

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 472 724**

21 Número de solicitud: 201400239

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

21.03.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.07.2014

Fecha de la concesión:

04.12.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

12.12.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO (100.0%)
San Francisco n. 3
33003 Oviedo (Asturias) ES**

72 Inventor/es:

**RODRIGUEZ GONZALEZ, Pablo;
GONZALEZ ANTUÑA, Ana y
GARCIA ALONSO, José Ignacio**

54 Título: **Método para la cuantificación absoluta de péptidos mediante espectrometría de masas en tándem, y sus usos**

57 Resumen:

Método para la cuantificación absoluta de péptidos mediante espectrometría de masas en tándem, y sus usos utilizando péptidos enriquecidos isotópicamente en isótopos estables que presenten solapamiento espectral con el péptido de abundancia isotópica natural, monitorización de reacciones múltiples a baja resolución en el primer analizador de un espectrómetro de masas en tándem y regresión lineal múltiple. El método es también aplicable para la determinación indirecta de proteínas tras la hidrólisis de las proteínas con enzimas, la selección de uno o varios péptidos característicos de éstas y la determinación absoluta de estos péptidos. La invención resulta de aplicación en aquellos sectores en los que sea necesaria la cuantificación de proteínas y/o péptidos en una muestra, como puede ser en fluidos biológicos o en cultivos celulares, como por ejemplo en los sectores de la agricultura, la química, la farmacia, la biomedicina o la seguridad alimentaria.

ES 2 472 724 B2

DESCRIPCIÓN**MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DE PÉPTIDOS
MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM, Y SUS USOS**

La presente invención se refiere a un método para la cuantificación absoluta de péptidos mediante espectrometría de masas en tándem utilizando péptidos enriquecidos isotópicamente con isótopos estables que presenten solapamiento espectral con el péptido de abundancia natural, monitorización de reacciones múltiples a baja resolución en el primer analizador y regresión lineal múltiple. El método es también aplicable para la determinación indirecta de proteínas tras su hidrólisis la selección de uno o varios péptidos característicos de éstas y la determinación absoluta de estos péptidos. La presente invención también se refiere a los usos del método para la cuantificación absoluta de péptidos.

La invención resulta de aplicación en aquellos sectores en los que sea necesaria la cuantificación de proteínas y/o péptidos en una muestra, como puede ser en fluidos biológicos o en cultivos celulares, como por ejemplo en los sectores de la agricultura, la química, la farmacia, la biomedicina o la seguridad alimentaria.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La expresión de los genes tiene como resultado final la síntesis de péptidos y proteínas. Se considera que una cadena de aminoácidos es un péptido cuando contiene menos de 50 aminoácidos y que es una proteína cuando la cadena es más larga. En muestras biológicas se pueden encontrar tanto péptidos como proteínas. Estas biomoléculas son la llave para descifrar y entender la información contenida en el genoma de cualquier organismo vivo. El proteoma humano comprende más de 100.000 proteínas y péptidos con diferentes propiedades químicas que cubren concentraciones de hasta nueve órdenes de magnitud. Para llegar a entender molecularmente los procesos de las enfermedades es vital comparar sistemas celulares normales y en estado patológico para identificar y cuantificar los cambios que se efectúan en el proteoma. Esta tecnología se conoce con el nombre de proteómica cuantitativa y se basa en el análisis de proteínas y péptidos mediante distintas técnicas

incluyendo su marcaje metabólico, químico o enzimático. Los métodos analíticos desarrollados hasta la fecha en este campo están lejos de lograr la cuantificación de todas las proteínas y péptidos contenidos en un organismo. Sin embargo, la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas es una de las herramientas actuales más eficientes y prometedoras.

El uso de isótopos estables enriquecidos juega un papel muy importante en el desarrollo de nuevas técnicas basadas en la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas para la cuantificación de proteínas y péptidos ya que permite el desarrollo de métodos de cuantificación mediante análisis por dilución isotópica (IDMS). El análisis por dilución isotópica está considerado como un método absoluto de análisis que proporciona resultados directamente trazables al Sistema Internacional de unidades. Además, el uso de isótopos estables enriquecidos ha dado lugar al desarrollo de nuevas metodologías para explorar la dinámica de proteomas enteros y así proporcionar comparaciones relativas de las abundancias de las proteínas entre muestras (**cuantificación relativa**). IDMS ha sido también empleado en el desarrollo de métodos capaces de proporcionar un alto nivel en la precisión y exactitud de la determinación de proteínas (**cuantificación absoluta**).

La **cuantificación relativa** tiene como objetivo caracterizar cualitativa y cuantitativamente los cambios en la composición de un proteoma en función del genotipo, estado del ciclo celular, estado de la enfermedad y metabolismo de un fármaco (Moseley A, *“Current trends in differential expression proteomics: isotopically coded tags”* Trends in Biotechnology 19 (2001) S10) en lo que se ha venido llamando “expresión diferencial”. Hay una gran cantidad de proteínas y péptidos que están involucrados en la respuesta a un estímulo, produciendo cambios en la señalización, transcripción, transducción y en las interacciones metabólicas de las modificaciones post-transduccionales. El reto reside en conocer los patrones de respuesta que se encuentran ocultos en ese cambio. El empleo de isótopos estables enriquecidos en combinación con la espectrometría de masas en tándem es una de las herramientas más eficaces para llevar a cabo el estudio de la expresión diferencial de las proteínas. Este tipo de cuantificación, conocida como cuantificación relativa, se basa en generar dos mezclas de proteoma: una

isotópicamente enriquecida y otra con abundancia natural. La combinación de ambas mezclas durante la preparación de la muestra disminuye al mínimo las diferencias en la pérdida de proteínas o péptidos. Por tanto, la comparación de las intensidades de las señales correspondientes a cada mezcla de proteoma separadas por una diferencia de masa definida, proporcionará una medida en el nivel de la expresión relativa de los péptidos o proteínas en la muestra que se estudia (Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B “*Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review*” Anal.Bioanal. Chem. 389 (2007) 1017). Es muy importante resaltar que este modo de cuantificación en ningún caso permite determinar la cantidad absoluta de proteína o péptido presente en una muestra. Los primeros procedimientos que se desarrollaron dentro de la cuantificación relativa con isótopos estables enriquecidos fueron el marcaje metabólico (Y, Huang K, Cross F.R, Cowburn D, Chait B.T “*Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation*” Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96 (1999) 6591; “*Method for the comparative quantitative analysis of proteins and other biological material by isotopic labelling and mass spectrometry*” Pat. No. US 6,391,649 B1) y el marcaje estable de células en cultivo con aminoácidos enriquecidos isotópicamente, SILAC (*Stable isotope labelling by aminoacids in cell culture*) (Ong S, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen D.B, Steen H, Pandey A, Mann M “*Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics*” Mol. Cell. Proteomics 1(2002) 376). Posteriormente se desarrollaron métodos basados en el marcaje proteolítico, como la introducción de la marca isotópica de forma simultánea con la digestión de la proteína (“*Enzyme Catalyzed Isotope Labeling*” Pat. No. US 2005/0032149; Fenselau C, Yao X “*¹⁸O₂-Labeling in Quantitative Proteomic Strategies: A Status Report*” J. Proteome Res 8 (2009) 2140). Sin embargo, los métodos más utilizados actualmente son los basados en el marcaje químico. Dependiendo del reactivo utilizado, se pueden encontrar numerosos métodos en la bibliografía (Julka S, Regnier F “*Quantification in Proteomics through Stable Isotope Coding: A Review*” J. Proteome Res 3 (2004) 350; Iliuk A, Galan J, Tao W.A “*Playing tag with quantitative proteomics*” Anal. Bioanal. Chem. 393 (2009) 503). Por ejemplo, *Goodlett y colaboradores* (Goodlett D. R, Keller A,

Watts J.D, Newitt R, Yi E.C, Purvine S, Eng J.K, von Haller P, Aebersold R, Kolker E “*Differential stable isotope labeling of peptides for quantitation and de novo sequence derivation*” Rapid Commun. Mass Spectrom. 15 (2001) 1214)

propusieron en 2001 introducir pequeñas marcas después de la digestión triptica.

5 Estas marcas consistían en utilizar alcoholes deuterados para esterificar los grupos carboxílicos de los péptidos (carboxilo terminal y cadena lateral del ácido glutámico y ácido aspártico). Otro marcaje químico es conocido como “dimethyl labelling” y consiste en utilizar formaldehído enriquecido con deuterio después de la digestión (Hsu J, Huang S, Chow N, Chen S “*Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics*” Anal. Chem.75 (2003) 6843; “*Reagent Kit of Global Analysis for Protein Expression and Method for Qualitative and Quantitative Proteomic Analysis using the same*” Patent No.: US 7,338,806 B2). Gygi y colaboradores (Gygi S. P, Rist B, Gerber S.A, Turecek F, Gelb M.H, Aebersold R “*Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags*” Nat. Biotechnol. 17 (1999) 994; “*Rapid Quantitative Analysis of Proteins or Protein Function in Complex Mixtures*” Patent No.: US 6,670,194 B1)

10 desarrollaron otra estrategia de marcaje químico con isótopos estables y una etiqueta de afinidad para la cuantificación relativa de proteínas en mezclas complejas. En ella se procede a la derivatización química de los péptidos con un reactivo conocido como ICAT. Este compuesto posee un extremo que reacciona con los residuos de cisteína libres, un *linker* que puede contener ocho hidrógenos (ligero) u ocho deuterios (pesado), y otro extremo con biotina como ancla de afinidad. Los péptidos (que contienen cisteína) se aíslan selectivamente por cromatografía de afinidad con avidina. Li y colaboradores (Li J, Steen H, Gygi S.P “*Protein Profiling with Cleavable Isotope-coded Affinity Tag (cICAT) Reagents*” Mol. Cell. Proteomics 2 (2003) 1198) desarrollaron una nueva versión de ICAT denominada “cleavage ICAT (cICAT)” mediante la sustitución del reactivo (*linker*) que contenía 8 átomos de deuterio por otro que contenía nueve átomos de ¹³C.

15 Otros métodos que se basaron en el procedimiento ICAT consistieron en marcar sitios específicos de péptidos con cisteína (Zhou H, Ranish J.A, Watts J.D, Aebersold R “*Quantitative proteome analysis By solid-phase isotope tagging and mass spectrometry*” Nat. Biotechnol. 19 (2002) 512). Otro tipo de estrategia de

20

25

30

marcaje químico es el que hace uso de marcas isobáricas. Este método fue publicado por Thompson y colaboradores (Thompson A, Schäfer J.U, Kuhn K, Kienle S, Schwarz J, Schmidt G, Neuman T, Hamon C “*Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS*” Anal. Chem.75 (2003) 1895; “*Mass Labels*” Patent Application No.: US 2005/0048489 A1) y recibió el nombre de etiqueta de masa en tándem (*tandem mass tags, TMT*). Es similar a otras estrategias para marcar péptidos pero la diferencia es que los péptidos de abundancia isotópica natural y sus análogos enriquecidos isotópicamente contienen la misma masa global. En este caso, el grupo amino terminal y el grupo épsilon amino de la lisina es marcado utilizando N-hidroxysuccinimida. Solamente, después de la colisión en la celda, los péptidos naturales y enriquecidos se distinguen en el espectro de masas. Actualmente, la estrategia que más se utiliza se conoce con el nombre de iTRAQ (*isobaric tags for relative and absolute quantification*) (Ross P.L, Huang Y.N, Marchese J.N, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlet-Jones M, He F, Jacobson A, Pappin D “*Multiplexed protein quantitation in Saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents*” Mol.Cell. Proteomics 3 (2004) 1154; “*Isobarically Labelled Analytes and Fragment Ions derived therefrom*” Patent Application No.: US 2010/0129842 A1). iTRAQ se basa en el empleo de un reactivo que reacciona con el grupo amino terminal y el grupo amino de la cadena lateral de la lisina. La molécula que se utiliza para el marcaje químico es la N-metilpiperazina. El reactivo iTRAQ consta de un *equilibrador* con masa 28 a 31 Da y un grupo *reporter* con masa 114 a 117 Da. Tras la fragmentación, el grupo *reporter* se pierde generando fragmentos entre 114 a 117 Da. La intensidad o la relación de la abundancia de los fragmentos se utilizan para la cuantificación de los péptidos. La principal ventaja es que se pueden marcar 4 muestras diferentes en el mismo experimento.

