donde el canal se extiende a través de un espesor del portador; y
la pluralidad de sitios discretos comprende un orificio acoplado fluidamente al canal;
e) la pluralidad de sitios discretos es direccionable individualmente;
f) la pluralidad de sitios discretos comprende un material térmicamente desorbible configurado para liberar la muestra biológica;
g) la pluralidad de sitios discretos comprende un dispositivo micromecánico; y/o
h) la superficie comprende características topográficas configuradas para cortar un tejido biológico, en donde las características topográficas están dispuestas entre la pluralidad de sitios discretos.

8. Un sistema para introducir muestras biológicas en una fuente de ionización de un citómetro de masas o espectrómetro de masas, que comprende;

el portador de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7;

un conducto que comprende una entrada y una salida, en donde,

la entrada está situada cerca de la superficie del portador; y la salida está situada cerca de la fuente de ionización;

un flujo de gas configurado para arrastrar una muestra biológica liberada de un sitio discreto y dirigir la muestra biológica liberada a través del conducto hasta la fuente de ionización;
opcionalmente, que comprende una etapa de traslación, en donde el portador está montado en una etapa de traslación.

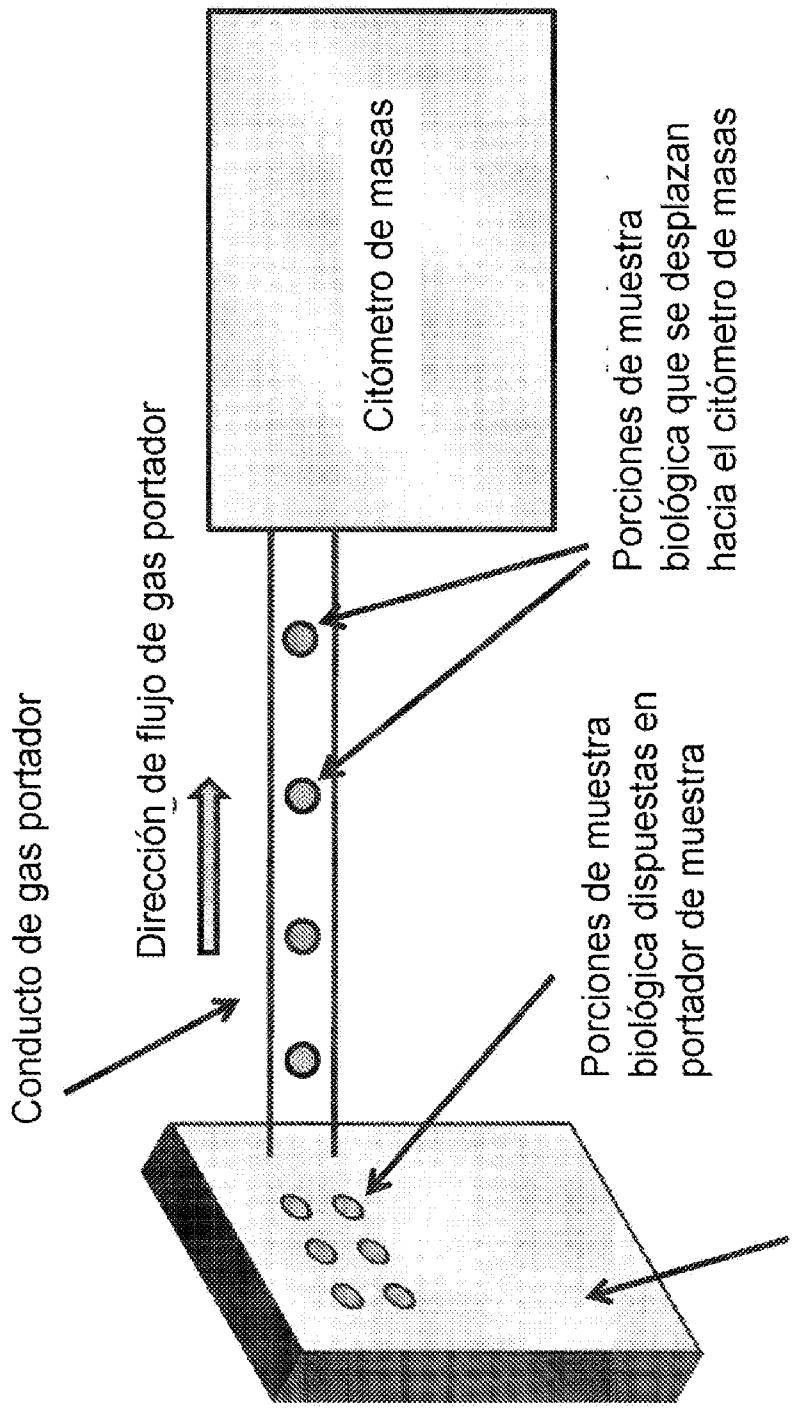
Conducto de gas portador
Dirección de flujo de gas portador
Citómetro de masas
Porciones de muestra biológica que se desplazan hacia el citómetro de masas
Porciones de muestra biológica dispuestas en portador de muestra
Portador de muestra que contiene muestra biológica preestructurada

