



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 270 279**

(51) Int. Cl.:

G01N 1/40 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 1/34 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **04102107 .2**

(86) Fecha de presentación : **13.05.2004**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1477792**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **17.11.2004**

(54) Título: **Método y aparato para purificar y desalar muestras biológicas.**

(30) Prioridad: **13.05.2003 US 469986 P**
13.05.2003 US 470021 P
23.01.2004 US 538913 P
23.04.2004 US 564927 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

(73) Titular/es: **Becton, Dickinson and Company**
1 Becton Drive
Franklin Lakes, New Jersey 07417-1880, US

(72) Inventor/es: **Chen, Xiaoxi**

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método y aparato para purificar y desalar muestras biológicas.

Campo de la invención

Esta invención se refiere a métodos y aparatos para procesar muestras biológicas y químicas.

Antecedentes de la invención

Existen técnicas convencionales para llevar a cabo análisis espectrométrico de masas de moléculas grandes usando placas MALDI (desorción e ionización mediante láser asistida por matriz). Típicamente con estas técnicas, se introducen inicialmente soluciones líquidas (incluyendo por ejemplo, péptidos, proteínas, y una matriz absorbente de energía) en sitios objetivo predefinidos en una placa MALDI. Ya que el diámetro de los sitios objetivo es generalmente pequeño y a menudo está densamente empaquetado, se disponen pequeñas (por ejemplo, 1-5 microlitros) gotitas de soluciones líquidas en los sitios objetivo de la placa para lograr la colocación apropiada de la muestra y evitar el traslape de la muestra entre sitios objetivo. Una vez dispuesta, las muestras líquidas se evaporan, quedando el conglomerado cristalino de matriz que contiene las moléculas de analito (por ejemplo, péptidos y proteínas) en los sitios objetivos que tienen características favorables para el procedimiento MALDI y el análisis espectrométrico de masas. Cuando se desean muestras de conglomerado más grandes, se usa la colocación de la muestra líquida sucesiva y la evaporación para construir iterativamente un conglomerado.

Antes de la colocación sobre la placa MALDI, la solución líquida típicamente se purifica y se desala. Tal purificación y desalación son logradas en la técnica anterior con columnas, puntas de pipeta o placas con filtro multi-pocillos que se empaquetan con medio C18 u otro medio de cromatografía. Los ejemplos de columnas empaquetadas con el medio C18 incluyen Columnas Spin C18 PepClean® de Pierce y Cartuchos de Disco de Extracción Empore® de 3M. Los ejemplos de puntas de pipeta empaquetadas con medio C18 incluyen Puntas de Pipeta ZipTip® de Millipore y Puntas de Pipeta C18 OMIX de Varian. Los ejemplos de placas multi-pocillos con filtro empaquetadas con medio C18 incluyen la placa Zip Plate Micro-SPE de Millipore y la Placa y el Disco de Extracción de 96 - pocillos Empore® de 3M.

Con objetivos ilustrativos, un procedimiento común para purificar y desalar muestras de soluciones líquidas usando uno de los dispositivos mencionados anteriormente incluye humedecer inicialmente el medio C18 con un tampón que contiene un disolvente orgánico, tal como metanol o acetonitrilo, y a partir de ahí, equilibrar el medio C18 con un tampón de equilibrado. Las muestras de solución líquida entonces se fluidifican a través del medio C18; se espera que los péptidos y las proteínas de la muestra quedan retenidos en el medio C18 durante esta etapa. A partir de entonces, el medio C18 se lava con tampón de lavado, y, de nuevo, los péptidos y las proteínas se espera que queden retenidos en el medio durante esta etapa. Finalmente, un tampón de elución de flujo se pasa a través del medio C18 que disocia a los péptidos y las proteínas del medio, y se espera que los péptidos y las proteínas se extraigan con el tampón de elución en esta etapa.

El documento US 2002/0034827 describe un pro-

cedimiento para purificar una muestra como se explica anteriormente.

Una parte significativa de péptidos y proteínas en la solución de la muestra puede fluir a través del medio C18 u otro medio de cromatografía en los dispositivos de la técnica anterior sin unirse al medio C18 u otros. Por consiguiente, la recuperación de los péptidos y las proteínas puede ser pobre, particularmente cuando la concentración de la muestra sea baja.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una técnica de procesamiento de muestra para purificar una muestra biológica o química. La invención es adecuada particularmente para preparar una muestra para espectrometría de masas, tal como para preparar una muestra para uso con una placa MALDI. El procedimiento debe ser realizado en un artículo que tenga al menos un pocillo, en el que la superficie del pocillo es al menos parcialmente hidrófoba y/o está modificada con ligandos bio-específicos. Con el procedimiento de la presente invención, se añade una solución de la muestra al pocillo, incluyendo la solución dos tipos de solutos: un primer tipo de solutos (tal como péptidos y proteínas) que es capaz de unirse fuerte a la superficie del pocillo por interacciones hidrófobas o por interacciones con los ligandos bio-específicos inmovilizados sobre la superficie del pocillo, y un segundo tipo de solutos (tal como sales o contaminantes de moléculas pequeñas) que no es capaz de unirse fuerte a la superficie del pocillo. Una vez añadida, la solución de la muestra se seca en el pocillo, dejando todos los solutos depositados sobre la superficie del pocillo. Un tampón, que no es capaz de disociar el primer tipo de solutos de la superficie del pocillo, pero que es capaz de disociar el segundo tipo de solutos de la superficie del pocillo, es añadido al pocillo. Como consecuencia, el segundo tipo de solutos se disuelve en el primer tampón, mientras que el primer tipo de restos de solutos queda unido a la superficie del pocillo. El primer tampón, que ahora contiene el segundo tipo de solutos, es eliminado del pocillo, dejando el primer tipo de solutos unidos a la superficie del pocillo. El primer tampón puede ser añadido en serie y ser eliminado para eliminar al máximo el segundo tipo de solutos. A partir de entonces, un segundo tampón, que es capaz de disociar el primer tipo de solutos de la superficie del pocillo, es añadido al pocillo. El primer tipo de solutos es disuelto en el segundo tampón proporcionando, así, una solución purificada del primer tipo de solutos. Opcionalmente, se puede permitir al segundo tampón evaporarse aumentando, así, su concentración.

El procedimiento de la presente invención puede ser puesto en práctica en una columna, pipeta o placa multi-pocillos, siendo aplicada la solución purificada más tarde a una placa objetivo o a otro dispositivo de análisis deseado. Además, el procedimiento de la presente invención puede ser puesto en práctica con una placa soporte objetivo que puede ser fijada de modo desprendible a un dispositivo objetivo, tal como una placa MALDI. Con una placa soporte objetivo, la muestra líquida puede ser purificada en la placa soporte objetivo y sobre el dispositivo, y, después, ser evaporada para permitir que un conglomerado sea formado directamente sobre la placa objetivo sin que sea requerida la transferencia de la muestra líquida.

Estas y otras propiedades de la invención serán mejor entendidas mediante un estudio de la siguien-

te descripción detallada y de los dibujos que acompañan.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un esquema de una placa multi-pocillos utilizable con la presente invención.

Las Figs. 2 (a) - (f) muestran el procedimiento de la presente invención siendo puesto en práctica en una placa multi-pocillos.

Las Figs. 3 (a) y (b) muestran esquemáticamente una placa soporte objetivo y el dispositivo objetivo utilizable con la presente invención.

Las Figs. 4-7 muestran diversos ensambles de placa soporte objetivo y dispositivo objetivo, en el que la figura 5 es una vista ampliada de la Sección 5 en la Fig. 4.

Las Figs. 8 (a) - (j) muestran el procedimiento de la presente invención siendo puesto en práctica con una placa soporte objetivo y el dispositivo objetivo.

Las Figs. 9-15 muestran varios espectros de masas.

Descripción detallada de la invención

Se proporciona en este documento un nuevo procedimiento para purificar una muestra biológica o química. El procedimiento particularmente es adecuado para preparar muestras líquidas para espectrometría de masas, tal como para preparar una muestra para uso con una placa MALDI. Como será descrito debajo, el procedimiento puede ser puesto en práctica remotamente desde el dispositivo con el que se pretende analizar la muestra o puede ser puesto en práctica en contacto contiguo con ello.

Con referencia a las Figs. 1 y 2 (a) - (f), se muestra una placa multi-pocillos (11) que tiene uno o varios pocillos (12) definidos como se conoce en la técnica. Al menos uno de los pocillos (12) está formado con una superficie que es hidrófoba y/o está modificada con ligandos bio-específicos (tales como matrices de cromatografía de afinidad de ión metálico inmovilizado (IMAC) para péptidos/proteínas fosforilados o péptidos/proteínas fusionados de poli(histidina), matrices de afinidad de biotina para péptidos/proteínas biotinilados, y matrices de cromatografía de intercambio de tiol-disulfuro para péptidos/proteínas fusionados de glutatona S-transferasa (GST)). Debe ser entendido que el procedimiento de la presente invención puede ser aplicado a otras estructuras distintas de la placa multi-pocillos, incluyendo, pero no limitado a, una placa soporte objetivo (como se describe debajo), una columna y una pipeta. Con cualquier estructura, se desea que se proporcione un pocillo dentro del dispositivo en la que la superficie que entra en contacto con la muestra líquida es hidrófoba y/o está modificada con ligandos bio-específicos. La superficie del pocillo entera no tiene que ser hidrófoba y/o estar modificada con ligandos bio-específicos. La superficie del pocillo puede ser intrínsecamente hidrófoba o estar tratada que sea hidrófoba (por ejemplo, revistiendo con alquil-silanos o polímeros hidrófobos).

Como se muestra en las Figs. 2 (a) - (f), la presente invención incluye etapas secuenciales para purificar una muestra líquida. La muestra líquida puede ser una muestra líquida conocida usada en preparar analitos para el procedimiento MALDI u otros procedimientos espectrométricos de masas (tales como muestras líquidas que contienen productos de digestión triptica). Específicamente, el procedimiento procura eliminar las sales y otros contaminantes de una solución de la muestra, manteniendo en ella péptidos y proteínas

en el nivel más alto posible. Con referencia a la figura 2 (a), una solución (14) de la muestra líquida es introducida en uno o varios pocillos (12). La solución (14) contiene dos tipos de solutos designados con los números de referencia (15) y (16) (los círculos rellenos negros representan el primer tipo de solutos 15 mientras que los triángulos abiertos representan el segundo tipo de solutos 16). El primer tipo de solutos (15) es capaz de unirse fuertemente a las superficies de los pocillos (12) por interacciones hidrófobas o por interacciones con los ligandos bio-específicos inmovilizados sobre las superficies del pocillo. El primer tipo de solutos (15) puede incluir péptidos y proteínas. Debe ser apreciado que cuando los péptidos y las proteínas están en proximidad a una superficie hidrófoba en soluciones acuosas, serán adsorbidos a la superficie hidrófoba. El segundo tipo de solutos (16) no es capaz de unirse fuertemente a las superficies del pocillo y pueden ser sales o contaminantes de moléculas pequeñas.

Una vez que la solución se deposita, la solución (14) se evapora o se seca dejando los solutos (15) y (16) depositados sobre las superficies del pocillo, como se muestra en la figura 2 (b). A partir de entonces, un primer tampón (17), que no es capaz de disociar el primer tipo de solutos (15) de las superficies del pocillo, pero que es capaz de disociar el segundo tipo de solutos (16) de las superficies del pocillo, es añadido a los pocillos (12) (Fig. 2 (c)). El primer tampón (17) preferiblemente está principalmente formado por agua. Como se muestra en la Fig. 2 (c), el segundo tipo de solutos (16) se disuelve en el primer tampón 17, mientras que el primer tipo de solutos (15) permanece unido a las superficies del pocillo. Con referencia a la Fig. 2 (d), el primer tampón (17), que contiene el segundo tipo de solutos (16), es eliminado de los pocillos (12), dejando el primer tipo de solutos (15) unido a las superficies del pocillo. El primer tampón (17) puede ser añadido en serie y ser retirado para eliminar al máximo el segundo tipo de solutos (16). A partir de entonces, un segundo tampón (18) es añadido a los pocillos (12). El segundo tampón (18) es capaz de disociar el primer tipo de solutos (15) de las superficies del pocillo. Preferiblemente, el segundo tampón (18) contiene un disolvente orgánico tal como acetonitrilo o metanol, y, más preferiblemente, es principalmente acetonitrilo. Además, el segundo tampón (18) puede incluir una matriz absorbente de energía tal como el ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico, el ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-cinámico, o el ácido 2,5-dihidroxibenzoico. Con el segundo tampón (18), el primer tipo de solutos (15) se disuelve en el segundo tampón (18) proporcionando una solución purificada del primer tipo de solutos (15) (Fig. 2 (e)). Opcionalmente, y como se muestra en la Fig. 2 (f), una concentración más alta del primer tipo de solutos (15) puede ser obtenida permitiendo al segundo tampón (18) evaporarse.