Cabe resaltar que ninguno de estos procedimientos permite determinar la cantidad absoluta de proteína presente en una muestra ya que la cuantificación relativa tiene como objetivo determinar la expresión diferencial de las proteínas entre dos estados, como por ejemplo ausencia o presencia de un fármaco. Sin embargo, la

cuantificación absoluta pretende conocer cuál es la concentración de las proteínas y los péptidos en una muestra concreta. Esto tiene una relevancia importante en campos como la biomedicina, la industria farmacéutica, la seguridad alimentaria o la salud pública. Solamente las concentraciones de proteínas o péptidos obtenidas mediante el empleo de cuantificaciones absolutas puede relacionarse con una referencia establecida a través de una cadena ininterrumpida de comparaciones, en donde todas ellas tienen asociada una incertidumbre (trazabilidad). Ésta es la única forma de asegurar que la determinación de la concentración de proteína en una muestra es directamente trazable al Sistema Internacional de unidades. La cuantificación de una proteína mediante IDMS requiere la adición de un compuesto enriquecido isotópicamente (trazador isotópico) a la muestra. La exactitud y precisión en la determinación de la concentración de la proteína dependerá del trazador que se seleccione y de la metodología analítica que se vaya a utilizar. Dependiendo de la forma en que se encuentre el análogo enriquecido se pueden encontrar proteínas, péptidos o aminoácidos enriquecidos isotópicamente en alguno de sus átomos. Por tanto, existen tres estrategias actuales de cuantificación absoluta.

La primera de las estrategias se basa en la cuantificación de proteínas y péptidos utilizando **aminoácidos enriquecidos isotópicamente**. Esta estrategia es directamente trazable al SI (Burkitt W. I, Pritchard C, Arsene C, Henrion A, Bunk D, O'Connor G "*Toward Système International d'Unité-traceable protein quantification: From amino acids to proteins*" Anal. Biochem. 376 (2008) 242), ya que los aminoácidos se pueden adquirir comercialmente en diferentes empresas con certificados de pureza que incluso pueden ser proporcionados por Institutos Nacionales de Metrología. La cuantificación de una proteína a través de esta estrategia se hace con una hidrólisis química en condiciones ácidas, pero también han sido descritas hidrólisis básicas y enzimáticas. Estas reacciones requieren tiempos largos (24 h), que pueden acortarse mediante el empleo de microondas (Fountoulakis M, Lahm H. "*Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins*" J. Chrom. A. 826 (1998) 109). El paso limitante en este procedimiento es conseguir una hidrólisis completa de las proteínas, lo cual es determinante para la exactitud final de la medida. La principal desventaja de este método es que no se puede aplicar directamente a muestras reales debido a la presencia de otras proteínas o péptidos que también

contienen los aminoácidos a determinar. Por tanto, este método está limitado al análisis de una proteína o péptido en patrones o en muestras que contengan única y exclusivamente la proteína a determinar. La determinación de proteínas como la albúmina (Kato M, Kato H, Eyama S, Takatsu A “*Application of amino acid analysis using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with isotope dilution mass spectrometry for peptide and protein quantification*” J. Chromatogr. B 877 (2009) 3059) de suero bovina, péptidos como la angiotensina o la hormona de crecimiento humana (Jeong J, Lim H, Kim S, Ku H, Oh K, Park S “*Quantification of human growth hormone by amino acid composition analysis using isotope dilution liquid-chromatography tandem mass spectrometry*” J. Chrom. A 1218 (2011) 6596) son algunos ejemplos recientes.

La segunda estrategia se basa en la utilización de **péptidos enriquecidos isotópicamente**. La cuantificación de proteínas a través péptidos enriquecidos se realiza a través de la determinación de uno o varios de los péptidos característicos de la proteína liberados tras una hidrólisis enzimática (comúnmente utilizando tripsina). Para llevar a cabo esta estrategia es imprescindible que el péptido a determinar sea único de la proteína que se va a estudiar. Además, se debe asegurar que la hidrólisis enzimática sea completa para que el péptido de interés de abundancia isotópica natural se libere cuantitativamente de la proteína. Esta estrategia, por tanto, está basada en la adición de un péptido enriquecido isotópicamente al inicio del análisis, es decir, antes de la digestión triptica. El péptido enriquecido isotópicamente debe ser estable a lo largo de todo el proceso de digestión y no debe sufrir ningún tipo de degradación hasta que el péptido característico de abundancia isotópica natural sea liberado completamente y se mezcle homogéneamente con el péptido enriquecido isotópicamente. La primera aplicación donde se utilizaron péptidos enriquecidos isotópicamente fue publicada por Desiderio y Kai (Desiderio D.M, Kai M “*Preparation of stable isotope-incorporated peptide internal standards for field desorption mass spectrometry quantification of peptides in biologic tissue*” Biol. Mass Spectrom. 10 (1983) 471) en 1983 para determinar una serie de aminoácidos presentes en el tejido del tálamo. A continuación, Barr y colaboradores (Barr J. R, Maggio V.L, Patterson D. G, Cooper G.R, Henderson L.O, Turner W.E, Smith S.J, Hannon W.H, Needham L.L, Sampson E. J “*Isotope dilution-mass spectrometric quantification of*

specific proteins: model application with apolipoprotein A-I Clin. Chem. 42 (1996) 1676) sintetizaron péptidos de abundancia natural y enriquecidos isotópicamente para llevar a cabo la cuantificación de la apoproteína A1. Posteriormente se desarrollaron y patentaron otras metodologías como AQUA y QCONCAT. El acrónimo AQUA (Absolute QUAntification) se refiere al uso de péptidos enriquecidos isotópicamente sintetizados químicamente para la cuantificación de las proteínas (Gygi S.P, Gerber S.A “*Absolute Quantification of Proteins and modified forms thereof by multistage mass Spectrometry*”. Pat. no. US 7,501,286 B2; Gerber S.A, Rush J, Stemman O, Kirschner M.W, S.P. Gygi “*Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS*” PNAS 100 (2003) 6940). Antes de optar por esta estrategia de trabajo la selección del tipo de péptido enriquecido isotópicamente es crucial y se deben realizar estudios previos para la selección del péptido más adecuado. El péptido seleccionado debe ser específico de la proteína y debe ser detectado mediante el espectrómetro de masas sin interferencias isobáricas incluso cuando se trabaje en modo tándem. Para la determinación directa de péptidos el método es análogo sin necesidad de realizar la hidrólisis de la proteína. Actualmente, existen empresas que ofrecen una amplia variedad de péptidos enriquecidos isotópicamente para aplicar métodos basados en la estrategia AQUA. Por otra parte, QconCAT es una estrategia más refinada capaz de realizar cuantificación múltiple de proteínas (“*Artificial protein, method for absolute quantification of proteins and uses thereof*” Pat. no. WO 2006/128492 A1; Rivers J, Simpson D.M, Robertson D.H.L, Gaskell S.J, Beynon R.J “*Absolute Multiplexed Quantitative Analysis of Protein Expression during Muscle Development Using QconCAT*” Mol. Cell. Proteomics 6 (2007) 1416). Este método se basa en crear genes artificiales (síntesis *de novo*) que al expresarse producen proteínas sintéticas formadas por péptidos trípticos. En otras palabras, los genes sintéticos se expresan generando péptidos estándar concatenados, los cuales a través de una digestión tríptica producen múltiples péptidos enriquecidos isotópicamente. De esta manera se pueden utilizar hasta 50 péptidos trípticos incluidos en QconCAT, permitiendo una cuantificación múltiple y absoluta de una o varias proteínas en un solo experimento. Las limitaciones de esta estrategia se deben principalmente a la trazabilidad del estándar de QconCAT. La calibración requiere la hidrólisis de aminoácidos descrita en la sección anterior. Además, al igual que en

AQUA, se necesita una hidrólisis completa de la proteína y una buena estabilidad de los péptidos a lo largo de la digestión. Las metodologías AQUA y QconCAT utilizan marcaje isotópico múltiple para evitar el solapamiento espectral entre los péptidos enriquecidos isotópicamente y los de abundancia isotópica natural ya que el cálculo final se realiza mediante relación de intensidades entre el pico más abundante del péptido de abundancia isotópica natural y el más abundante del péptido enriquecido isotópicamente. Además, para una cuantificación correcta estas metodologías requieren la preparación de un calibrado metodológico que se suele realizar en ausencia de matriz, lo que puede provocar errores significativos en la cuantificación.

La tercera estrategia para la cuantificación absoluta de proteínas se basa en la utilización de **proteínas enriquecidas isotópicamente**. Este procedimiento recibe el nombre de PSAQ (*Protein Standard for Absolute Quantification*) (Brun V, Dupuis A, Garin J “*Method for absolute quantification of polypeptides*”. Pat. no. US 2010/0173786 A1) y se aplicó por primera vez en la determinación de toxinas de estafilococos (Brun V, Dupuis A, Adrait A, Marcellin M, Thomas D, Court M, Vandenesch F, Garin J “*Isotope-labeled Protein Standards Toward Absolute Quantitative Proteomics*” Mol. Cell. Proteomics 6 (2007) 2139). La principal ventaja es la adición de la proteína marcada al comienzo del análisis. De esta forma se pueden corregir los errores a lo largo de todo el procedimiento, incluida una digestión no cuantitativa o la inestabilidad de los péptidos durante la misma. Otra ventaja es que al tener las mismas propiedades químicas hace que esta estrategia sea compatible con cualquier tipo de fraccionamiento de la muestra como es el SDS-PAGE o la inmunocaptura de proteínas. Otra ventaja de este método es que ofrece la posibilidad de que la cuantificación de la proteína se pueda realizar con cualquiera de los péptidos generados en la hidrólisis de la proteína. Por tanto, interferencias generadas durante la ionización de la muestra o la supresión de la ionización se pueden corregir con una adecuada selección del péptido que se va a medir (Brun V, Masselon C, Garin J, Dupuis A, “*Isotope dilution strategies for absolute quantitative proteomics*” J. Proteomics 72 (2009) 740). Sin embargo, esta estrategia tiene dos inconvenientes fundamentales. El primero de ellos es que la certificación de los estándares de proteínas debe realizarse mediante hidrólisis de aminoácidos para obtener una concentración trazable al SI. Como consecuencia, los estándares de la proteína deben

estar purificados y no contener ningún péptido o aminoácido que no pertenezca a la cadena proteica. El segundo es el alto coste de esta estrategia debido a la enorme dificultad de la síntesis y purificación de las proteínas enriquecidas isotópicamente.

Los métodos descritos hasta la fecha para la cuantificación absoluta de proteínas mediante el uso de péptidos enriquecidos isotópicamente, en concreto el método AQUA, utilizan análogos enriquecidos isotópicamente en un número suficiente de átomos de deuterio, ^{13}C ó ^{15}N , que permita evitar el solapamiento espectral en el espectrómetro de masas entre la distribución isotópica del péptido de abundancia isotópica natural y el péptido enriquecido isotópicamente. Esto permite obtener una relación isotópica utilizando las intensidades observadas a dos masas (o dos transiciones) libres de solapamiento espectral. Estas intensidades se utilizan junto con la cantidad de péptido enriquecido isotópicamente añadida para realizar la cuantificación absoluta de la proteína. Este tipo de procedimientos pueden conducir a errores significativos en la determinación de proteínas por dos razones:

- a) El uso de péptidos análogos enriquecidos isotópicamente en varios átomos de la molécula aumenta la probabilidad de efectos isotópicos no solo durante la preparación de la muestra sino también durante la separación cromatográfica y la ionización en la fuente de electroespray (ESI).
- b) Utilizar relaciones isotópicas calculadas a partir de intensidades de dos masas conduce a errores en la determinación final del péptido de abundancia isotópica natural. La relación isotópica no es igual a la relación de moles ya que las intensidades absolutas no tienen en cuenta el enriquecimiento isotópico del péptido enriquecido isotópicamente ni la abundancia isotópica relativa de cada uno de los isotopólogos constituyentes de los péptidos. Para una conversión correcta de la relación de intensidades a relación de número de moles es necesario realizar un calibrado metodológico que permita establecer una función de correlación entre ambos. Dicho calibrado se suele realizar en ausencia de matriz, lo cual puede provocar errores significativos en las determinaciones utilizando una fuente ESI.