FIG 1.

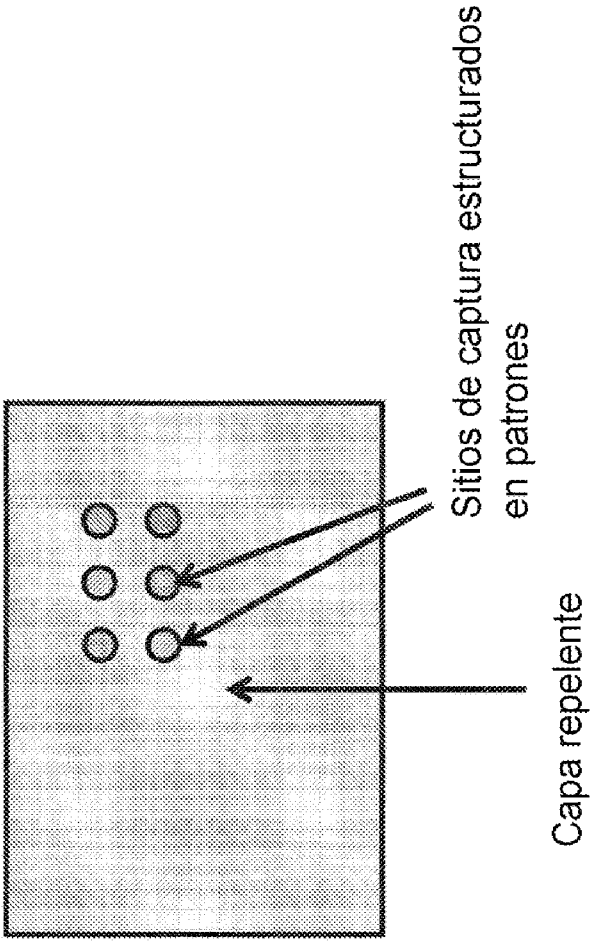
Sitios de captura estructurados en patrones
Capa repelente

