

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 203**

51 Int. Cl.:
G01N 30/72 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06795326 .5**
96 Fecha de presentación: **07.06.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1889047**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.02.2008**

54 Título: **UTILIZACIÓN DE CONJUGADOS CON CONECTORES CORTABLES MEDIANTE FOTODISOCIACIÓN O FRAGMENTACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LAS SECCIONES DE TEJIDO.**

30 Prioridad:
07.06.2005 US 687848 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.12.2011

73 Titular/es:
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS)
3, RUE MICHEL ANGE
75016 PARIS, FR;
UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
DE LILLE y
EUROGENTEC SA**

72 Inventor/es:
**LEMAIRE, Rémi;
FOURNIER, Isabelle;
SALZET, Michel;
DESCHAMPS, Michel;
TABET, Edmond, Jean-Claude;
PROESS, Gottfried;
RUDLOFF, Ivo y
LEMAITRE, Marc**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

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

ES 2 371 203 T3

DESCRIPCIÓN

Utilización de conjugados con conectores cortables mediante fotodisociación o fragmentación para el análisis de espectrometría de masas de las secciones de tejido.

La invención se refiere a un método para determinar por lo menos un mapa de una molécula diana en una sección de tejido, utilizando por lo menos un conjugado (A-X)_n-B, en el que A es una molécula de etiqueta de peso molecular conocido, X es un conector que es fotocortable a la longitud de onda de un láser MALDI, n es un número entero de por lo menos 1, y B es una molécula de unión que se une específicamente a dicha molécula diana. Al utilizar la espectrometría de masas MALDI, dicha molécula conectora X puede cortarse mediante fotodisociación durante la irradiación con láser de la muestra en el caso de que sea fotocortable a la longitud de onda de dicho láser MALDI.

Recientemente, algunos estudios de transcriptoma y de proteoma han conducido a la identificación de muchas proteínas implicadas en una amplia diversidad de enfermedades, tales como varios tipos de cáncer.

Sin embargo, la mayoría de estos resultados se han obtenido en muestras de ácidos nucleicos o proteínas extraídos y purificados, que no generan información sobre la localización de tejido de las proteínas implicadas, aunque este tipo de información resulta crucial para la comprensión de los procesos fisiológicos. Otra desventaja de la mayoría de los datos disponibles es que pocos estudios han analizado simultáneamente el ARNm y la expresión de proteínas de las moléculas de interés, lo que, sin embargo, resulta importante para clarificar el patrón de expresión de una proteína particular. De esta manera, resultaría muy útil disponer de datos combinados de mapas tanto ARNm como de expresión de proteínas.

Las técnicas actuales para el mapeado de expresión en tejidos del ARNm habitualmente recurren a sondas de ácidos nucleicos acoplados a marcadores radioactivos, fluorescentes o quimioluminiscentes tras la hibridación *in situ* (ISH). Para el mapeado de la expresión de proteínas en secciones de tejido, las técnicas habituales comprenden la inmunohistoquímica y la inmunofluorescencia.

La desventaja principal de todas dichas técnicas de mapeado de expresión de secciones de tejidos es que el número de moléculas diana que pueden analizarse simultáneamente es limitado, incluso con sondas fluorescentes o anticuerpos, debido a no pueden estudiarse más de 3 ó 4 moléculas diana diferentes en el mismo experimento.

Por otra parte, la espectrometría de masas permite el análisis multiplex simultáneo de mezclas complejas de moléculas biológicas dependiendo de su peso molecular. En particular, la espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI) se ha convertido en una potente herramienta en el campo de la investigación biológica y se utiliza para la detección, identificación y caracterización de ácidos nucleicos, péptidos y proteínas en mezclas complejas.

En particular, Olejnik y colaboradores describen la síntesis y caracterización de conjugados fotocortables de péptido-ADN conjuntamente con su utilización como sondas de hibridación de marcador de masa fotocortable (PCMM) para la detección de ADN diana sintéticos inmovilizados mediante espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI) (Olejnik *et al.*, Nucleic Acids Res. 27(23):4626-31, 1 de diciembre de 1999).

La solicitud de patente WO n° 98/26095 describe la síntesis y utilización de compuestos de marcado de masa para interactuar específicamente con dianas moleculares biológicas. La solicitud de patente WO n° 00/68434 describe un método para detectar múltiples analitos en una muestra en un único ensayo, basado en la codificación de las moléculas diana con señales, seguido de la descodificación de la señal codificada.

Sin embargo, ningún documento de la técnica anterior describe un método para el análisis de espectrometría de masas MALDI (MALDI-MS) de ácidos nucleicos comprendidos en secciones de tejido.

Se ha creado en el contexto de la presente invención un nuevo método para la detección de moléculas biológicas, en particular de ARNm, en secciones de tejido mediante MALDI-MS, utilizando conjugados compuestos de un grupo que se une específicamente a la molécula o moléculas diana, un grupo de peso molecular conocido (el grupo "etiqueta") y un conector fotocortable que el láser MALDI corta directamente durante el procedimiento de ionización (ver la figura 1). Este nuevo método permite el mapeado indirecto fácil y preciso del ARNm en secciones de tejido, y la utilización de grupos de etiqueta de pesos moleculares muy diferentes permite analizar un número elevado de moléculas biológicas diferentes simultáneamente.

Además, al utilizar este nuevo método para mapear la expresión en tejidos del ARNm, puede obtenerse una representación común del ARNm y de la expresión de la proteína correspondiente en dos secciones consecutivas de tejido. De hecho, varias publicaciones han demostrado que el MALDI-MS podría convertirse en una eficiente herramienta para el análisis directo de péptidos y proteínas de secciones de tejido (Caprioli R.M., Farmer T.B., Gile J., Anal. Chem. 69:4751-4760, 1997; Stoeckli M., Farmer T.B., Caprioli R.M., Nat. Med. 7:493-496, 2001; Chaurand P., Schwartz S.A., Caprioli R.M., Anal. Chem. 77A:93A, 2004).

De esta manera, la invención se refiere a un método para determinar por lo menos un mapa de una molécula diana en una sección de tejido, comprendiendo:

a) hibridar dicha sección de tejido con por lo menos un conjugado $(A-X)_n-B$, en el que:

- A es una molécula de etiqueta de peso molecular conocido,

- X es un conector que es fotocortable a la longitud de onda de un láser MALDI,

- n es un número entero igual o superior a 1,

- B es una molécula de unión que se une específicamente a dicha molécula diana, y cada molécula B diferente se une a una molécula A de etiqueta diferente,

b) escanear la superficie de la sección de tejido y análisis de cada punto contiguo con un espectrómetro de masas MALDI, en el que el láser MALDI se utiliza tanto para liberar la molécula A de etiqueta como para inducir la ionización de la muestra, y en el que se guardan los datos resultantes de cada punto, y

c) análisis de los datos obtenidos en la ventana o ventanas de masa molecular de cada molécula de etiqueta diferente con el fin de crear tantos mapas de la sección de tejido como moléculas de etiqueta estudiadas diferentes.

Según la invención, una "sección de tejido" preferentemente presenta las propiedades siguientes: puede congelarse o incluirse en parafina, su grosor preferentemente es del orden de un diámetro de célula de mamífero, estando comprendido, de esta manera, entre 5 y 20 μm . En el caso de una sección congelada obtenida a partir de un tejido congelado utilizando un criostato, preferentemente se utiliza un OCT (polímero de temperatura de corte óptima) únicamente para fijar el tejido, pero el tejido congelado no se incluye en OCT, de manera que las secciones de tejido no entren en contacto con el OCT. A continuación, la sección de tejido puede transferirse a una placa MALDI compuesta de cualquier material adecuado para el análisis MALDI posterior, incluyendo metales, materiales inorgánicos u orgánicos, tales como oro, acero, fibra de vidrio, vidrio, nilón 6/6, silicio, plástico, polietileno, polipropileno, poliamida, difluoruro de polivinilideno o una sección de vidrio de cualquier grosor recubierta de metal conductor que mantenga las propiedades de transparencia, tal como níquel o ITO.

Según la invención, una "molécula diana" se refiere a una molécula de interés que puede unirse específicamente a otra molécula, denominada "molécula de unión". Dichas moléculas diana/de unión en tándem pueden mostrar cualquier química, con la condición de que puedan generar una hibridación específica en una sección de tejido. Una gran diversidad de moléculas diana/de unión en tándem, así como de moléculas de unión/diana en tándem, se encuentra comprendida dentro del alcance de la presente invención, incluyendo ácidos nucleicos/ácidos nucleicos, ácidos nucleicos/péptidos, ácidos nucleicos/proteínas, ácidos nucleicos/anticuerpos, péptidos/péptidos, péptidos/proteínas, péptidos/anticuerpos, proteínas/proteínas (en particular ligandos/receptores), proteínas/azúcares, antígenos/anticuerpos, haptenos/anticuerpos, compuestos orgánicos/receptor (ver algunos ejemplos en la figura 2).

En particular, las secuencias de ácidos nucleicos diana pueden detectarse específicamente utilizando sondas de ácidos nucleicos de una cadena con una secuencia de ácidos nucleicos que sea complementaria al ácido nucleico diana de una cadena o a las cadenas de un ácido nucleico diana de doble cadena (ver la figura 1). En el caso de una molécula diana de ARNm, puede utilizarse un ácido nucleico sonda complementario a la secuencia de ARNm como molécula de unión. Dicha sonda de ácidos nucleicos preferentemente presenta una longitud de nucleótidos comprendida entre 250 y 550, más preferentemente entre 300 y 500, entre 350 y 450, más preferentemente de aproximadamente 400.

Pueden detectarse secuencias particulares de ácidos nucleicos utilizando proteínas o fragmentos de proteína (péptidos) que se unen específicamente a la secuencia diana, tal como, por ejemplo, factores de transcripción o anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que son específicos para secuencias de ADN particulares. Por ejemplo, pueden utilizarse anticuerpos anti-ADN autoinmunológicos.

En el caso de los péptidos y las proteínas, todas las moléculas en tándem de ligando peptídico/receptor peptídico conocidas de la técnica se encuentran comprendidas dentro del alcance de la presente invención. Dichas moléculas de ligando peptídico/receptor peptídico incluyen antígenos peptídicos/anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, así como cualquier tándem de hormona/receptor de hormona, citoquina/receptor de citoquina, quimoquina/receptor de quimoquina, aptámero/péptido o aptámero/proteína. Los sacáridos membranales que participan en la migración celular y los receptores proteicos de los mismos también se encuentran comprendidos dentro del alcance de la presente invención.

Además, los antígenos de cualquier tipo (tales como ácidos nucleicos, haptenos, péptidos o proteína) y los anticuerpos específicos de los mismos se encuentran incluidos en las moléculas en tándem de diana/molécula de unión y molécula de unión/diana según la invención. En particular, la utilización de un anticuerpo o fragmento de

anticuerpo como molécula de unión en un conjugado permite realizar un nuevo tipo de inmunocitoquímica en secciones de tejido utilizando el análisis de MALDI-MS como tecnología revelación debido a la molécula de etiqueta unida fotocortablemente a un anticuerpo.

- 5 También pueden mapearse compuestos orgánicos utilizando los métodos según la invención. En particular, puede realizarse un seguimiento de la distribución *in vivo* de los fármacos orgánicos administrados mediante los métodos según la invención.

10 En una forma de realización particular del método anteriormente descrito según la invención, se selecciona independientemente cada molécula diana de entre el grupo constituido por ácidos nucleicos, en particular molécula de ARNm, péptidos, proteínas, en particular receptores y ligandos, anticuerpos, antígenos, haptenos y compuestos orgánicos. En una forma de realización preferida, por lo menos una molécula diana es una molécula de ARNm. En otra forma de realización preferida, se selecciona por lo menos una molécula diana de entre un péptido, una proteína, un antígeno o un hapteno.

15 En una forma de realización particular de cualquier método anteriormente descrito según la invención, cada molécula B de unión que se une específicamente a una molécula diana se selecciona independientemente de entre el grupo constituido por ácidos nucleicos, particularmente oligonucleótidos, péptidos, proteínas, en particular receptores y ligandos, anticuerpos, antígenos, haptenos, aptámeros y compuestos orgánicos. En una forma de realización preferida, en el caso de que por lo menos una molécula diana sea una molécula de ARNm, cada molécula B que se une específicamente a un ácido nucleico diana es una sonda de ácidos nucleicos con una secuencia que es complementaria a dicha secuencia de ARNm diana. En otra forma de realización preferida, en el caso de que por lo menos una molécula diana sea un péptido, proteína, antígeno o hapteno, cada molécula B que se une específicamente a un péptido diana, proteína, antígeno o hapteno es un anticuerpo dirigido contra dicho péptido, proteína, antígeno o hapteno. En particular, en el caso de que se utilice un anticuerpo o fragmento de anticuerpo como molécula de unión B, la molécula diana contra la que dicho anticuerpo o fragmento del mismo se dirige específicamente puede ser la región marco de una subclase particular de anticuerpo, tal como IgM, IgD, IgG o IgE. Alternativamente, en el caso de que se utilice un anticuerpo o fragmento de anticuerpo como molécula de unión B, la molécula diana contra la que dicho anticuerpo o fragmento del mismo se dirige específicamente puede ser la región marco de anticuerpos generados en una especie particular, tal como, por ejemplo, el conejo, el ratón, la rata, la cabra, el hámster, la oveja y el ser humano. En estos dos casos, puede llevarse a cabo una detección indirecta en 2 etapas utilizando un anticuerpo primario no modificado de una subclase específica dirigida contra cualquier molécula diana deseable, siendo seguidamente reconocido dicho anticuerpo primario por un conjugado de anticuerpo-etiqueta según la invención (ver el Ejemplo 2 y la figura 3). Dicho conjugado resulta altamente ventajoso debido que permite su utilización con cualquier anticuerpo primario, de cualquier especificidad antigénica, con la condición de que dicho anticuerpo primario pertenezca a la subclase reconocida por el anticuerpo del conjugado.

Según la invención, una "molécula de etiqueta" se refiere a una molécula de peso molecular conocido que resulta detectable mediante espectrometría de masas utilizando MALDI (UV/IR), SIMS y DESI. Un espectrómetro de masas MALDI habitualmente permite la detección de compuestos en un amplio abanico de proporciones de m/z . Por ejemplo, los analizadores MALDI-tiempo de vuelo (TOF) pueden detectar compuestos con proporciones m/z de hasta 1.000.000. Una molécula de etiqueta adecuada no debería interferir con la unión específica de la diana y las moléculas de unión. Preferentemente, una molécula de etiqueta adecuada presenta, de esta manera, un volumen estérico limitado para evitar impedimentos estéricos de la unión de las moléculas diana y de unión. Por ambos motivos descritos anteriormente, las moléculas de etiqueta adecuadas preferentemente presentan, de esta manera, una proporción m/z inferior a 10.000. Los ejemplos particulares de moléculas de etiqueta adecuadas comprenden péptidos, ácidos nucleicos, sacáridos, polímeros, lípidos y compuestos orgánicos. Entre ellos, las moléculas de marcado que se utilizan para revelar la formación de complejo entre una molécula diana y una molécula de unión también pueden utilizarse como moléculas de etiqueta, incluyendo fluorocromos tales como, por ejemplo, el habitual isotiocianato de fluoresceína (FITC), la R-ficoeritrina (PE), Cy3, Cy5, Cy7, PerCP, alofocianina (APC), rojo Texas, TRITC, conjugados PE-Cy5, conjugados PE-Cy7 o conjugados APC-Cy7; enzimas tales como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, biotina, oro, o todas las matrices MALDI o incluso todos los compuestos que pueden analizarse en modo puro de desorción láser y, por ejemplo, moléculas preionizadas. En el caso de que se utilice una tecnología de espectrometría de masas adecuada para la detección de moléculas muy pequeñas, también pueden utilizarse átomos como molécula de etiqueta.

Todas las moléculas de etiqueta mencionadas anteriormente pueden utilizarse en la invención, y en cualquier caso, dependiendo de la técnica de espectrometría de masas utilizada, un experto en la técnica del análisis de espectrometría de masas sabrá qué tipo de molécula de etiqueta seleccionar para optimizar la etapa de detección. Por ejemplo, en el caso de que se utilice espectrometría de masas MALDI, las moléculas de etiqueta preferentemente presentan una proporción m/z <5.000. Alternativamente, en el caso de que se utilice SIMS, las moléculas de etiqueta preferentemente presentan una proporción m/z <500, y en el caso de que se utilice DESI, las moléculas de etiqueta preferentemente presentan una proporción m/z <5.000.

65 En una forma de realización particular de cualquier método anteriormente indicado según la invención, cada molécula A de etiqueta se selecciona de entre el grupo constituido por péptidos, ácidos nucleicos, sacáridos y

compuestos orgánicos. En una forma de realización preferida, por lo menos una molécula A de etiqueta es un péptido.

En una forma de realización preferida de un método anteriormente descrito según la invención, la molécula o moléculas diana son moléculas de ARN, la molécula o moléculas B de unión son sondas de ácidos nucleicos con una secuencia complementaria a las secuencias de ARNm y la molécula o moléculas A de etiqueta son péptidos. En una forma de realización preferida de un método anteriormente descrito según la invención, la molécula o moléculas diana son péptidos, proteínas (incluyendo anticuerpos), antígenos o haptenos; las moléculas de unión son anticuerpos o fragmentos de anticuerpo y las moléculas de etiqueta son péptidos. En otra forma de realización preferida de un método anteriormente descrito según la invención, la molécula o moléculas diana son péptidos, proteínas (incluyendo anticuerpos), antígenos o haptenos; las moléculas de unión son anticuerpos o fragmentos de anticuerpos y las moléculas de etiqueta son moléculas de marcado de anticuerpos habituales, tales como fluorocromos, incluyendo, por ejemplo, el habitual isotiocianato de fluoresceína (FITC), la R-ficoeritrina (PE), Cy3, Cy5, Cy7, PerCP, alofocianina (APC), rojo Texas, TRITC, conjugados PE-Cy5, conjugados PE-Cy7 ó conjugados APC-Cy7; enzimas tales como fosfatasa alcalina o peroxidasa; o biotina u oro; o todas las matrices de MALDI o incluso todos los compuestos que pueden analizarse en modo puro de desorción láser y por ejemplo moléculas preionizadas.

Según la invención, la expresión "hibridar dicha sección de tejido con por lo menos un conjugado (A-X)_n-B" se refiere a una reacción en la que la sección de tejido y el conjugado o conjugados se ponen en contacto bajo condiciones que permitan que la molécula B de unión del conjugado pueda unirse específicamente a su molécula diana en la sección de tejido. Dependiendo de la naturaleza de las moléculas de unión y diana, el experto en la materia dispone de protocolos de hibridación bien conocidos. En efecto, en el caso de que la molécula de unión sea una sonda de ácidos nucleicos, se encuentra bien documentada la hibridación *in situ* en secciones de tejido y, de esta manera, se encuentra fácilmente disponible para el experto en la materia. La tinción de anticuerpos en secciones de tejido también es una técnica rutinaria que se encuentra fácilmente disponible para el experto en la materia.

Utilizando un método según la invención, de esta manera resulta posible obtener un mapa de por lo menos una molécula diana en una sección de tejido. El término "mapa" referido a una molécula diana en una sección de tejido se refiere a una representación bidimensional de la expresión de dicha molécula diana en dicha sección de tejido. Esta representación bidimensional se obtiene mediante escaneo de la superficie de la sección de tejido utilizando el analizador MALDI a una densidad de puntos definida, realizando el análisis de MALDI en cada punto sucesivo y almacenando tanto los datos obtenidos como las coordenadas de cada punto. Cuanto mayor sea la densidad de puntos, más preciso es el mapa resultante. El diámetro de un láser MALDI generalmente es de entre 50 y 200 µm, dependiendo de la focalización del sistema, de manera que dos puntos de irradiación contiguos preferentemente se encuentran separados del diámetro del rayo láser (es decir 50 a 200 µm). Con el fin de permitir la obtención de un mapa preciso de la molécula diana, los puntos contiguos preferentemente se encuentran separados por como máximo 300 µm, como máximo 200 µm, más preferentemente como máximo 100 µm, como máximo 80 µm, como máximo 60 µm, como máximo 50 µm, como máximo 40 µm, más preferentemente por el diámetro del láser MALDI.