Los inventores también han desarrollado un modo alternativo de cuantificación en dilución isotópica que hace uso de análogos del compuesto a determinar

mínimamente enriquecidos en ^{13}C y regresión lineal múltiple (González-Antuña A, Rodríguez-González P, Centineo G, García Alonso JI. “*Evaluation of minimal labelling for stable isotope dilution in organic analysis*”. *Analyst* 2010;135:953–64; González-Antuña A, Rodríguez-González P, Lavandera I, Centineo G, Gotor V, García Alonso JI. “*Development of a routine method for the simultaneous confirmation and determination of clenbuterol in urine by minimal labelling isotope pattern deconvolution and GC-EI-MS*”. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012; 402:1879-88). La utilización de compuestos mínimamente enriquecidos isotópicamente permite evitar efectos isotópicos durante las determinaciones, y la regresión lineal múltiple permite la obtención de la relación de moles entre el compuesto enriquecido isotópicamente y el compuesto de abundancia isotópica natural mediante la medida de las abundancias isotópicas con espectrometría de masas. Sin embargo, cuando se han de utilizar espectrómetros de masas en tándem, como por ejemplo en la determinación de péptidos, el empleo de compuestos mínimamente enriquecidos isotópicamente requiere un cálculo complejo de los perfiles de fragmentación tanto del compuesto de abundancia isotópica natural como del compuesto enriquecido isotópicamente (Ramaley L., Cubero Herrera L. “*Software for the calculation of isotope patterns in tandem mass spectrometry*” *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008; 22: 2707-14; Castillo A., Gracia-Lor E., Roig-Navarro A.F., Sancho J.V., Rodríguez-González P., García Alonso J.I.: *Isotope pattern deconvolution-tandem mass spectrometry for the determination and confirmation of diclofenac in wastewaters*”. *Anal. Chim. Acta.* 765(2013)77-85).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

A efectos de la presente invención y su descripción, se definen a continuación algunos conceptos utilizados que pueden ser desconocidos para un experto en la materia o utilizados de una forma poco conocida o diferente de la habitual:

- *Isotopólogo*: entidad molecular que difiere solamente en su composición isotópica (numero de sustituciones isotópicas).
- *Perfil isotópico*: se define como el conjunto de abundancias isotópicas relativas de todos los isotopólogos de una molécula. La suma de todas las abundancias

isotópicas relativas de cualquier perfil isotópico es 1. El perfil isotópico de una molécula puede medirse experimentalmente mediante Espectrometría de Masas.

- 5 • *Perfil isotópico natural*: es el perfil isotópico de una molécula que se encuentra en la naturaleza. Para la mayoría de los elementos de la Tabla Periódica que constituyen las moléculas, el perfil isotópico natural es constante e invariable en toda la Tierra. Las abundancias isotópicas naturales de los elementos están tabuladas incluyendo sus incertidumbres debidas a la variabilidad natural.
- 10 • *Perfil isotópico enriquecido*: es el perfil isotópico de una molécula donde la abundancia relativa de uno o varios isótopos estables de uno o varios elementos constituyentes de la molécula es claramente distinta de la natural. En estos perfiles isotópicos enriquecidos, normalmente un isótopo se encuentra en una abundancia isotópica relativa más elevada que en el elemento natural, isótopo enriquecido, mientras que el resto de isótopos tienen una abundancia menor. Esto hace que la abundancia relativa de los isotopólogos de la molécula marcada isotópicamente difiera de la abundancia relativa de los isotopólogos en la molécula natural.
- 15 • *Solapamiento espectral*: cuando se mezclan en la misma disolución dos perfiles isotópicos distintos del mismo péptido, natural y enriquecido, existirá solapamiento espectral si las abundancias isotópicas en algunas de las masas del perfil isotópico son distintas de cero para los dos perfiles. Cuando se marca un compuesto con un número pequeño de isótopos enriquecidos ($n < 4$) hay una alta probabilidad de solapamiento espectral mientras que cuando se utiliza un número elevado de isótopos en el marcaje ($n > 4$) la probabilidad de solapamiento espectral disminuye.
- 20 • *Fracción molar del péptido natural*: se define como la cantidad de moles correspondientes al péptido de abundancia isotópica natural dividida por la cantidad de moles totales del péptido (natural y enriquecido) en la muestra analizada. La fracción molar se obtiene a partir de un perfil isotópico de una mezcla del péptido natural y enriquecido obtenido experimentalmente mediante Espectrometría de Masas.
- 25
- 30

- *Fracción molar del péptido enriquecido*: se define como la cantidad de moles correspondientes al péptido enriquecido de abundancia isotópica alterada dividida por la cantidad de moles totales del péptido (natural y enriquecido) en la muestra analizada. La fracción molar se obtiene a partir de un perfil isotópico de una mezcla del péptido natural y enriquecido obtenido experimentalmente mediante Espectrometría de Masas.
5
- *Regresión lineal múltiple*: es un procedimiento matemático que aquí permite calcular la contribución de los perfiles isotópicos del péptido natural y del péptido enriquecido en el espectro de masas experimental de una mezcla de ambos. El resultado de este proceso matemático es la fracción molar de cada uno de los dos perfiles isotópicos en la muestra. La relación de fracciones molares equivale a la relación de moles entre el péptido natural y el péptido enriquecido.
10
- *Espectrómetro de masas en tándem*: es un tipo de espectrómetro de masas que combina dos analizadores de masa y una celda de colisión entre ellos. El primer analizador selecciona un ión característico del analito y lo envía a la celda de colisión donde este ión sufre reacciones de fragmentación por colisión con distintos gases. Los fragmentos cargados son analizados por el segundo analizador de masas.
15
- *Monitorización de reacciones múltiples (MRM)*: es un modo de medida en Espectrometría de Masas que se puede aplicar con espectrómetros en tándem del tipo triple cuadrupolo (QqQ). En el primer cuadrupolo (primer analizador de masas) se transmite solamente los iones con la relación masa/carga (m/z) del analito (iones precursores). En la celda de colisión se rompen los iones precursores en iones producto mediante disociación inducida por colisión con moléculas neutras de un gas (normalmente nitrógeno). En el tercer cuadrupolo (segundo analizador de masas) se transmite solamente la relación masa/carga (m/z) de uno o varios iones producto del analito. Este modo de medida proporciona una mejor relación señal-ruido y una cuantificación más selectiva y libre de interferencias espectrales. Por tanto, es el modo más adecuado para la medida de péptidos por Espectrometría de Masas.
20
25
30

- 5 • *Resolución de un analizador de masas.* La resolución de un analizador de masas se puede definir de distintas formas. En el texto de la presente invención se define como “anchura de un pico de masa a mitad de su altura” (*Full Width at Half Maximum*, FWHM). Al aumentar el valor del FWHM de un analizador aumenta el intervalo de masas que es transmitido por el analizador. Un analizador de masas de tipo cuadrupolo trabaja normalmente con valores de FWHM entre 0.5 y 1. Sin embargo, modificando los parámetros eléctricos del cuadrupolo se pueden aumentar los valores de FWHM lo que permite una transmisión de un intervalo de masas amplio en el cuadrupolo.
- 10 • *Digestión proteolítica:* es la degradación de proteínas mediante enzimas específicas, llamadas proteasas, que tiene como resultado su rotura en varios péptidos constituyentes. En la mayoría de los casos se suele utilizar como enzima la tripsina (*digestión triptica*), que hidroliza los enlaces peptídicos de la proteína específicamente en el lado carboxilo de Arginina (R) y Lisina (K)

15 generando péptidos de un tamaño adecuado para su análisis por Espectrometría de Masas (1000-2000 Da). La digestión triptica se realiza normalmente a 37°C durante tiempos no inferiores a 24 horas.

 - 20 • *Péptido:* cadena lineal de aminoácidos con un número inferior a 50 unidades.
 - *Péptido característico de una proteína:* es un péptido que procede de la digestión de una proteína y que es exclusivo de la misma de modo que la presencia de dicho péptido en una muestra confirma la presencia de la proteína en dicha muestra y puede utilizarse para su cuantificación.
 - 25 • *Péptido isotópicamente diluido:* es un péptido de abundancia isotópica alterada que resulta de la mezcla del péptido de abundancia isotópica natural y del mismo péptido enriquecido isotópicamente.

El objetivo de la presente invención es la cuantificación absoluta, exacta, precisa y directamente trazable al Sistema Internacional de unidades de péptidos, entendidos como cadenas de aminoácidos con menos de 50 unidades. El método de la presente invención puede utilizarse también para la determinación de una o varias proteínas presentes en muestras biológicas mediante la cuantificación de sus péptidos característicos tras una hidrólisis de la proteína.

30

El método está basado en la determinación de péptidos de abundancia isotópica natural mediante: i) la adición de una cantidad conocida de análogos de estos péptidos, enriquecidos isotópicamente que presenten solapamiento espectral con el péptido de abundancia isotópica natural (en inglés “*Mass Overlapping Peptides*”), ii) monitorización de reacciones múltiples a valores de FWHM de entre 2 y 20 en el primer cuadrupolo de un espectrómetro de masas en tándem para la mezcla del péptido de abundancia isotópica natural y del enriquecido isotópicamente, y iii) la determinación de las fracciones molares de cada perfil isotópico utilizando regresión lineal múltiple.

10 Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es un método para la cuantificación absoluta de péptidos en una muestra mediante espectrometría de masas en tándem que comprende los siguientes pasos:

15 a) Selección de un péptido enriquecido isotópicamente, análogo químicamente al péptido a cuantificar, que presente solapamiento espectral con el péptido de abundancia isotópica natural en un espectro de masas.

b) Selección de uno o varios iones precursores y de uno o varios iones producto que permita la detección tanto del péptido de abundancia isotópica natural como del péptido enriquecido isotópicamente en un espectrómetro de masas en tándem.

20 c) Medida experimental de la composición isotópica del péptido de abundancia isotópica natural y del péptido enriquecido isotópicamente utilizando un espectrómetro de masas en tándem con una modificación de la resolución en el primer cuadrupolo de modo que el valor del FWHM esté entre 2 y 20 y la distribución isotópica medida en los iones producto seleccionados en b) se
25 corresponda con las distribuciones isotópicas teóricas para los fragmentos tanto para el péptido de abundancia isotópica natural como para el enriquecido isotópicamente.

d) Adición a la muestra de una cantidad conocida del péptido enriquecido isotópicamente seleccionado en a).

e) Separación del péptido isotópicamente diluido de otros componentes de la muestra mediante cualquier técnica de separación física, química o bioquímica que separe el péptido isotópicamente diluido de sus interferentes.

5 f) Medida de la distribución isotópica en iones fragmento del péptido isotópicamente diluido aislado en el paso e) utilizando el modo de medida optimizado en el paso c) en un espectrómetro de masas en tándem.

10 g) Cálculo de las fracciones molares tanto del péptido de abundancia isotópica natural como del péptido enriquecido isotópicamente mediante regresión lineal múltiple expresando la distribución isotópica obtenida experimentalmente en el paso f) como una combinación lineal de las composiciones isotópicas del péptido de abundancia isotópica natural y del péptido enriquecido isotópicamente medidas en el paso c).

15 h) Cálculo del número de moles de péptido de abundancia isotópica natural a partir de la relación de las fracciones molares determinadas en el paso g) y del número de moles conocido del péptido enriquecido isotópicamente añadidos a la muestra en el paso d).

20 En una realización preferida, la muestra es un fluido biológico, un cultivo celular o cualquier otra muestra biológica que contenga péptidos o proteínas, como por ejemplo tejidos de órganos, saliva, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico o esperma. En una realización más preferida, el método además comprende un paso de hidrólisis de la muestra para romper las proteínas y liberar sus péptidos constituyentes, previo o posterior del paso d) ya que el péptido enriquecido isotópicamente se puede degradar durante el proceso de hidrólisis de la muestra. En otra realización más preferida, el método además comprende un paso de hidrólisis de la muestra para
25 romper las proteínas y liberar sus péptidos constituyentes, posterior del paso e) ya que el péptido enriquecido isotópicamente se puede degradar durante el proceso de separación física, química o bioquímica. En una realización aún más preferida, la hidrólisis es enzimática y el péptido constituyente a cuantificar es característico de la proteína.

En otra realización preferida, el péptido enriquecido isotópicamente contiene entre 1 y 4 átomos de alguno de los isótopos enriquecidos ^{13}C ó ^{15}N en cualquier combinación.

5 En otra realización preferida, el péptido enriquecido isotópicamente se sintetiza químicamente utilizando distintas combinaciones de aminoácidos enriquecidos isotópicamente en ^{13}C ó ^{15}N .

En otra realización preferida, el ión precursor seleccionado en el paso b) posee carga +2 ó +3 y el ión producto seleccionado posee carga +1.

10 En una realización específica, el espectrómetro de masas en tándem es de tipo triple cuadrupolo. En una realización más específica, el espectrómetro de masas en tándem de tipo triple cuadrupolo es con trampa lineal en el tercer cuadrupolo.

En otra realización específica, el espectrómetro de masas en tándem es un equipo de tipo cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF).

