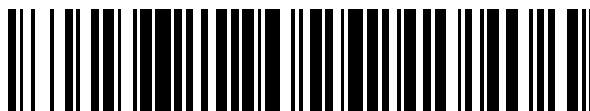


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 163**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2008** **E 08717707 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012** **EP 2115475**

54 Título: **Cuantificación mediante espectrometría de masas**

30 Prioridad:

12.03.2007 GB 0704764

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

19.02.2013

73 Titular/es:

**ELECTROPHORETICS LIMITED (100.0%)
COVEHAM HOUSE DOWNSIDE BRIDGE ROAD
COBHAM SURREY KT11 3EP, GB**

72 Inventor/es:

**SCHULZ-KNAPPE, PETER;
PIKE, IAN y
KUHN, KARSTEN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 396 163 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cuantificación mediante espectrometría de masas

5 Esta invención se refiere a métodos de espectrometría de masas para someter a ensayo un analito mediante el etiquetado de muestras de ensayo y muestras de calibración con etiquetas de masa isobáricas. La invención facilita particularmente la cuantificación relativa y/o absoluta de los analitos de interés.

10 Son conocidos en la técnica varios métodos de etiquetado de moléculas de interés, incluyendo átomos radiactivos, colorantes fluorescentes, reactivos luminiscentes, reactivos de captura de electrones y colorantes absorbentes de luz. Cada uno de estos sistemas de etiquetado tiene características que los hacen adecuados para ciertas aplicaciones y no otras. Por razones de seguridad, el interés en los sistemas de etiquetado no radiactivos conduce al desarrollo comercial generalizado de sistemas de etiquetado fluorescente particularmente para el análisis genético. Los esquemas de etiquetado fluorescente permiten el etiquetado de un número relativamente pequeño de moléculas simultáneamente, típicamente se pueden utilizar simultáneamente cuatro etiquetas y posiblemente hasta ocho. Sin embargo, los costes del aparato de detección y las dificultades para analizar las señales resultantes limitan el número de etiquetas que se pueden utilizar simultáneamente en un esquema de detección de fluorescencia.

Más recientemente ha habido un desarrollo en el área de la espectrometría de masas como método de detección de etiquetas que se anclan escindiblemente a su molécula asociada de interés. En muchas aplicaciones de biología molecular se necesita ser capaz de realizar separaciones de las moléculas de interés antes del análisis. Estas son generalmente separaciones en fase líquida. La espectrometría de masas en los últimos años ha desarrollado varias interfaces para separaciones en fase líquida que se hacen la espectrometría de masas particularmente eficaz como sistema de detección para este tipo de aplicaciones. Hasta hace poco se utilizaba la Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas para detectar iones analito o sus iones fragmento directamente, sin embargo, para muchas aplicaciones tales como análisis de ácidos nucleicos, la estructura del analito se puede determinar a partir de etiquetado indirecto. Esto es ventajoso en particular con respecto al uso de la espectrometría de masas porque las biomoléculas complejas tales como el ADN tienen espectros de masas complejos y se detectan con una sensibilidad relativamente escasa. Detección indirecta significa que se puede usar una molécula etiqueta asociada para identificar el analito original, donde la etiqueta está diseñada para la detección sensible y un espectro de masas sencillo. Espectro de masas sencillo significa que se pueden utilizar múltiples etiquetas para analizar múltiples analitos simultáneamente. El documento PCT/GB98/00127 describe matrices de sondas de ácidos nucleicos unidos covalentemente a etiquetas escindibles que son detectables por espectrometría de masas que identifica la secuencia de la sonda de ácido nucleico unida covalentemente. Las sondas etiquetadas de esta solicitud tienen la estructura Nu-L-M donde Nu es un ácido nucleico unido covalentemente a L, un conector escindible, unido covalentemente a M, una etiqueta de masa. Los conectores escindibles preferidos en esta solicitud escinden dentro de la fuente de iones del espectrómetro de masas. Las etiquetas de masa preferidas son poli-aril éteres sustituidos. Esta solicitud describe una variedad de métodos de ionización y análisis mediante analizadores de masas cuadrupolares, analizadores TOF e instrumentos del sector magnético como métodos específicos de análisis de etiquetas de masa mediante espectrometría de masas.