FIG. 2

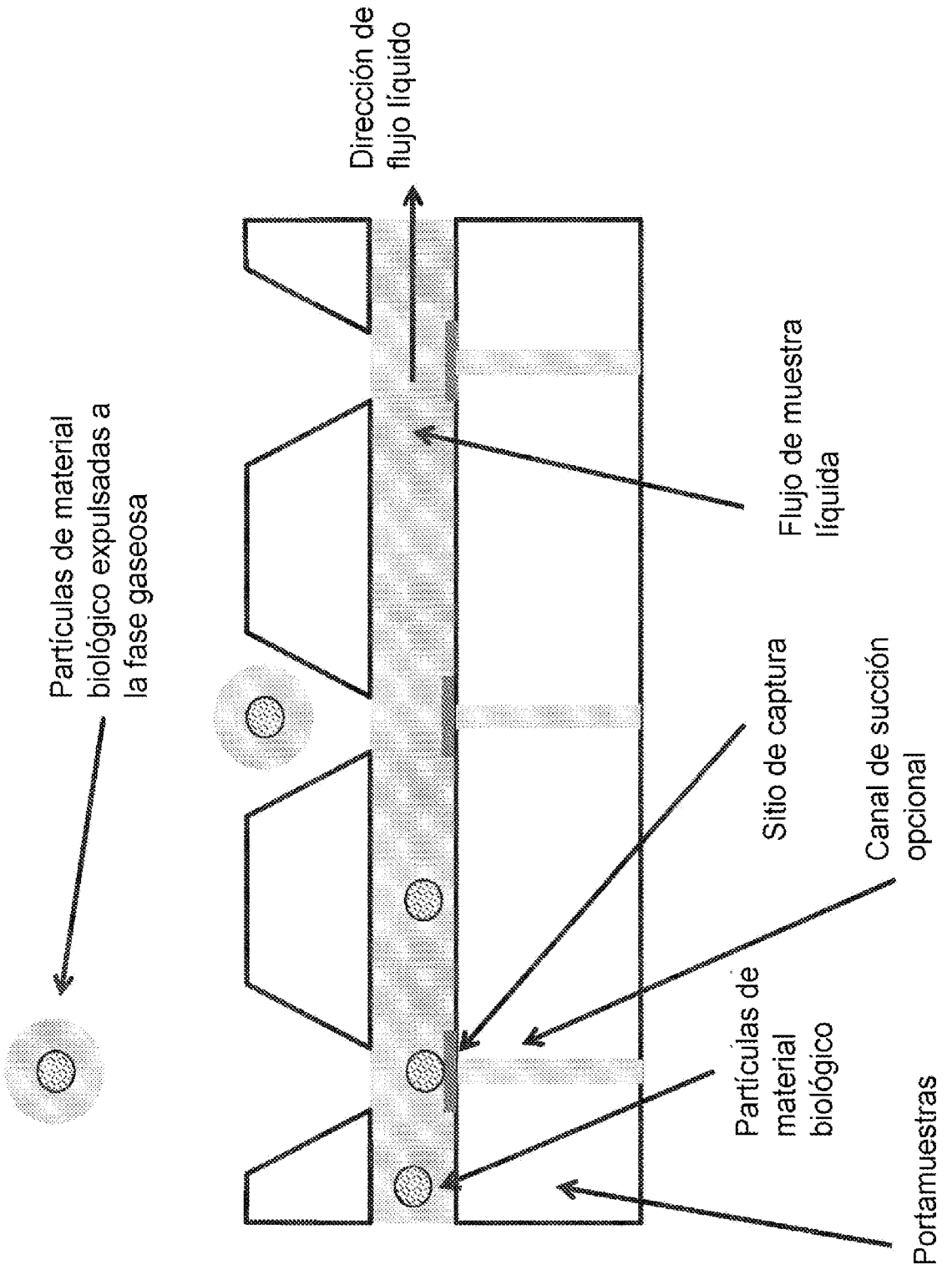
Dirección de flujo líquido
Partículas de material biológico expulsadas a la fase gaseosa
Flujo de muestra líquida
Sitio de captura
Canal de succión opcional
Partículas de material biológico
Portamuestras