15 En otra realización específica del método, en el paso c) además se aumenta la resolución en el tercer cuadrupolo reduciendo el FWHM a un valor entre 0.7 y 0.4, hasta que la distribución isotópica medida en los iones producto se corresponde con las distribuciones isotópicas teóricas. Estas distribuciones isotópicas teóricas se pueden calcular mediante métodos matemáticos tanto para el péptido de abundancia isotópica natural como para el péptido enriquecido isotópicamente.

20 En otra realización específica, el método físico para la separación en la etapa e) del péptido a cuantificar del resto de la muestra es la centrifugación.

En otra realización específica, el método químico para la separación en la etapa e) del péptido a cuantificar del resto de la muestra es la cromatografía de intercambio iónico, reparto o afinidad.

25 En una realización preferida, la separación del péptido a cuantificar del resto de la muestra se realiza por cromatografía líquida acoplada al espectrómetro de masas en tándem.

En una realización más preferida, la medida de las abundancias isotópicas en el espectrómetro de masas en tándem de los pasos c) y f) se realiza a partir de las áreas de pico obtenidas para el péptido de interés tras la separación cromatográfica.

5 En otra realización preferida, el método bioquímico para la separación en la etapa e) del péptido a cuantificar del resto de la muestra es la inmunoprecipitación.

En otra realización preferida, en el paso f) se mide un mínimo de 2 y un máximo de 6 transiciones para cada combinación ión precursor - ión producto seleccionado.

10 En otra realización preferida, las abundancias isotópicas para el péptido de abundancia isotópica natural y el enriquecido isotópicamente medidas en el paso c) y utilizadas en la regresión lineal múltiple del paso g) se determinan matemáticamente mediante un programa de ordenador.

15 Otro aspecto de la presente invención es el uso del método descrito anteriormente para la cuantificación de un péptido en una muestra como herramienta de diagnóstico clínico.

Otro aspecto de la presente invención es el uso del método descrito anteriormente para el análisis de muestras de alimentos y la certificación de su seguridad alimentaria.

20 Otro aspecto de la presente invención es el uso del método descrito anteriormente para el análisis de muestras farmacéuticas.

Otro objeto de la presente invención es el uso del método descrito anteriormente para el análisis de muestras en biomedicina.

Otro objeto de la presente invención es el uso del método descrito anteriormente para el análisis de muestras en metrología química.

25 Este método permite obtener directamente la relación de moles entre el péptido a determinar y su análogo enriquecido isotópicamente a partir de la determinación de la composición isotópica de la mezcla. La composición isotópica de la mezcla se mide mediante monitorización de reacciones múltiples en las que se emplea una FWHM

entre 2 y 20 en el primer cuadrupolo del espectrómetro de masas. Bajo estas condiciones, el primer cuadrupolo transmite todo el clúster isotópico de la mezcla de los péptidos (de abundancia natural y su análogo enriquecido isotópicamente) con el objetivo de poder recoger en el segundo analizador todos los fragmentos generados tras la fragmentación del ión precursor en una celda de colisión y realizar una medida exacta de la composición isotópica del péptido isotópicamente diluido midiendo iones producto. La composición isotópica del péptido isotópicamente diluido se expresa como una combinación lineal de la composición isotópica del péptido de abundancia isotópica natural y del péptido enriquecido isotópicamente, de modo que la fracción molar de ambos en la mezcla se calcula mediante regresión lineal múltiple. A partir de la relación de las fracciones molares, se obtiene la concentración del péptido de interés ya que la cantidad de moles del péptido enriquecido añadida al inicio del proceso es conocida. En el caso del uso de la determinación de un péptido para inferir la concentración de una proteína en la muestra se asume que la concentración molar del péptido es igual a la de la proteína de la que proviene.

En una realización de la presente invención, se hace uso de la cromatografía líquida acoplada a Espectrometría de Masas en tándem como algunos de los métodos descritos en el estado de la técnica pero, a diferencia de estos métodos, utiliza análogos de los péptidos a determinar enriquecidos isotópicamente en ^{13}C ó ^{15}N con un número pequeño de isótopos enriquecidos (entre 1 y 4) que permita obtener un solapamiento espectral entre el perfil isotópico del péptido de abundancia natural y del enriquecido isotópicamente. Este hecho, en combinación con la monitorización de reacciones múltiples (MRM) empleando valores de FWHM entre 2 y 20 en la medida del primer analizador de masas permite la obtención precisa y exacta de perfiles de abundancia isotópica en el péptido de abundancia isotópica natural, en el péptido enriquecido isotópicamente y en el péptido isotópicamente diluido. El uso de la regresión lineal múltiple permite, finalmente, a partir de las abundancias isotópicas del péptido isotópicamente diluido, la obtención de la fracción molar del péptido de abundancia isotópica natural y la fracción molar del péptido enriquecido isotópicamente en la muestra. Además, la presente invención puede ser aplicable a la determinación de proteínas cuando se usa la digestión trípica para obtener los péptidos característicos de la proteína de interés.

La utilización de péptidos enriquecidos isotópicamente con solapamiento espectral tiene dos ventajas: i) se minimizan los efectos isotópicos entre el péptido de abundancia isotópica natural y el péptido enriquecido isotópicamente, y ii) se favorece la transmisión de todo el clúster de iones precursores del péptido isotópicamente diluido a través del primer analizador de masas cuando se aumenta la FWHM hasta valores entre 2 y 20. Este concepto es totalmente nuevo y contrario a los métodos descritos en el estado de la técnica donde se requiere evitar a toda costa el solapamiento espectral entre el compuesto de abundancia isotópica natural y el enriquecido isotópicamente. Para ello se utilizan péptidos enriquecidos isotópicamente con un número alto de isótopos enriquecidos (por ejemplo, 6 átomos de ^{13}C en el método AQUA) que pueden producir efectos isotópicos durante la preparación de la muestra o la separación cromatográfica. Por tanto, la presente invención supone una mejora cuantitativa respecto a los métodos actuales.

Por otro lado, la utilización de regresión lineal múltiple permite obtener directamente las fracciones molares del péptido de abundancia isotópica natural y del péptido enriquecido isotópicamente a partir del espectro de masas de iones producto. Esto proporciona dos ventajas fundamentales respecto a los métodos descritos en el estado de la técnica: i) la relación de moles se obtiene a partir de la relación de fracciones molares en lugar de la relación de áreas de pico (método AQUA) proporcionando una mejor exactitud y precisión en las determinaciones, y ii) se evita la realización de un calibrado metodológico para evaluar la dependencia entre relación de intensidades y relación de moles, lo cual disminuye considerablemente el tiempo de análisis.

La invención resulta de aplicación en aquellos sectores en los que sea necesaria la cuantificación de péptidos en una muestra, como puede ser en fluidos biológicos o en cultivos celulares, como por ejemplo en los sectores de la agricultura, la química, la farmacia, la biomedicina o la seguridad alimentaria.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Ilustración del concepto de solapamiento espectral para un péptido de secuencia ALDFAVGEYNK medido por espectrometría de masas en el ión $(M+2H)^{2+}$. El eje de ordenadas se corresponde a la abundancia (A) y el eje de abscisas se corresponde a la relación masa/carga (m/z). Las barras negras corresponden con el perfil isotópico de abundancia isotópica natural mientras que las barras blancas corresponden con el perfil isotópico del mismo péptido enriquecido en dos átomos de ^{13}C enriquecidos al 99%. Se observa que existe solapamiento espectral desde la relación m/z 614.0 hasta la relación m/z 616.0. Las barras grises corresponden con el perfil isotópico del mismo péptido enriquecido en 6 átomos de ^{13}C enriquecidos al 99%. Como se puede observar no existe prácticamente solapamiento espectral con el perfil isotópico natural (barras negras). Para evitar efectos isotópicos a lo largo del proceso, el marcaje con dos átomos de ^{13}C es preferible al marcaje con 6 átomos de ^{13}C (método AQUA y QconCAT).

Figura 2. Monitorización de reacciones múltiples a resolución convencional (FWHM=0.7) utilizando un espectrómetro de masas de tipo triple cuadrupolo para la medida de un péptido de secuencia ALDFAVGEYNK y abundancias isotópicas naturales con un ión precursor doblemente cargado a m/z 613.5 (Fig.2A), y su análogo enriquecido en dos átomos de ^{13}C con un ión precursor doblemente cargado a m/z 614.5 (Fig.2B). Q1 se refiere al primer cuadrupolo donde se selecciona la relación m/z 613.5 para el péptido natural y la relación m/z 614.5 para el péptido enriquecido isotópicamente. Q2 se refiere a la celda de colisión donde el péptido seleccionado en Q1 da lugar a fragmentos de distintas relaciones m/z. Q3 se refiere al tercer cuadrupolo donde se analizan los fragmentos obtenidos en la celda de colisión Q2. Se observa que el perfil isotópico medido en el tercer cuadrupolo da lugar a un solo pico a masas 709 y 1042 para el péptido natural y a masas 711 y 1044 para el péptido enriquecido isotópicamente.

Figura 3. Monitorización de reacciones múltiples en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo a un valor de FWHM de aproximadamente 13 en el primer cuadrupolo, para la medida de un péptido de secuencia ALDFAVGEYNK y abundancia isotópica natural con un ión precursor doblemente cargado a m/z 613.5

(Fig.3A), y su análogo enriquecido en dos átomos de ^{13}C con un ión precursor doblemente cargado a m/z 614.5 (Fig.3B). Q1 se refiere al primer cuadrupolo donde se selecciona la relación m/z 613 tanto para el péptido de abundancia isotópica natural como para el péptido enriquecido isotópicamente. Q2 se refiere a la celda de colisión
 5 donde las distintas relaciones m/z seleccionadas en Q1 dan lugar a fragmentos de distintas relaciones m/z . Q3 se refiere al tercer cuadrupolo donde se analizan los fragmentos obtenidos en Q2. Se observa que el perfil isotópico medido en el tercer cuadrupolo da lugar a cuatro picos para cada fragmento (a relaciones m/z 709-714 y 1042-1047, respectivamente) cuyas abundancias isotópicas se corresponden con las
 10 calculadas teóricamente.

Figura 4. Espectro de masas obtenido con espectrómetro de masas de tipo triple cuadrupolo en el modo barrido de iones precursores seleccionando un rango de relaciones m/z de 600 a 630 m/z en el primer cuadrupolo (Q1) y además, en la Fig.4A, seleccionando en el tercer cuadrupolo (Q3) los iones producto con relaciones m/z 709,
 15 710, 711 y 712 para el péptido de abundancia natural y en la Fig.4B, seleccionando en el tercer cuadrupolo (Q3) los iones producto con relaciones m/z 711, 712, 713 y 714 para el péptido enriquecido isotópicamente en dos átomos de ^{13}C . El eje de ordenadas indica la abundancia relativa (A) de las señales obtenidas y el eje de abscisas indica la relación masa/carga (m/z). Se observa que los valores de FWHM son de aproximadamente 13, tanto para el péptido de abundancia isotópica natural como para
 20 el péptido enriquecido isotópicamente. Este hecho permite la selección de una única masa en el primer cuadrupolo para la transmisión simultánea de todo el perfil isotópico tanto del péptido de abundancia isotópica natural como del péptido enriquecido isotópicamente. La zona marcada con un rectángulo de trazos indica el
 25 intervalo de relaciones m/z que se puede seleccionar en Q1 para asegurar una transmisión cuantitativa de todas las relaciones m/z seleccionadas.

Figura 5. El gráfico de la Fig.5A muestra el espectro de masas obtenido con un espectrómetro de masas de tipo triple cuadrupolo en el modo barrido de iones precursores seleccionando un intervalo de relaciones m/z de 600 a 625 m/z en el
 30 primer cuadrupolo (Q1) para una mezcla de un péptido de abundancia isotópica

natural y su análogo enriquecido isotópicamente en dos átomos de ^{13}C seleccionando las relaciones m/z 709, 710, 711 y 712 como iones producto en el tercer cuadrupolo (Q3). El eje de ordenadas indica la intensidad medida (I) y el eje de abscisas indica la relación m/z . La flecha indica el intervalo donde se calcularía el valor de $\text{FWHM}=13$ para la relación m/z 709. Se observa que se puede seleccionar una relación m/z determinada en Q1 (por ejemplo la masa 610, centro de ventana) que permite la detección de las relaciones m/z 709, 710, 711 y 712 en Q3 en la zona constante del espectro de masas. El gráfico de la Fig.5B muestra la determinación de la concentración (C) del péptido enriquecido isotópicamente mediante el método propuesto utilizando distintos centros de ventana en Q1 (desde 605 hasta 616 m/z) y dos fragmentos moleculares (709-712 y 1042-1044) en Q3. Se observa que desde masa 608 hasta 615 aproximadamente todos los centros de ventana dan lugar a la misma concentración para los dos fragmentos considerados.