40 El documento PCT/GB94/01675 describe ligandos, y específicamente ácidos nucleicos, conectados escindiblemente a moléculas de etiquetas de masa. Los conectores escindibles preferidos son foto-escindibles. Esta solicitud describe la espectrometría de masas por Desorción/ionización mediante Láser Asistida por Matriz (MALDI) con Tiempo de Vuelo (TOF) como un método específico de análisis de etiquetas de masa mediante espectrometría de masas.

50 El documento PCT/US97/22639 describe moléculas de etiquetas de masa no volátiles liberables. En realizaciones preferidas, estas etiquetas comprenden polímeros, típicamente biopolímeros que están anclados escindiblemente a un grupo reactivo o ligando, es decir una sonda. Los conectores escindibles preferidos parecen ser escindibles químicamente o enzimáticamente. Esta solicitud describe la espectrometría de masas MALDI TOF como un método específico para analizar etiquetas de masa mediante espectrometría de masas.

55 Los documentos PCT/US97/01070, PCT/US97/01046, y PCT/US97/01304 describen ligandos, y específicamente ácidos nucleicos, conectados escindiblemente a moléculas de etiquetas de masa. Los conectores escindibles preferidos parecen ser escindibles químicamente o fotoescindibles. Estas aplicaciones describen una variedad de métodos de ionización y análisis mediante analizadores de masas cuadrupolares, analizadores TOF e instrumentos del sector magnético como métodos específicos para el análisis de etiquetas de masa mediante espectrometría de masas.

60 Ninguna de estas aplicaciones de la técnica anterior menciona el uso de análisis de masas en tándem o en serie para su uso en el análisis de etiquetas de masa.

Gygi et al. (Nature Biotechnology 17: 994-999, "Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags" 1999) describen el uso de "etiquetas de afinidad codificadas por isótopos" para la captura de péptidos de proteínas, para permitir el análisis de expresión de las proteínas. En este artículo, los autores describen el uso de un conector de biotina, que es reactivo con tioles, para los péptidos de captura con cisteína en ellos. Una muestra de proteína de una fuente se hace reaccionar con el conector de biotina y se escinde con una endopeptidasa. Los péptidos que contienen cisteína biotinilados se pueden aislar a continuación en cuentas con avidina para su posterior análisis mediante espectrometría de masas. Dos muestras se pueden comparar cuantitativamente etiquetando una muestra con el conector de biotina y etiquetando la segunda muestra con una forma deuterada del conector de biotina. Cada péptido en las muestras se representa después como un par de picos en el espectro de masas. La integración de los picos en el espectro de masas correspondiente a cada etiqueta indica los niveles de expresión relativos del péptido ligado a las etiquetas.

El documento PCT/GB01/01122 describe un conjunto de dos o más etiquetas de masa, comprendiendo cada etiqueta en el conjunto un radical marcador de masa unido a través de un conector escindible a un radical de normalización de masas, siendo el radical marcador de masa resistente a la fragmentación. La masa agregada de cada etiqueta en el conjunto puede ser la misma o diferente y la masa del radical marcador de masa de cada etiqueta en el conjunto puede ser igual o diferente. En cualquier grupo de etiquetas dentro de un conjunto que tiene un radical marcador de masa de una masa común cada etiqueta tiene una masa agregada diferente de todas las demás etiquetas de ese grupo, y en cualquier grupo de etiquetas dentro del conjunto que tiene una masa agregada común cada etiqueta tiene un radical marcador de masa que tiene una masa diferente de la de todos los otros radicales de etiquetas de masa de ese grupo, de tal manera que todas las etiquetas de masa en el conjunto son distinguibles entre sí mediante espectrometría de masas. Esta solicitud también describe una matriz de etiquetas de masa, que comprende dos o más conjuntos de etiquetas de masa como se ha definido anteriormente. La masa agregada de cada una de las etiquetas de masa en cualquier conjunto es diferente de la masa agregada de cada una de las etiquetas de masa en cada otro conjunto en la matriz. Esta solicitud describe adicionalmente métodos de análisis que comprenden detectar un analito identificando mediante espectrometría de masas una etiqueta de masa o una combinación de etiquetas de masa únicos para el analito. Esta solicitud describe un gran número de diferentes etiquetas de masa específicas. Las etiquetas de masa preferidas tienen la estructura MLX, donde M es el grupo de normalización de masas, L es el conector escindible y X es el radical marcador de masa. La naturaleza de M y X no está particularmente limitada.