Como se describe anteriormente, la presente aplicación puede ser usada con varios dispositivos que definen uno o varios de los pocillos (12). Los pocillos (12) pueden ser definidos totalmente por un componente (por ejemplo, una placa multi-pocillos) o por una combinación de dos o más componentes, tal como con una placa soporte objetivo fijada a un dispositivo objetivo. Con referencia a las Figs. 3 (a) - (b), una placa soporte objetivo (21) se muestra teniendo una o varias columnas (22) que se extienden entre, y a través de, las superficies superiores e infe-

riores (30) y (31). La placa soporte objetivo (21) se fija de modo desprendible a un dispositivo objetivo (23), tal como una placa MALDI u otra placa de espectrometría de masas que tiene uno o varios sitios de recolección (por ejemplo, una placa SELDI (Desorción/Ionización mediante Láser asistida por Matriz), o una placa DIOS (Desorción/Ionización en Silicio Poroso)). Las columnas (22) y el dispositivo objetivo (23) definen en conjunto pocillos que contienen fluido. Preferiblemente, la placa soporte objetivo (21) está formada de un material elastomérico que puede ser fijado de modo desprendible al dispositivo objetivo (23). Es preferido que el material elastomérico incluya un polímero de silicio, y más preferiblemente, que incluya poli(dimetil)siloxano (PDMS). Con un material elastomérico, las interacciones de Van der Waals entre las moléculas superficiales de la placa soporte objetivo (21) y el dispositivo objetivo (23) proporcionan una fijación desprendible. La placa soporte objetivo (21) puede ser presionada en el dispositivo objetivo (23) para fijarla y retirarla por despegue. Además se prefiere que el cuerpo de la placa soporte objetivo (21) esté totalmente formada a partir del material elastomérico, más preferiblemente que esté totalmente formado de PDMS. Las naturalezas elastoméricas e hidrófobas de PDMS permiten que se forme un enlace fuerte entre la placa soporte objetivo (21) y el dispositivo objetivo (23). Estando la placa soporte objetivo (21) sólo parcialmente formada del material elastomérico, las partes restantes pueden estar formadas de plástico rígido u otro material que impartirá propiedades favorables a las paredes de las columnas (22). La fijación es preferiblemente de una integridad suficiente que impide la contaminación cruzada entre las columnas (22) a lo largo del interfaz placa soporte objetivo (21)/dispositivo objetivo (23). Opcionalmente, las paredes de las columnas (22) pueden ser modificadas con ligandos bio-específicos.

Pueden usarse otras formas de la placa soporte objetivo (21) que permitan una fijación desprendible con el dispositivo objetivo (23). La placa soporte objetivo (21) puede basarse en adhesivo, una junta elastomérica, y/o una fijación mecánica desprendible para proporcionar una fijación desprendible entre la placa soporte objetivo (21) y un dispositivo objetivo (23). Con referencia a las Figs. 4 y 5, se describe una fijación mecánica, en la que puede ser proporcionado un elemento de cierre mecánico (38) que sobresale de la superficie inferior (37) a al menos parte del dispositivo objetivo (23) unido. El elemento de cierre (38) incluye un elemento soporte recto (40) y un elemento transversal (42). El elemento soporte recto (40) y el elemento transversal (42) están formados tal que una parte del dispositivo objetivo (23) se interpone entre una superficie de acoplamiento (44), definida sobre el elemento transversal (42), y la superficie inferior (37). El elemento transversal (42) también puede incluir un elemento protuberante que se extiende hacia atrás (46). El dispositivo objetivo (23) puede ser "roto" en la fijación desprendible con el elemento de cierre 38 desviándose y volviendo a la posición mostrada en las Figs. 4 y 5. La retirada del dispositivo objetivo puede ser lograda desplazando hacia atrás el elemento sobresaliente (46) causando el momento que se aplica sobre el elemento soporte recto (40), la desviación del elemento de cierre (38), y la separación de la superficie de acoplamiento (44) del dispositivo objetivo (23). Como puede ser apreciado, la resistencia de la fuerza

de sostén aplicada al dispositivo objetivo (23), así como la dificultad de fijación y retirada del dispositivo objetivo (23), será una función de la resistencia del elemento de cierre (38), y el grado al cual el elemento de cierre (38) se une al dispositivo objetivo (23).

Como se muestra en la figura 6, el adhesivo (48) puede ser usado para fijar de modo desprendible el dispositivo objetivo (23) a la placa soporte objetivo (21). Cualquier adhesivo adecuado puede ser usado lo que permitirá la liberación de la placa soporte objetivo (21), e incluso proporcionar la fuerza de sostén suficiente a la placa soporte objetivo (21) para proporcionar la preparación de los sitios de recolección (34).

Como se muestra en la figura 7, una junta elastomérica (50) puede ser interpuesta entre el dispositivo objetivo (23) y la placa soporte objetivo (21) para proporcionar una inter-fijación desprendible. De la misma manera que se describe anteriormente con el cuerpo de la placa soporte objetivo (21) que se forma de un material elastomérico, la junta elastomérica (50) proporciona una adherencia desprendible. Esta adherencia puede ser lograda por interacciones de Van der Waals. Preferiblemente, el material elastomérico de la junta (50) incluye un polímero de silicio, y más preferiblemente, incluye poli(dimetil)siloxano (PDMS). El material elastomérico también puede ser dopado con otros polímeros para particularizar sus propiedades físicas. Además se prefiere que la junta elastomérica (50) esté totalmente formada de PDMS. Las aberturas (52) serán formadas en la junta (50) como se requiere para exponer los sitios de recolección pretendidos (34). Es preferido que las aberturas (52) tengan cada una un diámetro que sea mayor, o igual, que el de los extremos inferiores abiertos de las columnas (22).

Como será entendido por los expertos en la técnica, independientemente de la manera por la cual la fijación desprendible sea alcanzada, se desea que sea proporcionado un sellado suficiente a lo largo del interfaz entre la placa soporte objetivo (21) y el dispositivo objetivo (23) para prevenir la contaminación cruzada de cualquier muestra líquida contenida en las columnas (22). El sellado debe ser al menos hermético. Además, el nivel de resistencia de la fijación desprendible debe ser considerado en vista de cualquier etapa de procesamiento a la que el ensamblaje deba ser sometido. El sellado adhesivo y elastomérico proporcionará generalmente una fuerza de sostén más débil que una fijación mecánica y puede ser usado con muestras líquidas de volumen más pequeño y/o dispositivos objetivos más livianos; mientras que, una fijación mecánica pueda ser usada con muestras líquidas más grandes y/o dispositivos objetivo más pesados. Esto es particularmente así cuando el ensamblaje se pretende centrifugar o de otra manera transportarse junto manteniéndose con la fijación desprendible. Por otra parte, el dispositivo objetivo (23) debe ser separado sin un daño adicional. Diversas formas de fijación desprendible pueden ser usadas en combinaciones variables (por ejemplo, el adhesivo puede ser usado en combinación con una fijación mecánica).

Se prefiere que la placa soporte objetivo (21) esté totalmente formada de PDMS. El PDMS es intrínsecamente hidrófobo, y como tal, al formar totalmente la placa soporte objetivo (21) de PDMS, las paredes de las columnas (22) serán intrínsecamente hidrófobas.

Con referencia a las Figs. 8 (a) - (j), se muestra

el procedimiento de la presente invención junto con el uso de la combinación de placa soporte objetivo (21)/dispositivo objetivo (23). Inicialmente, como se muestra en las Figs. 8 (a) y (b), la placa soporte objetivo (21) se fija al dispositivo objetivo (23). A partir de entonces, una solución de la muestra líquida (24) (tal como una solución que contiene productos de digestión triptica) se coloca en las columnas (22) (Fig. 8 (c)) que incluye los dos tipos de solutos (25) y (26): el primer tipo de solutos (25) (representado por círculos rellenos) es capaz de unirse fuertemente a las superficies de columna por interacciones hidrófobas o por interacciones con los ligandos bio-específicos inmovilizados sobre las superficies de columna (por ejemplo, péptidos y proteínas), mientras que el segundo tipo de solutos (26) (representado por triángulos abiertos) no es capaz de unirse fuertemente a las superficies de columna, por ejemplo, sales o contaminantes de moléculas pequeñas. Para secar o evaporar la solución (24) de la muestra (Fig. 8 (d)), los solutos (25) y (26) son depositados sobre las superficies de columna y posiblemente en cierta medida sobre el dispositivo objetivo (23). A causa de la atracción adsorptiva, el primer tipo de solutos (25) tenderá a ser depositado sobre las paredes de las columnas (22), más bien que sobre la superficie o el sitio de recolección (34) del dispositivo objetivo (23). Un primer tampón (27) se añade después que no es capaz de disociar el primer tipo de los solutos (25) de las superficies de las columnas (22), pero que es capaz de disociar el segundo tipo de solutos (26) de las superficies de columna. Por consiguiente, el segundo tipo de solutos (26) se disuelve en el primer tampón (27), mientras que el primer tipo de solutos (25) permanece unido a las superficies de columna (Fig. 8 (e)). El primer tampón (24), que contiene el segundo tipo disuelto de solutos (26), se elimina de las columnas (22), dejando el primer tipo de solutos (25) unido a las superficies de la columna (Fig. 8 (f)). Las etapas de añadir y eliminar el primer tampón (27) pueden ser llevadas a cabo repetidamente para eliminar al máximo el segundo tipo de solutos (26). Posteriormente, un segundo tampón (28), como se muestra en la figura 8 (g), se añade a las columnas (22), que es capaz de disociar el primer tipo de solutos (25) de las superficies de columna. Por consiguiente, el primer tipo de solutos (25) se disuelve en el segundo tampón (28), proporcionando así una solución purificada del primer tipo de solutos (25). El segundo tampón (28) puede ser evaporado para aumentar la concentración del líquido resultante (Fig. 8 (h)). La evaporación completa del segundo tampón (28) causa la deposición del primer tipo de solutos (25) en el dispositivo objetivo (23) dentro de las áreas en el fondo de las columnas respectivas (22) (Fig. 8 (i)). Los sitios de deposición coinciden con los sitios de recolección 34 sobre el dispositivo objetivo (23). Con objetivos de análisis, la placa soporte objetivo (21) se retira del dispositivo objetivo (23), por ejemplo desprendiéndola (Fig. 8 (j)). El primer tipo de solutos (25) depositados forma manchas de muestra que pueden ser usadas en análisis posteriores, tal como con espectrometría de masas, por ejemplo, análisis de espectrometría de masas MALDI.

Como con el método descrito anteriormente, el primer tampón (27) es preferiblemente principalmente de agua, y el segundo tampón (28) contiene un disolvente orgánico, tal como acetonitrilo o metanol, y, más preferiblemente, principalmente acetoni-

trilo. Además, el segundo tampón (28) puede incluir una matriz absorbente de energía tal como el ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico, el ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-cinámico, o el ácido 2,5-dihidroxibenzoico.

Con el procedimiento de la presente invención, pueden ser obtenidas muestras más puras que en la técnica anterior dando lugar a un análisis mejor. Las Figs. 9-12 muestran una comparación entre las mismas soluciones de la muestra que han sido procesadas usando puntas de pipeta con medio C18 frente al método descrito anteriormente en conjunción con la Fig. 8. Las Figs. 9 (a), 10 (a), 11 (a) y 12 (a) son espectros de masas obtenidos a partir de soluciones de la muestra preparadas por puntas de pipeta con el medio C18, mientras que las Figs. 9 (b), 10 (b), 11 (b) y 12 (b) fueron preparadas usando el método asociado con la Fig. 8 de la presente aplicación. Los espectros de masas de la Fig. 9 fueron obtenidos para una solución de la muestra (50 μ L) que contenía estándares de péptido 100 nM; los espectros de masas de la Fig. 10 fueron obtenidos para una solución de la muestra (50 μ L) que contenía estándares de péptido 50 nM; los espectros de masas de la Fig. 11 fueron obtenidos para una solución de la muestra (50 μ L) que contenía estándares de péptido 20 nM; y los espectros de masas de la Fig. 12 fueron obtenidos para una solución de la muestra (50 μ L) que contenía estándares de péptido 10 nM. Las flechas debajo del eje de abscisas en cada uno de los espectros de masas indican las posiciones de picos esperados de seis péptidos estándar (fragmento de bradiquinina humano 1-7, P.M. = 757,4; angiotensina II humana, P.M. = 1046,5; péptido sintético P₁₄R, P.M. = 1533,9; fragmento de ACTH humano 18-39, P.M. = 2465,2; cadena B oxidada de insulina bovina, P.M. = 3494,7; insulina bovina, P.M. = 5734,5), mientras que la "X" indica que un pico coincidente es encontrado en el espectro. Debe ser apreciado que algunos picos en la región de peso molecular bajo están contribuidos por el ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico (CHCA) de la matriz MALDI. Como será apreciado, fueron detectados más picos coincidentes de acuerdo con la presente invención que con las puntas convencionales con el medio C18.