A continuación, los datos de cada punto se analizan en la ventana molecular de la molécula diana y se informa la intensidad de la señal de la molécula diana en las coordenadas del punto. Dicha reconstrucción de imagen puede llevarse a cabo automáticamente utilizando cualquier programa adecuado de reconstrucción de imágenes conocido de la técnica o disponible comercialmente. Son ejemplos de programas adecuados, el programa IDL (Interactive Data Language), comercializado por RSI (RSI Corporate Headquarters, 4990 Pearl East Circle, Boulder, CO 80301), flexImaging (Bruker Daltonics, Bremen, DE) o MIT (M. Stoeckli, Novartis, Bâle, Suiza).

En un método según la invención para determinar un mapa de por lo menos una molécula diana en una sección de tejido, pueden mapearse varias moléculas diana diferentes simultáneamente. En efecto, resulta suficiente utilizar varios conjugados con diferentes moléculas etiqueta A, que de esta manera presentan pesos moleculares diferentes, para permitir la detección de varias moléculas diana diferentes. De esta manera, mediante la utilización de moléculas diana de pesos moleculares muy diferentes resulta posible, utilizando cualquier método descrito anteriormente según la invención, mapear simultáneamente la expresión de muchas moléculas diana diferentes de la misma sección de tejido. En formas de realización particulares, pueden mapearse simultáneamente por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 5, por lo menos 8, por lo menos 10, por lo menos 15, por lo menos 20, por lo menos 30, por lo menos 40, por lo menos 50, por lo menos 75 ó por lo menos 100 moléculas diana diferentes. En particular, en el caso de moléculas diana de ARNm, pueden mapearse simultáneamente de la misma sección de tejido por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 5, por lo menos 8, por lo menos 10, por lo menos 15, por lo menos 20, por lo menos 30, por lo menos 40, por lo menos 50, por lo menos 75 ó por lo menos 100 moléculas de ARNm diana diferentes.

En una forma de realización particular de cualquier método anteriormente descrito en el que la molécula o moléculas diana sea una o más moléculas de ARNm, dicho método puede comprender además una etapa d) consistente en analizar los datos obtenidos en las ventanas de masa molecular de cada proteína correspondiente a una molécula de ARNm con el fin de crear cada mapa de expresión de la proteína correspondiente de la sección de tejido.

En una primera forma de realización preferida, se utiliza la espectrometría de masas MALDI y la molécula conectora X es fotocortable a la longitud de onda de un láser MALDI. La invención se refiere a un método para determinar el mapa de por lo menos una molécula diana en una sección de tejido, comprendiendo:

5 a) hibridar dicha sección de tejido con por lo menos un conjugado (A-X)_n-B, en el que:

- A es una molécula diana de peso molecular conocido,

- X es un conector que es fotocortable a la longitud de onda de un láser MALDI,

10

- n es un número entero igual o superior a 1,

- B es una molécula de unión que se une específicamente a dicha molécula diana,

y

15

- cada molécula B diferente se encuentra unida a una molécula etiqueta A diferente,

b) escanear la superficie de la sección de tejido y analizar cada punto contiguo con un espectrómetro de masas MALDI, en el que el láser MALDI se utiliza tanto para liberar la molécula etiqueta A como para inducir la ionización de la muestra, y en el que se guardan los datos resultantes de cada punto, y

20

c) analizar los datos obtenidos en la ventana o ventanas de masa molecular de cada molécula diana diferente con el fin de crear tantos mapas de la sección de tejido como moléculas diana diferentes estudiadas.

25

Según la invención, un "conector que es fotocortable a la longitud de onda de un láser MALDI" se refiere a un compuesto químico que separa dos otros grupos químicos, y que puede cortarse por lo menos en un sitio bajo la exposición a un láser MALDI. La mayoría de los láser de MALDI presentan una longitud de onda ultravioleta (UV: inferior a 500 nm), habitualmente de entre 300 y 500 nm. Por ejemplo, muchos analizadores de UV-MALDI presentan un láser pulsado de nitrógeno con una longitud de onda de 337 nm. De esta manera, un conector según la invención, en una forma de realización particular, se corta eficientemente por lo menos en un sitio bajo exposición a una longitud de onda de entre 250 y 500 nm, preferentemente bajo una longitud de onda de entre 320 y 360 nm o de entre 320 y 350 nm, más preferentemente bajo una longitud de onda de 337 nm, de manera que el láser de UV-MALDI actúa tanto cortando el conector como ionizando la muestra. Otros analizadores MALDI disponen de un láser de infrarrojos (IR: superior a 770 nm). Por ejemplo, puede utilizarse como láser de IR-MALDI, un láser de Nd:YAG (longitud de onda: 1.060 nm), un láser Er:YAG (longitud de onda: 2.940 nm), un oscilador paramétrico óptico de la franja infrarroja media (OPO) (longitud de onda=2.940 nm) o un láser TEA-CO₂ (longitud de onda=10.600 nm). De esta manera, en otras formas de realización particulares, se corta eficientemente un conector según la invención en por lo menos un sitio bajo exposición a una longitud de onda de entre 1.000 y 1.100 nm, preferentemente bajo una longitud de onda de 1.060 nm, o bajo una longitud de onda de entre 2.900 y 3.000 nm, preferentemente bajo una longitud de onda de 2.940 nm o bajo una longitud de onda de entre 10.500 y 10.700 nm, preferentemente bajo una longitud de onda de 10.600 nm, de manera que, respectivamente, un láser de IR-MALDI Nd:YAG, Er:YAG o TEA-CO₂ actúa tanto cortando el conector como ionizando la muestra.

30

35

40

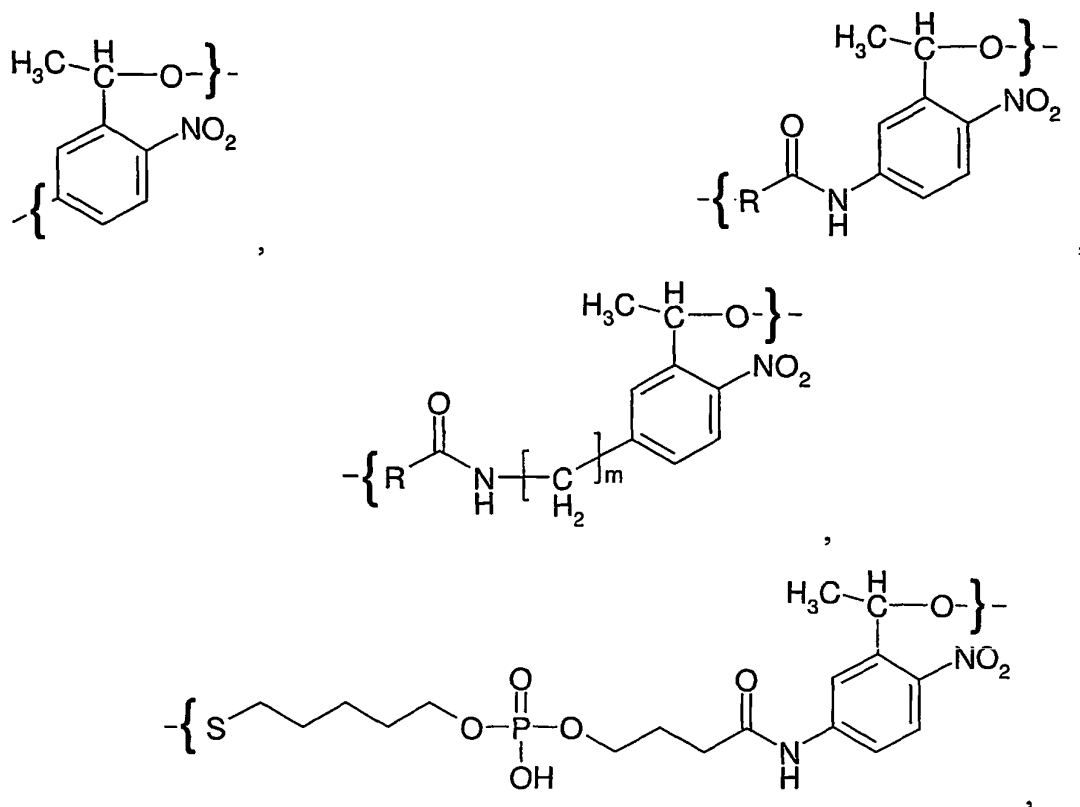
45

En el caso de los láser de UV-MALDI, se han descrito varios conectores (Olejnik *et al.*, Nucleic Acids Res. 27(23):4626-31, 1 de diciembre de 1999; Bai X. *et al.*, Nucleic Acids Res. 32(2):535-41, 26 de enero de 2004; Wenzel T. *et al.*, Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 22(5-8):1579-81, mayo-agosto de 2003) y se encuentran disponibles comercialmente varios reactivos que resultan útiles para introducir conectores fotocortables en moléculas orgánicas, notablemente, por ejemplo, AmberGenTM (1106 Commonwealth Avenue, Boston, MA 02215, USA), Link Technologies (3 Mallard Way, Strathclyde Business Park, Bellshill, Lanarkshire ML4 3BF, Escocia), Integrated DNA Technologies (1710 Commercial Park, Coralville, IA 52241, USA), Glen Research (22825 Davis Drive, Sterling, Virginia, 20164, USA), Eurogentec (oficinas centrales de EUROGENTEC s.a., LIEGE Science Park, Rue Bois Saint Jean 5, 4102 Seraing, Bélgica).

50

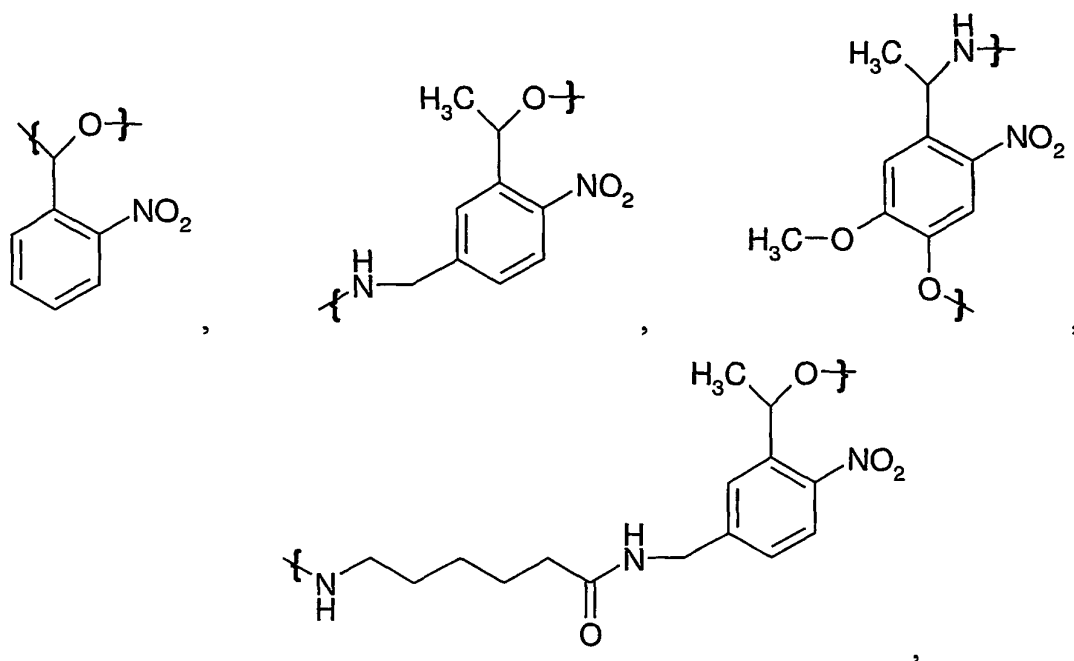
En una forma de realización particular de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente según la invención en los que se utiliza la espectrometría de masas MALDI y una molécula conectora X que es fotocortable a la longitud de onda de un láser de MALDI, la molécula conectora X comprende un grupo que se selecciona de entre el grupo constituido por:

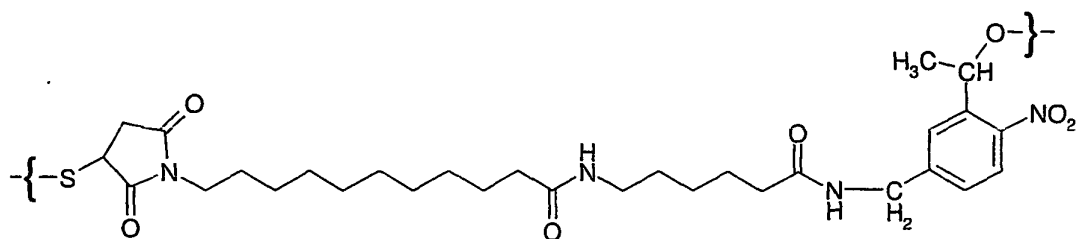
55



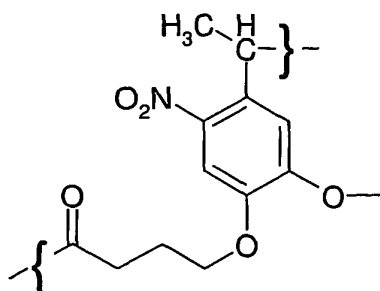
5 en el que R es un grupo alquilo C_1 - C_6 y m es un número entero comprendido entre 1 y 4.

Alternativamente, se utiliza dicha molécula conectora X que es fotocortable a la longitud de onda de un láser de MALDI, comprendiendo la molécula conectora X un grupo seleccionado de entre el grupo constituido por:





y



5

Pueden obtenerse moléculas conectoras X que unen una molécula etiqueta A y una molécula de unión B entre A y B utilizando conectores comercialmente disponibles que comprenden dichos grupos. Por ejemplo, pueden obtenerse conectores adecuados para preparar conjugados con conectores fotocortables para la utilización en un método según la invención de Glen Research Corporation (22825 Davis Drive, Sterling, VA 20164, USA), incluyendo los conectores denominados:

conector PC (ref. nº 10-4920-02),

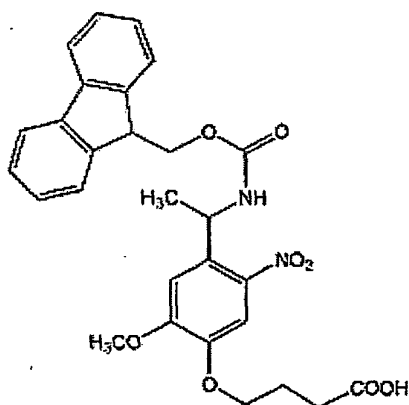
espaciador fosforamidita PC (ref. nº 10-4913-02),

y

modificador amino PC (ref. nº 10-4906-02)

o de Pierce (Pierce Biotechnology, Inc., Customer Service Department, P.O. Box 117, Rockford, IL, 61105 USA), por ejemplo el conector Sulfo-KMUS (ref. nº 21111),

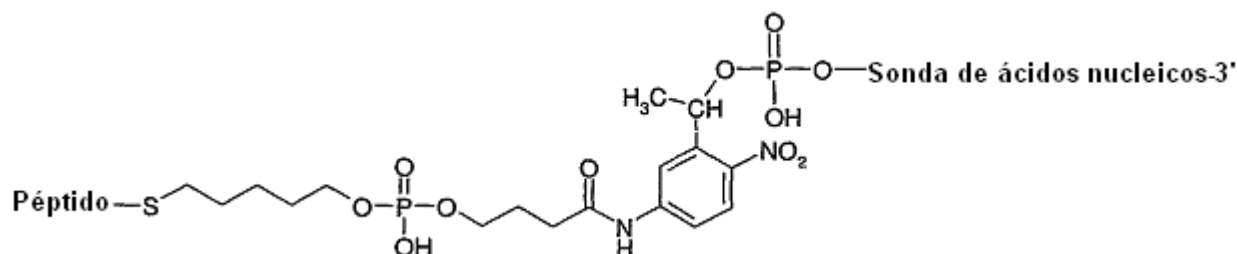
o de Merck Biosciences Ltd. (Boulevard Industrial Park, Padge Road, Beeston, Nottingham NG9 2JR, Reino Unido), marca comercial Novabiochem®, por ejemplo el conector:



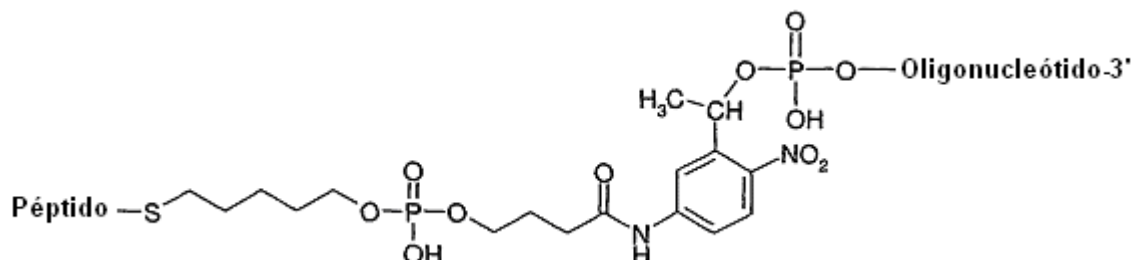
(ref. 01-60-0042),

o de Solulink bajo el nº de referencia B1001, denominado Chromalink Biotin 354S, que puede cortarse a una longitud de onda de 354 nm.

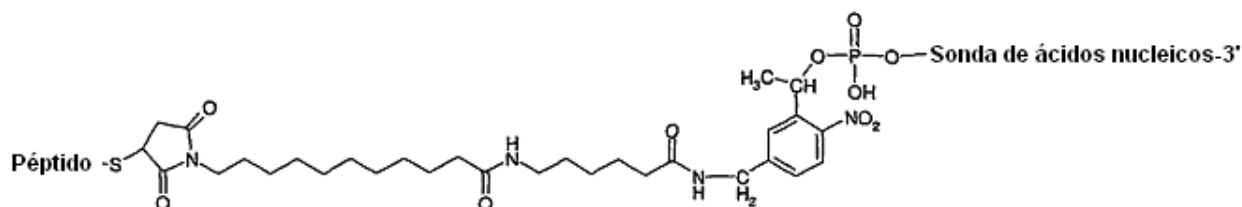
En una forma de realización preferida en la que la molécula o moléculas diana son moléculas de ARNm, la molécula o moléculas B de unión son sondas de ácidos nucleicos que presentan una secuencia complementaria a las secuencias de ARNm, y una o más moléculas etiqueta A son péptidos, n es 1 en el conjugado o conjugados (A-X)_n-B y el conjugado o conjugados (A-X)-B resultantes presentan la estructura siguiente:



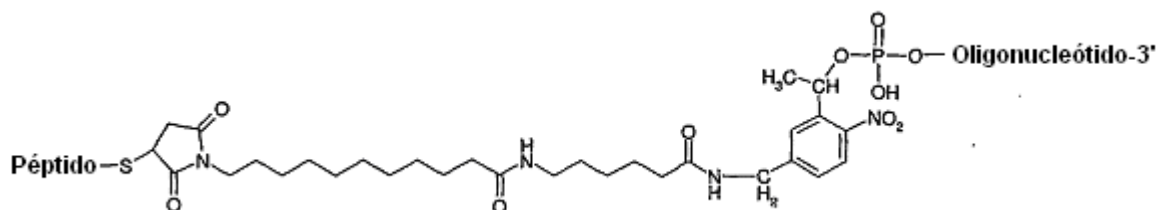
Dichos conjugados pueden obtenerse, por ejemplo, mediante amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos deseada utilizando un cebador directo (5') de la estructura siguiente:



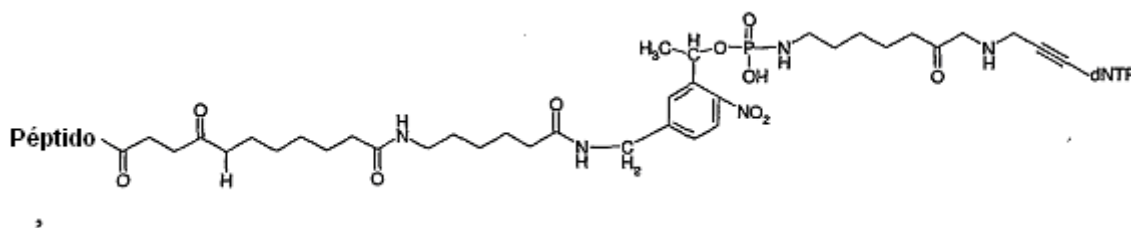
En otra forma de realización preferida en la que la molécula o moléculas diana son moléculas de ARNm, la molécula o moléculas de unión B son sondas de ácidos nucleicos que presentan una secuencia complementaria a secuencias de ARNm y una o más moléculas etiqueta A son péptidos, n es 1 en el conjugado o conjugados (A-X)_n-B, y el conjugado o conjugados (A-X)-B resultantes presentan la estructura siguiente:



Dichos conjugados pueden obtenerse, por ejemplo, mediante amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos deseada utilizando un cebador directo (5') de la estructura siguiente:

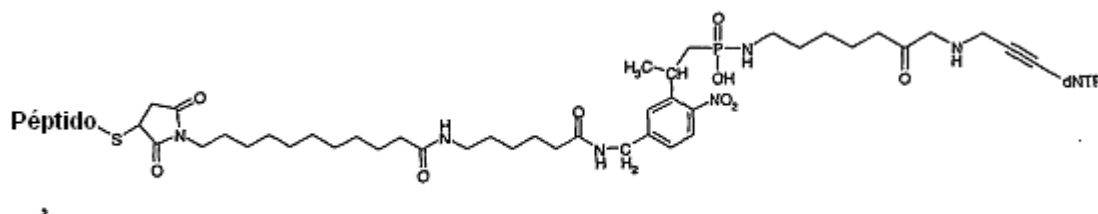


Alternativamente, en otra forma de realización preferida en la que la molécula o moléculas diana son moléculas de ARNm, la molécula o moléculas de unión B son sondas de ácidos nucleicos que presentan una secuencia complementaria a secuencias de ARNm, y una o más moléculas etiqueta A son péptidos, n es superior a 1 y la sonda o sondas de ácidos nucleicos comprenden por lo menos una base modificada que presenta la estructura siguiente:



en la que "dNTP" se refiere a cualquier desoxinucleótido trifosfato, incluyendo dATP, dCTP, dGTP, dTTP y dUTP. En una forma de realización preferida, se utiliza una base dUTP modificada.