El documento PCT/GB02/04240 describe un conjunto de dos o más etiquetas de masa, comprendiendo cada etiqueta en la serie un radical marcador de masa unido a través de al menos un enlace amida a un radical de normalización de masas.

El radical marcador de masa comprende un aminoácido y el radical de normalización de masas comprende un aminoácido. En cuanto al documento PCT/GB01/01122 la masa agregada de cada etiqueta en el conjunto puede ser igual o diferente y la masa del radical marcador de masa de cada etiqueta en el conjunto puede ser igual o diferente, de manera que todas las etiquetas de masa del conjunto son distinguibles entre sí por espectrometría de masas. En cuanto al documento PCT/GB01/01122 esta solicitud también describe una matriz de etiquetas de masa y un método de análisis. Esta aplicación está dirigida específicamente al análisis de péptidos y etiquetas de masa con radicales de normalización de masas y radicales de marcadores de masa que comprenden al menos un aminoácido.

Mientras que las etiquetas de masa y los métodos de análisis descritos en los documentos PCT/GB01/01122 y PCT/GB02/04240 tienen éxito por lo general, todavía hay una necesidad de proporcionar reactivos y métodos mejorados para cuantificar relativamente o absolutamente un analito proporcionando una referencia con etiqueta de masa correspondiente a dicho analito, cuyo material de referencia marcado se puede añadir a la muestra que contiene el analito y en el que el analito y el material de referencia se pueden cuantificar e identificar simultáneamente mediante espectrometría de masas en tándem.

El desarrollo de etiquetas de masa isobáricas a finales de 1990 ha revolucionado el descubrimiento de biomarcadores. La capacidad para analizar múltiples muestras en un número ilimitado teóricamente en un solo flujo de trabajo de LC-MS/MS aumenta el rendimiento, mientras que al mismo tiempo reduce la variabilidad analítica. Mientras que la aplicación de estas metodologías proporciona la mejora del descubrimiento de biomarcadores queda un obstáculo significativo en la validación de biomarcadores y el desarrollo de ensayos rutinarios, capaces de analizar un gran número de muestras. Este obstáculo es creado por la necesidad de obtener reactivos de alta especificidad, típicamente en forma de anticuerpos, contra cada biomarcador candidato. La producción de anticuerpos es laboriosa, costosa y lleva varios meses sin ninguna garantía de éxito.

Además de las limitaciones de coste y tiempo, el uso de métodos basados en anticuerpos para la validación de biomarcadores también se ven dificultado por las limitaciones de tales métodos para detectar analitos con intervalos de concentración normales y regulados muy diferentes. Por ejemplo, rara vez es posible medir más de 10 y hasta 20 analitos diferentes en un único ensayo múltiple usando matrices de anticuerpos. Cuando la concentración normal de tales proteínas se separa por más de un log (es decir de micromolar a nanomolar) es aún menos probable que tales

matrices de anticuerpos múltiple puedan cuantificar con precisión cada analito y las tasas de multiplexación por consiguiente son significativamente menores.

Por tanto, persiste una necesidad de métodos mejorados para detectar cuantitativamente y medir rutinariamente analitos mediante espectrometría de masas en un amplio intervalo de muestras.

La mayoría de descubrimiento de biomarcadores de proteínas se lleva a cabo mediante espectrometría de masas conectada a diversos métodos de separación de proteínas. Más recientemente, varios grupos han propuesto la utilización de espectrómetros de masa para proporcionar la cuantificación absoluta de proteínas basándose en uno o más péptidos de referencia marcados isotópicamente. El documento WO 03/016861 describe una de tales realizaciones denominada 'AQUA' que utiliza péptidos sintéticos que incorporan uno o más aminoácidos etiquetados con isótopos estables como patrón de referencia. Tales péptidos se seleccionan normalmente basándose en una serie de criterios, incluyendo su comportamiento de ionización, sus propiedades fisicoquímicas, y la facilidad y coste de fabricación. En un experimento AQUA los péptidos de referencia se añaden a la muestra de interés a una concentración definida. Debido a que están marcados con isótopos estables del péptido de referencia producirán un pico distinto de la forma natural del péptido en la muestra de interés. Típicamente, la masa del péptido AQUA estará separada por un aumento de la masa de aproximadamente 5 a 50 daltons en comparación con el péptido natural. Mediante la comparación de las intensidades relativas de los picos del péptido natural y su equivalente AQUA se puede determinar la concentración absoluta del péptido parental en la muestra.