La Fig. 13-15 muestra una comparación similar, en la que la Fig. 13 (a), 14 (a) y 15 (a) fueron obtenidas usando puntas de pipeta con el medio C18, mientras que las Figs. 13 (b), 14 (b) y 15 (b) fueron obtenidos usando la presente invención. Los espectros de masas en la Fig. 13 fueron obtenidos para una solución de la muestra (50 μ L) que contenía digestión triptica de albúmina de suero bovino (BSA) 50 nM, los espectros de masas en la figura 14 fueron obtenidos para una solución de la muestra (50 μ L) que contenía digestión triptica de BSA 20 nM, y los espectros de masas en la Fig. 15 fueron obtenidos para una solución de la muestra (50 μ L) que contenía digestión triptica de BSA 10 nM. Como puede observarse a partir de las Figs. 13-15, fueron resueltos más picos de péptido de la digestión triptica de BSA según la presente invención que con las puntas convencionales con el medio C18, indicando un mejor rendimiento de péptidos a partir del procedimiento de purificación.

Pueden hacerse diversos cambios y modificaciones en la presente invención. Se desea que todos tales cambios y modificaciones estén dentro de la amplitud de la invención como se expone en adelante en las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para purificar una muestra biológica o química, comprendiendo dicho procedimiento:

proporcionar un artículo que tenga un pocillo con una superficie que sea al menos parcialmente hidrófoba y/o esté modificada con ligandos bio-específicos;

depositar una muestra líquida en dicho pocillo;

evaporar dicha muestra líquida con una primera clase de solutos en dicha muestra fuertemente unida a dicha superficie, y una segunda clase de solutos en dicha muestra no fuertemente unida a dicha superficie;

depositar un primer tampón en dicho pocillo, disociando dicho primer tampón de dicha segunda clase de solutos de dicha superficie;

retirar dicho primer tampón y dicha segunda clase disociada de solutos de dicho pocillo; y

depositar un segundo tampón en dicho pocillo después de retirar dicho primer tampón, disociando dicho segundo tampón de dicha primera clase de solutos de dicha superficie.

2. Un procedimiento como en la reivindicación 1, en el que dicho artículo se selecciona a partir del grupo que consiste en una placa multi-pocillos, una columna, y una pipeta.

3. Un procedimiento como en la reivindicación 1, en el que dicho artículo incluye una placa soporte objetivo que tiene las superficies superior e inferior aparte, al menos una columna que se extiende entre, y a través de, dichas superficies superiores e inferiores, y un dispositivo objetivo fijado de modo desprendible a dicha placa soporte objetivo, teniendo dicho dispositivo objetivo al menos un sitio de recolección, registrando dicha columna con dicho sitio de recolección, definiendo en conjunto dicha columna y dicho sitio de recolección dicho pocillo.

4. Un procedimiento como en la reivindicación 3, en el que dicho dispositivo objetivo se fija de modo desprendible a dicha placa soporte objetivo.

5. Un procedimiento como en la reivindicación 3, en el que al menos la superficie inferior de dicha placa soporte objetivo, al menos parcialmente, preferible-

mente totalmente está formada de un material elastomérico adherido de modo desprendible a dicho dispositivo objetivo.

6. Un procedimiento como en la reivindicación 1, en el que dicho artículo, al menos parcialmente, preferiblemente totalmente está formado a partir de un material elastomérico.

7. Un procedimiento como en la reivindicación 5, en el que dicha placa soporte objetivo, al menos parcialmente, preferiblemente totalmente está formada a partir de dicho material elastomérico.

8. Un procedimiento como en cualquiera de las reivindicaciones 5, 6 y 7, en el que dicho material elastomérico incluye un polímero de silicio, preferiblemente poli(dimetil)siloxano.

9. Un procedimiento como en la reivindicación 3, en el que dicho dispositivo objetivo es una placa de espectrometría de masas.

10. Un procedimiento como en la reivindicación 1, en el que dicha muestra líquida incluye productos de digestión trípica.

11. Un procedimiento como en la reivindicación 1, en el que dicha primera clase de solutos incluye péptidos o proteínas.

12. Un procedimiento como en la reivindicación 1, en el que dicha segunda clase de solutos incluye sales o contaminantes de moléculas pequeñas.

13. Un procedimiento como en la reivindicación 1, en el que dicho primer tampón incluye agua.

14. Un procedimiento como en la reivindicación 1, en el que dicho segundo tampón incluye un disolvente orgánico o una matriz absorbente de energía.

15. Un procedimiento como en la reivindicación 1, en el que dicha superficie es un revestimiento que incluye uno o más seleccionados a partir del grupo que consiste en alquil-silanos y polímeros hidrófobos.

16. Un procedimiento como en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en el que el artículo que tiene un pocillo con una superficie está modificada, al menos parcialmente, con ligandos bio-específicos.

17. Un procedimiento como en la reivindicación 16, en el que dichos ligandos bio-específicos pueden ser uno o varios seleccionados a partir del grupo que consiste en matrices de cromatografía de afinidad de ión metálico inmovilizado (IMAC) para péptidos/proteínas fosforilados o péptidos/proteínas fusionados de poli(histidina), matrices de afinidad de biotina para péptidos/proteínas biotinilados, y matrices de cromatografía de intercambio de tiol-disulfuro para péptidos/proteínas fusionados de glutatona S-transferasa (GST)).