En otra forma de realización preferida en la que la molécula o moléculas diana son moléculas de ARNm, la molécula o moléculas de unión B son sondas de ácidos nucleicos que presentan una secuencia complementaria a las secuencias de ARNm y una o más moléculas etiqueta A son péptidos, n es superior a 1 y la sonda o sondas de ácidos nucleicos comprenden por lo menos una base modificada que presenta la estructura siguiente:



en la que "dNTP" se refiere a cualquier desoxinucleótido trifosfato, incluyendo dATP, dCTP, dGTP, dTTP y dUTP. En una forma de realización preferida, se utiliza una base dUTP modificada.

Mediante la utilización de dicho dUTP etiquetado con un péptido modificado, las sondas de hibridación de ácidos nucleicos etiquetados con péptidos pueden generarse de modo muy sencillo utilizando una simple amplificación por PCR en presencia de dATP, dCTP, dGTP y el dUTP etiquetado con un péptido modificado. De esta manera, puede sintetizarse fácilmente una sonda de hibridación específica para cualquier secuencia diana de ARNm.

Además, permite la amplificación de señal debido a que una sonda de hibridación dada sintetizada con el dUTP etiquetado con péptido modificado portará tantos péptidos de etiqueta como bases de U en su secuencia.

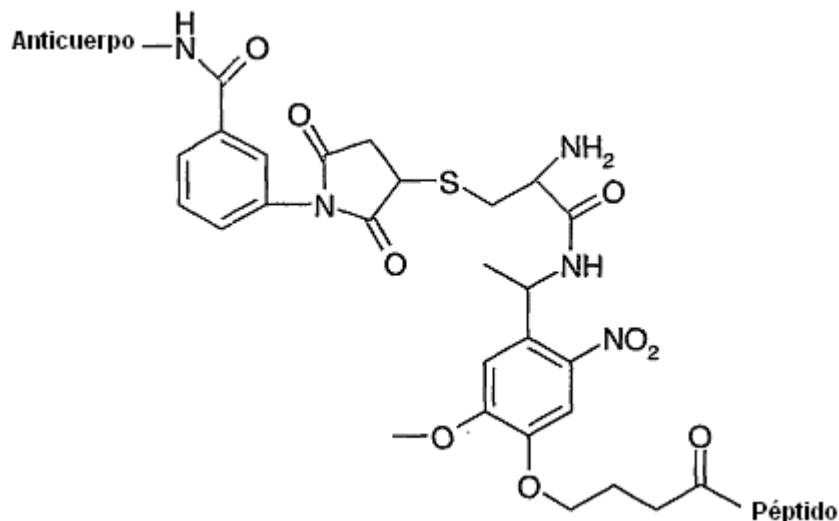
Finalmente, la utilización de sondas de hibridación sintetizadas con dUTP etiquetado con péptido modificado permite realizar un análisis cuantitativo de la expresión de ARNm en secciones de tejido. En efecto, la señal generado por la etiqueta o etiquetas correspondientes de uno o varios ARNm estudiados puede compararse con la obtenida para una secuencia de ARNm de referencia (por ejemplo un gen de mantenimiento tal como el gen actina o HPRT). Debido a que se conoce el número de bases U de cada sonda de hibridación, puede calcularse la proporción de expresión entre cada secuencia de ARNm estudiada y la secuencia de ARNm de referencia.

En un método en el que la molécula o moléculas diana son moléculas de ARNm, la molécula o moléculas de unión B son sondas de ácidos nucleicos que presentan una secuencia complementaria a las secuencias de ARNm, y una o más moléculas etiqueta A son péptidos, utilizando los conjugados indicados anteriormente pueden mapearse simultáneamente varias moléculas de ARNm diana diferentes. En efecto, resulta suficiente la utilización de varios conjugados con diferentes sondas de ácidos nucleicos y diferentes péptidos de señal que presenten diferentes pesos moleculares, para permitir la detección de varias moléculas diana diferentes. De esta manera, mediante la utilización de péptidos etiqueta que presentan pesos moleculares muy diferentes resulta posible utilizar cualquiera de los conjugados anteriormente indicados para mapear simultáneamente la expresión de muchas moléculas de ARNm diana diferentes de la misma sección de tejido. En las formas de realización particulares, pueden mapearse simultáneamente por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 5, por lo menos 8, por lo menos 10, por lo menos 15, por lo menos 20, por lo menos 30, por lo menos 40, por lo menos 50, por lo menos 75 ó por lo menos 100 moléculas de ARNm diana diferentes.

Además, los datos espectrales almacenados también muestran el análisis directo de péptidos/proteínas de la sección de tejido, de manera que el método de análisis de la sección de tejido de moléculas de ARNm diana utilizando los conjugados indicados anteriormente puede comprender además una última etapa d) consistente en analizar los datos obtenidos en las ventanas de masa molecular de cada proteína correspondiente a una molécula de ARNm con el fin de crear cada mapa de expresión de la proteína correspondiente de la sección de tejido.

En una forma de realización preferida en la que la molécula o moléculas diana son uno o más péptidos, proteínas (incluyendo anticuerpos) o haptenos, la molécula o moléculas de unión B son anticuerpos dirigidos contra dichas moléculas diana, la molécula o moléculas etiqueta A son péptidos, n es 1 y el conjugado o conjugados (A-X)-B presentan la estructura siguiente:

5



En cualquier método según la invención en el que se utilice la espectrometría de masas MALDI, la matriz que se utiliza para el análisis de MALDI-MS puede ser cualquier matriz clásica de MALDI (por ejemplo CHCA, 2,5-DHB, SA, HABA, 3-HPA, etc.) ó 2,4-DNPH.

10

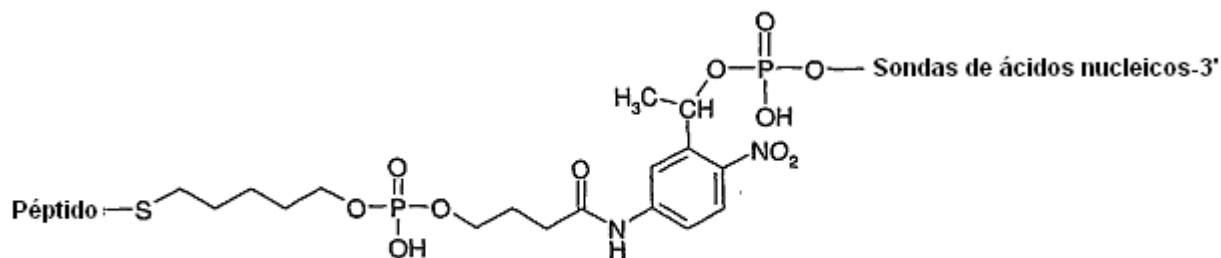
El término "matriz" se refiere a cualquier material que, mezclado con el analito, genera moléculas de analito incluidas en una matriz cristalina que resultan desorbidas con éxito al irradiarlas con láser y que se ionizan a partir de los cristales de la fase sólida liberándose a la fase gaseosa o vapor y se aceleran en forma de iones moleculares. Las matrices de MALDI-MS utilizadas comúnmente generalmente son compuestos químicos ácidos de tamaño reducido que absorben a la longitud de onda del láser, entre ellos el ácido nicotínico, el ácido cinámico, el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (2,5-DHB), el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA), el ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido sinapínico o SA), el ácido 3-metoxi-4-hidroxicinámico (ácido ferúlico), el ácido 3,4-dihidroxicinámico (ácido cafeico), el ácido 2-(4-hidroxifenilazo)benzoico (HABA), el ácido 3-hidroxipicolínico (HPA), la 2,4,6-trihidroxiacetofenona (THAP) y la 2-amino-4-metil-5-nitropiridina. Los protocolos para la preparación de estas matrices son bien conocidos de la técnica y la mayoría de estas matrices se encuentra comercialmente disponible. Entre las matrices actualmente utilizadas comúnmente para el análisis de péptidos/proteínas se incluyen el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA), el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (2,5-DHB) y el ácido sinapínico (SA). El DNPH es la 2,4-dinitrofenilhidrazina y se utiliza para la detección de aldehídos y cetonas.

15

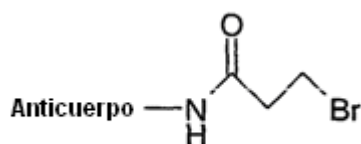
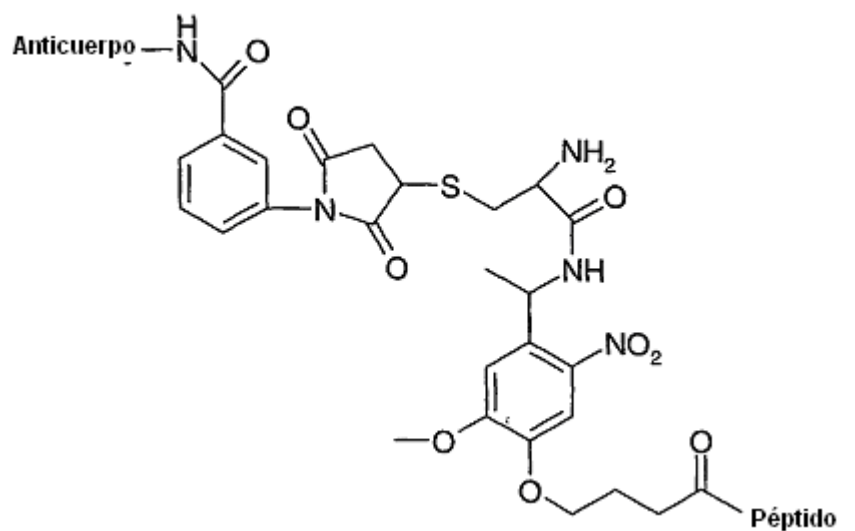
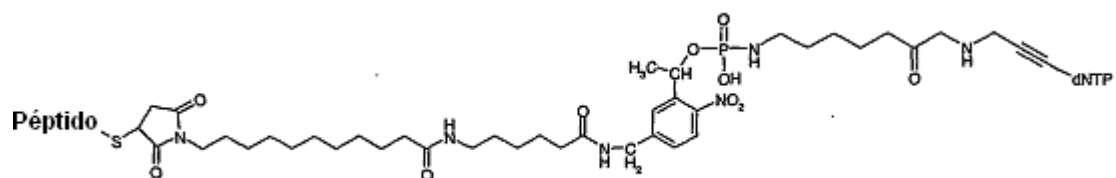
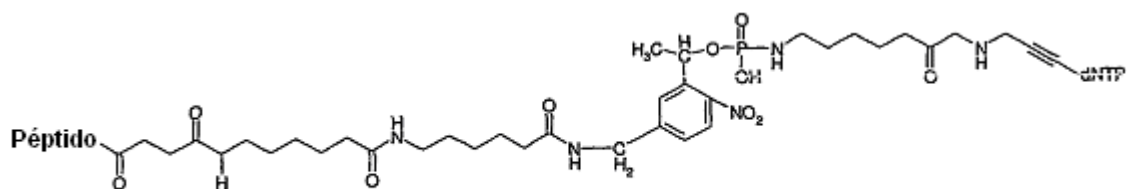
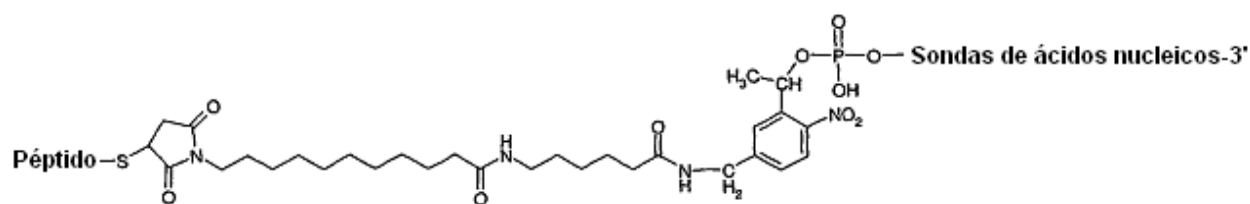
20

25

Un conjugado adecuado para la utilización en un método según la invención puede seleccionarse de entre:



,



5

Cada uno de los conjugados anteriormente indicados resulta individualmente preferido como conjugado según la invención.

- 10 Tras describir de manera general la presente invención, puede obtenerse una comprensión adicional de las características y ventajas de la invención haciendo referencia a determinados ejemplos específicos y figuras que se proporcionan en la presente memoria únicamente a título ilustrativo y que no pretenden ser limitativos, a menos que se indique lo contrario.

Descripción de los dibujos

Figura 1. Principio esquemático de la obtención multiplex de imágenes específica de ARNm mediante MALDI, que combina sondas marcadas diseñadas específicamente para la detección indirecta a partir de la liberación de moléculas de etiqueta durante la etapa de desorción/ionización del MALDI y mediante la utilización de tecnología de ISH.

Figura 2. Esquema general de la posible obtención de imágenes de diferentes dianas (péptidos, proteínas, ARNm, sacáridos, fármacos) utilizando diferentes sondas marcadas (oligonucleótidos, anticuerpos, lectinas, aptámeros).

Figura 3. Principio esquemático de la obtención específica multiplex de imágenes de péptidos/proteínas mediante MALDI, que combina sondas marcadas y diseñadas específicamente para la detección indirecta a partir de las etiquetas liberadas durante la etapa de desorción/ionización del MALDI y mediante la utilización de técnicas inmunocitoquímicas.

Figura 4. Detección del grupo péptido de A. el oligopéptido 3 en modo positivo lineal. B. 100 fmoles de oligopéptido 1 en modo positivo lineal. C. oligopéptidos 1, 2 y 3 simultáneamente en modo positivo reflector, y D. oligopéptido 3 en una placa de soporte de MALDI de oro.

Figura 5. Mapeado del oligopéptido 3 en un soporte sólido. Se depositó oligopéptido 3 con una multipipeta sobre un soporte sólido para obtener la imagen de una letra X. A continuación, se mapeó la presencia de oligopéptido 3 mediante análisis de MALDI-MS y se reconstruyó la imagen utilizando el software IDL. Se muestra la imagen resultante.

Figura 6. Síntesis de una sonda de hibridación *in situ* proencefalina etiquetada con péptido. A. Productos de la amplificación por PCR de la proencefalina obtenida utilizando oligonucleótidos etiquetados (péptido-conector fotocortable-oligonucleótido) o convencionales (sin conector fotocortable y el grupo péptido) directos (5'-CAG-GAC-TCC-CCA-AAG-GAG-AAC-AGG-A-3') e inversos (5'-GA-CGT-ACC-AGG-CGG-TAG-CTG-CAT-TT-3'). Carril 1: cebadores convencionales directo e inverso. Carril 2: cebadores etiquetado directo y convencional inverso. Carril 3: cebadores convencional directo y etiquetado inverso. Carril 4: cebadores etiquetado directo y etiquetado inverso. Carril 5: control negativo: control de agua. Carril 6: marcadores de peso molecular. B. Productos de amplificación correspondientes tras la purificación en columnas de sílice. Carril 1: cebadores convencionales directo e inverso. Carril 2: cebadores etiquetado directo y convencional inverso. Carril 3: cebadores convencional directo y etiquetado inverso. Carril 4: cebadores etiquetado directo y etiquetado inverso. Carril 5: control negativo: control de agua. Carril 6: marcadores de peso molecular. C. y D. Análisis MALDI de producto de amplificación por PCR purificados con cebadores etiquetados directo e inverso (C.) o cebadores etiquetado directo y convencional inverso (D.).

Figura 7. Análisis MALDI directo de una sección desparafinada de cerebro de rata tras la hibridación de una sonda de hibridación *in situ* de proencefalina etiquetada con péptido. A. Localización de la primera sección de tejido. B. Localización de la segunda sección de tejido diferente. C. Análisis de control con una sonda de hibridación *in situ* de proencefalina no etiquetada con péptido.

Figura 8. Síntesis y análisis MALDI de una sonda de ácidos nucleicos que incorpora un dUTP modificado y etiquetado con péptido. A. Estructura del dUTP modificado y etiquetado con péptido y esquema de la síntesis de RT-PCR de una sonda de ácidos nucleicos de proencefalina (400 pb) que incorpora dUTP modificado y etiquetado con péptido. B. Análisis MALDI de dUTP modificado y etiquetado con péptido. C. Análisis MALDI de la sonda de ácidos nucleicos de proencefalina que incorpora dUTP modificado y etiquetado con péptido. D. Análisis MALDI de una sonda de ácidos nucleicos de proencefalina que incorpora un dUTP normal no modificado, sin péptido etiqueta.

Figura 9. Reacciones para la síntesis de un conjugado de anticuerpo-péptido con un conector fotocortable X.

Figura 10. Estructura de un conjugado de anticuerpo-péptido con un conector fotocortable X. Se muestran los 2 fragmentos principales detectados mediante espectrometría de masas MALDI (primer fragmento obtenido mediante fotodisociación de la etiqueta a través del corte del conector fotocortable, y segundo fragmento obtenido mediante fragmentación rápida de la molécula).

Figura 11. Espectro de masas típico obtenido durante el análisis de MALDI en solución de un conjugado de anticuerpo-péptido con un conector fotocortable X (matriz de ácido sinapínico, SA).

Figura 12. Espectro de masas típico obtenido durante el análisis directo de una sección de tejido cerebral de rata sin utilizar conjugado (A, control de cerebro de rata) frente a la utilización de un conjugado de anticuerpo-péptido con un conector fotocortable (B).

Figura 13. Mapa de expresión de la proteína membranal carboxipeptidasa D (180 kDa) detectada con un anticuerpo primario de conejo dirigido contra dicha proteína y el conjugado de anticuerpo-péptido con un conector fotocortable. La imagen se ha reconstruido a partir de la señal de detección correspondiente al péptido etiqueta.

Figura 14. Espectro de masas típico obtenido ruante el análisis de MALDI en solución de un anticuerpo marcado con FITC utilizando una matriz de CHCA. A. Sin anticuerpo marcado con FITC (únicamente matriz de CHCA). B. Con anticuerpo marcado con FITC.

Ejemplo 1

Utilización de conjugados oligopéptido con un conector fotocortable para la detección indirecta de ARNm en secciones de tejidos mediante MALDI-MS

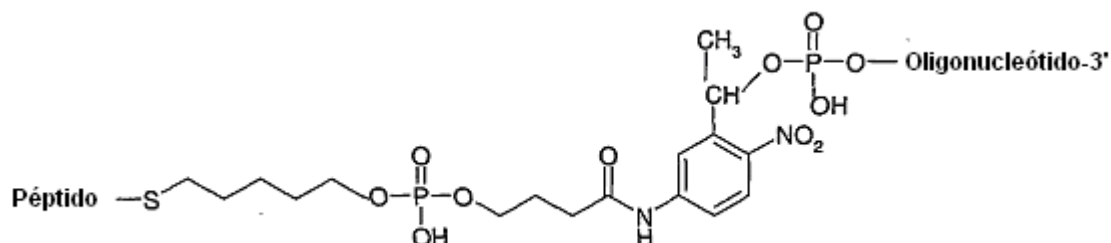
Se sometieron a ensayo conjugados oligopéptido con un conector fotocortable para su capacidad de permitir la detección indirecta de ARNm específico en secciones de tejido mediante MALDI-MS.