15 **EXPLICACIÓN DE UNA FORMA DE REALIZACIÓN PREFERENTE**

Para una mejor comprensión de la presente invención, se exponen los siguientes ejemplos de realización preferente, descritos en detalle, que deben entenderse sin carácter limitativo del alcance de la invención.

20 EJEMPLO 1

Se explica paso por paso la forma de poder cuantificar el péptido de secuencia ALDFAVGEYNK que corresponde a un péptido característico de la proteína cistatina C (biomarcador renal) utilizando como trazador isotópico el mismo péptido enriquecido en dos átomos de ^{13}C en un espectrómetro de masas de tipo triple cuadrupolo. De la descripción realizada en este ejemplo se puede deducir la forma general de cuantificación de cualquier otro péptido, con las modificaciones adecuadas en caso de ser necesarias. En el caso de la determinación de una proteína el procedimiento es totalmente análogo pero incluiría un paso de digestión proteolítica, tal como el que se muestra en el ejemplo 2.

Cabe destacar que los puntos 1 a 6 de la explicación de una forma de realización preferente incluyen una serie de actividades encaminadas a la puesta a punto de la metodología y sirven para establecer una mejor comprensión del proceso seguido y su validación. El ejemplo de aplicación de la invención propiamente dicha se deduce de todos los pasos anteriores y se recoge en el punto 7.

1. Selección del marcaje isotópico del péptido.

1.1. Para la determinación del péptido de secuencia ALDFAVGEYNK y fórmula química $C_{56}H_{83}N_{13}O_{18}$ se calcularon las abundancias isotópicas teóricas del péptido de abundancia natural y del enriquecido isotópicamente, suponiendo que se puede obtener el péptido enriquecido isotópicamente en un número cualquiera de isótopos enriquecidos. Para este cálculo se hizo uso de un programa de ordenador desarrollado en el grupo de investigación al que pertenecen los inventores. Por ejemplo, la Fig. 1 muestra el perfil isotópico teórico calculado para el péptido de abundancia natural y para el enriquecido en 2 y 6 átomos de ^{13}C , respectivamente. Con el objeto de que existiera solapamiento espectral entre el péptido natural y el enriquecido isotópicamente se seleccionó el péptido enriquecido en 2 átomos de ^{13}C . El péptido enriquecido en 6 átomos de ^{13}C , preferido en otros métodos descritos en el estado de la técnica, no fue adecuado en el contexto de la presente invención ya que no presentaba solapamiento espectral con el péptido de abundancia natural.

1.2 Se adquirió comercialmente el péptido seleccionado en el paso anterior tanto de abundancia isotópica natural como enriquecido en dos átomos de ^{13}C donde la glicina (G) se sustituyó por glicina marcada universalmente en ^{13}C . Se prepararon sendas disoluciones patrón del péptido de abundancia natural y del enriquecido isotópicamente.

2. Optimización de la medida de la composición isotópica del péptido mediante monitorización de reacciones múltiples (MRM).

2.1 Se midieron en modo “barrido de iones precursores” (*precursor ion scan*) los patrones del péptido de interés, tanto de abundancia isotópica natural como enriquecido isotópicamente para la selección, en el primer cuadrupolo (Q1), del ión precursor más adecuado. Se seleccionó un ión precursor doblemente cargado cuyo ión

principal aparecía a relación m/z de 613.5 para el péptido de abundancia natural y a m/z 614.5 para el péptido enriquecido en dos átomos de ^{13}C .

2.2 Se realizó un análisis en modo “barrido de iones producto” (*product ion scan*) del ión precursor seleccionado en el paso anterior para la selección tanto de la energía de colisión a utilizar en la celda de colisión (Q2) como de los iones producto que se generasen. En el caso del péptido enriquecido isotópicamente los iones producto debían mantener la marca isotópica. Se seleccionaron dos iones producto con una sola carga positiva a relaciones m/z de 709 y 1042 para evaluar el procedimiento. En estos iones producto, el compuesto enriquecido isotópicamente presentaba su pico principal a relaciones m/z 711 y 1044, lo que confirmó la presencia de la marca isotópica en los iones producto.

2.3 Se seleccionaron distintas transiciones para trabajar en el modo MRM. Estas transiciones se correspondían con los iones producto más abundantes del péptido natural y del enriquecido isotópicamente. En primer lugar se trabajó en el modo convencional de trabajo de un triple cuadrupolo a FWHM de 0.7. La Fig. 2A muestra el esquema del modo MRM convencional para el péptido seleccionado de abundancia isotópica natural con un ión precursor doblemente cargado a m/z 613.5 y para el mismo péptido enriquecido en dos átomos de ^{13}C . El primer y tercer cuadrupolo (Q1 y Q3, respectivamente) operaban con la resolución típica para este tipo de espectrómetros de masas con un valor de anchura total a la mitad del máximo del pico (FWHM) de 0.7 unidades de masa. En el cuadrupolo Q1 se seleccionó una relación m/z (ión precursor natural, 613.5) que fue filtrada para pasar a la celda de colisión (Q2) donde el ión precursor se fragmentaba produciendo diferentes iones producto (709, 1042 y otros) entre los que se seleccionaron los más sensibles para ser analizados en el tercer cuadrupolo (m/z 709 y 1042). La Fig. 2B muestra el mismo proceso para el péptido enriquecido en dos átomos de ^{13}C , donde los iones producto aparecían a m/z 711 y 1044 respectivamente. Este modo de trabajo convencional en los equipos de triple cuadrupolo es el que se aplica en los métodos de determinación de péptidos y proteínas descritos en el estado de la técnica (por ejemplo en el método AQUA). Estos métodos precisan que no exista solapamiento espectral entre el péptido de abundancia natural y el enriquecido isotópicamente para obtener resultados

satisfactorios en la medida de las intensidades pero tienen el problema de los efectos isotópicos, tal como se ha indicado anteriormente.

3. *Disminución de la resolución del primer cuadrupolo.*

La presente invención evita los efectos isotópicos utilizando péptidos
5 enriquecidos isotópicamente que presenten solapamiento espectral con el péptido natural. Para utilizar esta ventaja de modo adecuado, se requería la disminución de la resolución espectral del primer cuadrupolo aumentando la FWHM a valores entre 2 y 20 unidades de masa de forma que, al seleccionar una determinada relación m/z en el primer cuadrupolo, éste fuera capaz de transmitir completamente todo el perfil
10 isotópico del ión precursor seleccionado a la celda de colisión. Se seleccionó un ión precursor con dos cargas positivas para que el intervalo de relaciones m/z de todo el perfil isotópico fuera menor (a más carga, menor intervalo de m/z) y se facilitase su transmisión cuantitativa. El intervalo de valores de FWHM con el que decidió trabajar fue de 2-20 unidades de m/z . En la Fig. 3 se muestra un esquema del análisis de los
15 mismos péptidos de la Fig. 2 cuando se disminuyó la resolución del primer cuadrupolo hasta un valor de FWHM=13 y donde se seleccionó un valor de m/z nominal (ión precursor) de 613 tanto para el péptido natural (Fig. 3A) como para el péptido enriquecido isotópicamente (Fig. 3B). Esta selección del valor de m/z nominal del ión precursor permitió que, junto con la resolución modificada del primer cuadrupolo, se
20 transmitiera el clúster molecular completo del péptido (desde m/z 613.5 hasta m/z 615.0 para el péptido de abundancia isotópica natural o desde 614.5 a 616.0 para su análogo enriquecido isotópicamente) hacia la celda de colisión donde se fragmentaba. Los iones fragmento generados se transmitieron a través del tercer cuadrupolo para obtener su distribución isotópica. En este caso, los fragmentos más sensibles
25 seleccionados correspondían a valores de m/z 709 -712 y m/z 1042-1045 para el péptido de abundancia natural y m/z 711 -714 con m/z 1044-1047 para el péptido enriquecido isotópicamente.

Dependiendo del rango de masas en el que se trabaje, se podría requerir un
aumento de la resolución del tercer cuadrupolo para disminuir la contribución de
30 masas adyacentes y aumentar la exactitud y precisión de la medida de la distribución isotópica del péptido. Por ejemplo, en el caso del péptido de la Fig. 3B, un aumento de

la resolución en el tercer cuadrupolo desde el valor convencional de FWHM= 0.7 hasta un valor de 0.6 proporcionaba una mejor exactitud en la medida de la distribución isotópica de los iones fragmento del péptido a m/z 1042-1047.

5 *4. Cálculo de las distribuciones isotópicas teóricas de los fragmentos moleculares del péptido natural y enriquecido isotópicamente.*

El cálculo de la distribución isotópica de los fragmentos moleculares de los péptidos de abundancia isotópica natural y enriquecido isotópicamente se realizó utilizando el mismo programa de ordenador que el señalado en el apartado 1.1 pero no para el péptido completo sino para sus fragmentos. Estas distribuciones isotópicas así calculadas se utilizaron posteriormente en los cálculos de regresión lineal múltiple. Las abundancias isotópicas calculadas matemáticamente para los fragmentos analizados se recogen en la Tabla 1.

15 **Tabla 1.** *Abundancias isotópicas teóricas de los iones producto (1042-1045 y 709-712) de un péptido de secuencia ALDFAVGEYNK de abundancias isotópicas naturales y de su análogo enriquecido en dos átomos de ^{13}C .*

Iones producto 709-712	Péptido natural	Péptido $^{13}\text{C}_2$
709	0.6687	0.0004
710	0.2511	0.0094
711	0.0622	0.6808
712	0.0114	0.2400
Iones producto 1042-1045	Péptido natural	Péptido $^{13}\text{C}_2$
1042	0.5438	0.0010
1043	0.3098	0.0141
1044	0.1019	0.5567
1045	0.0257	0.3010

5. *Comparación de las distribuciones isotópicas teóricas de los fragmentos moleculares del péptido de abundancia isotópica natural y del enriquecido isotópicamente con sus distribuciones isotópicas medidas experimentalmente.*

Las distribuciones isotópicas del péptido de abundancia natural y de su análogo enriquecido se midieron experimentalmente según las condiciones seleccionadas en el punto 3. Las distribuciones isotópicas experimentales obtenidas se compararon con las teóricas que aparecen en la Tabla 1. Se observó que los valores de FWHM=13 en el primer cuadrupolo y FWHM=0.6 en el tercer cuadrupolo proporcionaban resultados satisfactorios.

6. Selección de la masa nominal en el primer cuadrupolo (Q1) para el péptido de abundancia isotópica natural, el enriquecido isotópicamente y sus mezclas.

6.1 Se realizó la medida de una disolución patrón del péptido de interés en modo “barrido de iones precursores” (*precursor ion scan*). Este modo de adquisición permitió la selección de la masa nominal en el primer cuadrupolo (Q1). Tomando como ejemplo el péptido natural de la Fig. 3, se escogió un rango de masas de 600 a 630 en Q1 ya que la relación m/z del ión precursor del péptido natural era 613.5 mientras que en el tercer cuadrupolo (Q3) se seleccionaron los iones fragmento de m/z 709, 710, 711 y 712. En la Fig. 4A se puede observar el resultado de la adquisición del péptido natural en el modo barrido de iones precursores con las resoluciones de Q1 y Q3 previamente optimizadas. Se puede ver cómo desde un centro con un m/z de 604 a m/z 617 se transmitía todo el rango de masas 709-712 correspondiente a la distribución isotópica del fragmento molecular de interés. De manera análoga, cuando se analizó el péptido enriquecido en dos átomos de ^{13}C se puede observar en la Fig. 4B que estableciendo un centro de ventana en el intervalo desde 608 a 616, se transmitía completamente el rango de masas desde 711 a 714 correspondiente a la distribución isotópica del fragmento molecular de interés.

El centro óptimo de Q1 debía situarse en un valor de m/z que permitiese transmitir completamente y de forma simultánea las distribuciones isotópicas de los fragmentos moleculares del péptido de abundancia isotópica natural y de su análogo enriquecido isotópicamente. Según los espectros de masa de la Fig. 4, el centro de ventana del Q1 debería situarse aproximadamente entre 608 y 614 (en la Fig.4 se muestra esta zona, marcada con un rectángulo de trazos).