Mientras AQUA es capaz de medir cantidades absolutas de proteínas múltiples en un solo experimento, no es adecuado para el desarrollo de las curvas patrón de referencia para cubrir un amplio intervalo de concentraciones de origen natural. Para los estudios de validación de biomarcadores esto puede ser problemático ya que la regulación de la expresión de proteínas puede dar como resultado un rango de diez veces o mayor de concentraciones para una proteína dada. El uso de un patrón de referencia único puede dar lugar a la cuantificación inexacta de los niveles de péptidos naturales en los extremos de la regulación y sería deseable proporcionar un medio para incluir péptidos de referencia fácilmente distinguibles a varias concentraciones diferentes para cubrir el rango fisiológico y que proporcionan una curva patrón apropiada contra la cual se puede leer el nivel del péptido diana en una muestra. La producción de tales curvas utilizando AQUA sería difícil ya que cada péptido añadido aumenta la complejidad del perfil de MS. Además, para asegurar que la curva patrón se contruye sólo sobre los péptidos de referencia sería conveniente si no esencial para llevar a cabo la confirmación de la secuencia por MS/MS de cada péptido de referencia, así como para el péptido diana en la muestra.

Un objetivo de la presente invención es resolver uno o más de los problemas con la técnica anterior descrita anteriormente. Específicamente, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método de espectrometría de masas mejorado para someter a ensayo un analito.

Para superar las limitaciones de la técnica los autores de la presente invención han desarrollado un método de cuantificación de moléculas de interés usando biomoléculas de referencia etiquetadas isobáricamente o materiales biológicos complejos, por ejemplo péptidos, que permiten la construcción de curvas patrón multipunto para cada analito sin aumentar la complejidad del MS.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método de ensayo para un analito, cuyo método comprende:

1. a) combinar una muestra de ensayo, que puede comprender el analito, con una muestra de calibración que comprende al menos dos alícuotas diferentes del analito, teniendo cada alícuota una cantidad conocida diferente del analito, donde la muestra y cada alícuota se etiquetan diferencialmente con una o más etiquetas de masa isobáricas cada una con un grupo marcador de masa con masa espectrométricamente distinta, de tal manera que la muestra de ensayo y cada alícuota de la muestra de calibración se pueden distinguir mediante espectrometría de masas;
2. b) determinar mediante espectrometría de masas la cantidad de analito en la muestra de ensayo y la cantidad de analito en cada alícuota en la muestra de calibración, y calibrar la cantidad de analito en la muestra de ensayo contra las cantidades conocidas y determinadas de los analitos en las alícuotas de la muestra de calibración.

Las diferentes alícuotas tienen cada una cantidad conocida del analito. El término "cantidad conocida" significa que se conoce la cantidad absoluta, o una cantidad cualitativa del analito en cada alícuota de la muestra de calibración. Una cantidad cualitativa en el presente contexto significa una cantidad que no se conoce en absoluto, sino que puede ser un intervalo de cantidades que se espera que tenga un sujeto un estado particular, por ejemplo, un sujeto en un estado sano o enfermo, o algún otro intervalo esperado dependiendo del tipo de muestra de ensayo en investigación. Cada alícuota es "diferente", ya que contiene una cantidad diferente de analito. Típicamente esto se logra tomando diferentes volúmenes de una muestra convencional, especialmente para cantidades cualitativas

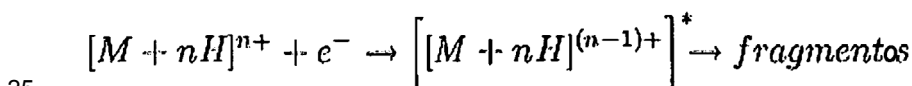
donde se toman diferentes volúmenes que aseguran que las diferentes cantidades están presentes en cada alícuota a una razón deseada, sin necesidad de conocer las cantidades absolutas.