1.1 Materiales y métodos

1.1.1 Conjugados oligopéptido

Estructura

Los conjugados oligopéptido estudiados mostraban la estructura siguiente:



Se sintetizaron cinco conjugados oligopéptido con grupos péptidos diferentes. La secuencia de aminoácidos del péptido, los pesos moleculares monoisotópico (M_{mono}) y medio (M_{avg}), y la secuencia de aminoácidos del oligonucleótido de cada conjugado se muestran en la Tabla 2 siguiente.

Tabla 2. Características de los conjugados oligopéptido estudiados

Oligopéptido	Secuencia del péptido (de extremo N-terminal a extremo C-terminal)	M_{mono} (u.m.a.)	M_{avg} (u.m.a.)	Secuencia oligonucleótida (5'-3')
1	GRALGVFVC (SEC ID nº 1)	918,50	919,14	CACGTACAGGATGTACAG (SEC ID nº 6)
2	RPKPQQFFGLMC (SEC ID nº 2)	1.448,73	1.449,79	TCGAGAGGTACATCGTG (SEC ID nº 7)
3	RPPGFSPFRC (SEC ID nº 3)	1.160,58	1.161,37	AAGCGGTACGAGTAGCA (SEC ID nº 8)
Directo	RPPGFSPFRC (SEC ID nº 4)	1.718,00	1.719,00	GACGTACCAGGCGGTAGCTGCATTT (SEC ID nº 9)
Inverso	RPPGFSPFRC (SEC ID nº 5)	1.718,00	1.719,00	CAGGACTCCCCAAAGGAGAACAGGA (SEC ID nº 10)

Síntesis

Se sintetizaron conjugados oligopéptido mediante el protocolo siguiente:

el péptido se sintetizó en un sintetizador Symphony (Protein Technologies Inc.) y se purificó en una columna Delta-Pak C18 de 15 μm 100A (Waters).

Se sintetizó el oligonucleótido de 3' a 5' en Expedite (ABI). Se añadió la función amina con un conector fotocortable en 5' antes del corte y desprotección. Estas etapas se llevaron a cabo utilizando una solución de NH_4OH al 28% durante 24 horas en la oscuridad. A continuación, se purificó el amino-oligonucleótido en una columna Delta-Pak C18 15 μm 300A (Waters). Se acopló la función amino del oligonucleótido a un reactivo heterobifuncional que comprendía una función maleimida. Se solubilizó el oligonucleótido maleimido en agua y se añadió a 1,2 equivalentes de péptido en solución. Se dejó la mezcla bajo agitación durante 16 horas.

A continuación, se purificó el conjugado oligopéptido en una columna Delta-Pak C18 de 15 µm 300A (Waters) y se caracterizó mediante espectrometría de masas.

5 1.1.2 Preparación de muestras antes de la MALDI-MS

Se utilizaron indiferentemente varias matrices utilizadas comúnmente para el análisis de MALDI-MS: ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA), ácido 3-hidroxipicolínico (HPA) y ácido sinapínico (SA).

10 Para el CHCA, se disolvieron 10 mg de la matriz en 1 ml de acetonitrilo/agua (2:1, TFA/H₂O al 0,1% v/v).

Para el SA, se disolvieron 20 mg de matriz en el mismo solvente.

Para el HPA, se disolvieron 50 mg/ml de la matriz en agua.

15 En algunos casos se añadió un aditivo (citrato o acetato amónico) a la matriz.

Antes del análisis de MALDI-MS, se mezcló 1 µl de solución para muestras y 1 µl de solución de matriz en la placa MALDI según el procedimiento de preparación de gota seca (Karas M., Hillenkamp F., Anal. Chem. 60:2299-2301, 1998).

20 Se sometieron a ensayo tres materiales de placa MALDI diferentes: acero inoxidable, oro y Teflon.

25 1.1.3 Análisis de MALDI-MS

Se generaron espectros de masas de MALDI-TOF en un espectrómetro de masas Voyager-DE STR (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) con extracción retardada (DE) y que operaba con un láser de nitrógeno pulsado que emitía a 337 nm.

30 *Análisis en modo lineal*

Para las placas MALDI nox, se fijaron los parámetros de captación en: voltaje de aceleración=20 kV, voltaje de la primera rendija=94%, voltaje del alambre-guía: 0,05%, tiempo de retardo de extracción: 100 a 250 ns.

35 Para las placas MALDI de oro, se fijaron los parámetros de captación en: voltaje de aceleración=25 kV, voltaje de la primera rendija: 96%, voltaje del cable-guía: 0,05%, tiempo de retardo de extracción: 600 ns.

Análisis en modo reflector:

40 Voltaje de aceleración=20 kV, voltaje de la primera rendija=70%, voltaje del alambre-guía: 0,05%, tiempo de retardo de extracción: 200 ns.

1.1.4 Software para la reconstrucción de imágenes

45 Para la reconstrucción de imágenes, se utilizó el programa flexImaging (Bruker Daltonics, Bremen, DE).

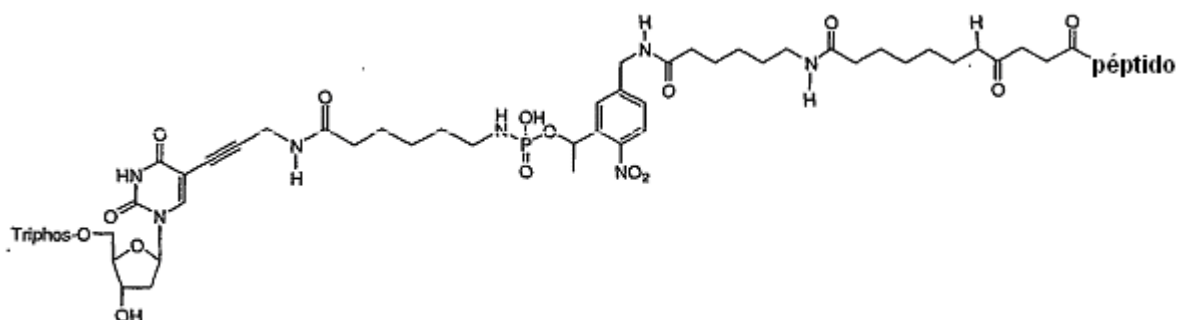
1.1.5 Amplificaciones por PCR utilizando conjugados oligopéptido

50 Se realizaron amplificaciones por PCR de la proencefalina utilizando cebadores etiquetados (péptido-conector fotocortable-oligonucleótido) o convencionales (sin el conector fotocortable y el grupo péptido) directo (5'-CAG-GAC-TCC-CCA-AAG-GAG-AAC-AGG-A-3', SEC ID nº 9, ver la Tabla 2) e inverso (5'-GA-CGT-ACC-AGG-CGG-TAG-CTG-CAT-TT-3', SEC ID nº 10, ver la Tabla 2).

A continuación, se analizaron los productos de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

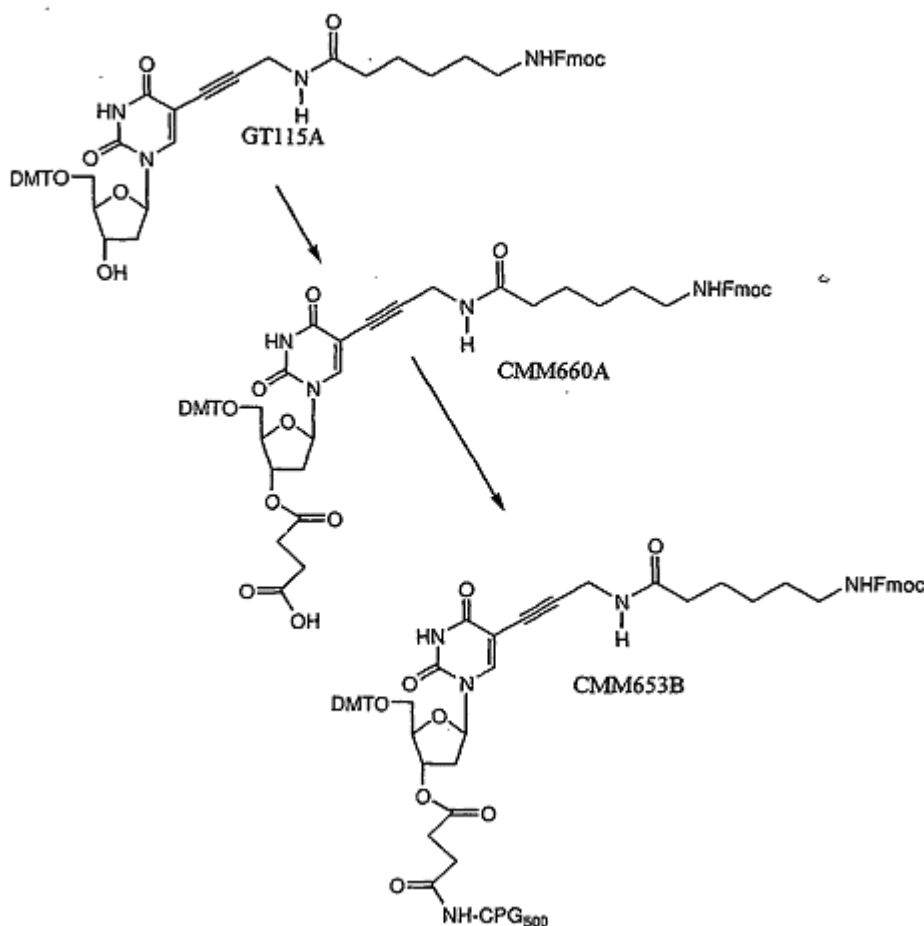
55 1.1.6 Síntesis de un conjugado de dUTP-péptido con un conector fotocortable

Se sintetizó un dUTP etiquetado con péptido y modificado que presentaba la fórmula siguiente:



Para la síntesis, se siguió el esquema de síntesis siguiente:

Esquema 1. Trifosfato de Fmoc-aminopropargilcaproil-dU



5

Con el fin de preparar este trifosfato, resultó necesaria una resina CPG protegida con Fmoc. Debido a que no se disponía de ninguno de los precursores, se preparó el succinilato a partir de GT115A (100 mg). La muestra era relativamente pura pero contenía una pequeña cantidad (según la TLC) de un compuesto no tritilado de mayor velocidad (originado a partir de la reacción de Sonogashira y que no interfería con reacciones posteriores y que no resultaba visible en los espectros de RMN de la muestra). Debido a que no resultó posible purificar el succinato, se modificó ligeramente la reacción. Normalmente se añaden 2 equivalentes de anhídrido succínico a la reacción para obtener un rendimiento cuantitativo, pero si no se elimina por completo, los residuos amino de la resina cpg pueden bloquearse durante la funcionalización. Por lo tanto, se utilizaron 1,5 equivalentes debido a que no se había determinado la pureza exacta del producto. La reacción no siguió hasta completarse (de la TLC, era de más de 50%, obtenido de la comparación entre la intensidad de los componentes en la TLC bajo UV (254 nm) y la intensidad del catión DMT al tratarlo con vapor de HCl. Debido a que el producto no succinilado no reaccionará, se funcionalizó la resina utilizando esta mezcla. Se preparó la resina pero la carga era muy baja, de 5,4 $\mu\text{moles g}^{-1}$ (180 mg).

Se destritiló la resina utilizando TCA/DCM al 2% lavada con DCM y se repitió el procedimiento hasta que ya no se observaba color naranja debido al catión DMT.

5 A continuación se secó lo anterior (succión bajo argón) y se sumergió la resina en pyr/DMF 1:3 (0,4 ml) durante 5 minutos antes de añadir una solución de reactivo de Eckstein 0,1 M en dioxano (0,1 ml). Se dejó reposar la reacción durante 15 minutos, después de lo cual se lavó la resina (dioxano, MeCN) y se secó (succión bajo argón).

10 A continuación, se sumergió la resina en una solución de bis-(tributilamino)pirofosfato 0,5 M en DMF anhidro y tri-n-butilamina durante 20 minutos y se lavó la resina (DMF, MeCN) y se secó (succión bajo argón).

Se oxidó el producto (yodo/agua/piridina/THF durante 30 minutos), se lavó (MeCN) y se secó (succión bajo argón).

15 Se eliminó el grupo protector Fmoc (piperidina al 20%/DMF, 0,5 ml, 20 minutos) y se lavó a fondo la resina (DMF, MeCN) y se secó (succión bajo argón). A continuación, se lavó con DCI y se añadió una solución de DCI/conector CEP fotolábil de aminas (1:1, 0,5 ml) y se dejó reposar la reacción durante 20 minutos. Se eliminó la solución y se lavó la resina (MeCN) y se secó (succión bajo argón). Se añadió una mezcla de cap A/cap B (1:1, 0,5 ml) y se sumergió la resina durante 5 minutos antes de eliminar los reactivos de adición de caperuza y lavar y secar la resina tal como anteriormente. Se oxidó el producto (I_2 /THF/pyr/ H_2O , 5 minutos) y se lavó y se secó la resina tal como anteriormente. El producto resultante se cortó de la resina con cNH_4OH a temperatura ambiente durante 30 minutos, después se purificó mediante HPLC de intercambio aniónico en una columna de HPLC Dionex NucleoPac100 utilizando el sistema de solventes siguiente: tampón A: NH_4Cl 0,1 M con acetonitrilo al 10%; tampón B: NH_4Cl 1 M con acetonitrilo al 10%, caudal: 2,5 ml/minuto utilizando 6Triphos.mth. Esto proporcionó 3 fracciones (A: 7 minutos, B: 7 a 9 minutos y C: 10,3 minutos). La totalidad de las 3 fracciones se liofilizó durante la noche antes de desalar mediante HPLC de fase inversa. Tampón A: agua, tampón B: acetonitrilo; caudal: 4 ml/minuto. Las 3 fracciones se liofilizaron nuevamente durante la noche antes de suspenderlas en 200 μ l de agua. La E.M. demostró que CMM661A pico 1 definitivamente no era el trifosfato, aunque podía ser CMM661 pico 2 ó 3 (perfiles de E.M. muy similares) (CMM662A se formó a partir de CMM661A pico 2 y CMM663A se formó a partir de CMM661A pico 3).

30 A continuación se utilizaron ambas muestras en la reacción posterior. Se añadieron tampón bicarbonato (10 μ l) y el éster de NHS de maleimida (50 μ l) a cada muestra y se agitaron las reacciones durante la noche. Se diluyeron las muestras con agua milliQ (500 μ l) y se filtraron. Las muestras se purificaron mediante RP-HPLC, tampón A: TEAA 0,1 M, tampón B: MeCN, caudal: 4 ml/minuto, utilizando MeCN50.mth y se llevó a cabo el acoplamiento del péptido con estas fracciones.

35 1.1.7 Síntesis de una sonda de ácidos nucleicos de proencefalina (400 pb) que incorporar dUTP modificado y etiquetado con péptido

40 Se sintetizó una sonda de ácidos nucleicos de proencefalina (400 pb) que incorporaba dUTP modificado y etiquetado con péptido que se había sintetizado anteriormente (ver la sección 1.1.6) mediante RT-PCR utilizando los cebadores convencionales directo e inverso indicados en la sección 1.1.5.

1.2 Resultados

45 1.2.1 Detección de uno o múltiples conjugados oligopéptido en diversos modos de análisis

Se analizaron los tres conjugados oligopéptido en diversos modos de análisis, separada o simultáneamente (figura 4).

50 El análisis de conjugados oligopéptido separados en modo positivo lineal (figura 4A), modo negativo lineal y modo positivo reflector demostró que los conjugados oligopéptido eran fácilmente detectables en diversos modos de análisis de MALDI.

55 También se llevaron a cabo ensayos de sensibilidad para evaluar el umbral de detección de los diversos modos de análisis de MALDI. Los umbrales observados eran de 100 fmoles, con una proporción señal/ruido de 8 en el modo positivo lineal (figura 4B) y de 1 pmol con una proporción de señal/ruido de 5 en el modo positivo reflector.

60 Los oligopéptidos 1, 2 y 3 se analizaron adicionalmente de modo simultáneo en el modo positivo lineal, modo negativo lineal y modo positivo reflector (figura 4C). En la figura 4C, para cada conjugado oligopéptido, se observaron dos picos de diferente proporción m/z. Los picos de proporción m/z más altos (m/z 1.346,95, 1.603,74 y 1.891,72, respectivamente para los péptidos 1, 3 y 2) corresponden a los péptidos fotocortados en el sitio de corte esperado (que contenían el conector fotocortable). Los picos de proporción m/z más baja (m/z 1.161,87 y 1.449,88, respectivamente para los péptidos 3 y 2) aparentemente corresponden a un posterior corte en la fase gaseosa, conduciendo a la formación de un ión protonado del péptido únicamente (sin el conector fotocortable).

65

En cualquier caso, estos resultados muestran que pueden detectarse con facilidad simultáneamente tres oligopéptidos diferentes.

La influencia del material de la placa del MALDI sobre la resolución, sensibilidad y proporción de señal/ruido se investigó utilizando placas MALDI de acero inoxidable, oro y teflón, con o sin un aditivo compuesto de citrato o acetato amónico.

Los resultados muestran que el corte del conector fotocortable resulta posible con independencia del material utilización, con o sin recubrimiento con citrato o acetato amónico.

Además, aparentemente la proporción de señal/ruido y la intensidad de las señales son más altas en las placas MALDI de oro (figura 4D).

1.2.2 Mapeado de un conjugado oligopéptido sobre un soporte sólido

Con el fin de evaluar la posibilidad de mapear un conjugado oligopéptido sobre una superficie, se dibujó la imagen de una letra X realizada con oligopéptido 3, utilizando una multipipeta sobre una placa MALDI.

A continuación, se analizó el área correspondiente, punto por punto, mediante MALDI-MS y la repartición del ión m/z 1.626,37 correspondiente al fragmento fotocortado de oligopéptido 3 bajo su forma sódica cationizada MNa^+ se reconstruyó utilizando un programa de reconstrucción de imágenes.

La figura 5 muestra la imagen reconstruida obtenida, que demuestra la posibilidad de obtener una imagen simple a partir del corte directo.

1.2.3 Síntesis de una sonda de hibridación *in situ* de proencefalina etiquetada con péptido, utilizando conjugados oligopéptido como cebadores

Con el fin de confirmar la posibilidad de sintetizar sondas de hibridación de mayor tamaño utilizando un conjugado oligopéptido como cebador directo y/o inverso, se llevaron a cabo amplificaciones de PCR utilizando cebadores etiquetados (péptido-conector fotocortable-oligonucleótido) o convencionales (sin el conector fotocortable y el grupo péptido) directo (5'-CAG-GAC-TCC-CCA-AAG-GAG-AAC-AGG-A-3') e inverso (5'-GA-CGT-ACC-AGG-CGG-TAG-CTG-CAT-TT-3').

Los productos de amplificación resultantes se muestran en la figura 6A. Los resultados obtenidos muestran que la utilización de cebadores etiquetados con péptido directo y/o inverso no inhiben la amplificación y resultan en una sonda de hibridación *in situ* de proencefalina de aproximadamente 400 pb.

Tras la purificación en una columna de sílice, se eliminaron los dímeros de cebadores no amplificados y se obtuvieron los productos puros de amplificación de PCR (figura 6B).

Se llevó a cabo el análisis de MALDI de estos productos purificados mediante amplificación por PCR. Los resultados obtenidos con cebadores etiquetados tanto directos como inversos (figura 6C) y con cebadores etiquetado directo y convencional inverso (figura 6D) demuestran que, a pesar de la presencia de cantidades significativas de PEG, la péptido etiqueta resulta cortada y puede detectarse. En efecto, aunque la proporción m/z del péptido cortado ($m/z=1.704$) puede, en algunos casos, atribuirse a una señal de PEG, el ión característico $(M-NH_2)^+$ con una proporción m/z de 1.720 puede detectarse fácilmente.