FIG. 3

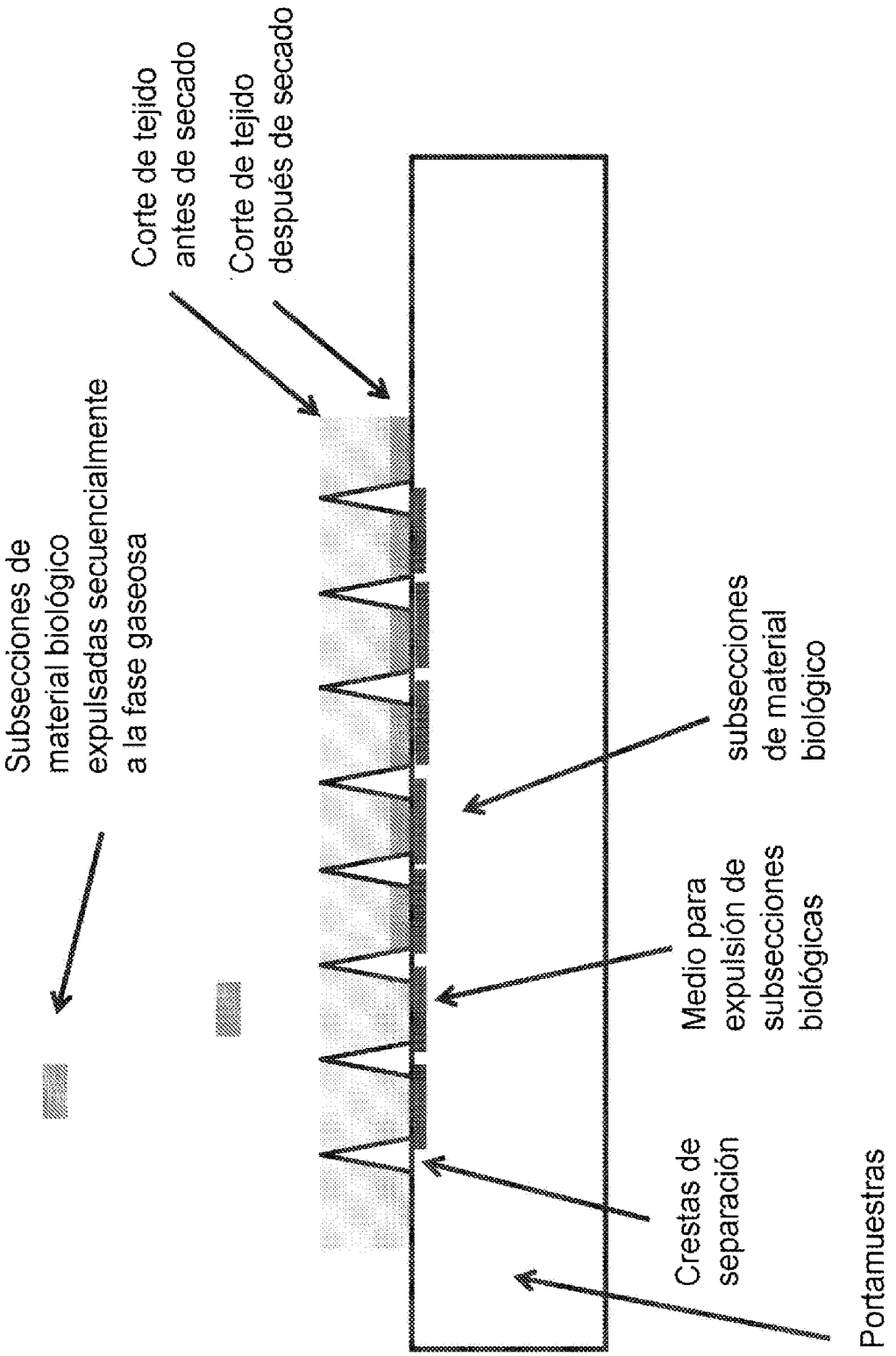
Subsecciones de material biológico expulsadas secuencialmente a la fase gaseosa
Corte de tejido antes de secado
Corte de tejido después de secado
subsecciones de material biológico
Medio para expulsión de subsecciones biológicas
Crestas de separación
Portamuestras