Preferiblemente, la etapa (b) comprende:

- 5 1. i) en un espectrómetro de masas seleccionar y fragmentar iones de una relación masa a carga correspondiente al analito marcado con la etiqueta de masa, detectar y producir un espectro de masas de iones de fragmento, e identificar los iones fragmento correspondientes a los grupos marcadores de masa de las etiquetas de masa;
- 10 2. ii) determinar la cantidad del analito en cada muestra de ensayo basándose en la cantidad de sus grupos marcadores de masa en un espectro de masas con respecto a las cantidades de los grupos marcadores de masa de las alícuotas de la muestra de calibración en el mismo espectro de masas.

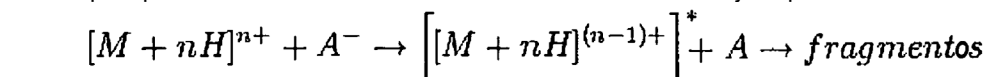
Por lo general, la fragmentación se produce mediante Disociación Inducida por Colisión (CID), Disociación Inducida en Superficie (SID), Disociación por Captura de Electrones (ECD), Disociación por Transferencia de Electrones (ETD) o Bombardeo con Átomos Rápidos.

La Disociación por Captura de Electrones (ECD) es un método para fragmentar iones de péptidos o proteínas múltiplemente cargados (protonados) para el análisis de espectrometría de masas en tándem (elucidación estructural). En este método se confinan péptidos o proteínas protonados multiplicados en la trampa de Penning de un espectrómetro de masas de resonancia iónica en ciclotrón con transformada de Fourier (FTICR) y se exponen a electrones con energías casi térmicas. La captura de un electrón térmico por un péptido protonado es exotérmica (≈ 6 eV; $1 \text{ eV} = 1,602 \times 10^{-19} \text{ J}$), y hace que el esqueleto peptídico se fragmente mediante un proceso no ergódico (es decir, un procedimiento que no implican una redistribución energía vibracional intramolecular).



Además, se pueden neutralizar uno o más cationes de proteínas con electrones de baja energía para provocar la escisión específica de enlaces para formar productos c, z, en contraste con los productos b, y formados mediante otras técnicas tales como la disociación activada colisionalmente (CAD, también conocida como disociación inducida por colisión, CID). Puesto que los electrones térmicos introducidos en los campos de RF de aparatos de trampa de iones cuadrupolar RF 3D (QIT), cuadrupolo tiempo de vuelo, o trampa de iones cuadrupolar RF lineal 2D (QLT) mantienen su energía térmica sólo durante una fracción de microsegundo y no están atrapados en estos dispositivos, la ECD sigue siendo una técnica utilizada exclusivamente con FTICR, el tipo más costoso de la instrumentación MS.

Disociación por transferencia de electrones (ETD) es un método de fragmentación de iones de péptidos o proteínas múltiplemente protonados para el análisis de espectrometría de masas en tándem (elucidación estructural). Similar a la disociación por captura de electrones (ECD), la ETD induce la fragmentación de cationes (por ejemplo, péptidos o proteínas con carga múltiple) mediante la transferencia de electrones a ellos. En contraste con la ECD, ETD no utiliza electrones libres, pero emplea aniones radicales para este fin (por ejemplo, aniones antraceno o azobenceno que poseen afinidades electrónicas suficientemente bajas para actuar como donadores de electrones).



Después de la transferencia de electrones, la ETD da como resultado un patrón de fragmentación similar a ECD, es decir, la formación de los llamados iones c y z. Basándose a la diferente forma de transferencia de electrones, la ETD se puede implementar en varios aparatos de espectrómetros de masas de tipo trampa de iones cuadrupolar (QIT) o trampa de iones cuadrupolar RF lineal 2D (QLT) de "menor coste" que no son apropiados para la EDC. Para una referencia apropiada véase John EP Syka, Joshua J. Coon, Melanie J. Schroeder, Jeffrey Shabanowitz, y Donald F. Hunt, PNAS, vol. 101, núm. 26, págs 9528 - 9533.