1.2.4 Análisis de ARNm de proencefalina en una sección desparafinada de cerebro de rata utilizando una sonda de hibridación etiquetada con péptido

Se llevó a cabo la hibridación *in situ* en una sección desparafinada de cerebro de rata utilizando una sonda de hibridación etiquetada con péptido, tal como se ha descrito anteriormente.

A continuación, se llevó a cabo el análisis MALDI en diferentes localizaciones del tejido y se analizaron los espectros resultantes.

La figura 7 muestra los espectros obtenidos en dos localizaciones diferentes de la sección cerebral (figuras 7A y B), así como un espectro de control obtenido mediante el análisis de una sección cerebral de control que se había hibridado con una sonda de hibridación no etiquetada con péptido.

El espectro de control muestra que no se detectó ninguna señal en las proporciones m/z del péptido cortado ($m/z=1.704$) o del ión característico ($m/z=1.720$) al utilizar una sonda de hibridación no etiquetada con péptido.

En contraste, la expresión de ARNm de proencefalina podía identificarse claramente en la localización de la sección cerebral de la figura 7A (ver los picos en $m/z=1.704$ y 1.720), mientras que no podía detectarse expresión de ARNm de proencefalina en la segunda localización diferente (figura 7B, ningún pico en $m/z=1.704$ ó 1.720).

- 5 De esta manera, puede realizarse un claro seguimiento de la expresión de ARNm de la proencefalina en diferentes puntos de la sección de tejido, permitiendo de esta manera reconstruir adicionalmente una imagen de la expresión de ARNm de proencefalina de la sección de tejido.

10 1.2.5 Síntesis de un conjugado dUTP-péptido con un conector fotocortable y utilización de dicho dUTP modificado y etiquetado con péptido, para generar una sonda (400 pb) de proencefalina etiquetada con múltiples péptidos

De esta manera, mediante el protocolo de síntesis descrito en la sección de materiales y métodos, se sintetizó un nucleótido dUTP modificado y etiquetado con péptido, con la fórmula mostrada en la figura 8A.

- 15 El dUTP modificado y etiquetado con péptido se analizó mediante análisis MALDI con el fin de confirmar la detección de la péptido etiqueta. Tal como se muestra en la figura 8B, la péptido etiqueta se detecta claramente en $1.163,23 M+H^+$.

20 Mediante la utilización de dicho dUTP modificado y etiquetado con péptido, se generó muy sencillamente una sonda de hibridación de ácidos nucleicos etiquetada con múltiples péptidos para la proencefalina, utilizando una simple amplificación por RT-PCR en presencia de dATP, dCTP, dGTP y el dUTP modificado y etiquetado con péptido, tal como se muestra en la figura 8A. De esta manera, pudo sintetizarse fácilmente una sonda de hibridación específica para cualquier otra secuencia de ARNm diana.

- 25 Con el fin de confirmar que el dUTP modificado y etiquetado con péptido se incorporaba fácilmente en la sonda de proencefalina, se analizó mediante análisis MALDI el producto de PCR purificado de proencefalina amplificado con dUTP modificado y etiquetado con péptido o un dUTP no modificado y sin etiqueta.

30 Tal como se muestra en la figura 8, la péptido etiqueta se detecta fácilmente en la muestra de proencefalina amplificada con dUTP modificado y etiquetado con péptido en el punto esperado $1.163,06 M+H^+$ (figura 8C), mientras que no se detectó ninguna señal a la $M+H^+$ esperada en la muestra de proencefalina amplificada con un dUTP no modificado y sin etiqueta (figura 8D).

35 Además, la utilización de un dUTP modificado y etiquetado con péptido permite la amplificación de señales debido a que una sonda de hibridación dada sintetizada con dUTP modificado y etiquetado con péptido portará tantos péptidos etiqueta como bases de U presentes en su secuencia.

40 Finalmente, la utilización de sondas de hibridación sintetizadas con dUTP modificado y etiquetado con péptido permite un análisis cuantitativo de la expresión de ARNm en secciones de tejido. Efectivamente, la señal generada por la etiqueta o etiquetas correspondientes de uno o varios ARNm estudiados puede compararse con la obtenida para una secuencia de ARNm de referencia (por ejemplo un gen de mantenimiento, tal como el gen actina o HPRT). Debido a que se conoce el número de bases U en cada sonda de hibridación, puede calcularse la proporción de expresión entre cada secuencia de ARNm estudiada y la secuencia de ARNm de referencia.

45 *1.3 Conclusión*

Estos resultados demuestran claramente la posibilidad de utilizar conjugados de ácido nucleico-conector fotocortable-péptido para la detección simultánea indirecta de múltiples moléculas diana de ARNm en secciones de tejido, utilizando sondas de hibridación sintetizadas con cebadores etiquetados con péptido.

50 Además, se ha sintetizado un dUTP modificado y etiquetado con péptido que permite una síntesis más sencilla de las sondas de hibridación etiquetadas con péptido con cualquier especificidad de ARNm diana, una señal de etiqueta amplificada, reduciendo de esta manera el umbral de detección y la posibilidad de realizar un análisis cuantitativo de la expresión de ARNm en secciones de tejido.

55 De esta manera, el mapeado simultáneo indirecto de varias moléculas diana de ARNm diferentes en secciones de tejido utilizando el análisis MALDI-MS ahora resulta posible, con un umbral de detección más bajo, el posible análisis multiplex e incluso el posible análisis cuantitativo.

60 **Ejemplo 2**

Utilización de un conjugado de anticuerpo-péptido con un conector fotocortable para la detección indirecta de una proteína en secciones de tejido mediante MALDI-MS

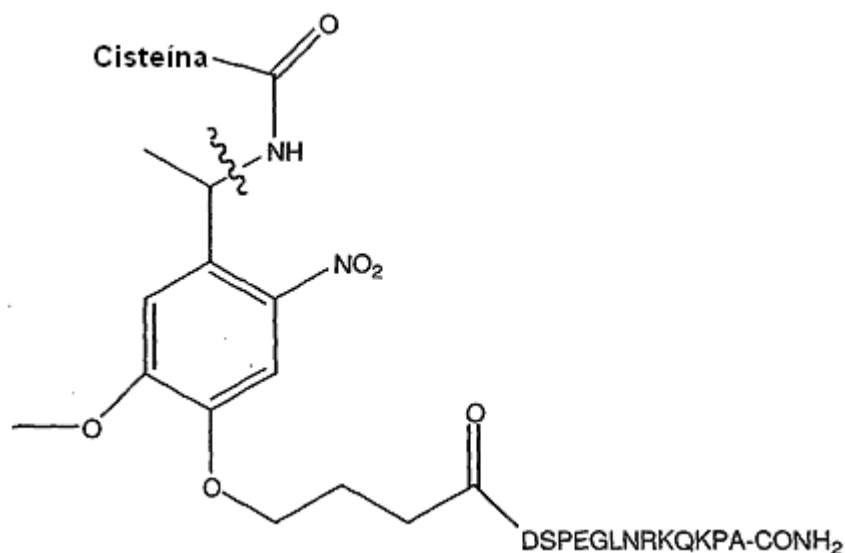
65 Se sintetizó un conjugado de anticuerpo-péptido con un conector fotocortable y se sometió a ensayo para su capacidad de permitir la detección indirecta de una proteína específica en secciones de tejido mediante MALDI-MS.

2.1 Síntesis del conjugado de anticuerpo-péptido

Se ha utilizado un anticuerpo de cabra específico para la región de marco de anticuerpos de conejo (anticuerpo de cabra anticonejo) para sintetizar un conjugado de anticuerpo-péptido con un conector que resulte fotocortable a la longitud de onda del láser UV-MALDI. De esta manera, el conjugado resulta adecuado como anticuerpo secundario para el análisis indirecto de cualquier péptido, proteína, antígeno o hapteno para el que se encuentre disponible un anticuerpo primario de conejo. Además, debe indicarse que el protocolo de síntesis descrito posteriormente resulta aplicable a cualquier anticuerpo de cualquier especificidad, incluyendo cualquier péptido, proteína, antígeno o hapteno, de manera que otros conjugados en los que el anticuerpo resulte específico para otro tipo de anticuerpo o para cualquier péptido, proteína, antígeno o hapteno deseable pueden sintetizarse fácilmente utilizando el protocolo descrito posteriormente.

A modo de molécula de etiqueta se utilizó un péptido que presentaba la fórmula siguiente: DSPEGLNRKQKPA (SEC ID n° 11). Sin embargo, también en este caso resulta aplicable el protocolo descrito posteriormente a cualquier otro péptido que deseablemente pueda ser una molécula de etiqueta.

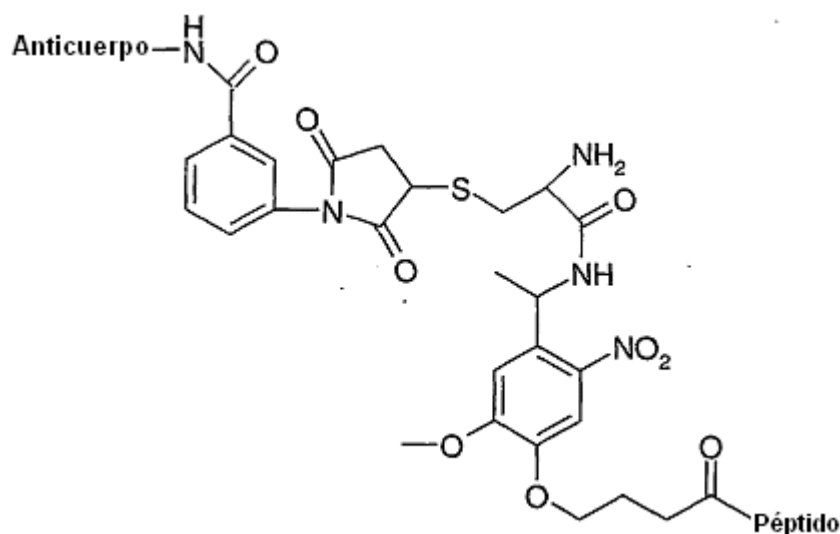
El péptido se sintetizó en fase sólida y se acopló directamente al conector fotocortable, resultando en un compuesto de péptido fotocortable de fórmula:



El conjugado de anticuerpo-péptido se sintetizó utilizando las etapas de reacción siguientes:

1. Síntesis del péptido en fase sólida con el conector fotocortable (estrategia clásica de Fmoc).
2. Purificación del péptido utilizando RP-HPLC (C18) utilizando agua/acetonitrilo + TFA al 0,5%.
3. Disolución de 0,5 mg de MBS en 300 µl de DMF.
4. Disolución de 4 mg de IgG (de cabra anticonejo) en 2 ml de PBS.
5. Mezcla lenta de los productos 3 y 4. La reacción se realizó bajo agitación durante 30 minutos a 20°C.
6. Eliminación de las sales utilizando PD10 con tampón fosfato 50 mM, pH 6.
7. Disolución de 1 mg del péptido en 300 µl de DMF y después adición de 1 ml de PBS.
8. Adición de esta solución de péptido a solución del anticuerpo activo; la reacción se realiza bajo agitación durante 3 horas a 20°C en la oscuridad.
9. Se eliminó el PBS mediante diálisis durante la noche.

Las reacciones principales para la síntesis del conjugado de anticuerpo-péptido con un conector fotocortable se muestran en la figura 9. El conjugado de anticuerpo-péptido obtenido presentaba la fórmula siguiente:



que se muestra en forma abreviada en la figura 10.

5 2.2 Análisis MALDI del conjugado de anticuerpo-péptido obtenido en solución

El conjugado de anticuerpo-péptido obtenido con un conector fotocortable se sometió a ensayo en solución en primer lugar, con el fin de verificar la capacidad del péptido etiqueta de ser cortado eficientemente mediante fotodisociación inducida por el láser UV-MALDI.

Se muestran los resultados en la figura 10, e indican claramente que el péptido etiqueta, todavía unido al conector fotocortable PC (péptido + PC, $m/z=1.703$), se detecta fácilmente tras el procedimiento de desorción/ionización MALDI.

Además, también se detecta un fragmento de fragmentación rápida que comprende el péptido etiqueta, el conector fotocortable y una cisteína inicialmente perteneciente al anticuerpo (ver la figura 11) (péptido + PC + cisteína, $m/z=1.822$), demostrando claramente que el conjugado de anticuerpo-péptido obtenido también resultaría adecuado para otro tipo de análisis mediante espectrometría de masas (tal como SIMS o DESI) de una sección de tejido.

20 2.3 Análisis directo MALDI de secciones de tejido cerebral de rata utilizando el conjugado de anticuerpo-péptido obtenido

El conjugado de anticuerpo-péptido obtenido con un conector fotocortable se sometió a continuación a ensayo para el análisis UV-MALDI indirecto de la proteína membranal carboxipeptidasa D (180 kDa) en secciones de tejido cerebral de rata.

En primer lugar se hibridaron las secciones de tejido cerebral de rata con un anticuerpo primario de conejo específico para la carboxipeptidasa D. En una segunda etapa, se añadió el conjugado de anticuerpo-péptido con un conector fotocortable para hibridarlo con anticuerpos primarios presentes en la sección de tejido.

Las secciones de tejido teñidas resultantes se analizaron a continuación mediante UV-MALDI.

Se muestra un espectro típico en la figura 12. Indica claramente que la péptido etiqueta, todavía unida al conector fotocortable PC (péptido + PC, $m/z=1.703,23$) se detecta fácilmente utilizando el análisis indirecto UV-MALDI de secciones de tejido. También se detecta fácilmente otro fragmento correspondiente al péptido etiqueta (péptido + PC+O, $m/z=1.686,43$).

Mediante la utilización del método según la invención, se escaneó la sección de tejido cerebral de rata, se almacenó cada dato espectral y se construyó la imagen del mapa de expresión de la carboxipeptidasa D. Se muestra el resultado en la figura 13, que demuestra claramente que resulta posible construir un mapa de expresión mediante el método según la invención con un conjugado de anticuerpo-péptido y un conector fotocortable.

Además, con el fin de demostrar adicionalmente la fiabilidad del método según la invención para construir mapas de expresión, la sección de tejido cerebral de rata teñida con anticuerpos primarios de conejo específicos para la carboxipeptidasa D se reveló utilizando T-cloronaftol como cromógeno tras la fijación con un anticuerpo secundario comercial clásico. La tinción obtenida se colocalizaba con la detección MALDI de la carboxipeptidasa D (datos no

mostrados), demostrando de esta manera la fiabilidad del método según la invención, demostrándose que las imágenes de MALDI eran incluso más sensibles que el revelado clásico.

Estos resultados demuestran que el conjugado de anticuerpo-péptido sintetizado con un conector fotocortable permite la detección indirecta de una proteína en una sección de tejido, así como la construcción de un mapa de expresión.

Ejemplo 3

Demostración de la posibilidad de utilización de la fragmentación rápida en lugar de la fotodisociación para el análisis indirecto de espectrometría de masas de moléculas biológicas presentes en secciones de tejido

La fragmentación rápida habitualmente se considera un fenómeno degenerativo aunque inevitable.

En el presente caso, se ha descubierto que resulta posible aprovechar este fenómeno inevitable para implementar un método para determinar un mapa de por lo menos una molécula diana en una sección de tejido utilizando conjugados (A-X)_n-B en los que el conector X se corta mediante fragmentación rápida.

3.1 Fragmentación rápida para el análisis indirecto de espectrometría de masas de moléculas biológicas presentes en secciones de tejido utilizando conjugados en los que el conector es fotocortable a la longitud de onda de un láser US-MALDI

Aunque este concepto es aplicable a otras técnicas de espectrometría de masas, tales como la espectrometría de masas SIMS o DESI, se ha demostrado por primera vez la posibilidad de utilizar este concepto utilizando la espectrometría de masas MALDI y conjugados en los que el conector es fotocortable a la longitud de onda de un láser UV-MALDI.

Efectivamente, al utilizar los conjugados oligopéptido o conjugados de anticuerpo-péptido con conectores fotocortables (PC), además de fragmentos esperados (péptido+PC), se observan otros fragmentos que comprenden el péptido etiqueta, correspondiendo estos fragmentos a fragmentos de fragmentación rápida de los conjugados.

Más exactamente, al utilizar 3 conjugados oligopéptido diferentes con conectores fotocortables (ver el Ejemplo 1 para una definición más exacta de estos conjugados), se observan los fragmentos correspondientes a los péptidos etiqueta 1, 2 ó 3 además de los fragmentos esperados (péptidos 1, 2 ó 3 + PC), tal como se muestra claramente en la figura 4C. Por ejemplo, para el conjugado 2 utilizando una molécula de péptido etiqueta 2, se observa tanto un fragmento de fotodisociación como un fragmento de fragmentación rápida:

- fragmento de fotodisociación esperado=(péptido 2 + PC), $m/z=1.892$, y

- fragmento de fragmentación rápida=péptido 2 únicamente, $m/z=1.450$.

El mismo fenómeno era observable para el conjugado 3 en la figura 4C:

- fragmento de fotodisociación esperado=(péptido 3 + PC), $m/z=1.604$, y

- fragmento de fragmentación rápida=péptido 3 únicamente, $m/z=1.162$.

Al utilizar también el conjugado de anticuerpo-péptido indicado en el Ejemplo 2, se observaron tanto un fragmento de fotodisociación esperado como un fragmento de fragmentación rápida, tal como se muestra en la figura 11:

- fragmento de fotodisociación esperado (péptido + PC), $m/z=1.702$, y

- fragmento de fragmentación rápida=péptido + PC + cisteína, $m/z=1.822$.

3.2 Fragmentación rápida para el análisis indirecto de espectrometría de masas de moléculas biológicas presentes en secciones de tejido utilizando un anticuerpo marcado con FITC

Se analizó asimismo la posibilidad de utilizar la fragmentación rápida para el análisis indirecto de espectrometría de masas de moléculas biológicas presentes en secciones de tejido utilizando anticuerpos marcados convencionales, y notablemente comerciales.

Efectivamente, las moléculas de marcado convencionales presentan pesos moleculares definidos y de esta manera pueden utilizarse como moléculas de etiqueta. Además, se encuentran disponibles comercialmente como anticuerpos marcados todos los tipos de anticuerpo, con un abanico muy amplio de especificidades antigénicas. Finalmente, las técnicas para unir una molécula de marcado mediante conectores convencionales a cualquier anticuerpo son técnicas rutinarias bien conocidas, garantizando de esta manera que la posibilidad de utilizar

anticuerpos convencionalmente marcados para el análisis indirecto de espectrometría de masas de moléculas biológicas presentes en secciones de tejido permitiría ampliar significativamente el número de moléculas biológicas diferentes que pueden mapearse mediante el método según la invención.

- 5 Se utilizó un anticuerpo marcado con FITC para el análisis de MALDI en solución de un anticuerpo marcado con FITC utilizando una matriz de CHCA.

Se muestran los resultados en la figura 14, y demuestran que se detecta fácilmente una señal característica para la molécula de FITC ($m/z=365,18$). Debido a que el conector entre el anticuerpo y la molécula de FITC no es fotocortable a la longitud de onda del láser MALDI, demuestra claramente que la fragmentación rápida permite el corte del enlace entre el anticuerpo y su molécula de marcado.

Aunque estos resultados todavía deben confirmarse en secciones de tejido, todos los resultados anteriores obtenidos en solución se han confirmado posteriormente en secciones de tejido. De esta manera, estos resultados confirman la posibilidad de utilizar la fragmentación rápida y los anticuerpos marcados convencionales para la detección indirecta de moléculas diana en secciones de tejido utilizando la espectrometría de masas MALDI, aunque también pueden utilizarse otras técnicas de espectrometría de masas que implican la fragmentación rápida, y notablemente la espectrometría de masas SIMS o DESI.

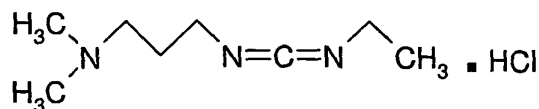
20 3.3 Conclusión

Los resultados obtenidos demuestran claramente la posibilidad de aprovechar el fenómeno habitualmente degenerativo de la fragmentación rápida para la detección indirecta de moléculas diana en secciones de tejido utilizando diversas técnicas de espectrometría de masas, en particular la espectrometría de masas MALDI, SIMS o DESI.