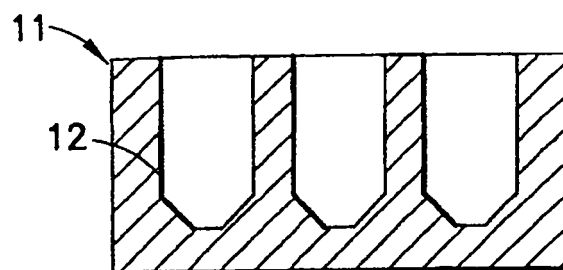


FIG. 1

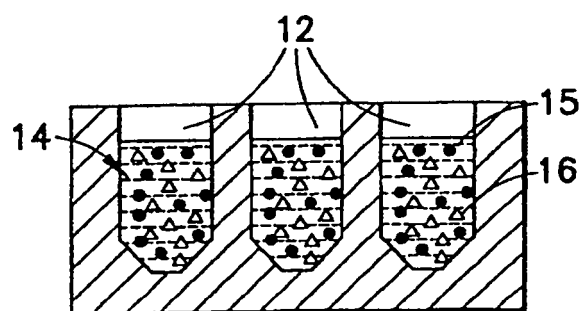


FIG. 2a

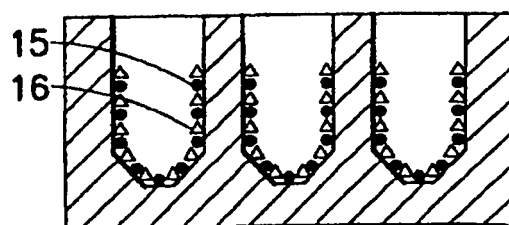


FIG. 2b

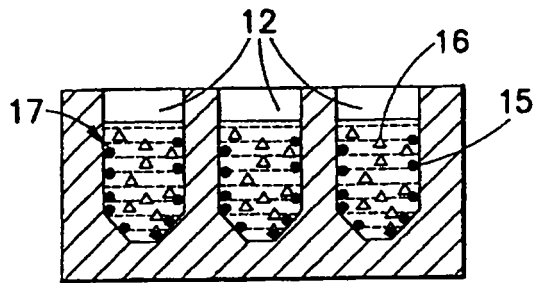


FIG.2c

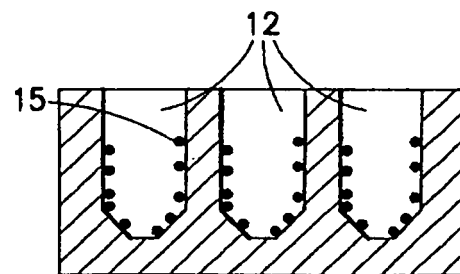


FIG.2d

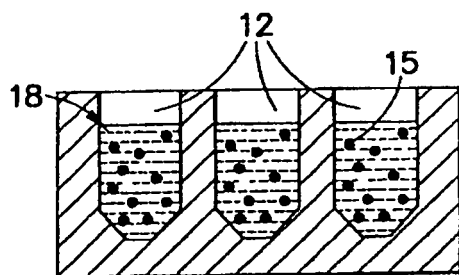


FIG.2e

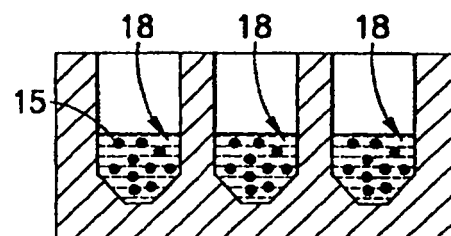


FIG.2f

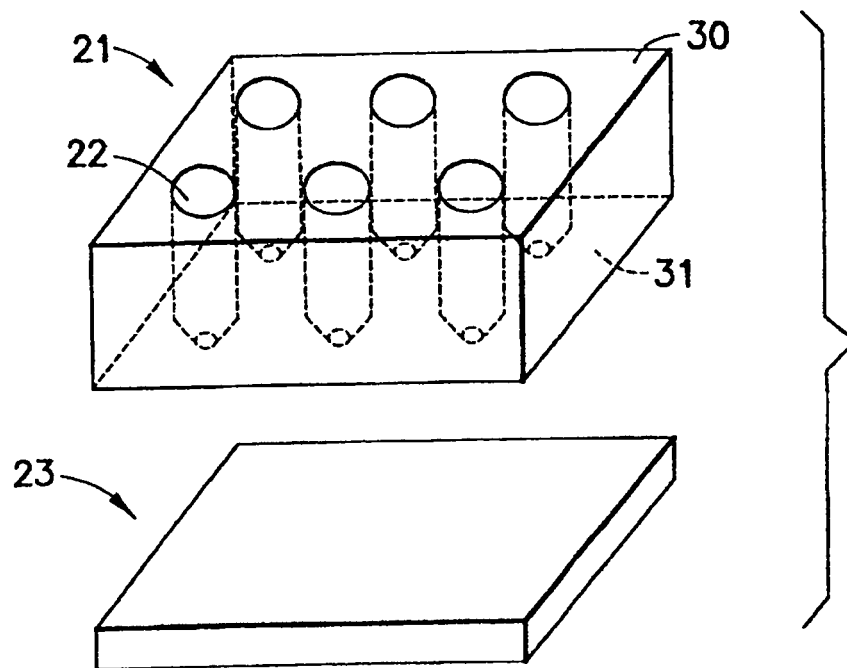