La realización más preferida es aquella en la que la fragmentación es causada por disociación inducida por colisión. La disociación inducida por colisión se produce durante un experimento MS/MS. El término 'MS/MS' en el contexto de la espectrometría de masas hace referencia a un experimento que implica seleccionar iones, someter los iones seleccionados a CID y someter los iones fragmento a un análisis adicional.

Este método permite una calibración multipunto de la cantidad de cada analito sin aumentar la complejidad del MS. La cuantificación del analito se obtiene en el perfil de MS/MS, y el analito en la muestra y en la muestra de calibración se pueden cuantificar e identificar simultáneamente mediante espectrometría de masas en tándem. Este

método proporciona un medio para la medición de hasta 10, hasta 20, hasta 50 o más analitos en un único experimento de LC-MS/MS.

5 El método puede comprender una etapa adicional antes de la etapa (a) para etiquetar diferencialmente cada muestra de ensayo o cada alícuota de la muestra de calibración con una o más etiquetas de masa isobáricas. En una realización preferida el método también comprende una etapa adicional para combinar las alícuotas etiquetadas diferencialmente para producir una muestra de calibración antes de la etapa (a).

10 La muestra de ensayo puede comprender una pluralidad de diferentes analitos, y en este caso se proporciona una muestra de calibración para cada analito diferente, y la etapa (b) se repite para cada analito diferente. En una realización, la pluralidad de analitos son fragmentos de péptidos de una proteína o polipéptido que se producen por transformación química o enzimática de la proteína o polipéptido antes de la etapa (a). En una realización particular, la pluralidad de analitos son péptidos de la misma proteína o polipéptido.

15 En una realización, se somete a ensayo una pluralidad de muestras de ensayo para determinar un analito. En una realización concreta, cada una de la pluralidad de muestras de ensayo se somete a ensayo para determinar el mismo analito. En este caso, cada una de las muestras de ensayo se puede etiquetar diferencialmente con una o más etiquetas de masa isobáricas y combinar con una sola muestra de calibración en la etapa (a), y la cantidad del analito en cada muestra se determina de forma simultánea en la etapa (b). En otra realización, cada muestra de ensayo se marca con la misma etiqueta de masa, y los pasos (a) y (b) se repiten para cada muestra diferente. Se puede utilizar la misma muestra de calibración para cada muestra de ensayo que se vaya a someter a ensayo. Típicamente, se añade a cada muestra de ensayo diferente el mismo volumen conocido de la muestra de calibración que comprende al menos dos alícuotas de analito. Este método es particularmente útil en los estudios clínicos que implican múltiples muestras de pacientes. Si se prepara una gran cantidad de las muestras de calibración y se recogen fracciones, varios laboratorios pueden utilizar la misma muestra de calibración, facilitando las comparaciones entre estudios y entre laboratorios.

25 En un método de acuerdo con la invención, la cantidad de analito en cada alícuota en la muestra de calibración es una cantidad absoluta conocida. Esto permite determinar la cantidad absoluta de un analito en una muestra de ensayo en la etapa (b).

30 En un método alternativo, no se conoce la cantidad absoluta de un analito en cada alícuota en la muestra de calibración. En esta realización, la cantidad de analito en cada alícuota en la muestra de calibración es una cantidad cualitativa conocida. La etapa de calibración comprende la calibración de la cantidad de analito en la muestra de ensayo frente a las cantidades cualitativas y determinadas de los analitos en las alícuotas de la muestra de calibración. En una realización concreta, la cantidad cualitativa es un intervalo esperado de cantidades de analito en un sujeto que tiene un estado particular, tal como un estado sano o enfermo.

35 En una realización preferida, la cantidad de analito en cada alícuota diferente se selecciona para reflejar la variación conocida o dudosa de la cantidad de analito en la muestra de ensayo. En una realización aún más preferida, se proporcionan alícuotas que se corresponden con los límites superior e inferior, y opcionalmente los puntos intermedios dentro de un intervalo de las cantidades conocidas o dudosas del analito encontrado en las muestras de ensayo de sujetos sanos o enfermos. Las diferentes cantidades de analito presente en las diferentes alícuotas puede corresponder a la cantidad conocida o dudosa de analito presente en una muestra de ensayo que ha sido incubadas durante diferentes períodos de tiempo.