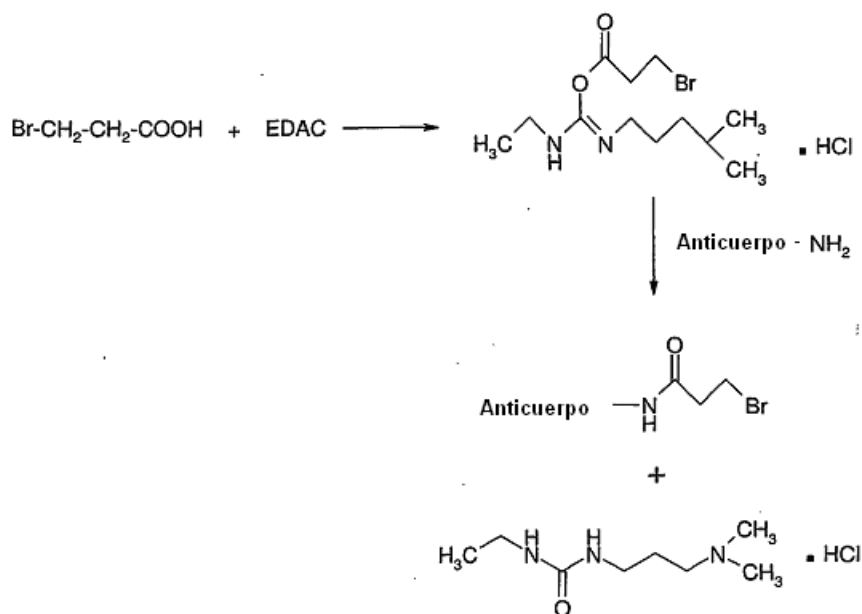
Ejemplo 4

Síntesis de un conjugado de anticuerpo-Br para la utilización en el análisis de espectrometría de masas de secciones de tejido utilizando la fragmentación para cortar la molécula conectora entre el anticuerpo y el átomo de Br

Puede sintetizarse un conjugado de anticuerpo-Br utilizando el conector EDAC:



disponible de SIGMA con el número de referencia E1769, mediante el protocolo siguiente:



Dicho protocolo puede aplicarse con cualquier anticuerpo o fragmento de anticuerpo, para conjugarlo con un átomo de Br. Dichos conjugados pueden utilizarse en un método según la invención en el que se utilice la fragmentación para cortar el conector entre el anticuerpo y el átomo de Br.

5 Listado de secuencias

<110> CNRS
UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE EUROGENTEC SA
FOURNIER, Isabelle

10 LEMAIRE, Rémi
DESCHAMPS, Michel
SALZET, Michel
TABET, Jean-Claude

15 PROESS, Gottfried
RUDLOFF, Ivo
LEMAITRE, Marc

<120> Utilización de conjugados con moléculas conectoras fotocortables mediante fotodisociación o fragmentación para el análisis de espectrometría de masas de las secciones de tejido

20 <130> 349763-D23437

<150> US 60/687,848
<151> 7 de junio de 2005

25 <160> 11

<170> PatentIn versión 3.1

30 <210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial '

35 <220>
<223> péptido etiqueta del oligopéptido 1
<400> 1

Gly Arg Ala Leu Gly Val Phe Val Cys
1 5

40 <210> 2
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial

45 <220>
<223> péptido etiqueta del oligopéptido 2

50 <400> 2

Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met Cys
1 5 10

55 <210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial

60 <220>
<223> péptido etiqueta del oligopéptido 3

<400> 3

Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg Cys
1 5 10

<210> 4

5 <211> 10

<212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> péptido etiqueta del oligopéptido directo

<400> 4

Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg Cys
1 5 10

15

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial

20

<220>

<223> péptido etiqueta del oligopéptido inverso

<400> 5

25

Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg Cys
1 5 10

<210> 6

<211> 18

<212> ADN

30 <213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido del oligopéptido 1

35

<400> 6

cacgtacagg atgtacag

18

<210> 7

<211> 17

40 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido del oligopéptido 2

45

<400> 7

tcgagaggtg catcgtg

17

<210> 8

50 <211> 17

<212> ADN

<213> artificial

<220>

55 <223> oligonucleótido del oligopéptido 3

	<400> 8 aagcggtacg agtagca	17
5	<210> 9 <211> 25 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido del oligopéptido directo	
	<400> 9 gacgtaccag gcggtagctg cattt	25
15	<210> 10 <211> 25 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> oligonucleótido del oligopéptido inverso	
25	<400> 10 caggactccc caaaggagaa cagga	25
30	<210> 11 <211> 13 <212> PRT <213> artificial	
	<220> <223> péptido etiqueta del conjugado de anticuerpo-péptido	
35	<400> 11 Asp Ser Pro Glu Gly Leu Asn Arg Lys Gln Lys Pro Ala 1 5 10	13

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar un mapa de por lo menos una molécula diana en una sección de tejido, que comprende:

a) hibridar dicha sección de tejido con por lo menos un conjugado (A-X)_n-B, en el que:

- A es una molécula de etiqueta de peso molecular conocido,
- X es un conector que es fotocortable a la longitud de onda de un láser MALDI,
- n es un número entero de por lo menos 1,
- B es una molécula de unión que se une específicamente a dicha molécula diana, y
- cada molécula B diferente es conectada a una molécula de etiqueta A diferente,

b) escanear la superficie de la sección de tejido y analizar cada punto adyacente con un espectrómetro de masas MALDI, en el que el láser MALDI se utiliza tanto para liberar la molécula de etiqueta A como para inducir la ionización de la muestra, y en el que los datos resultantes de cada punto se guardan; y

c) analizar los datos obtenidos en la ventana o ventanas de masa molecular de cada molécula de etiqueta diferente con el fin de crear tantos mapas de la sección de tejido como el número de moléculas diana estudiadas diferentes.

2. Método según la reivindicación 1, en el que cada molécula diana se selecciona independientemente de entre el grupo constituido por ácidos nucleicos, en particular moléculas de ARNm, péptidos, proteínas, en particular receptores y ligandos, anticuerpos, antígenos, aptámeros, haptenos y compuestos orgánicos.

3. Método según la reivindicación 2, en el que por lo menos una molécula diana es una molécula de ARNm.

4. Método según la reivindicación 2, en el que por lo menos una molécula diana es un péptido, una proteína, un antígeno o un hapteno.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que cada molécula B que se une específicamente a una molécula diana se selecciona independientemente de entre el grupo constituido por ácidos nucleicos, particularmente oligonucleótidos, péptidos, proteínas, en particular receptores y ligandos, anticuerpos, antígenos, haptenos y compuestos orgánicos.

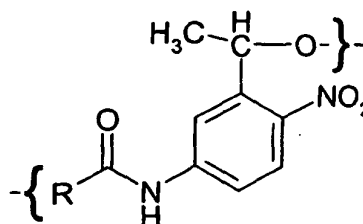
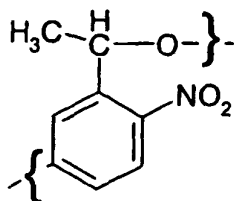
6. Método según la reivindicación 5, en el que cada molécula B que se une específicamente a un ácido nucleico diana es una sonda de ácidos nucleicos con una secuencia que es complementaria a dicha secuencia de ARNm diana.

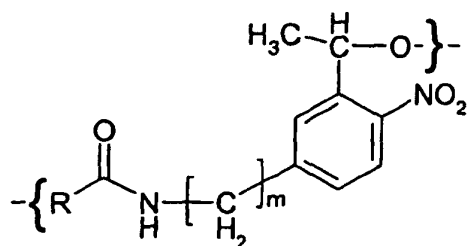
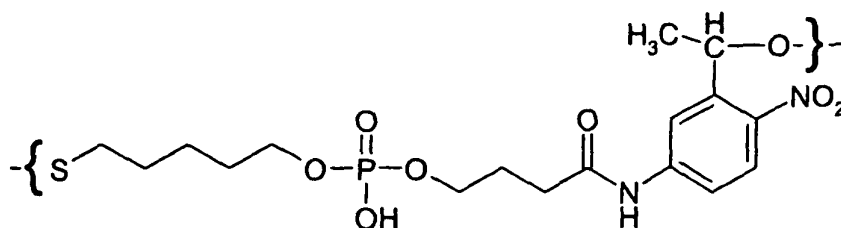
7. Método según la reivindicación 5, en el que cada molécula B que se une específicamente a un péptido, proteína, antígeno o hapteno diana es un anticuerpo dirigido contra dicho péptido, proteína, antígeno o hapteno.

8. Método según cualquiera de la reivindicaciones 1 a 7, en el que cada molécula de etiqueta A se selecciona de entre el grupo constituido por péptidos, ácidos nucleicos, azúcares, polímeros, lípidos y compuestos orgánicos.

9. Método según la reivindicación 8, en el que por lo menos una molécula de etiqueta A es un péptido.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la molécula conectora X comprende una fracción seleccionada de entre el grupo constituido por:



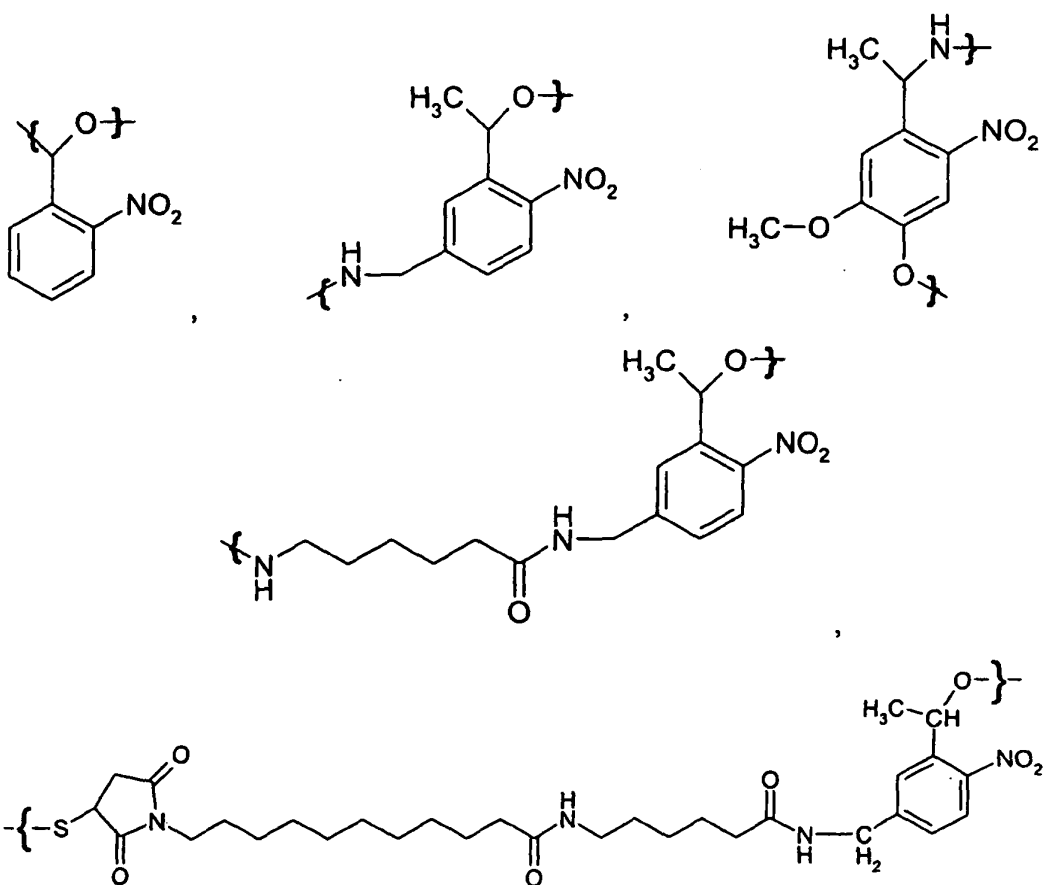
 y 

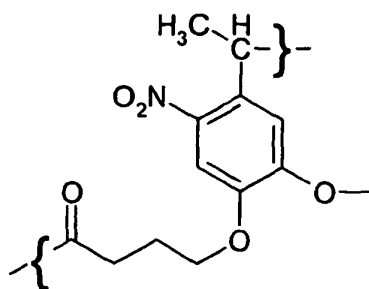
5

en el que R es un grupo alquilo C₁-C₆ y m es un número entero comprendido entre 1 y 4.

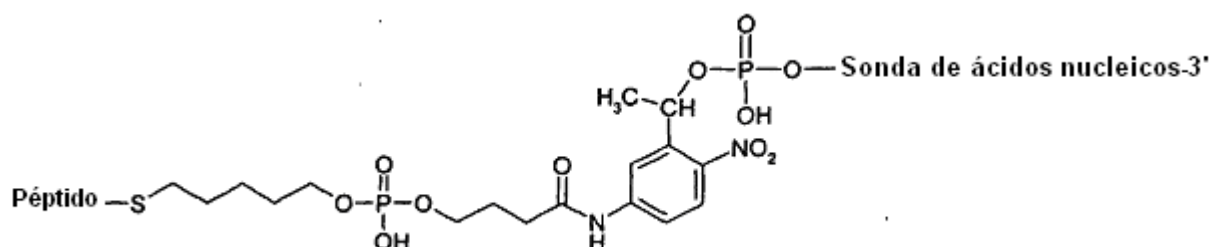
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la molécula conectora X comprende una fracción seleccionada de entre el grupo constituido por:

10

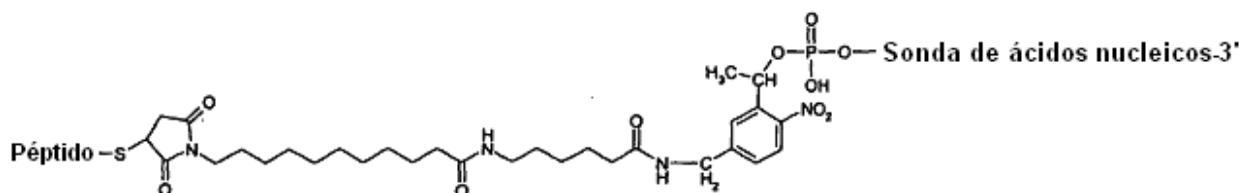
 y



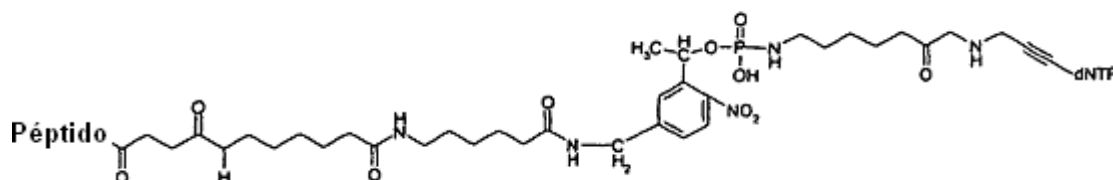
- 5 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la molécula o moléculas diana son moléculas de ARNm, la molécula o moléculas de unión B son sondas de ácidos nucleicos con una secuencia complementaria a las secuencias de ARNm, la molécula o moléculas de etiqueta A son péptidos, n es 1 y el conjugado o conjugados (A-X)-B presentan la estructura siguiente:



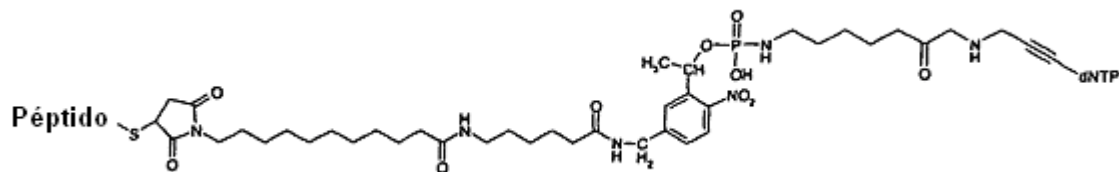
- 10 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la molécula o moléculas diana son moléculas de ARNm, la molécula o moléculas de unión B son sondas de ácidos nucleicos con una secuencia complementaria a las secuencias de ARNm, la molécula o moléculas de etiqueta A son péptidos, n es 1 y el conjugado o conjugados (A-X)-B presentan la estructura siguiente:



- 15 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la molécula o moléculas diana son moléculas de ARNm, la molécula o moléculas de unión B son sondas de ácidos nucleicos con una secuencia complementaria a las secuencias de ARNm, la molécula o moléculas de etiqueta A son péptidos, n es superior a 1 y la sonda o sondas de ácidos nucleicos comprenden por lo menos una base modificada de la estructura siguiente:



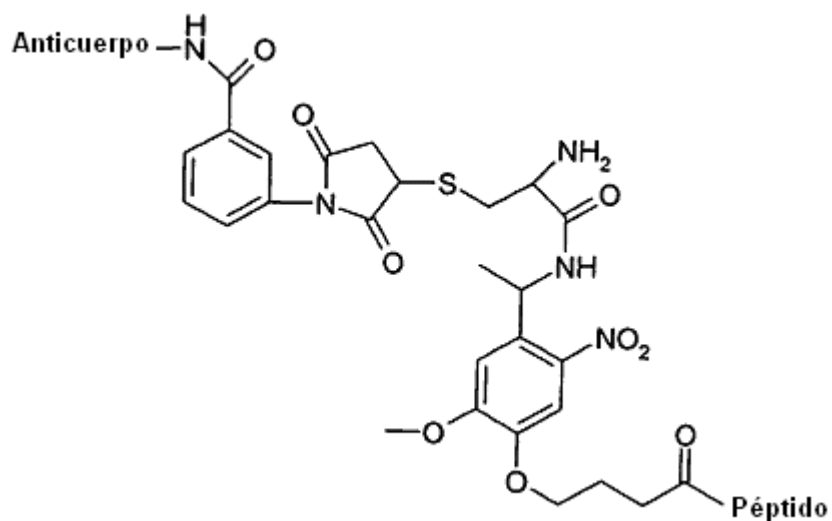
- 25 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la molécula o moléculas diana son moléculas de ARNm, la molécula o moléculas de unión B son sondas de ácidos nucleicos con una secuencia complementaria a las secuencias de ARNm, la molécula o moléculas de etiqueta A son péptidos, n es superior a 1 y la sonda o sondas de ácidos nucleicos comprenden por lo menos una base modificada de la estructura siguiente:



16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que se mapean por lo menos 5 moléculas de ARNm diferentes en la sección de tejido.

5 17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, que comprende además una etapa d) que consiste en analizar los datos obtenidos en las ventanas de masa molecular de cada proteína correspondiente a cada molécula de ARNm con el fin de crear el mapa de expresión de cada proteína correspondiente de la sección de tejido.