FIG. 3a

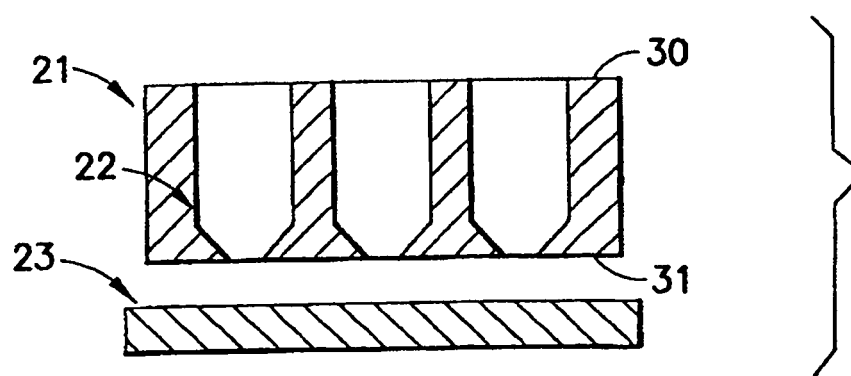


FIG. 3b

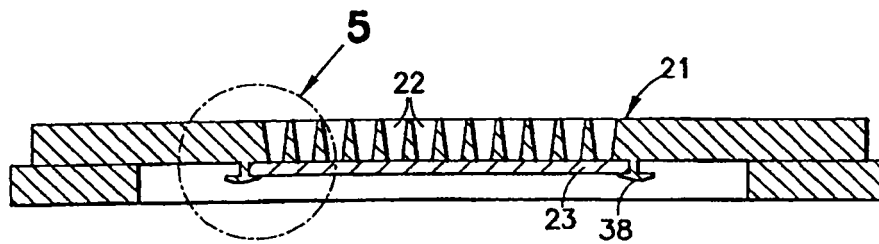


FIG. 4

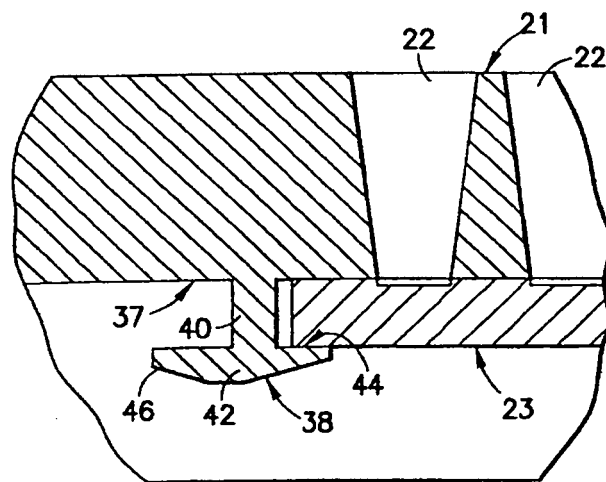


FIG. 5

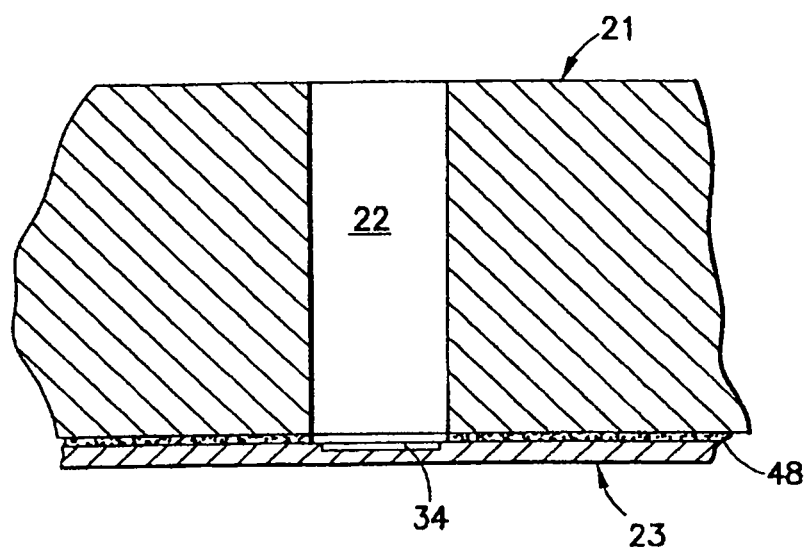


FIG.6

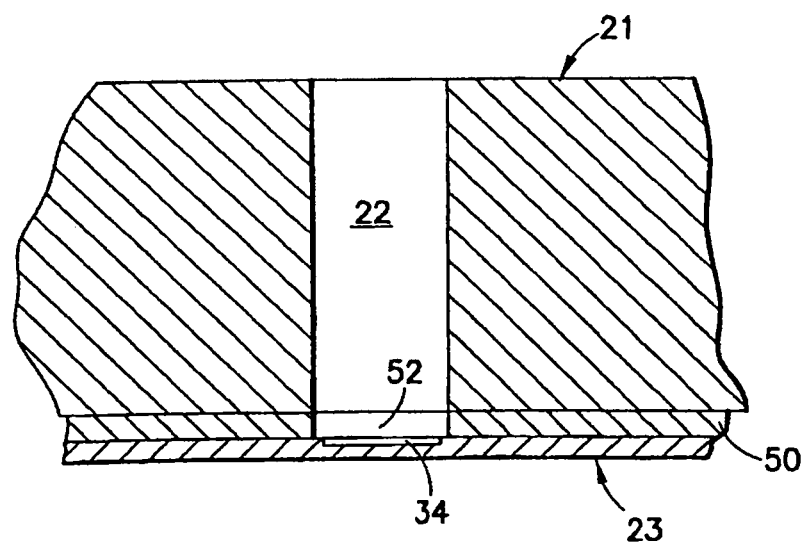


FIG.7

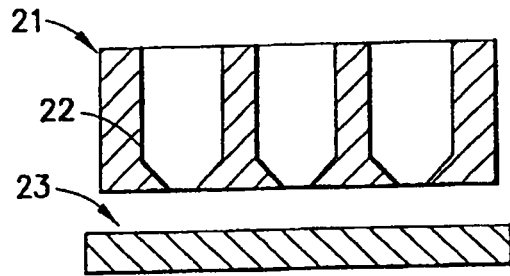


FIG. 8a

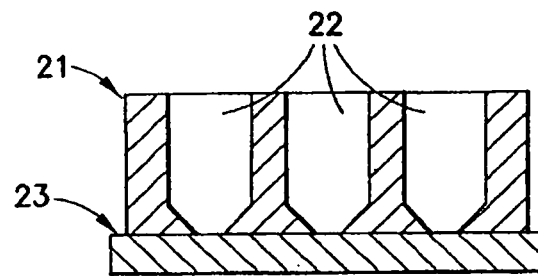


FIG. 8b