FIG. 4

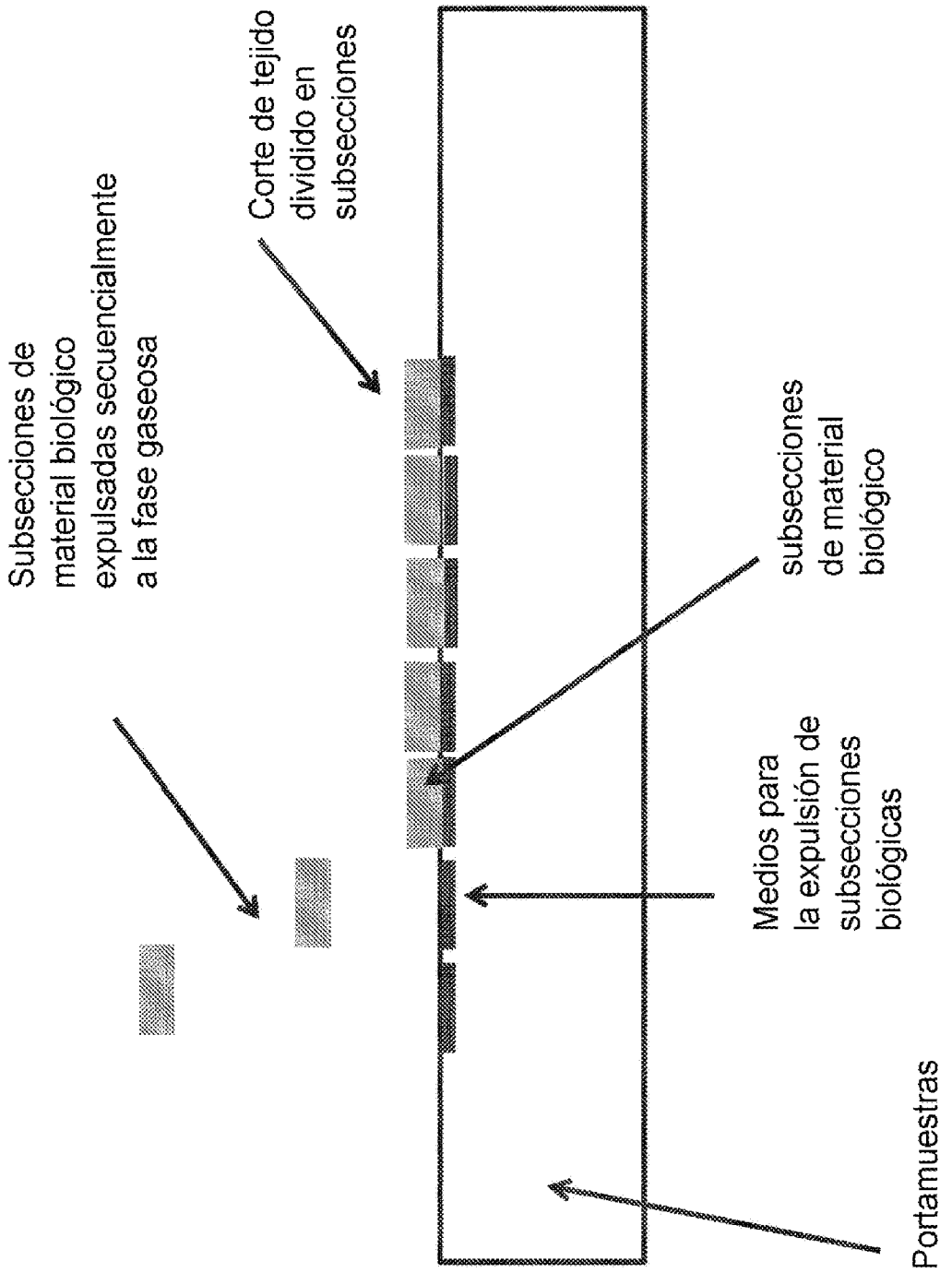
Subsecciones de material biológico expulsadas secuencialmente a la fase gaseosa
Corte de tejido dividido en subsecciones
subsecciones de material biológico
Medios para la expulsión de subsecciones biológicas
Portamuestras