10 18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la molécula o moléculas diana son uno o más péptidos, proteínas o haptenos, la molécula o las moléculas de unión B son anticuerpos dirigidos contra dichas moléculas diana, la molécula o las moléculas de etiqueta A son péptidos, n es 1 y el conjugado o los conjugados (A-X)-B presentan la estructura siguiente:



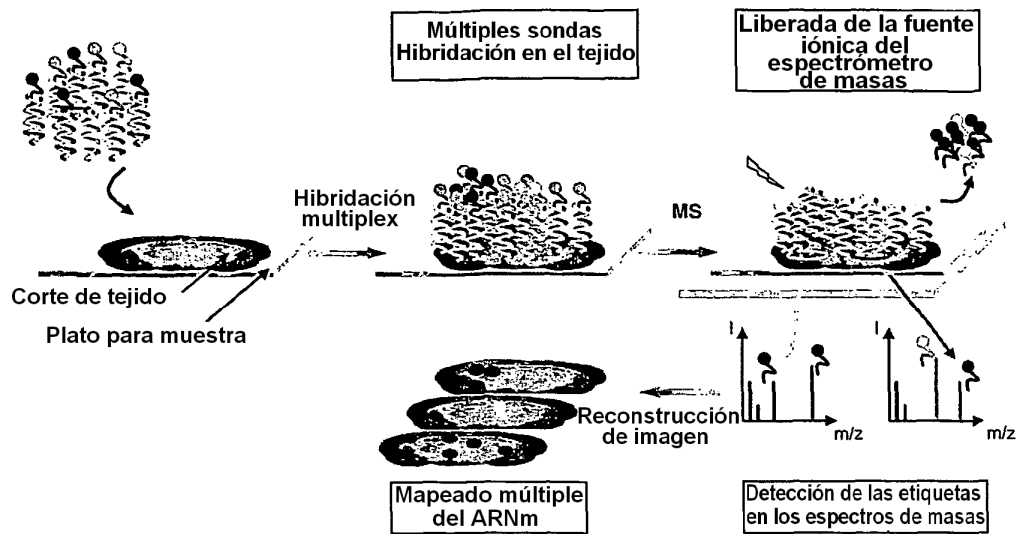


Figura 1

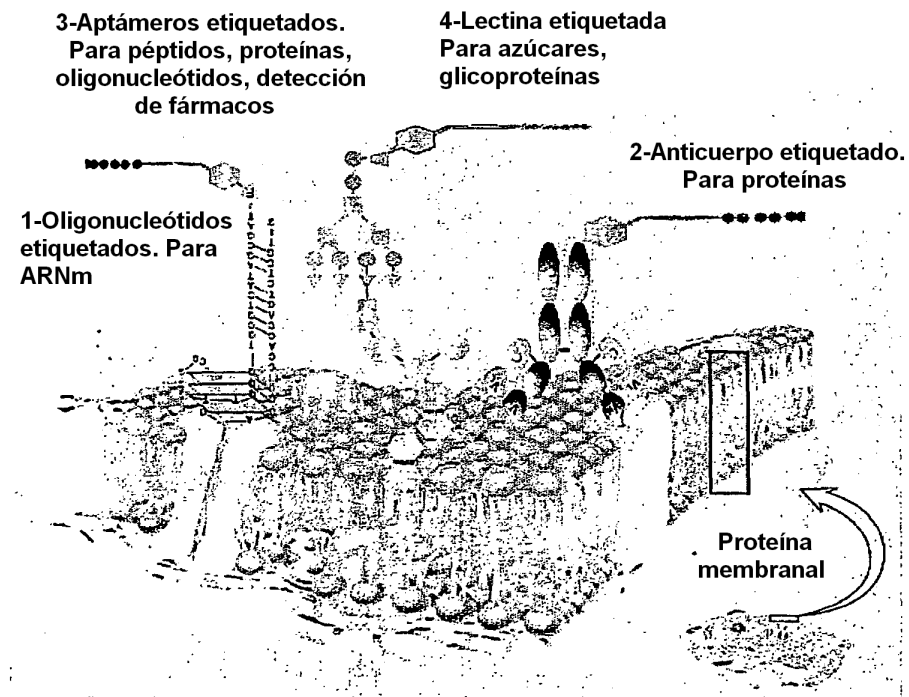


Figura 2

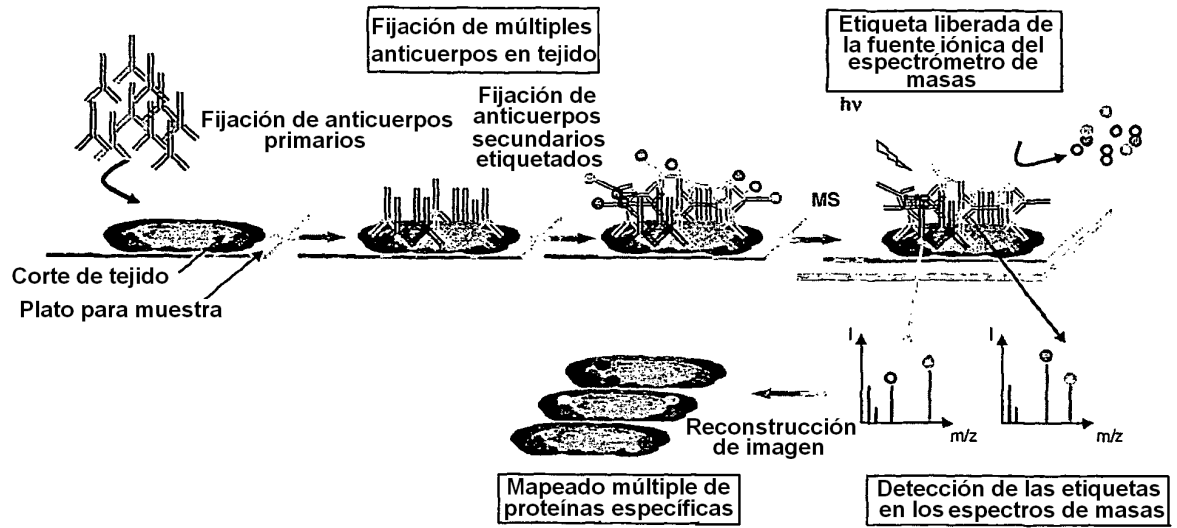


Figura 3

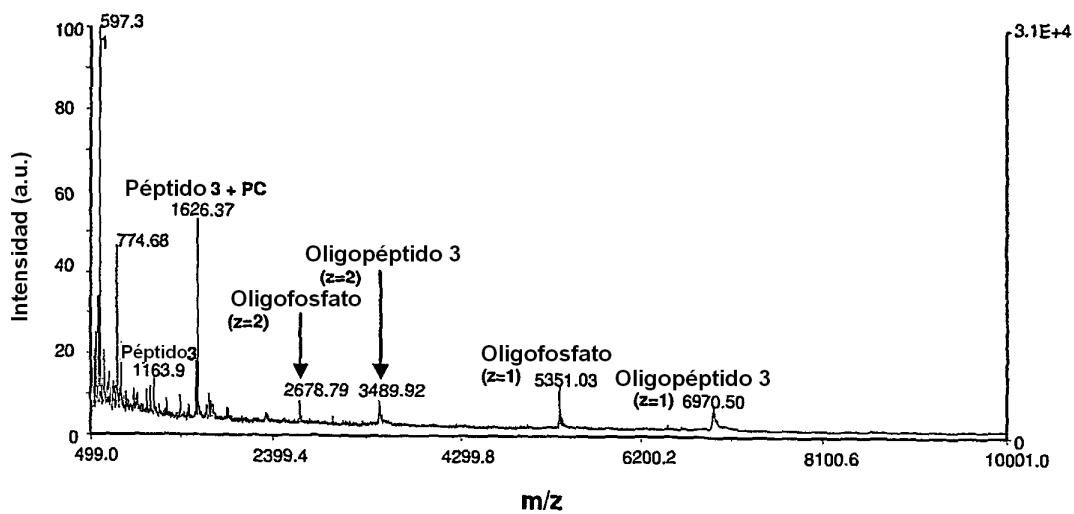


Figura 4A

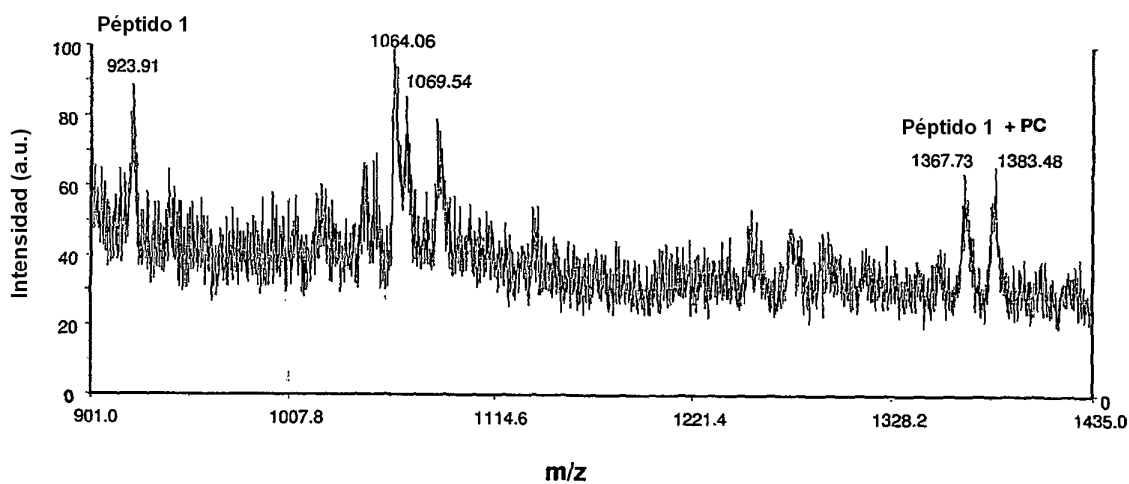


Figura 4B

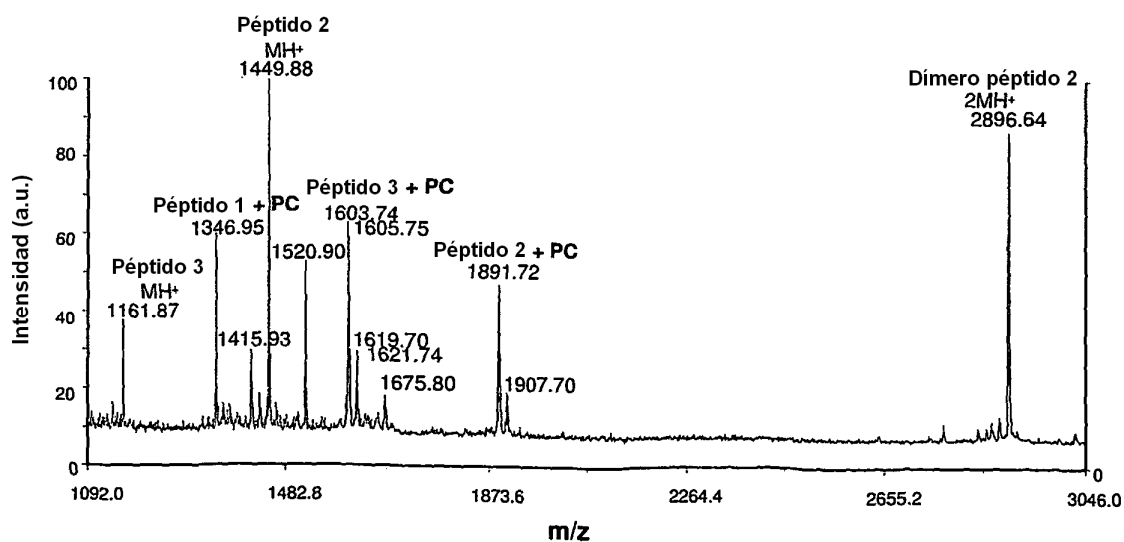


Figura 4C

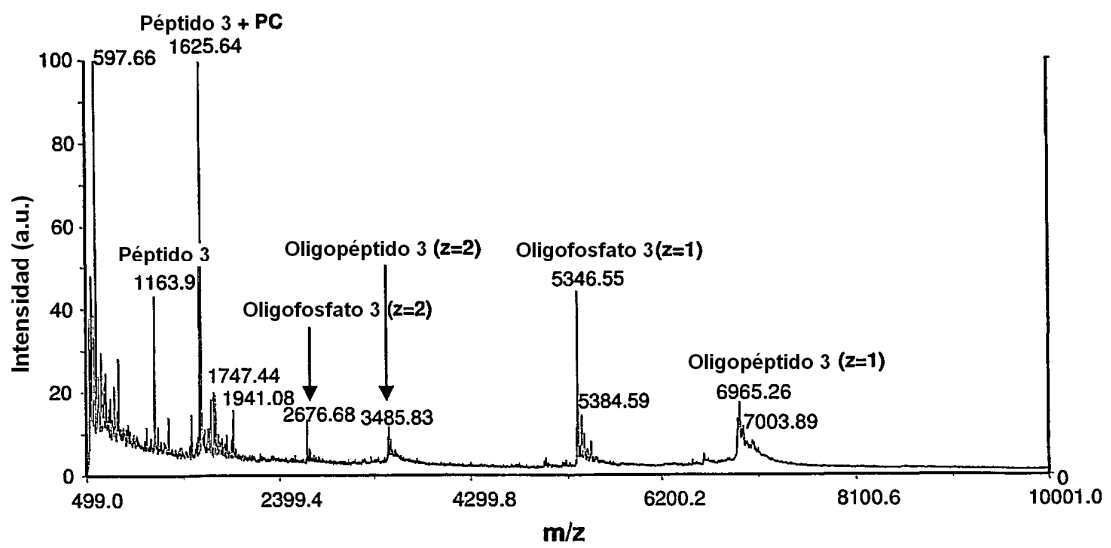


Figura 4D

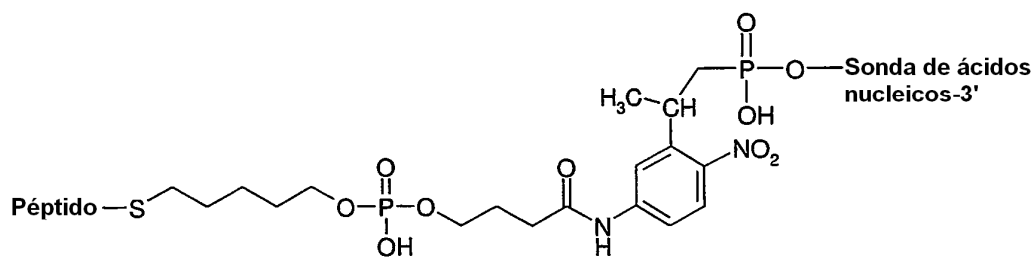


Figura 4E

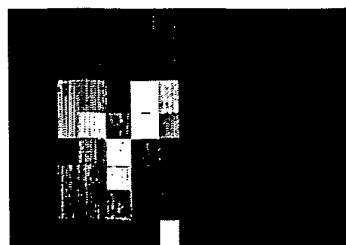


Figura 5

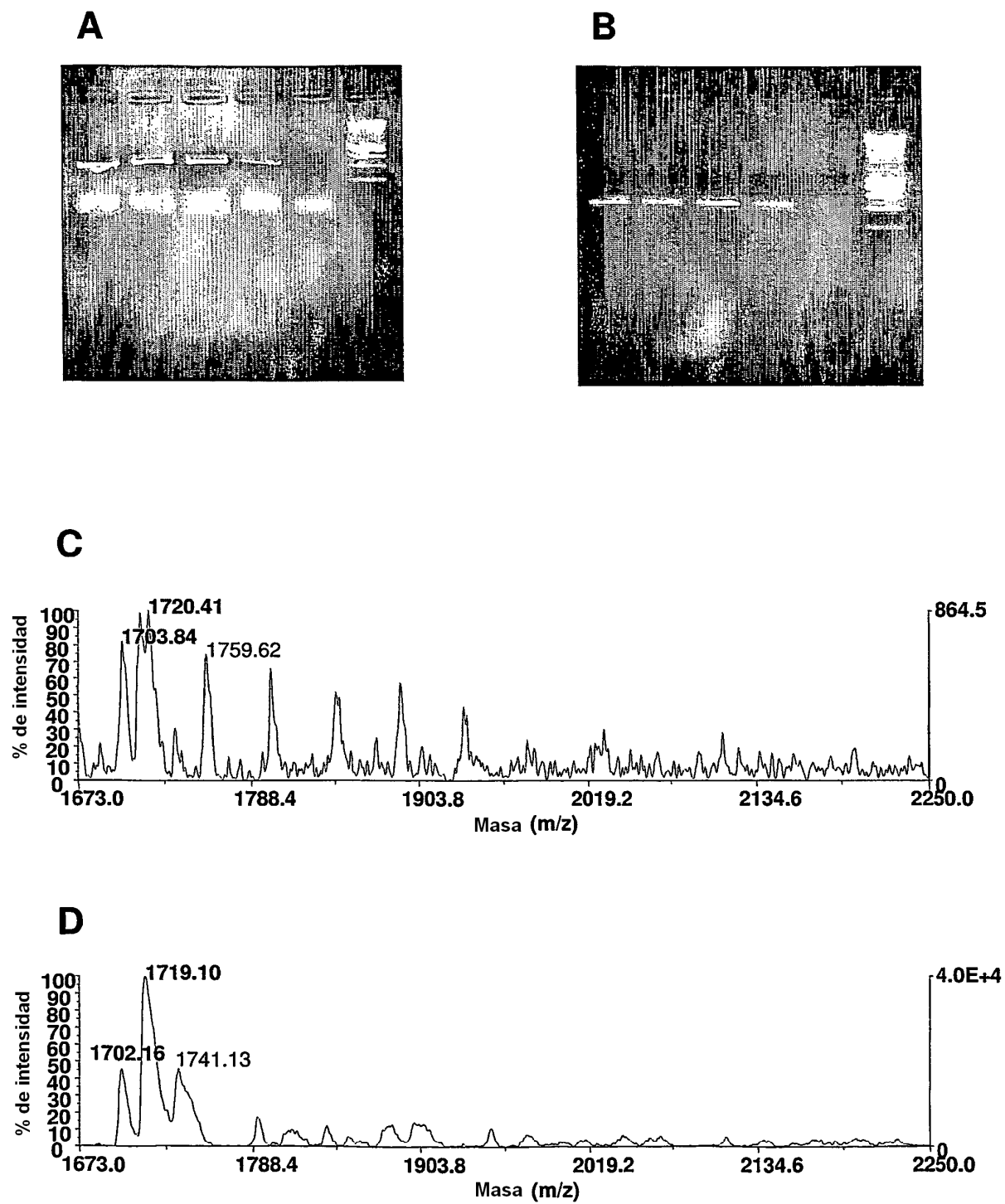
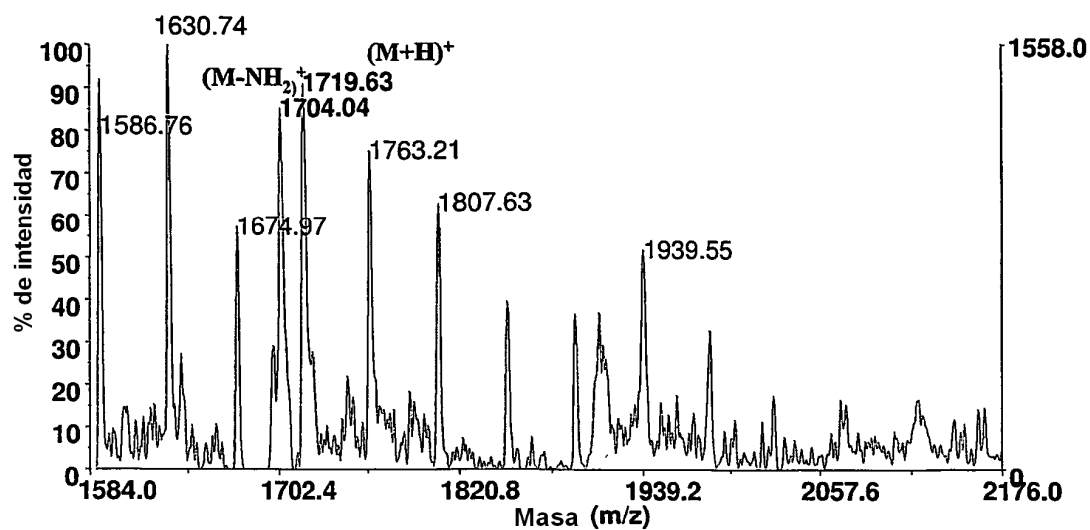
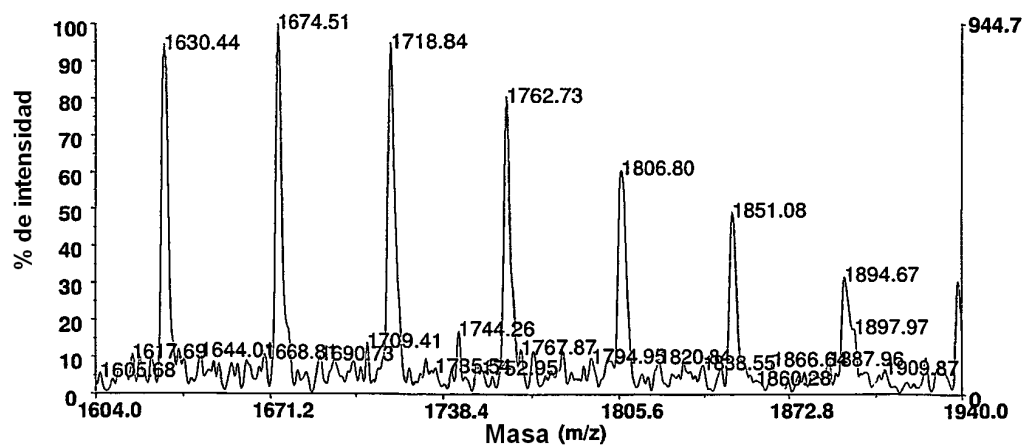