6.2. Finalmente, y para confirmar la correcta selección del centro de masa en Q1, se mezcló una cantidad conocida de péptido de abundancia isotópica natural con una cantidad conocida de la disolución de péptido enriquecido en ^{13}C . En la Fig. 5A se muestra el espectro de masas obtenido en el modo barrido de iones precursores de la mezcla de péptidos. Las m/z a 709 y 710 proceden mayoritariamente del péptido de abundancia isotópica natural, mientras que las m/z a 711 y 712 proceden mayoritariamente del péptido enriquecido isotópicamente. Como se puede observar, existe un amplio intervalo de relaciones m/z en Q1 (entre 608 y 614 aproximadamente) que permitían la transmisión completa de todas las masas seleccionadas. Finalmente, se determinó la relación de fracciones molares entre el péptido de abundancia isotópica natural y el péptido enriquecido en ^{13}C mediante regresión lineal múltiple seleccionando distintos centros de ventana en Q1. En la Fig. 5B se muestran los valores obtenidos en la concentración del péptido enriquecido isotópicamente con los diferentes centros de masa seleccionados. En este experimento se utilizaron los dos fragmentos moleculares (709-712 y 1042-1045) para confirmar los resultados. Se puede observar cómo, desde un centro de m/z en Q1 de 608 a 614 unidades de masa, el valor de la concentración obtenida era constante e idéntico para los dos fragmentos seleccionados. Se confirmó que, en ese intervalo, el centro de masas seleccionado en Q1 permitía la transmisión cuantitativa tanto del ión precursor del péptido de abundancia isotópica natural como de su análogo enriquecido isotópicamente de forma simultánea, para obtener los correspondientes fragmentos en Q3. Se validó de esta manera el procedimiento y se procedió a su aplicación a muestras reales fortificadas.

7. Cuantificación del péptido de interés en una muestra real.

Se describe a continuación el método para la cuantificación absoluta del péptido en una muestra mediante espectrometría de masas en tándem tanto en agua (ausencia de matriz) como en un suero humano (presencia de matriz).

7.1 Se seleccionó un péptido enriquecido isotópicamente análogo al péptido a cuantificar y que presentaba solapamiento espectral con el péptido de abundancia isotópica natural en un espectro de masas. En el caso de este ejemplo, se escogió el péptido ALDFAVGEYNK enriquecido en dos átomos de ^{13}C .

7.2 Posteriormente se seleccionaron uno o varios iones precursores y uno o varios iones producto que permitían la detección del péptido de abundancia isotópica natural y de su análogo enriquecido isotópicamente. En el caso de este ejemplo, para la determinación del péptido ALDFAVGEYNK se seleccionó como ion precursor para todas las transiciones el ion a m/z 614, y como iones producto los iones 709, 710, 711, 712, 1042, 1043, 1044 y 1045.

7.3 Se determinó experimentalmente la composición isotópica del péptido de abundancia natural y del péptido enriquecido isotópicamente mediante espectrometría de masas en un espectrómetro de masas en tándem de tipo triple cuadrupolo con un aumento de la FWHM de entre 2 y 20 en el primer analizador, de modo que la distribución isotópica medida en los iones producto seleccionados en 7.2 se correspondía con las distribuciones isotópicas teóricas para los fragmentos tanto para el péptido de abundancia isotópica natural como para el enriquecido isotópicamente.

7.4 Posteriormente se realizó la adición de una cantidad conocida del péptido enriquecido isotópicamente seleccionado en 7.1 a la muestra. Para llevar a cabo el procedimiento se pesaron aproximadamente 0.5 g de agua o de un suero libre del péptido y a continuación se añadieron aproximadamente 0.10 g de una disolución de péptido de abundancia isotópica natural de $1.91 \mu\text{g g}^{-1}$ y 0.10 g de una disolución de péptido enriquecido isotópicamente de $1.97 \mu\text{g g}^{-1}$. En la Tabla 2 se muestran las cantidades exactas tomadas de muestra y las cantidades añadidas de péptido de abundancia isotópica natural y enriquecido isotópicamente, respectivamente.

Tabla 2. *Cantidades de muestra, péptido de abundancia isotópica natural y análogo enriquecido isotópicamente utilizadas para el desarrollo del procedimiento.*

Tipo de Muestra	Muestra (g)	Péptido Natural (g)	Péptido enriquecido (g)
Agua	0.4980	0.0995	0.0990
Suero	0.5065	0.1385	0.0936

7.5. Posteriormente, se separó el péptido isotópicamente diluido (mezcla de péptido de abundancia isotópica natural y el enriquecido isotópicamente) de otros componentes de la muestra mediante una técnica de separación física, química o

bioquímica apropiada. Dependiendo del péptido elegido, su concentración y la complejidad de la muestra, podría ser necesario realizar uno o varios pasos de separación incluyendo separaciones cromatográficas para eliminar interferencias. En este ejemplo, se utilizó una separación por cromatografía líquida. Las muestras
5 disueltas en 0.1 % de ácido trifluoroacético (TFA) se sometieron a dos purificaciones mediante HPLC preparativa (fase reversa e intercambio catiónico). En ambas cromatografías se seleccionaron las fracciones de interés. Tras el intercambio catiónico se eliminaron las sales con columnas de extracción en fase sólida con un recubrimiento C₁₈. Finalmente, las muestras se disolvieron en 0.05 mL de agua con
10 0.1% de ácido fórmico y se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos acoplado al espectrómetro de masas para medir su distribución isotópica.

7.6. Se midió la distribución isotópica del péptido isotópicamente diluido (mezcla de péptido de abundancia isotópica natural y el enriquecido isotópicamente) mediante espectrometría de masas en tándem. El pico cromatográfico correspondiente
15 al péptido de interés se midió en las condiciones seleccionadas de resolución y para las transiciones escogidas en 7.3. No se observaron cambios en los tiempos de retención para el marcaje isotópico seleccionado, lo que indicó que no existían efectos isotópicos. En este caso, la FWHM del primer cuadrupolo se ajustó a 13, la del tercer cuadrupolo a 0.6 y se seleccionaron 4 transiciones para el fragmento de masa 709
20 (709, 710, 711 y 712) y otras cuatro transiciones para el fragmento 1042 (1042, 1043, 1044 y 1045). La distribución isotópica se calculó dividiendo el área de pico determinada para cada transición por la suma de áreas de pico obtenidas para las cuatro transiciones de cada fragmento correspondiente.

7.7. Se calcularon las fracciones molares del péptido de abundancia isotópica natural y del péptido enriquecido isotópicamente mediante regresión lineal múltiple expresando la distribución isotópica del péptido isotópicamente diluido (A_{mix})
25 obtenida experimentalmente en el paso 7.6 como una combinación lineal de las composiciones isotópicas del péptido de abundancia isotópica natural (A_{nat}) y del péptido enriquecido isotópicamente (A_{enr}) respectivamente obtenidas en el paso 7.3. Para este propósito se aplicó la ecuación (1) para la medida de n m/z, donde A se
30

refiere a la abundancia relativa de cada uno de los isotopólogos constituyentes de la molécula.

$$\begin{bmatrix} A_{mix}^1 \\ A_{mix}^2 \\ A_{mix}^3 \\ \dots \\ A_{mix}^{n-1} \\ A_{mix}^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^1 & A_{enr}^1 \\ A_{nat}^2 & A_{enr}^2 \\ A_{nat}^3 & A_{enr}^3 \\ \dots & \dots \\ A_{nat}^{n-1} & A_{enr}^{n-1} \\ A_{nat}^n & A_{enr}^n \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_{nat} \\ x_{enr} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad (1)$$

Las soluciones a la ecuación (1) fueron las fracciones molares del péptido de abundancia isotópica natural (x_{nat}) y el péptido enriquecido isotópicamente (x_{enr}).

7.8. Se calcularon el número de moles de péptido de abundancia isotópica natural (N_{nat}) a partir de la relación de las fracciones molares determinadas en el paso 7.7 y del número de moles conocido del péptido enriquecido isotópicamente (N_{enr}) añadidos a la muestra en el paso 7.4. A partir de la relación de estas fracciones molares se obtuvo directamente el número de moles de péptido natural según la ecuación (2).

$$\frac{N_{nat}}{N_{enr}} = \frac{x_{nat}}{x_{enr}} \quad (2)$$

Utilizando este procedimiento no se necesitó recurrir a un calibrado metodológico para el cálculo de la relación de moles entre el péptido de abundancia isotópica natural y su análogo enriquecido isotópicamente, ya que la relación de fracciones molares era igual a la relación de moles. Los resultados finales obtenidos se muestran en la Tabla 3, donde se pueden observar las fracciones molares obtenidas así como el número de moles de péptido determinado y las recuperaciones obtenidas respecto a la cantidad añadida inicialmente. Los datos de la Tabla 3 muestran que se recuperaba aproximadamente el 100% de la cantidad de péptido de abundancia isotópica natural añadida utilizando tanto los iones fragmento del clúster a 709 como los correspondientes al clúster a masa 1042.

Tabla 3. Resultados obtenidos en el cálculo del número de moles de un péptido de secuencia ALDFAVGEYNK añadido en una muestra de agua y suero humano.

Muestra	X_{enr}	X_{nat}	N_{enr} (nmol) añadidos	N_{nat} (nmol) añadidos	N_{nat} (nmol) obtenidos	Recuperación (%)
Agua (Cluster 709)	0.5169	0.5217	0.147	0.144	0.148	103
Agua (Cluster 1042)	0.5393	0.5407	0.147	0.144	0.148	103
Suero (Cluster 709)	0.5129	0.5276	0.139	0.145	0.143	99
Suero (Cluster 1042)	0.5248	0.5419	0.139	0.145	0.143	99

EJEMPLO 2

5 En este ejemplo se describe el método para la cuantificación absoluta de un péptido característico de una proteína que está presente en una muestra. La proteína seleccionada en este ejemplo es la cistatina C y el péptido proteotípico a cuantificar es el de secuencia ALDFAVGEYNK que corresponde a un péptido característico de la proteína cistatina C (biomarcador renal). Se utilizó como trazador isotópico el mismo péptido enriquecido en dos átomos de ^{13}C en un espectrómetro de masas de tipo triple cuadrupolo. Para esta realización se empleó el mismo método que el descrito en el ejemplo 1, aunque con un paso de hidrólisis para la romper las proteínas y liberar sus péptidos antes o después de la adición del péptido enriquecido isotópicamente a la muestra.

15 Para ello se realizó una digestión proteolítica con tripsina para simular la fragmentación de proteínas en sus péptidos constituyentes. El proceso de digestión empleado aquí tenía como objetivo la comprobación de la exactitud del procedimiento en condiciones donde debía realizarse una digestión enzimática de proteínas y así asegurar una ausencia de degradación tanto del péptido de abundancia isotópica natural como del péptido enriquecido isotópicamente (si se añade antes de la

20

digestión). El procedimiento seguido fue el siguiente: se llevó a cabo la digestión triptica durante 24 horas. A continuación, se añadió ditioeritritol (agente reductor) y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Tras este tiempo, se centrifugó y los sobrenadantes se evaporaron a sequedad. Posteriormente, se reconstituyó en agua (0.7 mL) y se volvió a
5 centrifugar. Se añadió iodoacetamida (agente alquilante) a los sobrenadantes y se agitó en oscuridad durante 1h. Se eliminó el exceso de iodoacetamida añadiendo ditioeritritol y finalmente se añadió 0.1 mL TFA al 15 %.

REIVINDICACIONES

1. Método para la cuantificación absoluta de péptidos en una muestra mediante espectrometría de masas en tándem que comprende los siguientes pasos:

- 5 a) selección de un péptido enriquecido isotópicamente, análogo químicamente al péptido a cuantificar, que presente solapamiento espectral con el péptido de abundancia isotópica natural en un espectro de masas;
- b) selección de uno o varios iones precursores y de uno o varios iones producto que permita la detección tanto del péptido de abundancia isotópica natural como
10 del péptido enriquecido isotópicamente en un espectrómetro de masas en tándem;
- c) medida experimental de la composición isotópica del péptido de abundancia isotópica natural y del péptido enriquecido isotópicamente utilizando un espectrómetro de masas en tándem, ajustando la resolución en el primer
15 analizador de masas de modo que el valor del FWHM esté entre 2 y 20 y que la distribución isotópica medida en los iones producto seleccionados en b) se corresponda con las distribuciones isotópicas teóricas para los fragmentos tanto para el péptido de abundancia isotópica natural como para el enriquecido isotópicamente;
- 20 d) adición a la muestra de una cantidad conocida del péptido enriquecido isotópicamente seleccionado en a);
- e) separación del péptido isotópicamente diluido de otros componentes de la muestra mediante cualquier técnica de separación física, química o bioquímica que separe el péptido isotópicamente diluido de sus interferentes;
- 25 f) medida de la distribución isotópica en iones fragmento del péptido isotópicamente diluido aislado en el paso e) utilizando el modo de medida optimizado en el paso c) en un espectrómetro de masas en tándem;
- g) cálculo de las fracciones molares tanto del péptido de abundancia isotópica natural como del péptido enriquecido isotópicamente mediante regresión lineal

múltiple expresando la distribución isotópica obtenida experimentalmente en el paso f) como una combinación lineal de las composiciones isotópicas del péptido de abundancia isotópica natural y del péptido enriquecido isotópicamente medidas en el paso c);

5 h) cálculo del número de moles del péptido de abundancia isotópica natural a partir de la relación de las fracciones molares determinadas en el paso g) y del número de moles conocido del péptido enriquecido isotópicamente añadidos a la muestra en el paso d).