FIG. 5

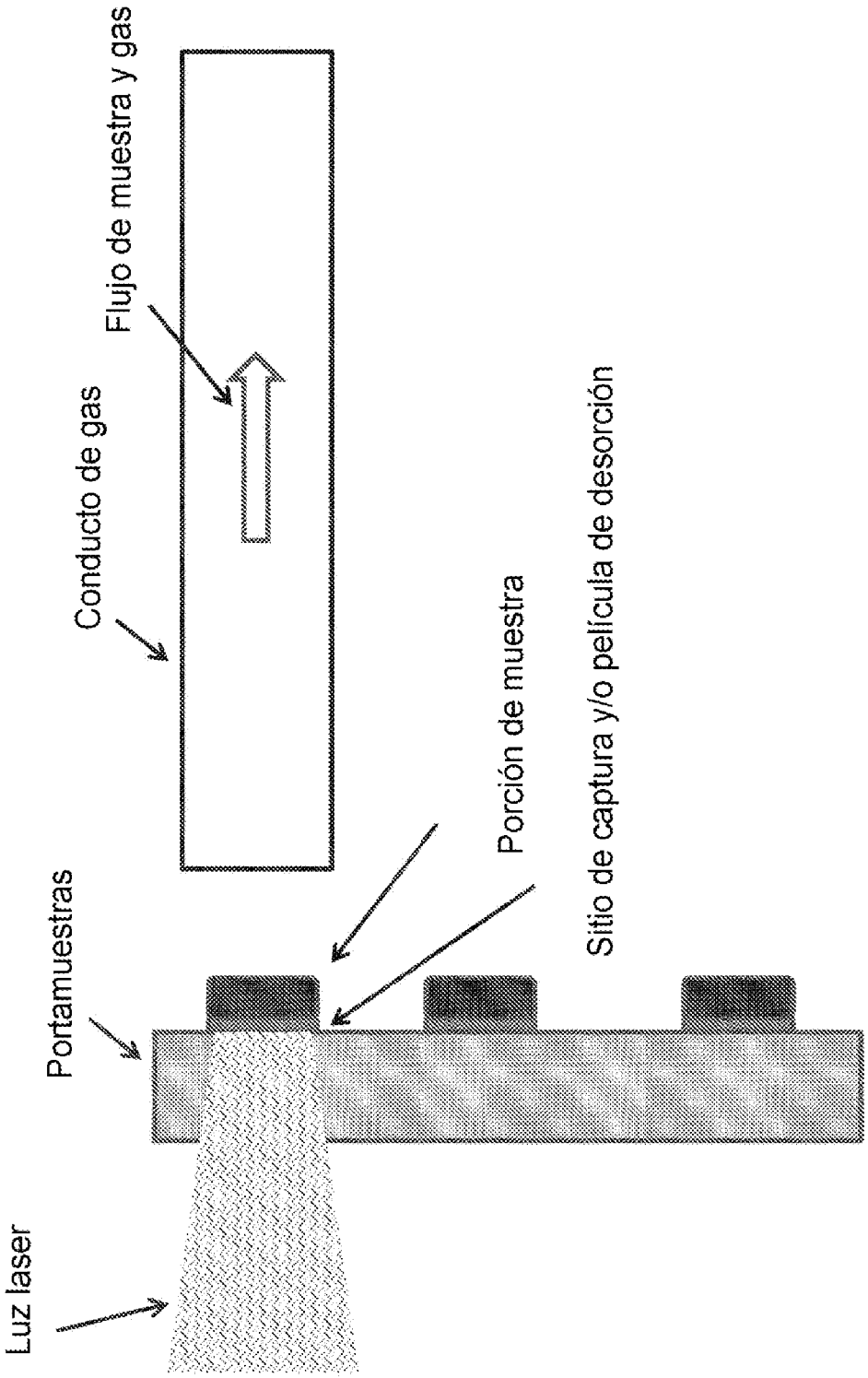
Flujo de muestra y gas
Conducto de gas
Porción de muestra
Sitio de captura y/o película de desorción
Portamuestras
Luz laser