Figura 6

A



B



C

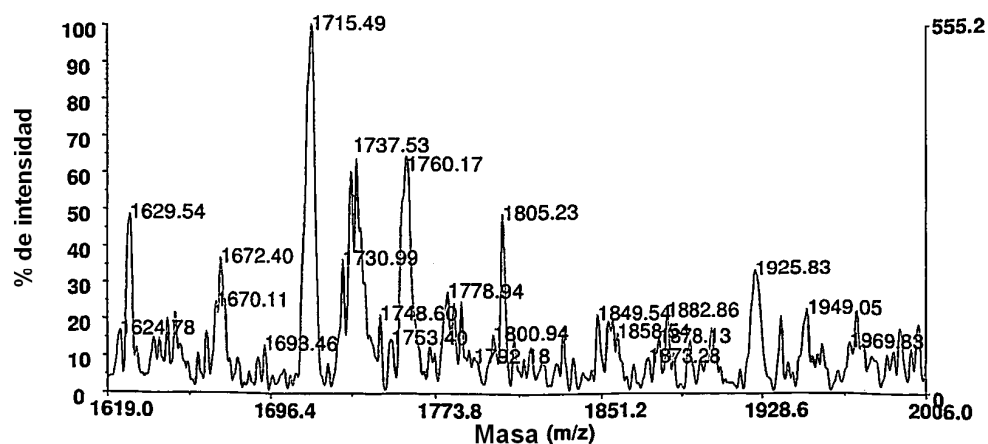


Figura 7

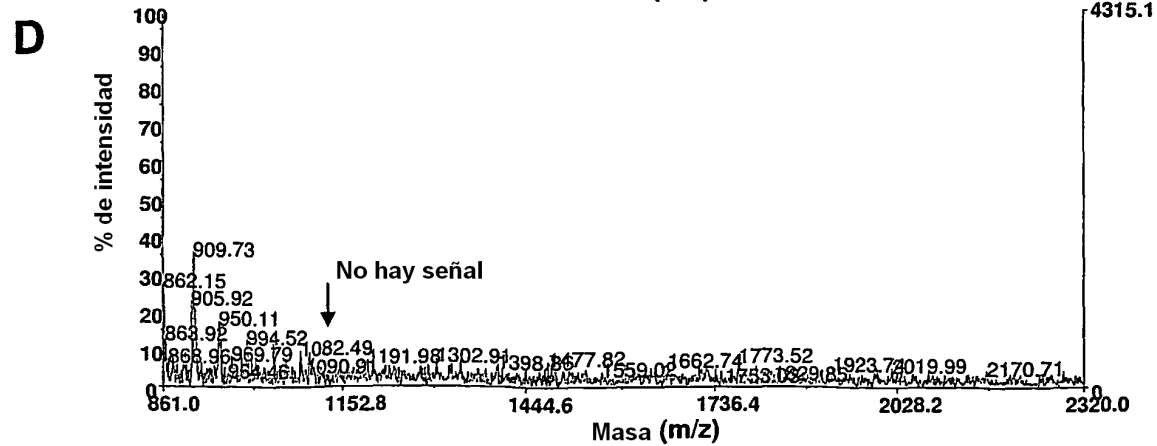
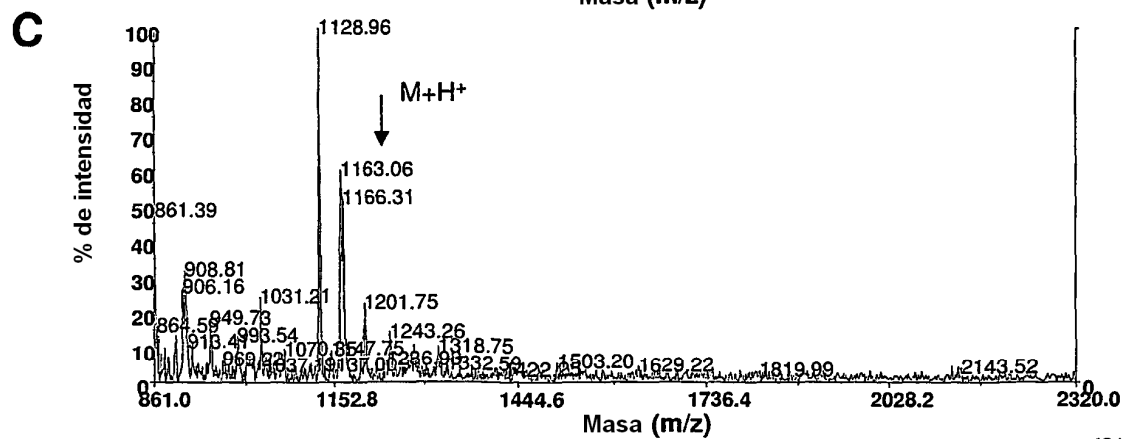
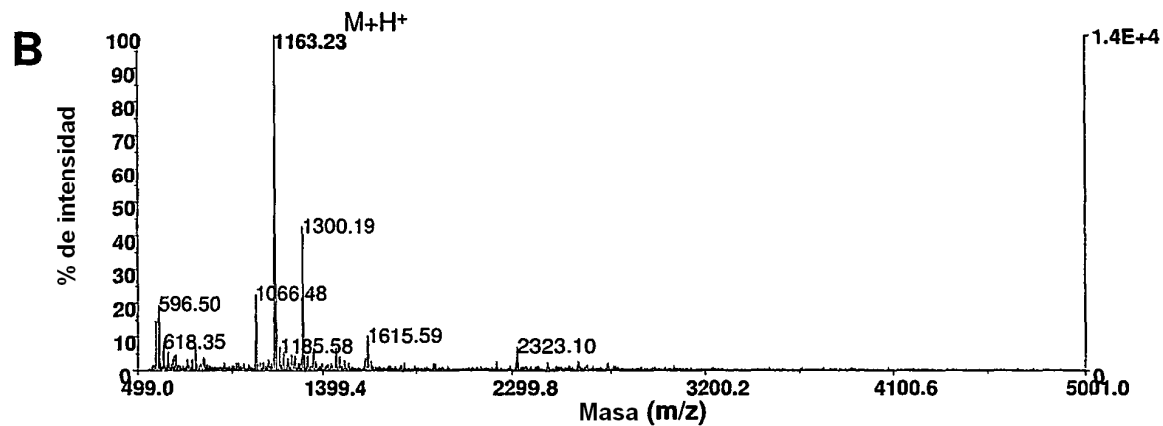
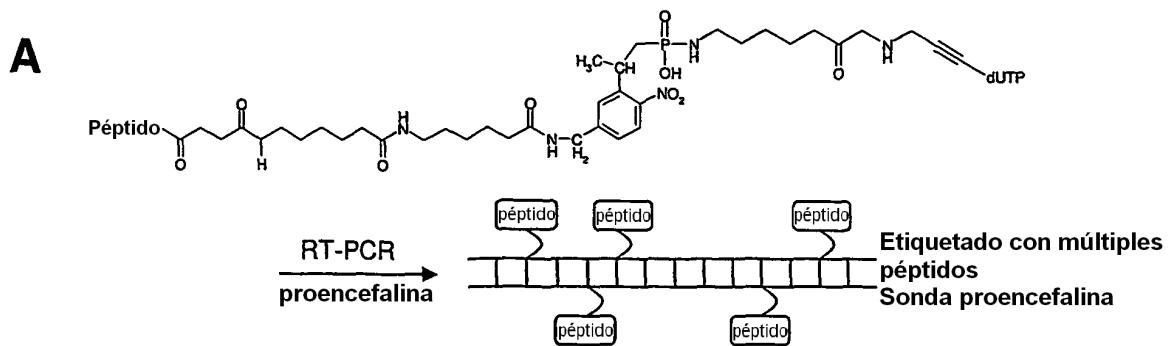


Figura 8

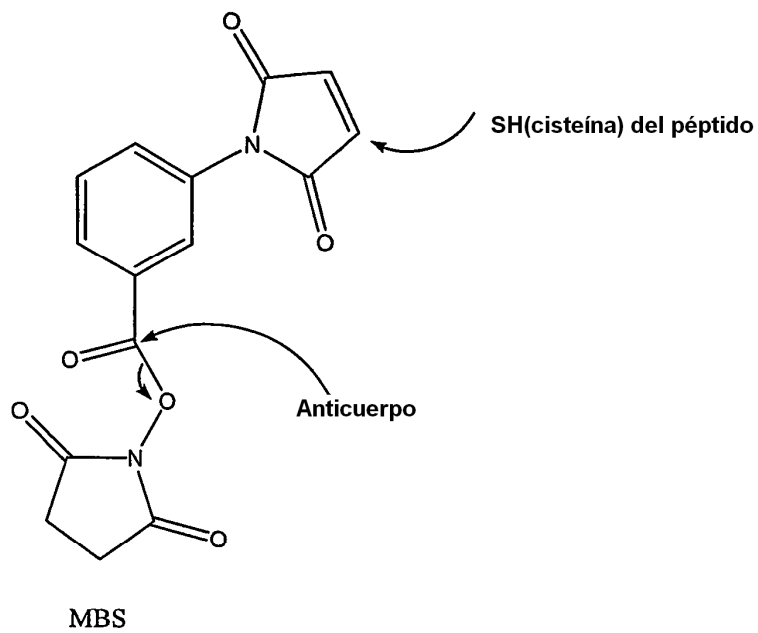


Figura 9

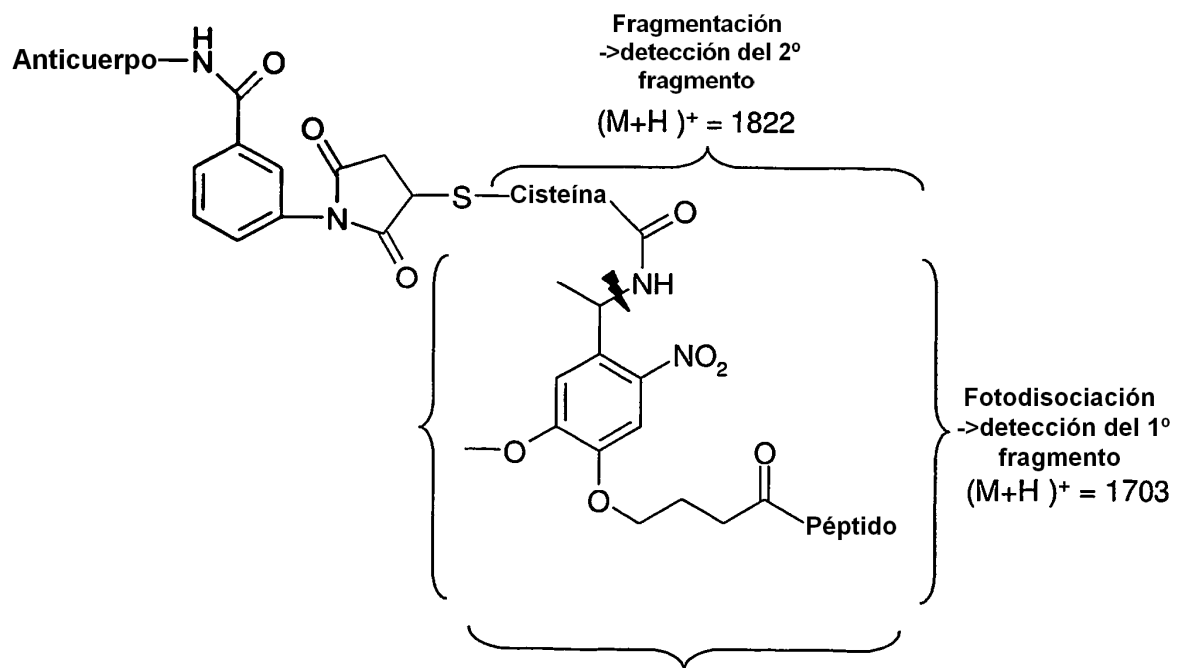


Figura 10

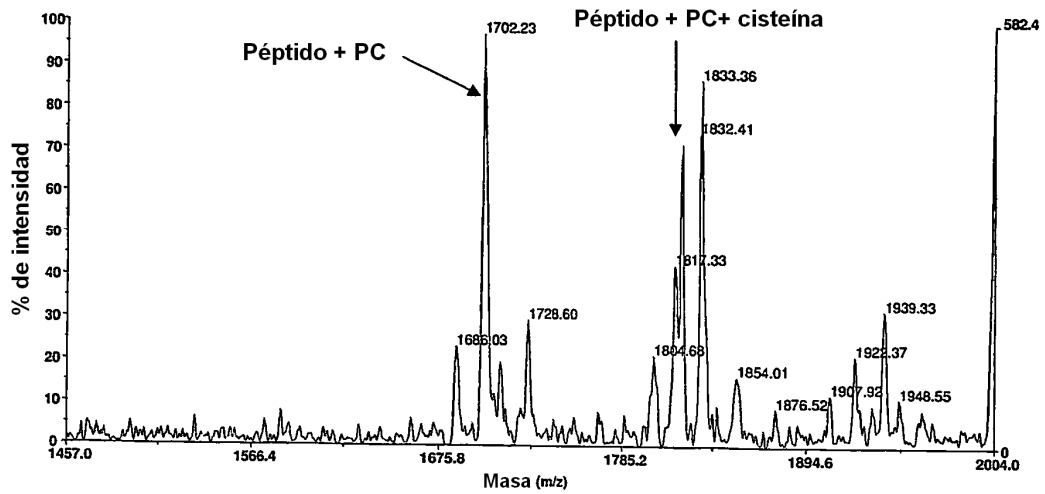


Figura 11

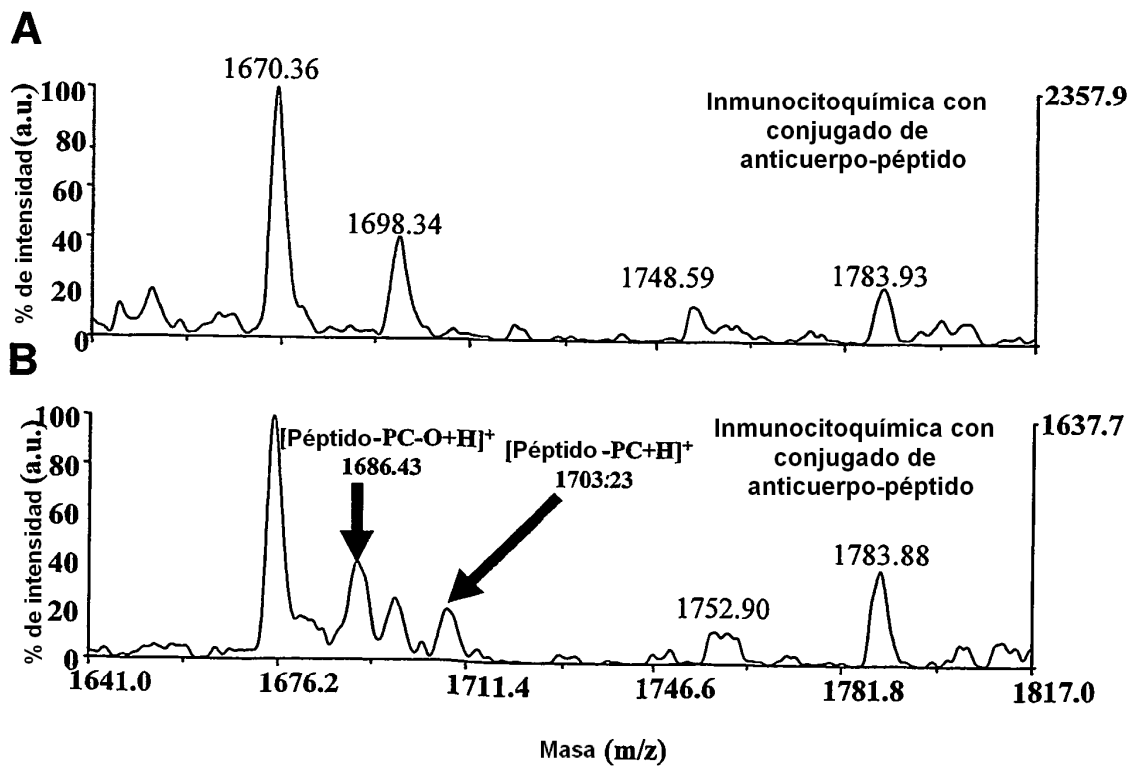


Figura 12

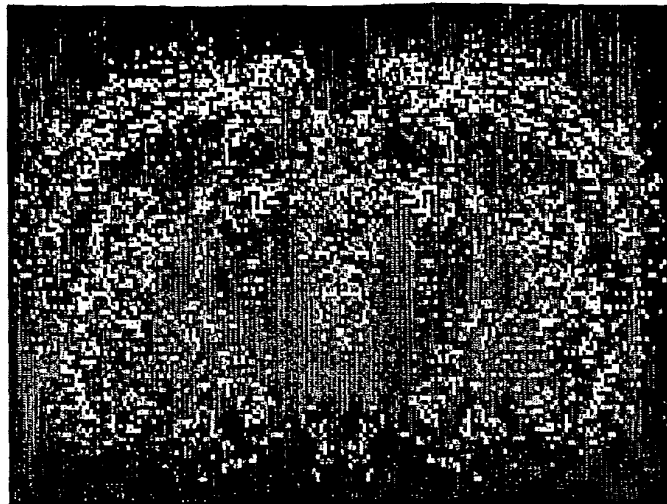


Figura 13

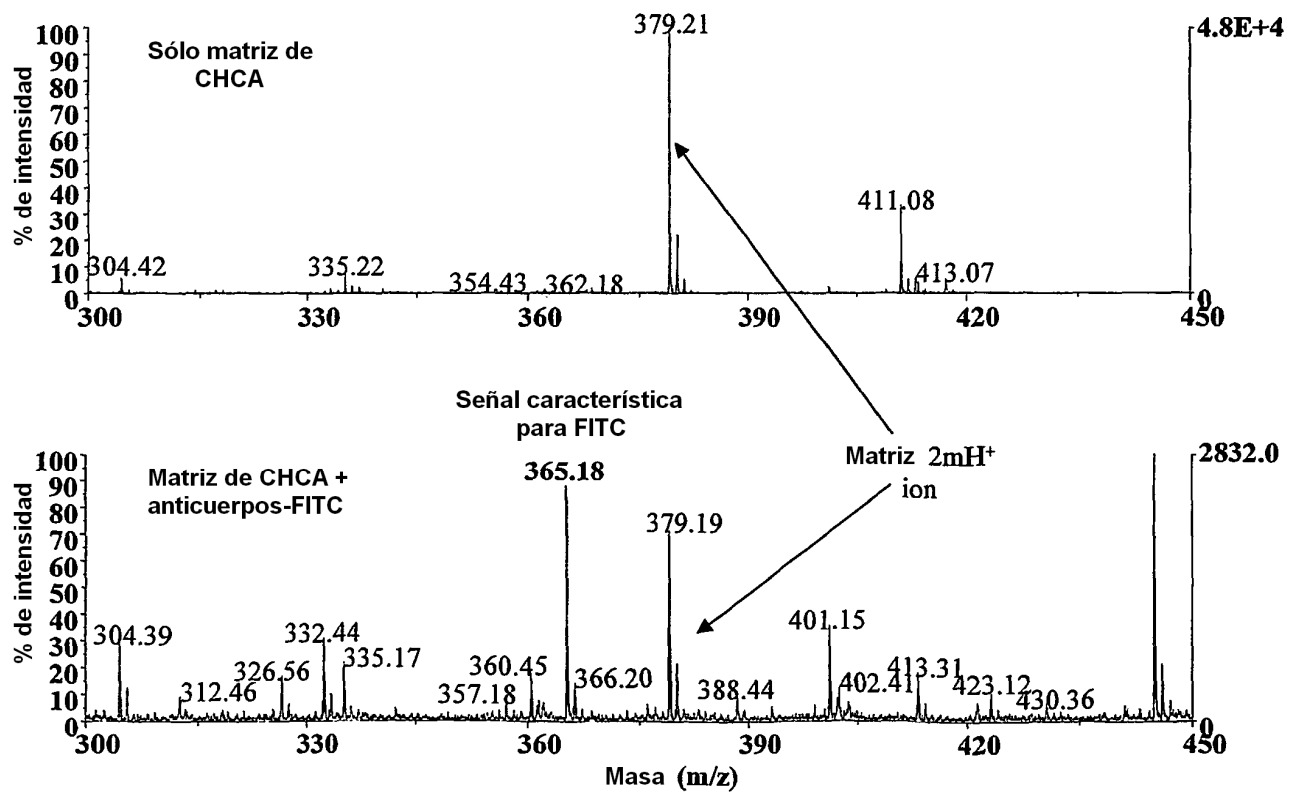


Figura 14