10 2. Método según la reivindicación 1 caracterizado por que la muestra es un fluido biológico, un cultivo celular o cualquier otra muestra biológica que contenga péptidos o proteínas.

3. Método según la reivindicación 2 caracterizado por que además comprende un paso de hidrólisis de la muestra para romper las proteínas y liberar sus péptidos constituyentes, previo al paso d).

15 4. Método según la reivindicación 2 caracterizado por que además comprende un paso de hidrólisis de la muestra para romper las proteínas y liberar sus péptidos constituyentes, posterior al paso d).

20 5. Método según la reivindicación 2 caracterizado por que además comprende un paso de hidrólisis de la muestra para romper las proteínas y liberar sus péptidos constituyentes, posterior al paso e).

6. Método según las reivindicaciones 3, 4 ó 5 caracterizado por que la hidrólisis es enzimática y el péptido constituyente a cuantificar es característico de la proteína.

25 7. Método según la reivindicación 1 caracterizado por que el péptido enriquecido isotópicamente contiene entre 1 y 4 átomos de alguno de los isótopos enriquecidos ^{13}C ó ^{15}N en cualquier combinación.

8. Método según la reivindicación 1 caracterizado por que el péptido enriquecido isotópicamente se sintetiza químicamente utilizando distintas combinaciones de aminoácidos enriquecidos en ^{13}C ó ^{15}N .

9. Método según la reivindicación 1 caracterizado por que el ión precursor seleccionado en el paso b) posee carga +2 ó +3 y el ión producto seleccionado posee carga +1.
- 5 10. Método según la reivindicación 1 caracterizado por que el espectrómetro de masas en tándem es de tipo triple cuadrupolo.
11. Método según la reivindicación 10 caracterizado por que el espectrómetro de masas en tándem de tipo triple cuadrupolo es con trampa lineal en el tercer cuadrupolo.
- 10 12. Método según la reivindicación 1 caracterizado por que el espectrómetro de masas en tándem es un equipo de tipo cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF).
13. Método según la reivindicación 1 caracterizado por que en el paso c) además se reduce el FWHM en el tercer cuadrupolo a un valor entre 0.7 y 0.4, hasta comprobar que la distribución isotópica medida en los iones producto se corresponde con las distribuciones isotópicas teóricas calculadas para los fragmentos tanto para el péptido natural como para el enriquecido isotópicamente.
- 15 14. Método según la reivindicación 1 caracterizado por que el método físico para la separación en la etapa e) del péptido isotópicamente diluido del resto de la muestra es la centrifugación.
- 15 15. Método según la reivindicación 1 caracterizado por que el método químico para la separación en la etapa e) del péptido isotópicamente diluido del resto de la muestra es la cromatografía de intercambio iónico, reparto o afinidad.
- 20 16. Método según la reivindicación 1 caracterizado por que la separación del péptido isotópicamente diluido del resto de la muestra se realiza por cromatografía líquida acoplada al espectrómetro de masas en tándem.
- 25 17. Método según la reivindicación 16 caracterizado por que la medida de las abundancias isotópicas en el espectrómetro de masas en tándem de los pasos c) y f) se realiza a partir de las áreas de pico obtenidas para el péptido isotópicamente diluido tras la separación cromatográfica.

18. Método según la reivindicación 1 caracterizado por que el método bioquímico para la separación en la etapa e) del péptido isotópicamente diluido del resto de la muestra es la inmunoprecipitación.
- 5 19. Método según la reivindicación 1 caracterizado por que en el paso f) se mide un mínimo de 2 y un máximo de 6 transiciones para cada combinación ión precursor - ión producto seleccionado.
- 10 20. Método según la reivindicación 1 caracterizado por que las abundancias isotópicas para el péptido de abundancia isotópica natural y el enriquecido isotópicamente medidas en el paso c) y utilizadas en la regresión lineal múltiple del paso g) se determinan matemáticamente mediante un programa de ordenador.
21. Uso del método según las reivindicaciones 1 a 20 como herramienta de diagnóstico clínico.
22. Uso del método según las reivindicaciones 1 a 20 para el análisis de muestras de alimentos y la certificación de su seguridad alimentaria.
- 15 23. Uso del método según las reivindicaciones 1 a 20 como herramienta para el análisis de muestras farmacéuticas.
24. Uso del método según las reivindicaciones 1 a 20 para el análisis de muestras en biomedicina.
- 20 25. Uso del método según las reivindicaciones 1 a 20 para el análisis de muestras en metrología química.