FIG. 6

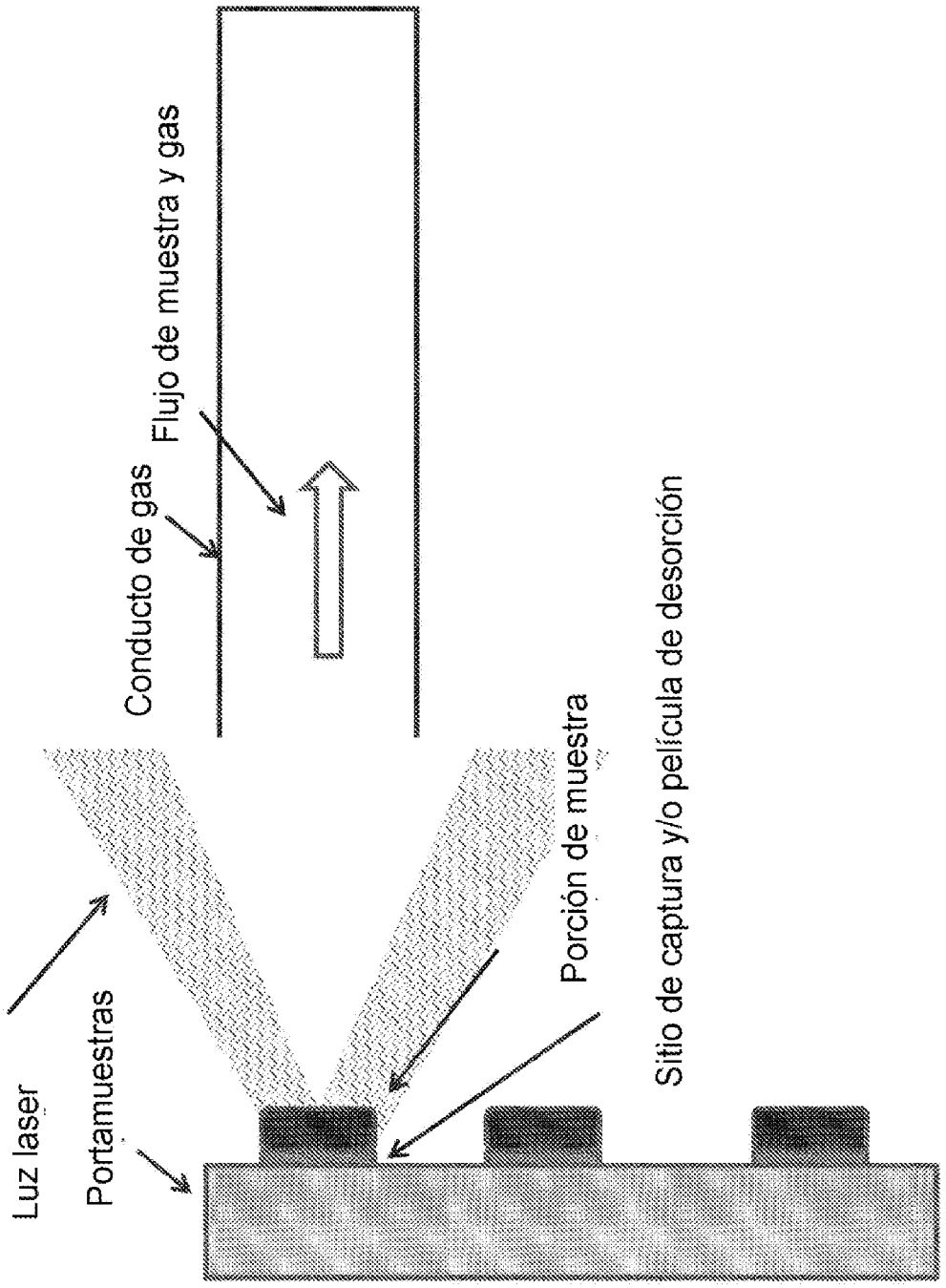
Luz laser
Portamuestras
Porción de muestra
Sitio de captura y/o película de desorción
Conducto de gas
Flujo de muestra y gas