40 La muestra de calibración puede comprender un analito en una cantidad que indica la presencia y/o fase de una enfermedad particular. La muestra de calibración puede comprender también el analito en una cantidad que indica la eficacia y/o toxicidad de una terapia.

45 El método de acuerdo con la presente invención puede comprender una etapa adicional de separación de los componentes de las muestras antes de la etapa (a). El método también puede comprender una etapa de digestión de cada muestra con al menos una enzima para digerir los componentes de las muestras antes de la etapa (a). En una realización, las muestras se etiquetan con las etiquetas de masa isobáricas antes de la digestión. En otra realización, la etapa de etiquetado se produce después de la etapa de digestión. La etapa de digestión con enzima también puede ocurrir después de la etapa (a) pero antes de la etapa (b).

50 En otra realización, las etiquetas de masa utilizadas en el método comprenden adicionalmente un ligando de captura por afinidad. El ligando de captura por afinidad de la etiqueta de masa se une a un ligando contador con el fin de separar los analitos etiquetados isobáricamente de los analitos no marcados después de la etapa (a) pero antes de la etapa (b). El ligando de captura por afinidad proporciona un medio de enriquecimiento de los analitos de interés, aumentando así la sensibilidad analítica.

El método de acuerdo con la invención puede incluir además la etapa de separar electroforéticamente o cromatográficamente los analitos etiquetados isobáricamente después de la etapa (a) pero antes de la etapa (b).

- 5 Aunque la estructura de las etiquetas de masa utilizadas en la presente invención no está limitada especialmente, siempre que sean isobáricas y tengan grupos marcadores de masa de masas espectrométricamente diferentes (radicales), en realizaciones preferidas, la etiqueta de masa comprende la siguiente estructura:

X-L-M

- 10 donde X es un radical marcador de masa, L es un conector escindible y M es un radical de normalización de masas. L puede ser un enlace sencillo, o parte de X, o parte de M. Estas etiquetas de masa se puede anclar en cualquier punto al analito en el ensayo o a muestras de calibración, por ejemplo, a través de M, L o X. Preferiblemente, se anclan a través de M, por ejemplo la etiqueta comprendería la estructura:

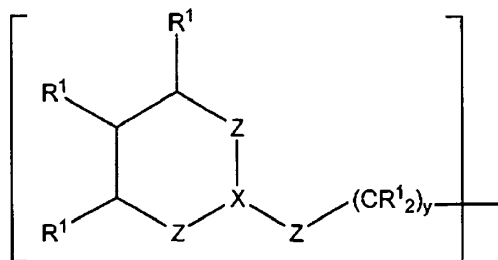
(-X-L-M) -

- 15 Esto se efectúa típicamente mediante la inclusión de una funcionalidad reactiva en la etiqueta de masa para permitir que se una al analito, por ejemplo:

X-L-M-funcionalidad reactiva

Cuando las etiquetas comprenden una funcionalidad reactiva estas se denominan etiquetas de masas reactivas.

- 20 En realizaciones preferidas, X es un radical marcador de masa que comprende el siguiente grupo:



- 25 en el que la unidad cíclica es aromática o alifática y comprende de 0 a 3 enlaces dobles independientemente entre dos átomos adyacentes; cada Z es independientemente N, N(R¹), C(R¹), CO, CO(R¹) (es decir, -OC(R¹) o -O-C(R¹)-O-), C(R¹)₂, O o S, X es N, C o C(R¹); cada R¹ es independientemente H, un grupo alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado sustituido o no sustituido, un grupo cíclico alifático sustituido o no sustituido, un grupo aromático sustituido o no sustituido o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido; e y es un número entero de 0-10.

- 30 La funcionalidad reactiva para anclar la etiqueta de masa al analito no está especialmente limitada y puede comprender cualquier grupo reactivo apropiado.

Se pretende que el término etiqueta de masa que se utiliza en el presente contexto haga referencia a un radical adecuado para etiquetar un analito para su determinación. La término marca es sinónimo del término etiqueta.

- 35 Se pretende que el término radical marcador de masa que se utiliza en el presente contexto haga referencia a un radical que se va a detectar mediante espectrometría de masas. El término radical marcador de masa es sinónimo del término grupo marcador de masa o el término grupo indicador.