FIG. 1

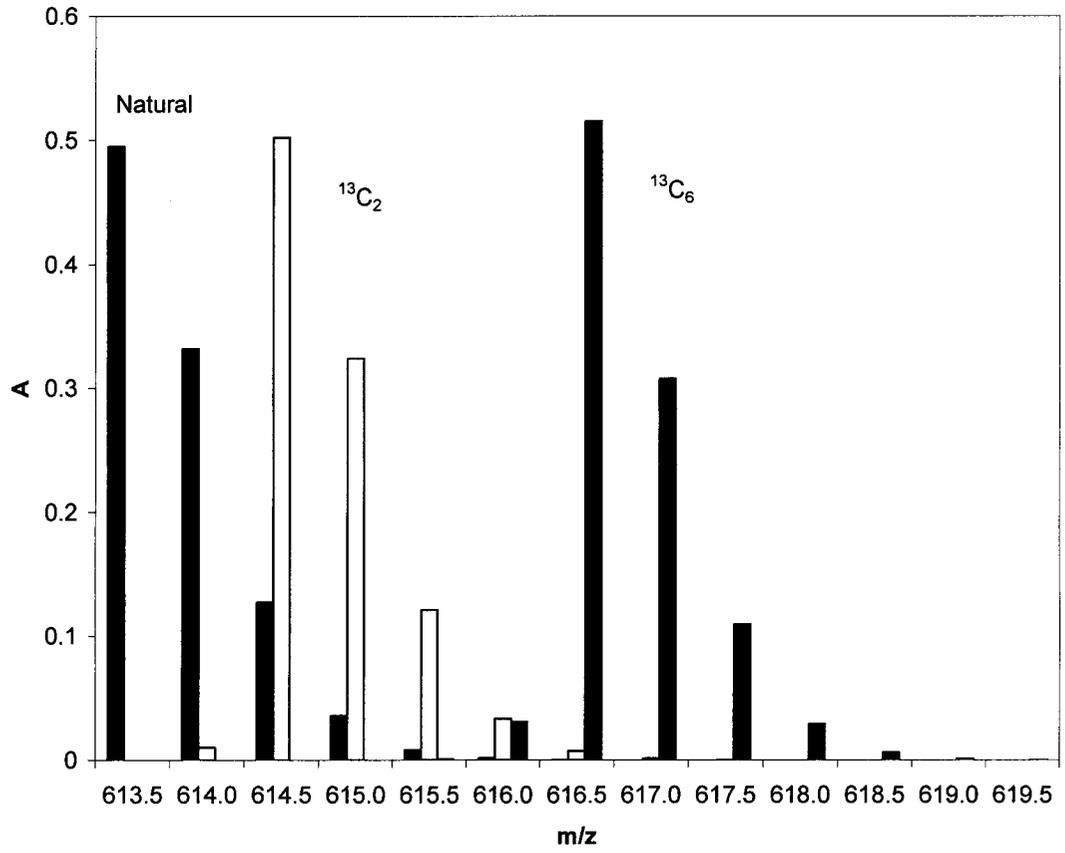


FIG. 2A

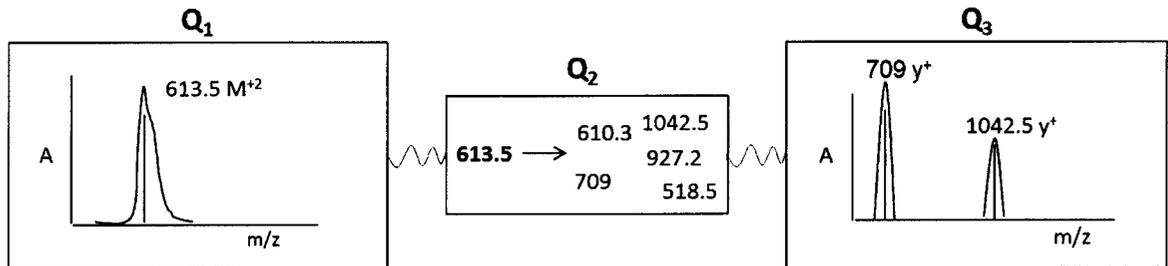


FIG. 2B

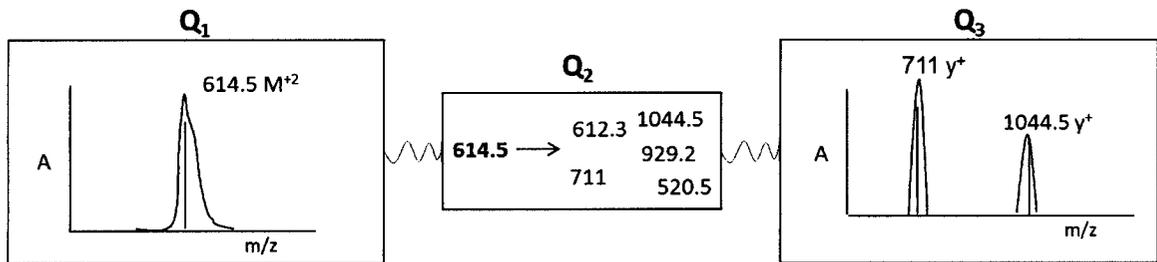


FIG. 3A

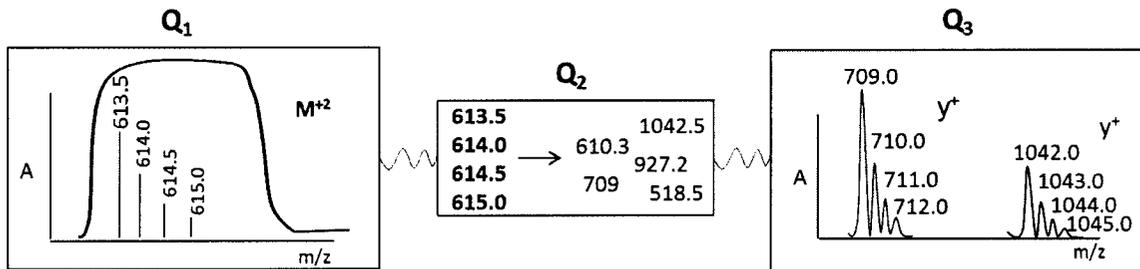


FIG. 3B

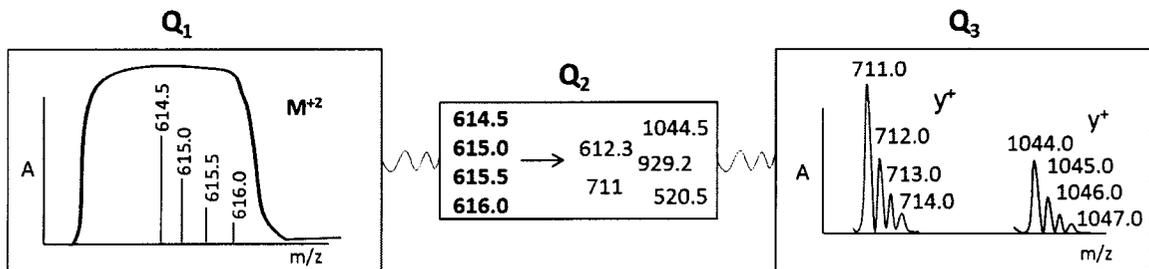


FIG. 4A

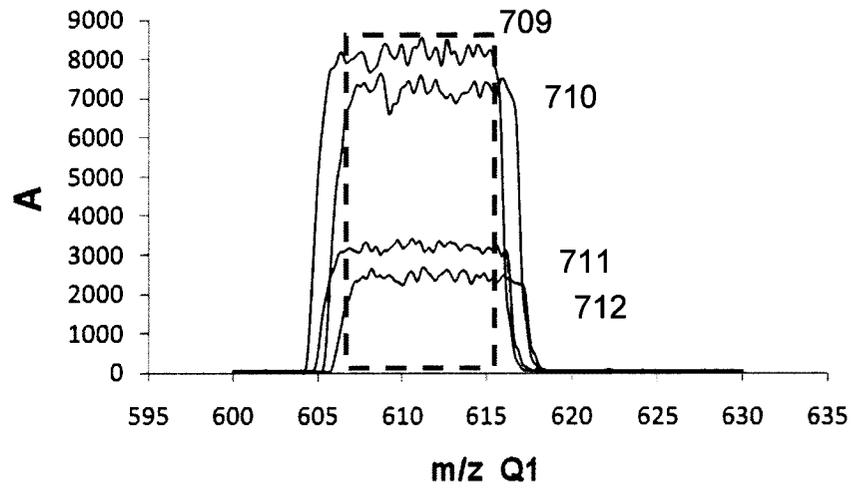


FIG. 4B

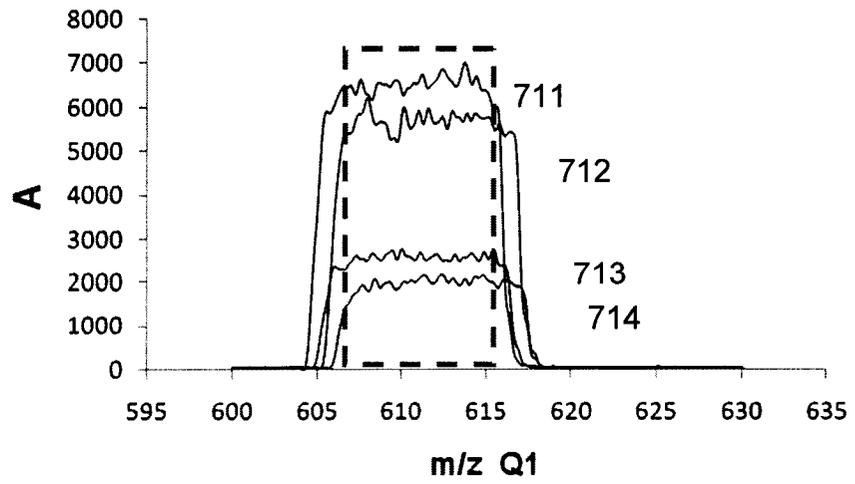


FIG. 5A

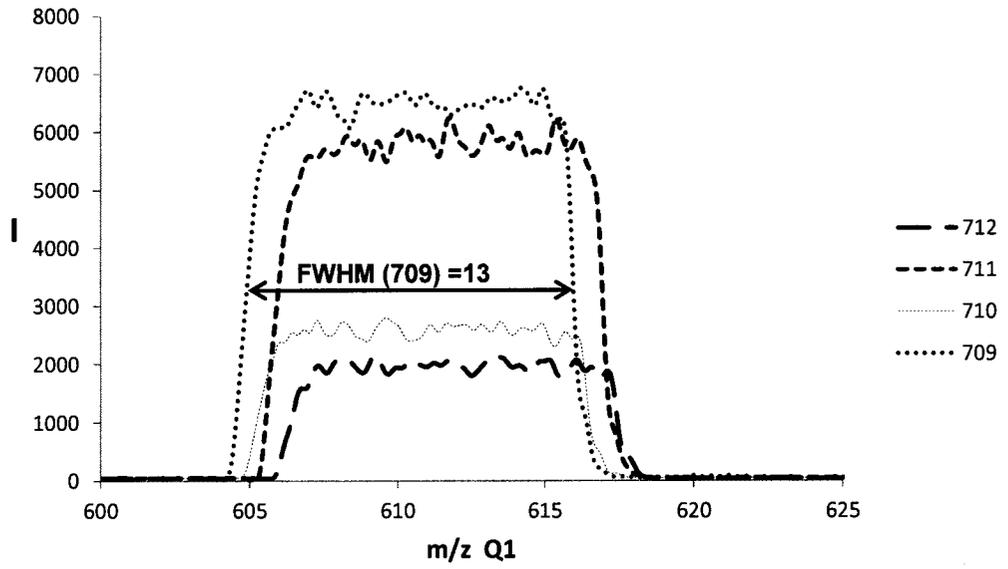
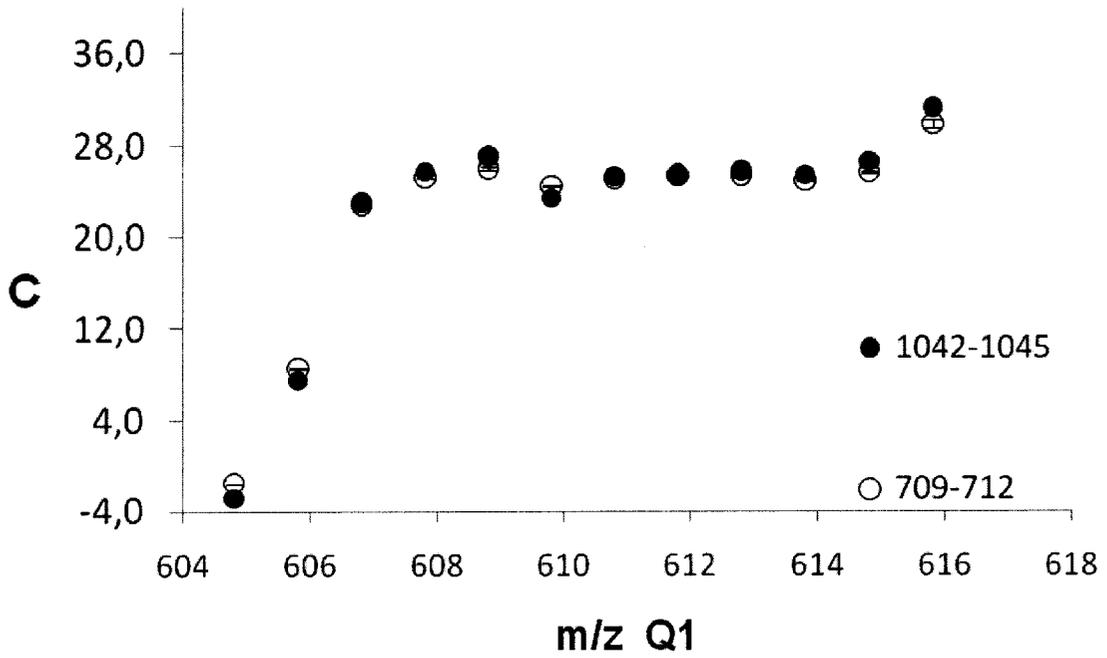


FIG. 5B





- ②① N.º solicitud: 201400239
②② Fecha de presentación de la solicitud: 21.03.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US 20040229283 A1 (GYGI, S.P. ET AL.) 18.12.2004, todo el documento.	1-25
Y	WO 2006128492 A1 (ENTELECHON GMBD) 07.12.2006, todo el documento.	1-25
Y	ES 2320085 A1 (UNIVERSIDAD DE OVIEDO) 18.05.2009, reivindicación 1.	1-25
Y	CASTILLO, A. et al. "Isotope pattern deconvolution-tandemmass spectrometry for the determination and confirmation of diclofenac in wastewaters". ANALYTICA CHIMICA ACTA. 26.02.2013. Vol. 765, páginas 77 - 85; todo el documento.	1-25

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
23.06.2014

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.06.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-25	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-25	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

El objeto de la invención es un método para realizar la cuantificación exacta de péptidos de menos de 50 aminoácidos por medio de espectrometría de masas en tándem, utilizando un péptido enriquecido isotópicamente con un número bajo de átomos análogo al péptido a cuantificar, de forma que se produce solapamiento espectral. Después de haber seleccionado en un espectrómetro de masas, uno/varios iones precursores tanto del péptido natural como del péptido marcado, se mide la composición isotópica de ambos péptidos utilizando un espectrómetro de masas en tándem de tipo triple cuadrupolo, con una modificación de la resolución en el primer cuadrupolo de forma que el valor de la anchura de un pico de masa a mitad de su altura (Full Width at Half Maximum, FWHM), esté comprendida entre 2 y 20. Después de adicionar una cantidad conocida del péptido marcado, se separa el péptido isotópicamente diluido (mezcla del péptido natural y el péptido marcado) por cualquier técnica de separación física. Se mide a continuación, la distribución isotópica en iones del péptido diluido en un espectrómetro de masas en tándem y se calculan las fracciones molares de los péptidos natural y marcado por medio de un procedimiento matemático de regresión lineal múltiple. A partir de las fracciones molares, se calcula el número de moles del péptido natural cuya cantidad absoluta en la muestra quiere determinarse.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 20040229283 A1 (GYGI, S.P. et al.)	18.12.2004
D02	WO 2006128492 A1 (ENTELECHON GMBD)	07.12.2006
D03	ES 2320085 A1 (UNIVERSIDAD DE OVIEDO)	18.05.2009
D04	CASTILLO, A. et al. "Isotope pattern deconvolution-tandem mass spectrometry for the determination and confirmation of diclofenac in wastewaters". ANALYTICA CHIMICA ACTA. 26.02.2013. Vol. 765, páginas 77 - 85; todo el documento.	

El documento D01, describe un método de cuantificación absoluta de proteínas en una muestra, utilizando péptidos enriquecidos isotópicamente que se detectan por medio de un espectrómetro de masas. Es necesario que no se produzca solapamiento espectral.

El documento D02, describe también un método para cuantificar proteínas en el que se determinan péptidos que son los péptidos tripticos de la proteína. En este método también es necesario que no se produzca solapamiento espectral.

El documento D03, describe un procedimiento para marcar e identificar objetos manufacturados en general, que consiste en a) obtener perfiles isotópicos alterados de un mismo elemento químico que forma parte del objeto, b) la medida de las abundancias isotópicas por medio de espectrometría de masas, c) el cálculo de las fracciones molares de los perfiles isotópicos por un procedimiento matemático que puede ser regresión lineal múltiple y d) la identificación y cuantificación del producto a partir de las fracciones molares medidas para los diferentes perfiles isotópicos obtenidos.

El documento D04, describe un método para identificar y cuantificar diclofenaco en muestras de aguas residuales. Se utiliza espectrometría de masa de dilución isotópica aplicada en un espectrómetro en tándem de tipo triple cuadrupolo. Se utiliza un diclofenaco enriquecido isotópicamente de forma que se produce solapamiento espectral respecto al producto sin marcar. Las fracciones molares de ambos productos, se calculan por regresión lineal múltiple.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD**

Reivindicaciones 1-25

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que describa un método de cuantificación de péptidos por espectroscopía de masas en tándem con dilución isotópica, en el que la diferencia de masa del péptido marcado respecto al natural es tan pequeña que se produce solapamiento espectral. Se considera que el contenido de las reivindicaciones 1-25 es nuevo y cumple los requisitos del Artículo 6 de la Ley de Patentes 11/1986.

ACTIVIDAD INVENTIVA

Reivindicaciones 1-25

El método de cuantificación de proteínas de la invención, presenta respecto a los métodos descritos en el estado de la técnica las siguientes diferencias:

- 1) Se utiliza un péptido enriquecido con un nº pequeño de isótopos por lo que se produce solapamiento espectral.
- 2) Se reduce la resolución en el primer cuadrupolo de modo que $2 < \text{FWHM} < 20$
- 3) Se usa cromatografía líquida acoplada al espectrómetro de masas en tándem para la separación del péptido diluido.
- 4) En estas condiciones después de la monitorización de reacciones múltiples MRM, se obtienen precisa y exactamente los perfiles de los 3 tipos de péptidos: natural, enriquecido y diluido.
- 5) La utilización de regresión lineal múltiple permite obtener directamente las fracciones molares de los péptidos natural y enriquecidos. La relación de moles que se obtiene a partir de las fracciones molares supone una mejora en la precisión de las determinaciones respecto a otros métodos conocidos en el estado de la técnica aplicada a la cuantificación de proteínas.

6) Permite obtener directamente la relación de moles entre el péptido y su análogo marcado a partir de la composición isotópica de la mezcla.

Se considera que un experto en la materia podría intentar la cuantificación de péptidos en muestras, por medio de espectrometría de masas en tándem en la que se produce solapamiento espectral, aplicando la metodología matemática descrita en los documentos D03 y D04 para calcular las fracciones molares de los distintos péptidos con los que se trabaja (natural, enriquecido y diluido), a los métodos de cuantificación de péptidos descritos en los documentos D01 y D02 y tener una expectativa razonable de éxito para conseguir el resultado descrito en la presente solicitud; por tanto se considera que las reivindicaciones 1-25, carecen de actividad inventiva y no cumplen el requisito del Artículo 8 de la Ley de Patentes 11/1986.