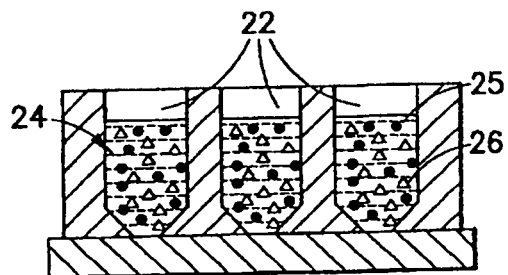


FIG. 8c

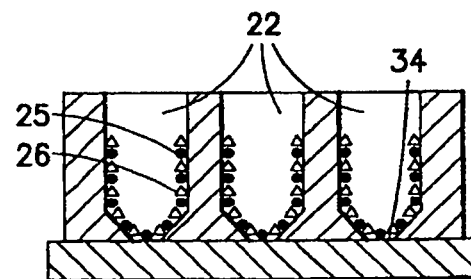


FIG. 8d

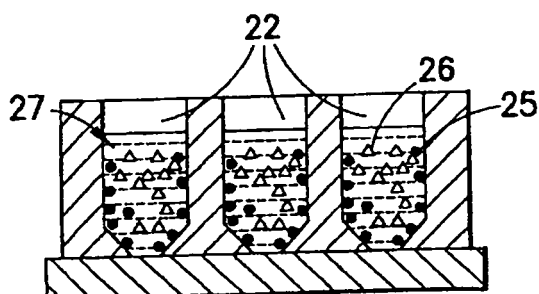


FIG. 8e

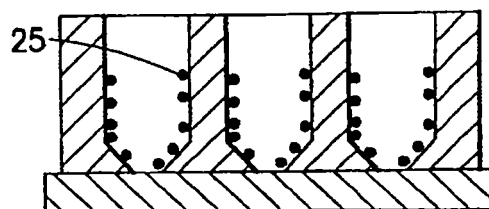


FIG. 8f

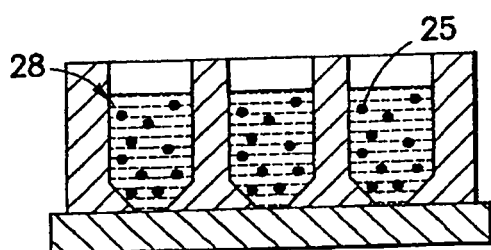


FIG. 8g

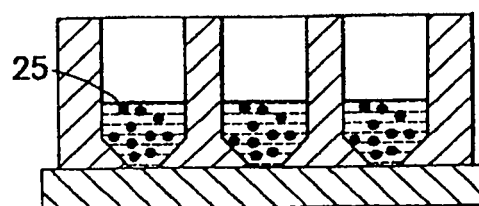


FIG. 8h

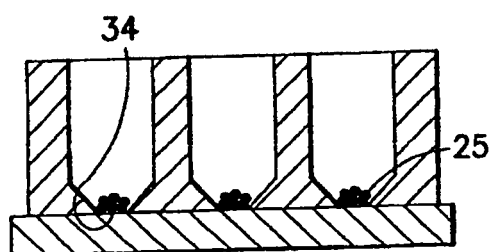


FIG. 8i