FIG. 7

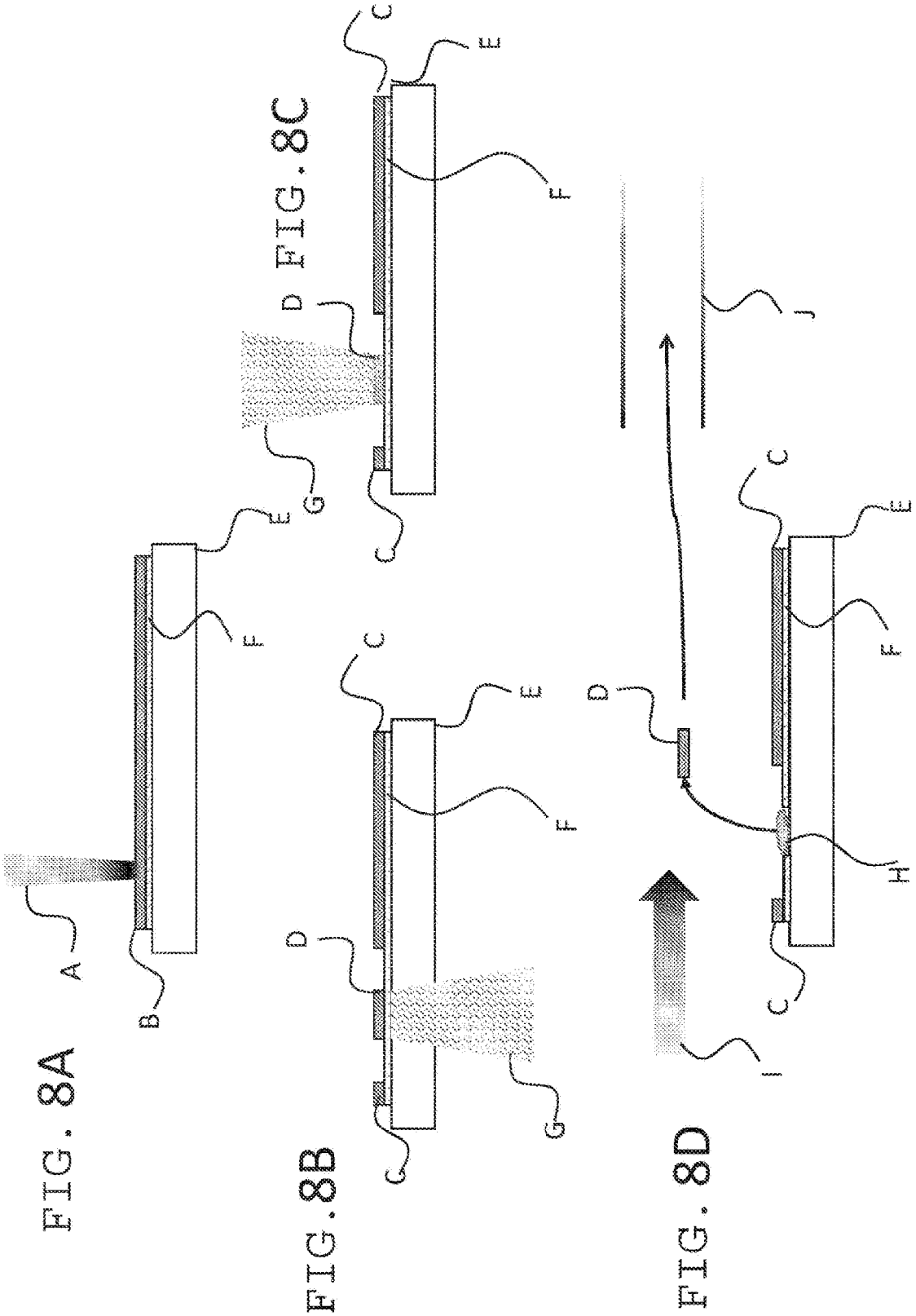

FIG. 8A

FIG. 8B

FIG. 8C

FIG. 8D