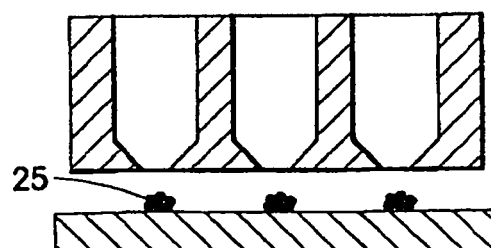


FIG. 8j

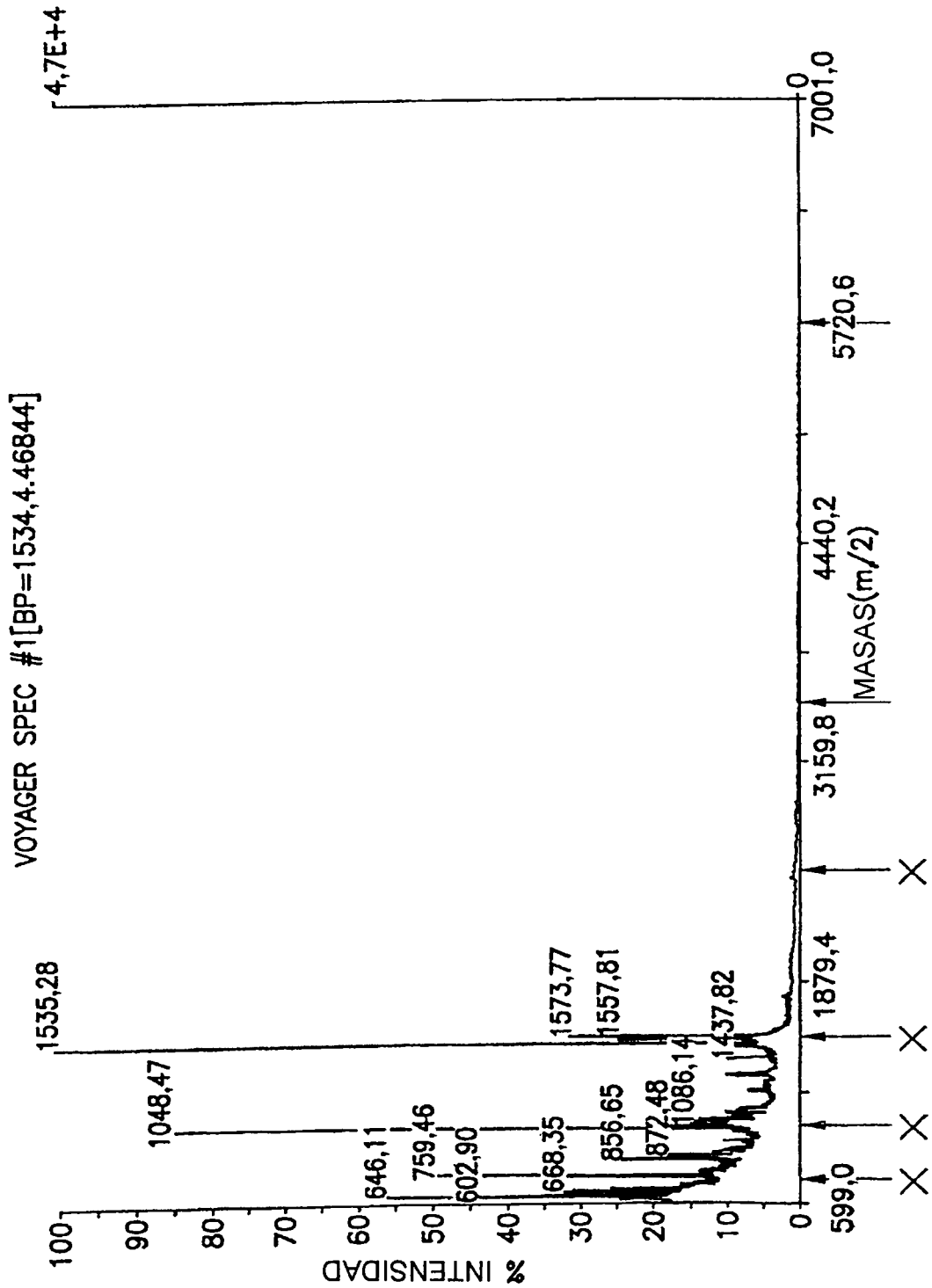


FIG. 9a

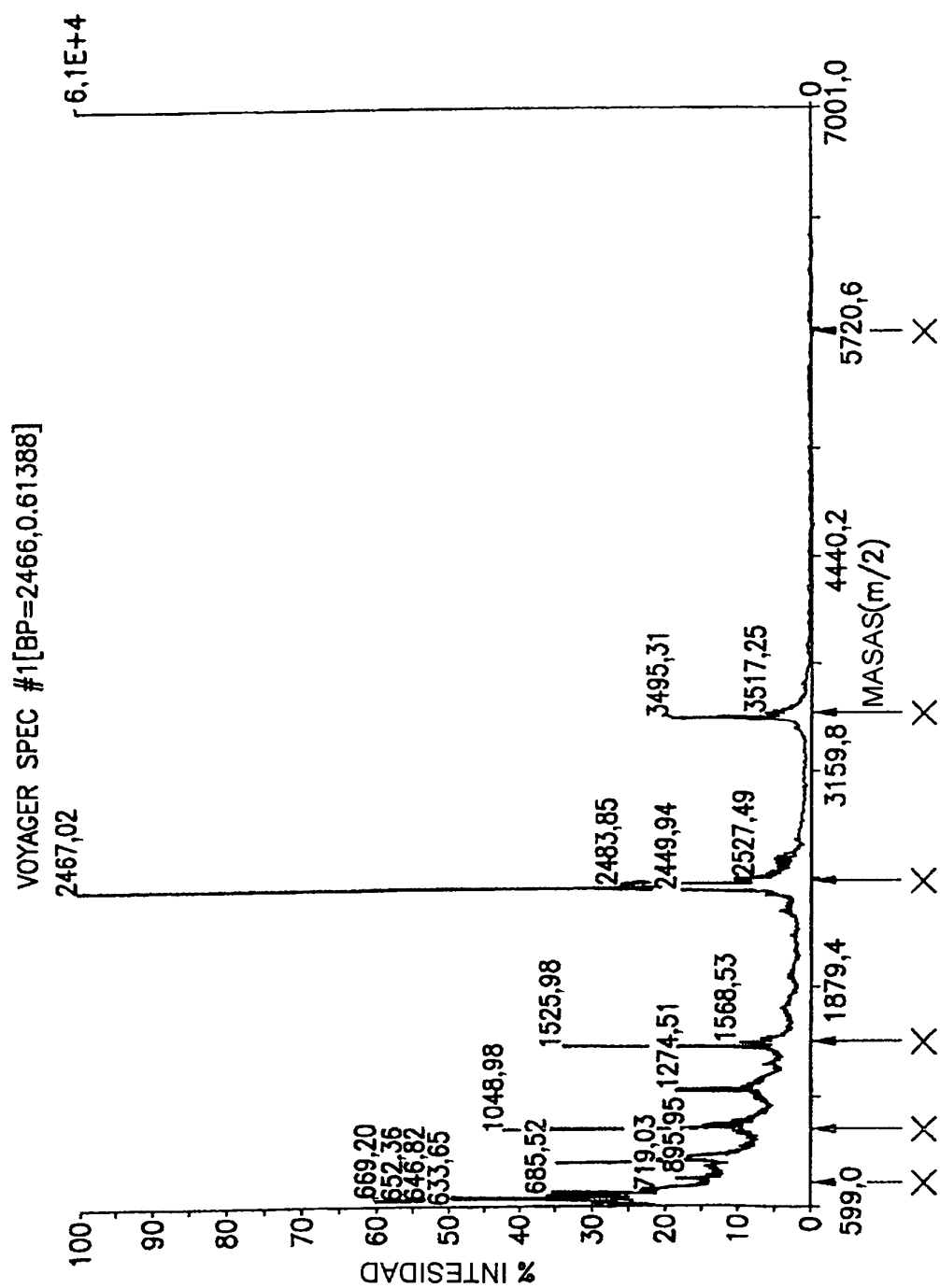


FIG. 9b

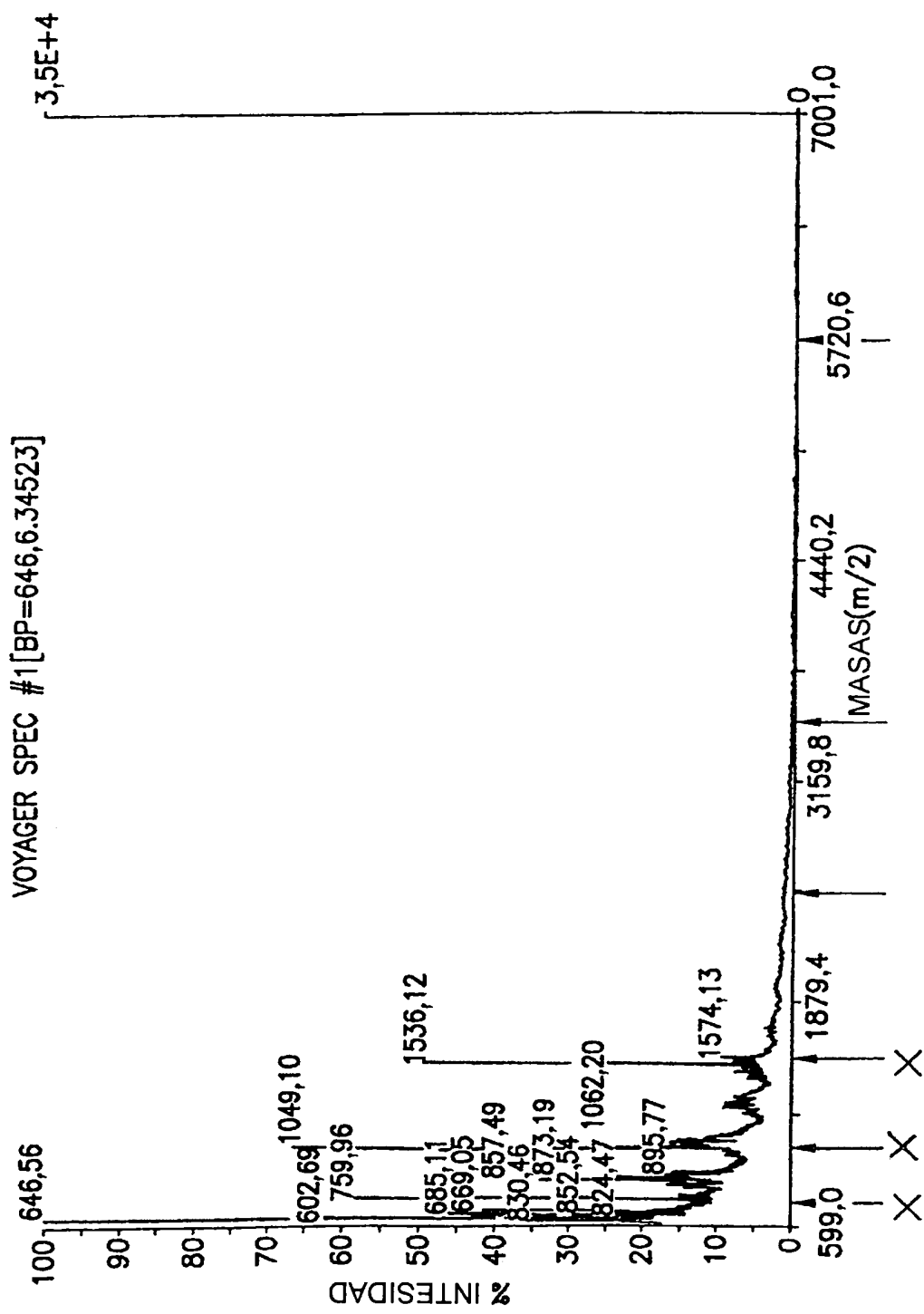


FIG. 10a

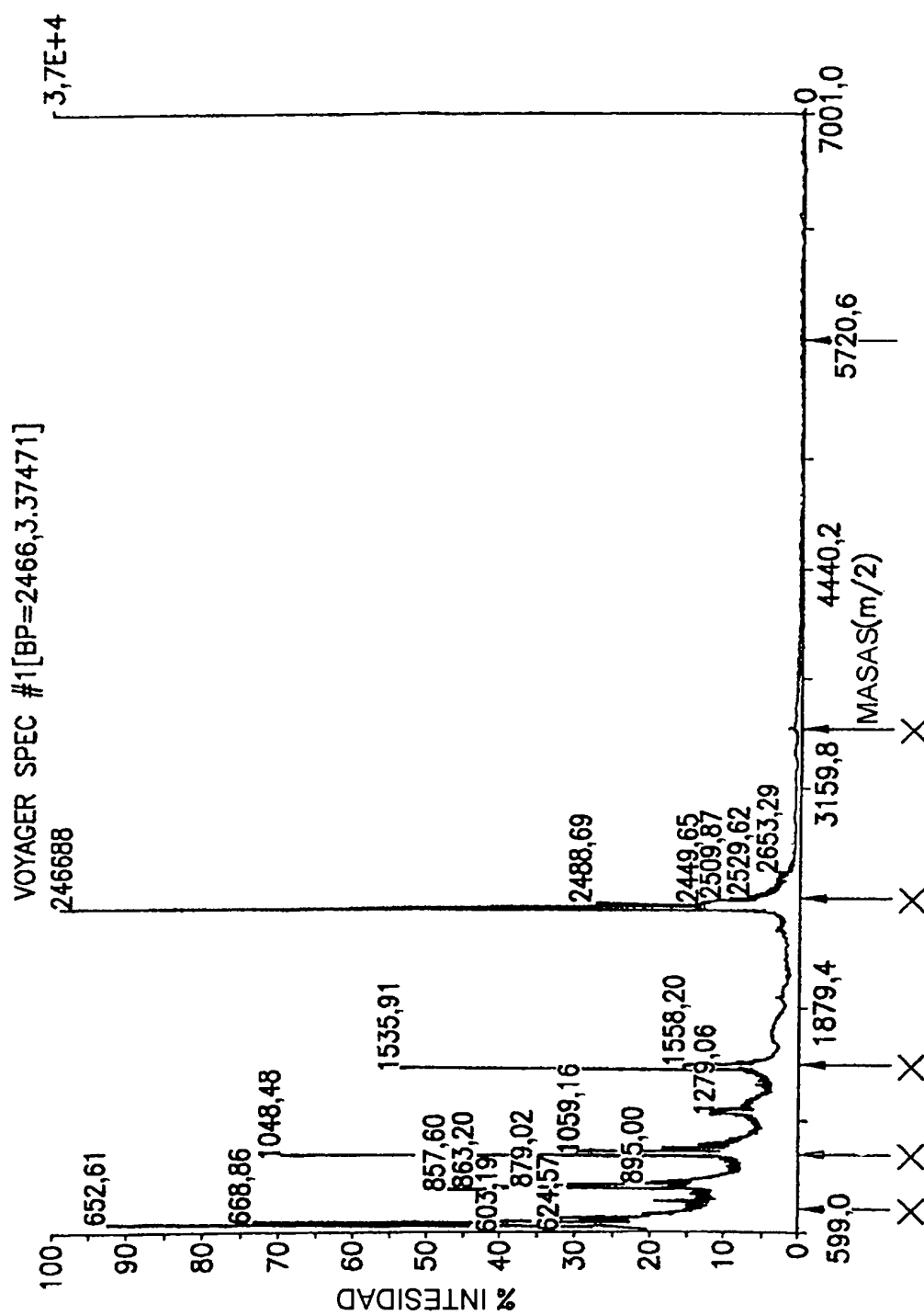


FIG. 10b

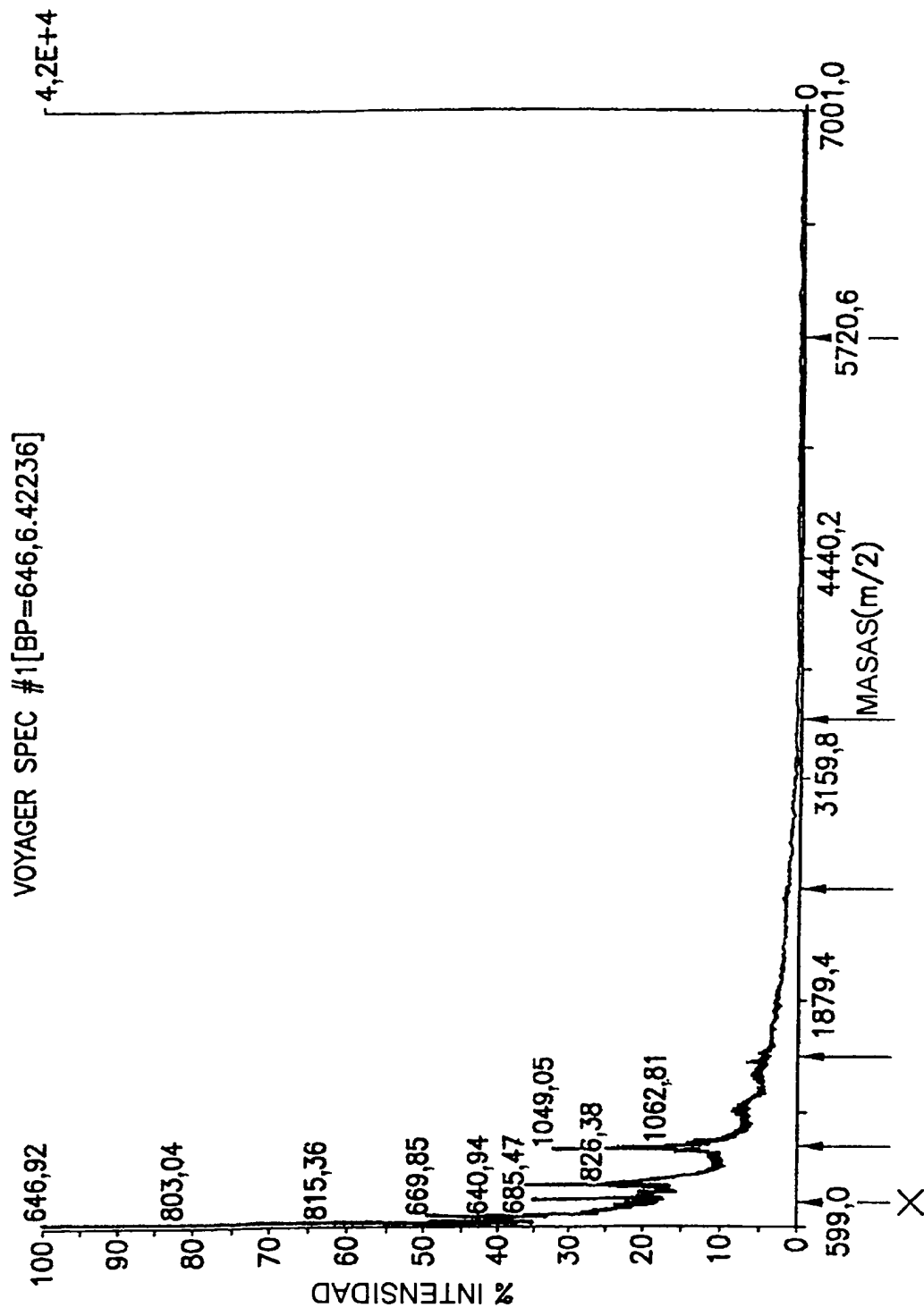


FIG. 11a

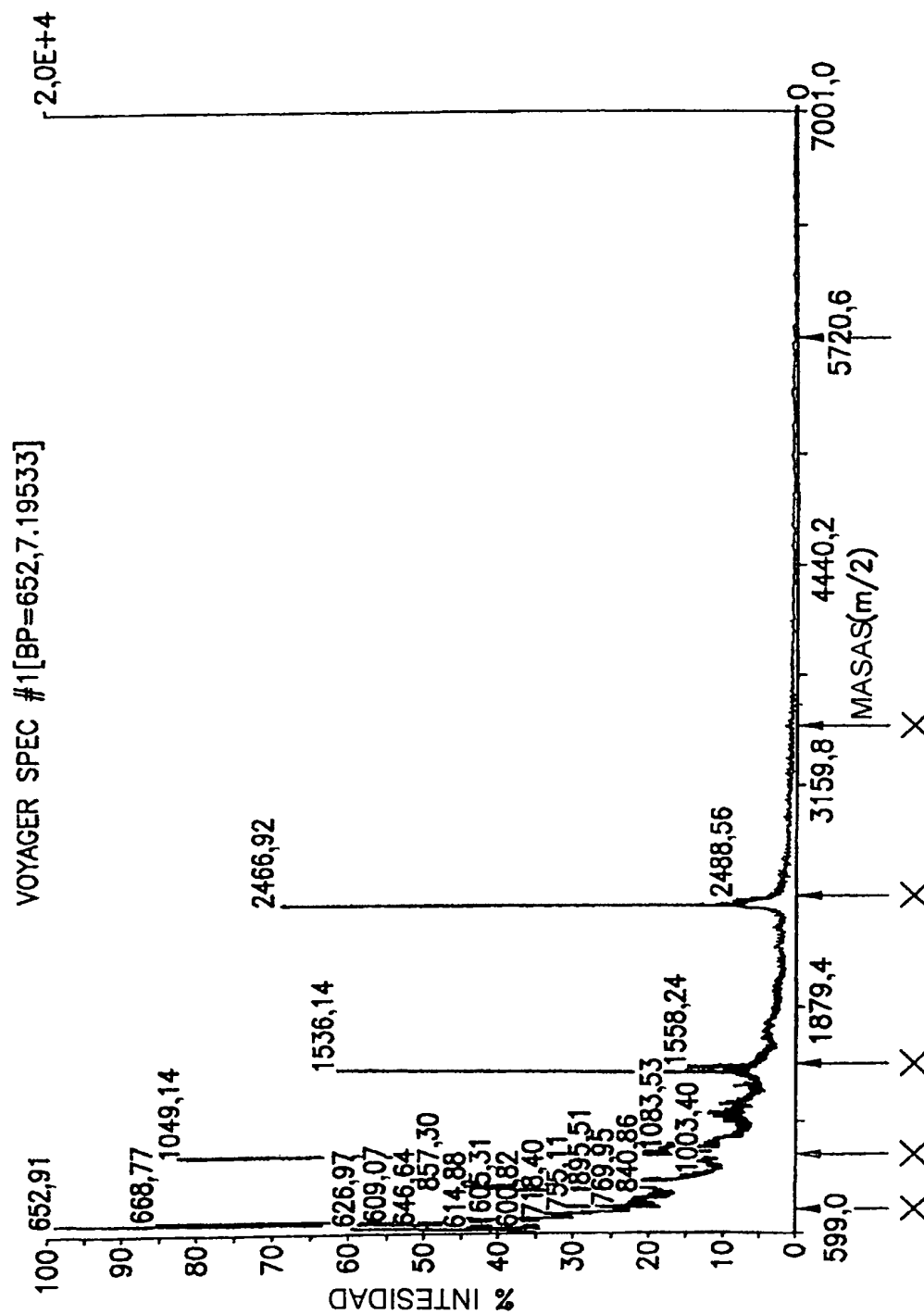


FIG. 11b

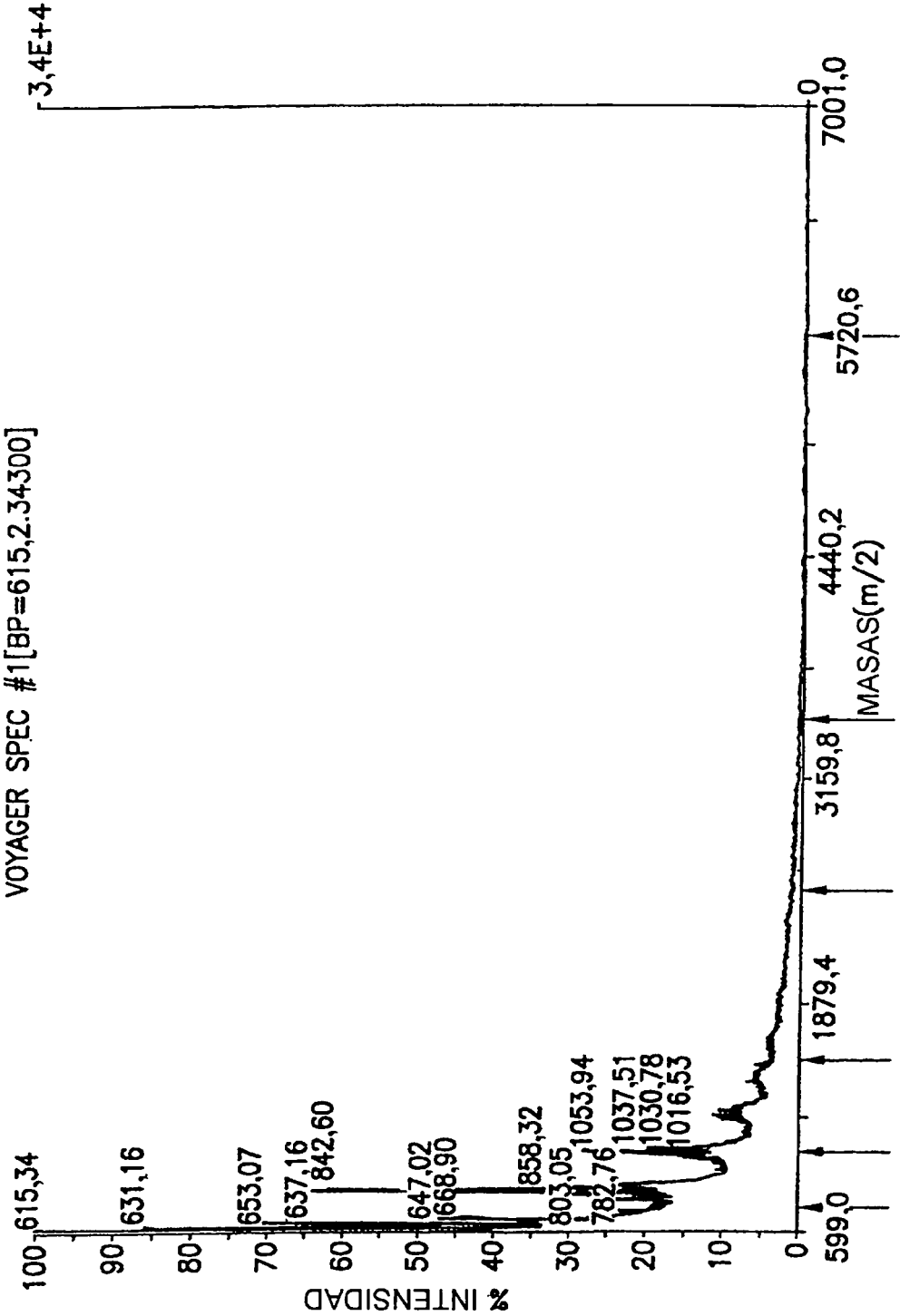


FIG. 12a

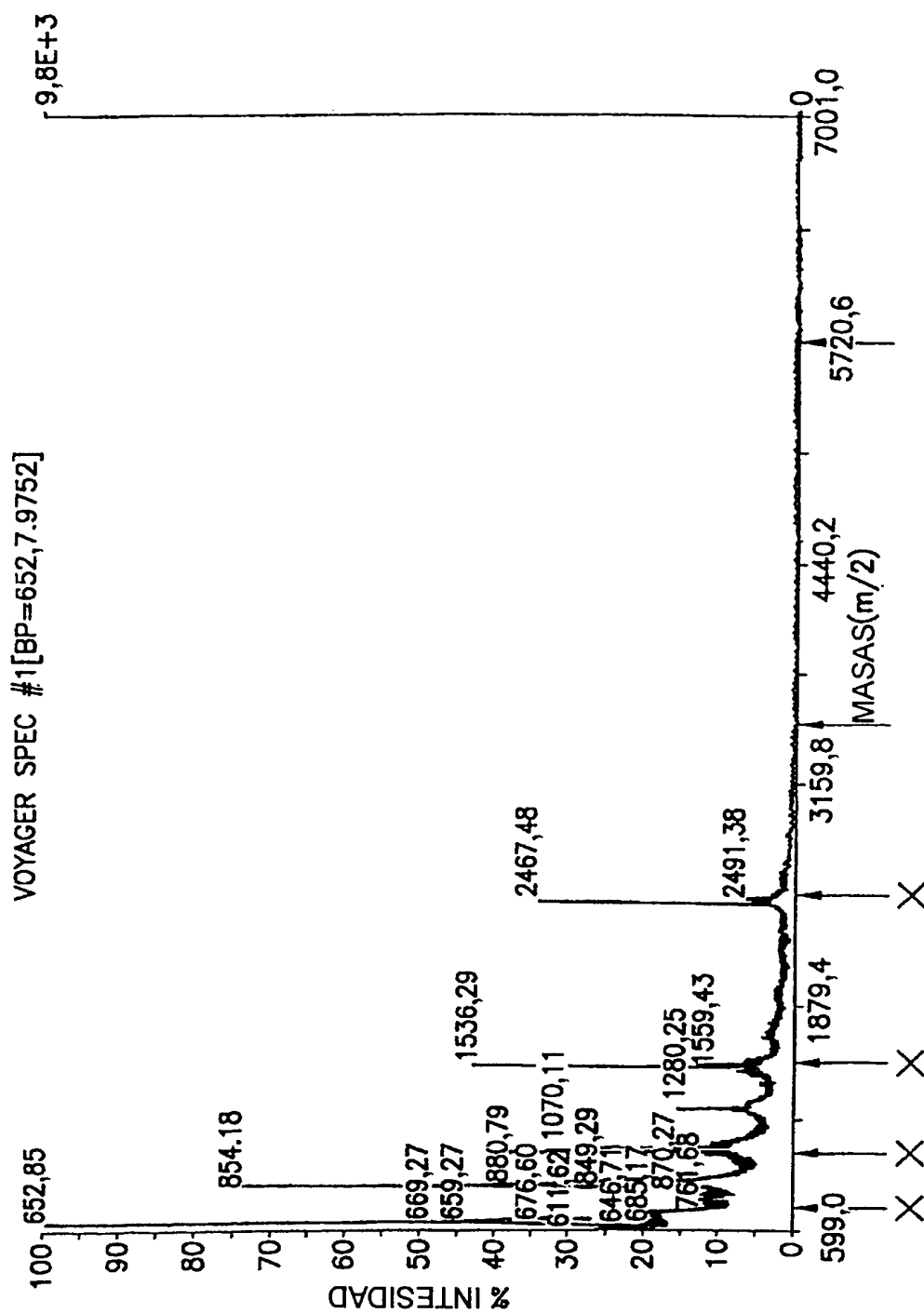


FIG. 12b

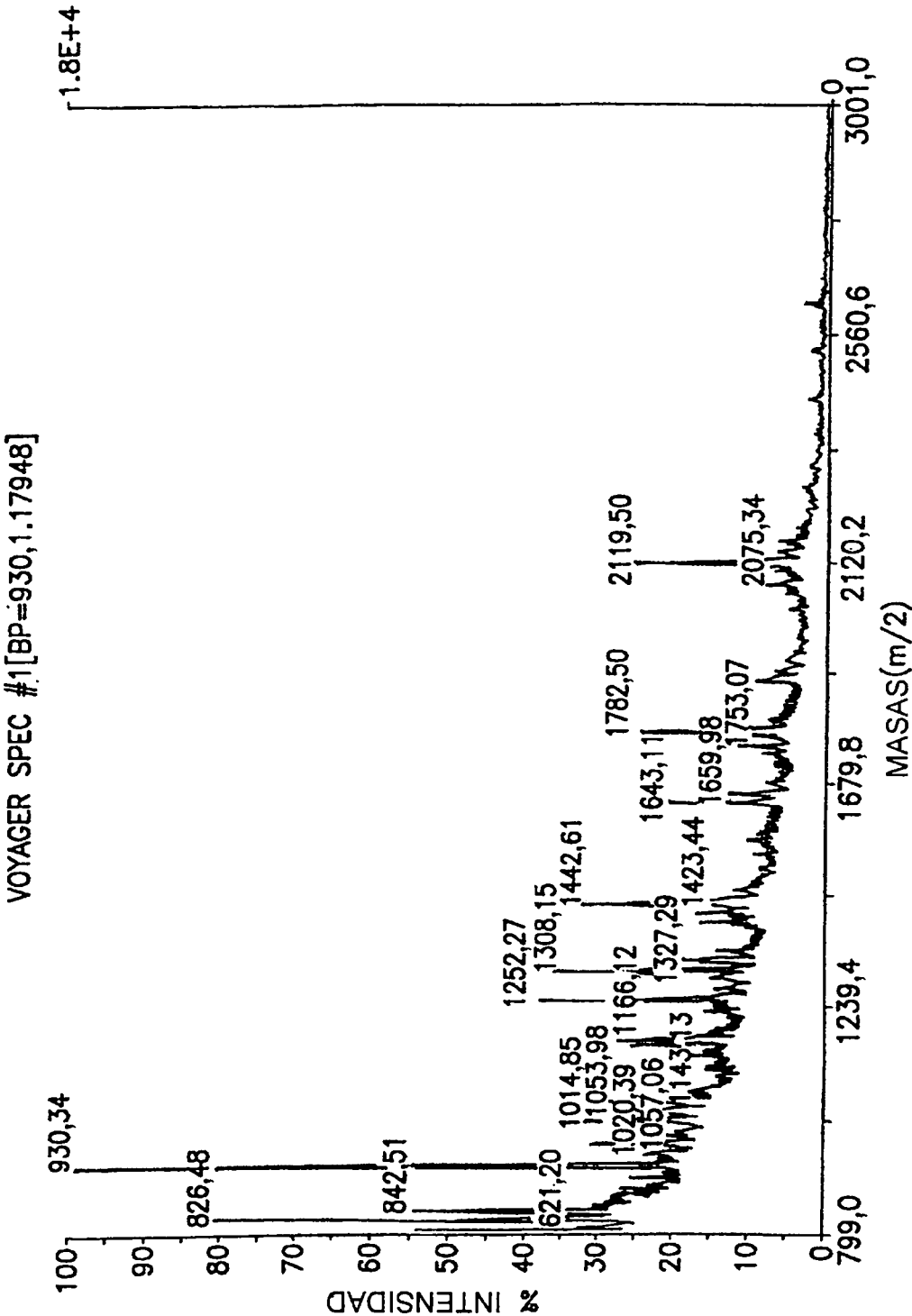


FIG. 13a

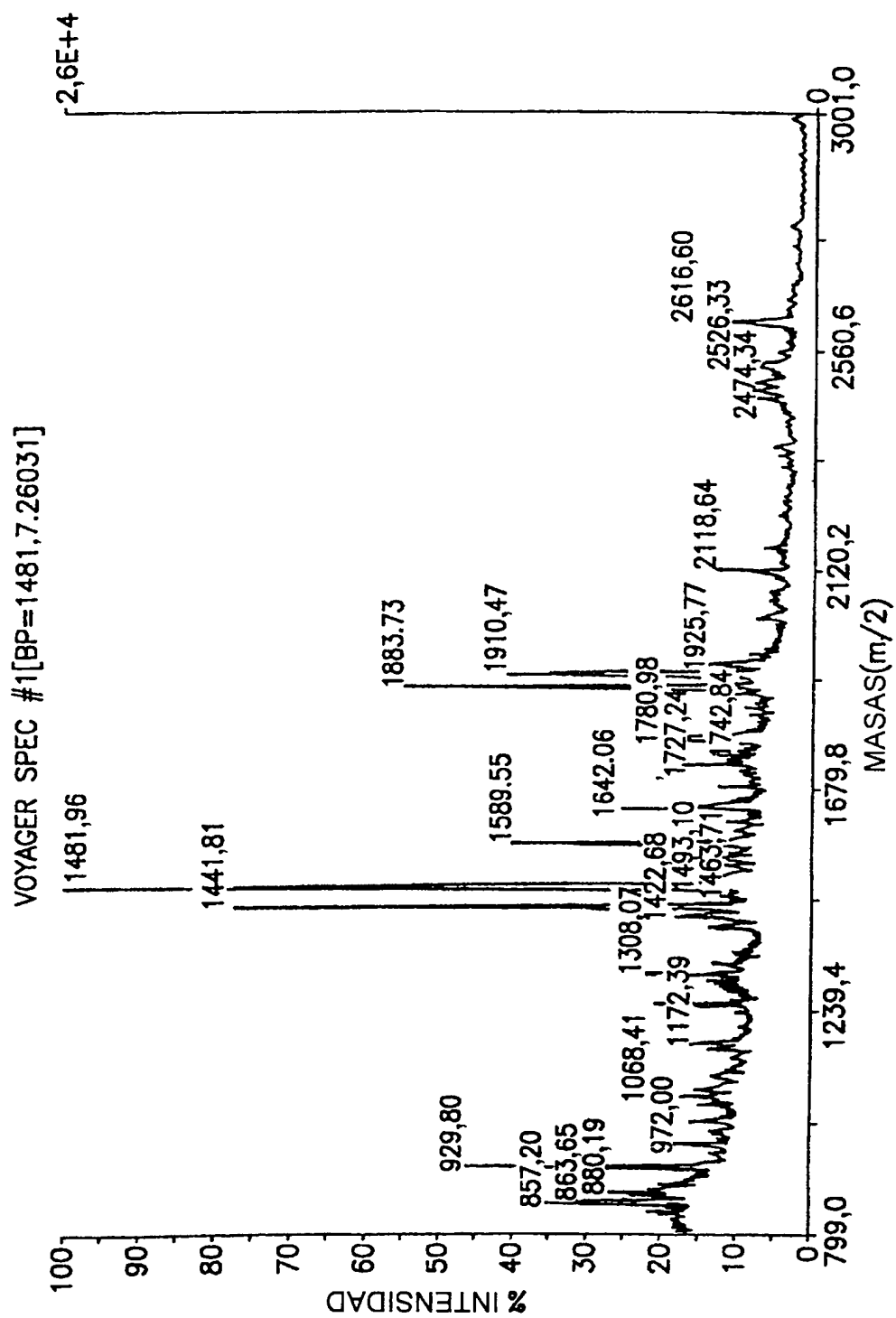


FIG. 13b

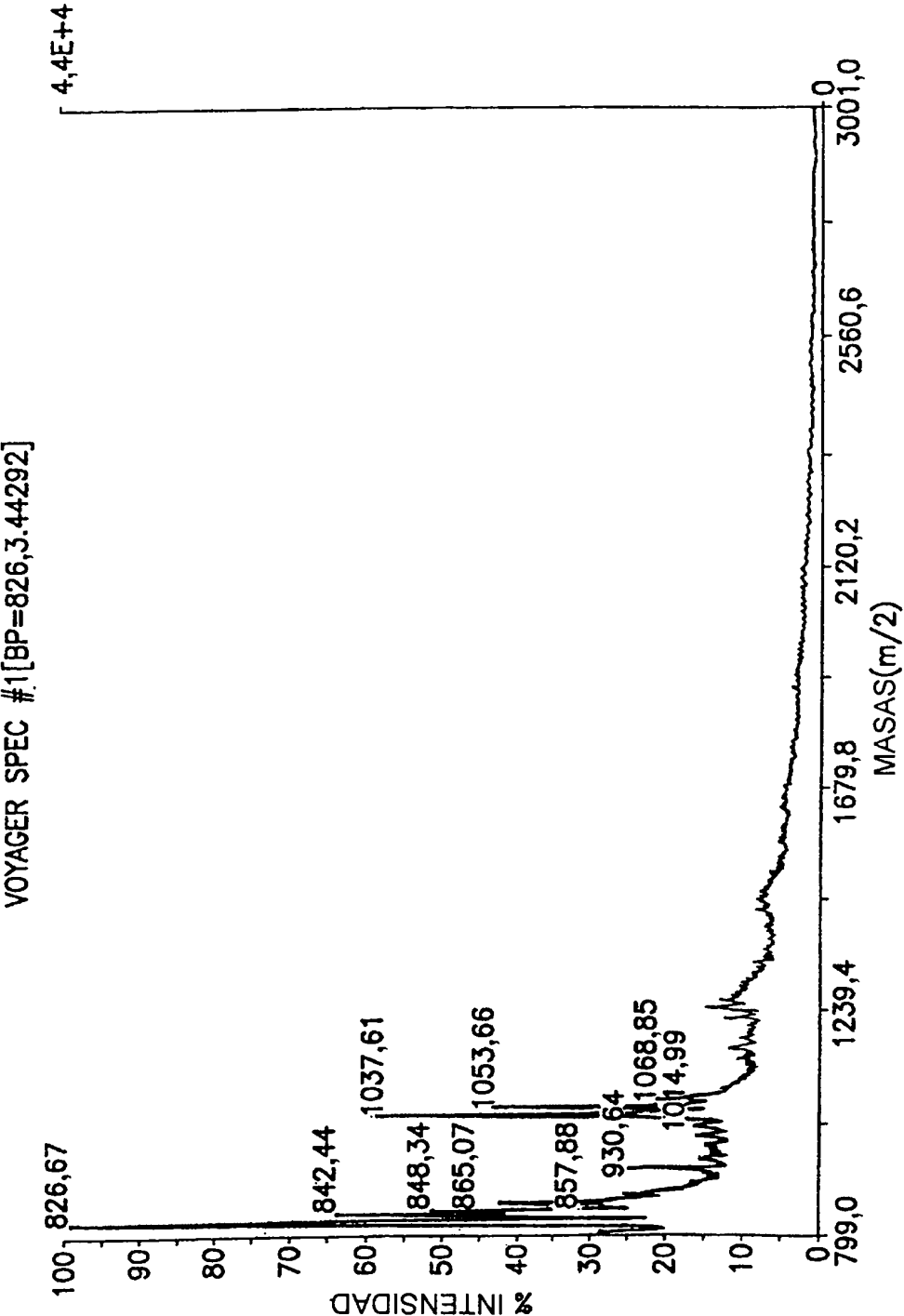


FIG. 14a

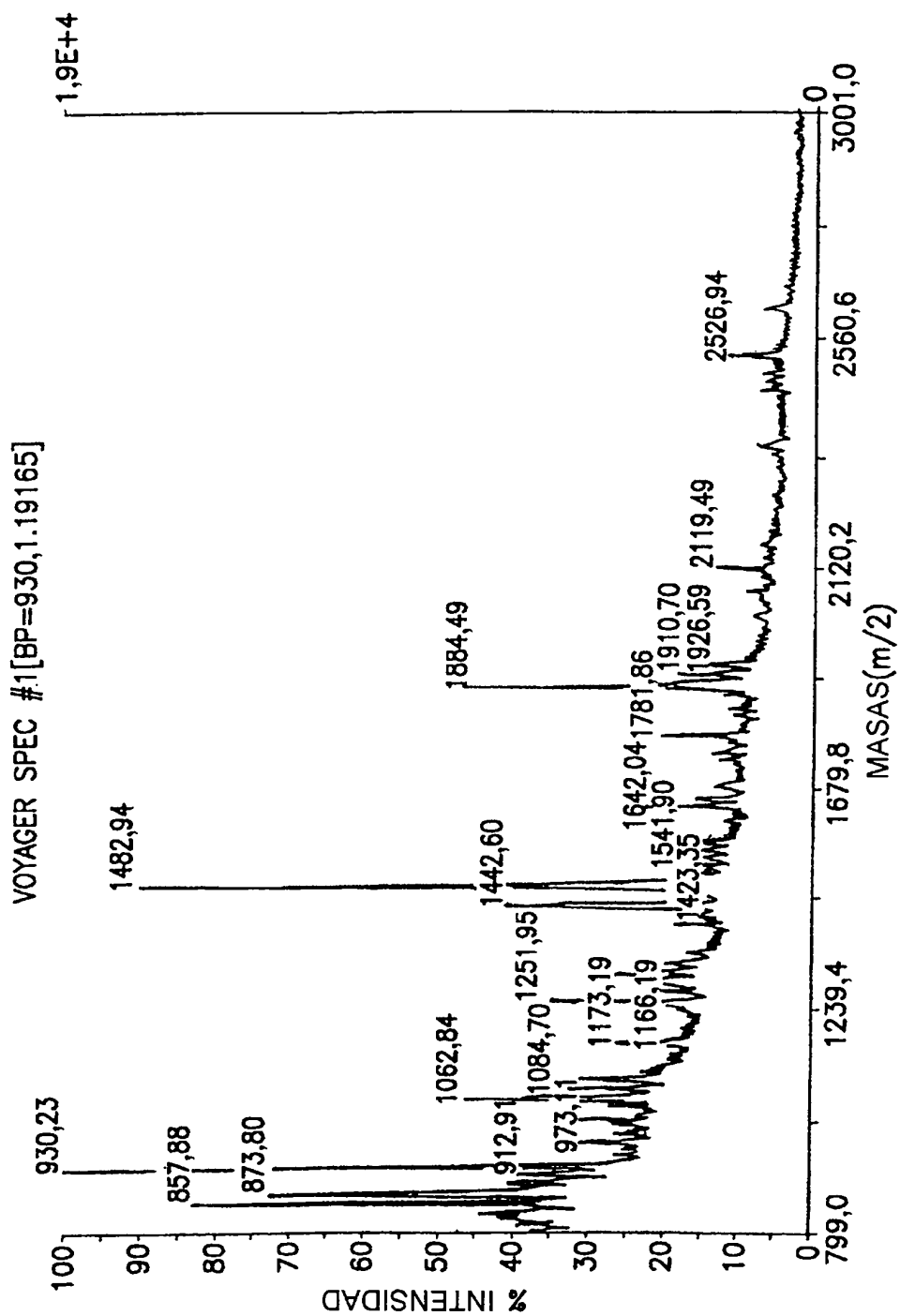


FIG. 14b

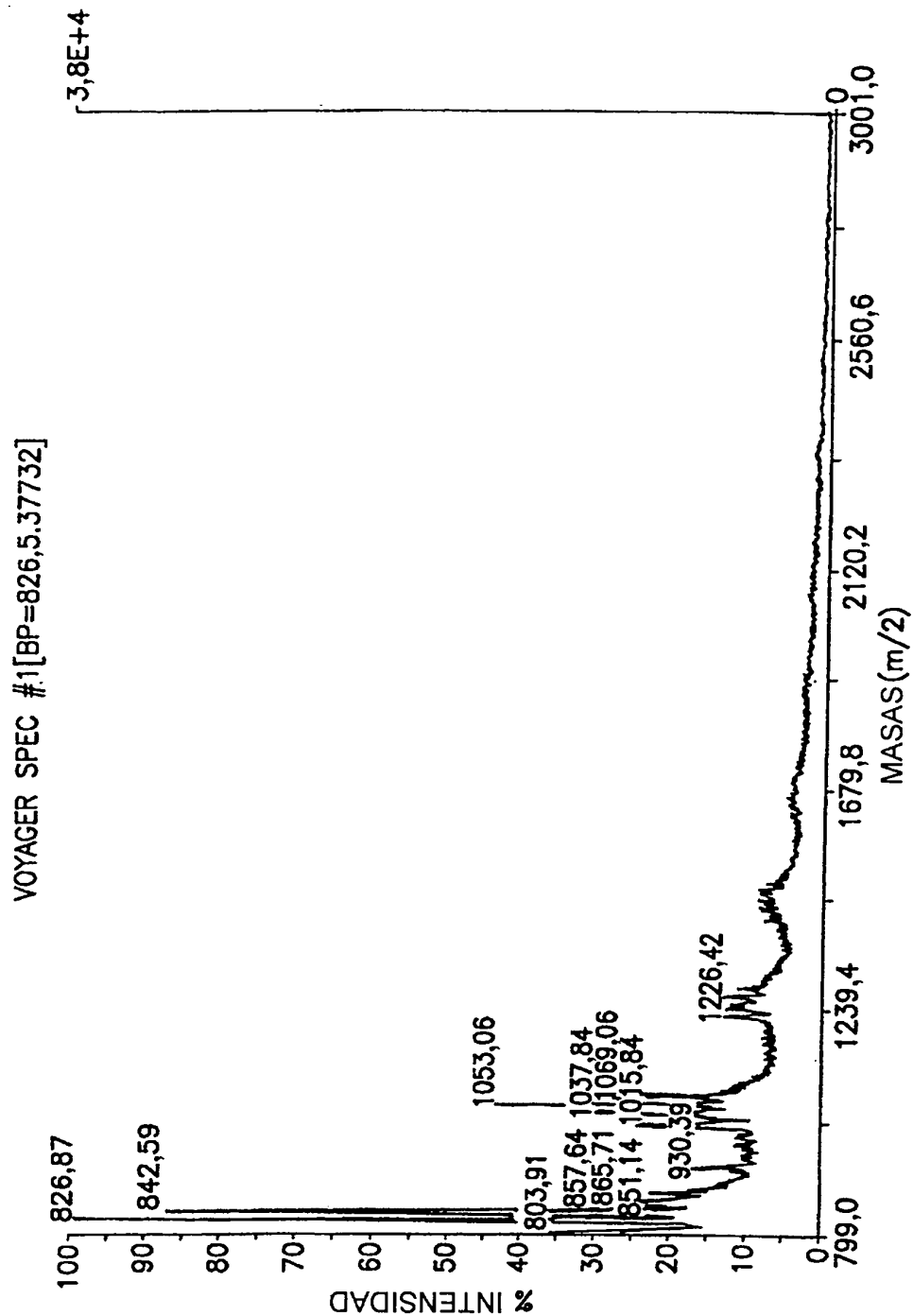


FIG. 15a

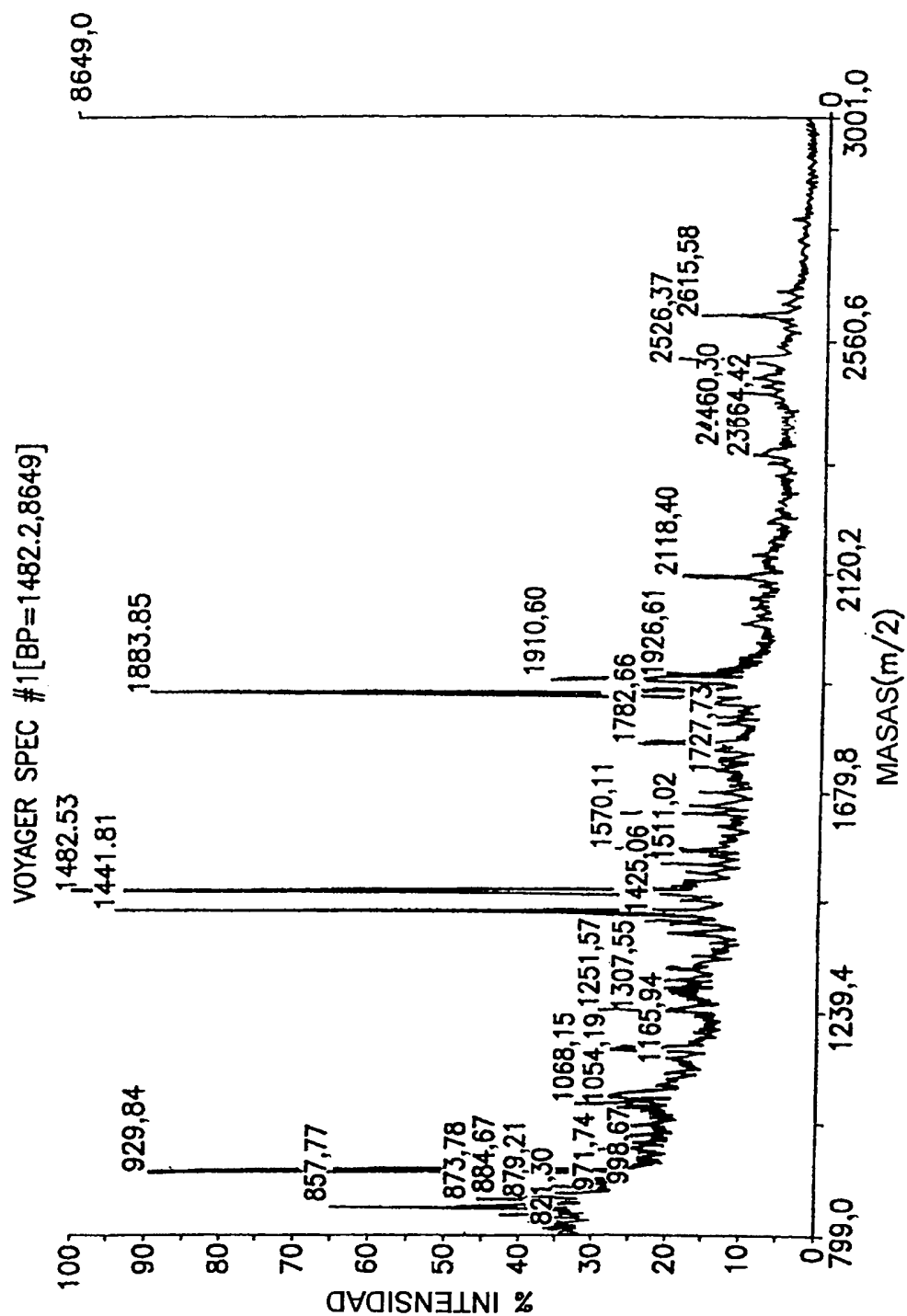


FIG. 15b