- 40 Se pretende que el término radical de normalización masas que se utiliza en el presente contexto haga referencia a un radical que no se va a detectar necesariamente mediante espectrometría de masas, pero está presente para asegurarse de que una etiqueta de masa tiene una masa agregada deseada. El radical de normalización de masas no está particularmente limitado estructuralmente, sino que sirve simplemente para variar la masa total de la etiqueta de masa.

- 45 En la fórmula general anterior, cuando Z es C(R¹)₂, cada R¹ en el átomo de carbono puede ser igual o diferente (es decir, cada R¹ es independiente). Así, el grupo (CR¹)₂ incluye grupos tales como CH(R¹), donde un R¹ es H y el otro R¹ es otro grupo seleccionado de la anterior definición de R¹.

- 50 En la fórmula general anterior, el enlace entre X y el Z no cíclico puede ser un enlace sencillo o un doble enlace dependiendo de los grupos X y Z seleccionados en esta posición. Por ejemplo, cuando X es N o C(R¹) el enlace de

X al Z no cíclico debe ser un enlace sencillo. Cuando X es C, el enlace de X al Z no cíclico puede ser un enlace sencillo o un doble enlace dependiendo del grupo Z seleccionado no cíclico y los grupos Z cíclicos. Cuando el grupo Z no cíclico es N o C(R¹) el enlace de Z no cíclico a X es un enlace sencillo o si y es O puede ser un doble enlace dependiendo del grupo X seleccionado y el grupo al que están anclado el Z no cíclico. Cuando el Z no cíclico es N(R¹), CO(R¹), CO, C(R¹)₂, O o S el enlace a X debe ser un enlace sencillo. El experto en la técnica puede seleccionar fácilmente los grupos X, Z y (CR¹)₂ adecuados con las valencias correctas (conexiones mediante enlaces sencillos o dobles) de acuerdo con la fórmula anterior.

Los autores de la presente invención han descubierto que las etiquetas de masa definidas anteriormente se pueden identificar fácilmente en un espectrómetro de masas y también permiten la cuantificación sensible.

En una realización preferida, el peso molecular agregado de la etiqueta de masa es de 600 Daltons o menos, más preferiblemente de 500 Daltons o menos, aún más preferiblemente 400 Daltons o menos, muy preferiblemente 300 a 400 Daltons. Los pesos moleculares particularmente preferidos de las etiquetas de masa son 324, 338, 339 y 380 Daltons. Estas realizaciones preferidas son particularmente ventajosas debido a que el pequeño tamaño de las etiquetas de masa significa que el tamaño del péptido que se va a detectar aumenta mínimamente cuando se marca con la etiqueta de masa. Por lo tanto, el péptido marcado con la etiqueta de masa puede ser visionado en la misma ventana de espectro de masas que el péptido no marcado cuando se analizan mediante espectroscopía de masas. Esto facilita la identificación de los picos de la propia etiqueta de la masa.

En una realización preferida, el peso molecular del radical marcador de masa es de 300 Daltons o menos, preferiblemente de 250 Daltons o menos, más preferiblemente de 100 a 250 Daltons, muy preferiblemente de 100-200 Daltons. Estas realizaciones preferidas son particularmente ventajosas debido a que el pequeño tamaño del radical marcador de masa significa que produce un pico en la región silenciosa de un espectro de masas, que permite que la etiqueta de masa sea fácilmente identificada a partir del espectro de masas y también permite la cuantificación sensible.

Se pretende que el término región silenciosa de un espectro de masas (tal como un espectro MS/MS) según se utiliza en el presente contexto haga referencia a la región de un espectro de masas con bajo "ruido" fondo causado por picos relativos a la presencia de los fragmentos generados por la fragmentación de los péptidos marcados. Un espectro de MS/MS se obtiene mediante la fragmentación de un pico en el modo MS, de manera que no deberían aparecer contaminantes, tales como reactivos tamponadores, desnaturalizantes y detergentes en el espectro MS/MS. De esta manera, la cuantificación en modo MS/MS es ventajosa. Así, se pretende que el término región silenciosa haga referencia a la región del espectro de masas con bajo "ruido" causado por picos relativos al péptido que se va a detectar. Para un péptido o proteína, la región silenciosa del espectro de masa es menor de 200 Daltons.

Los autores de la presente invención han descubierto también que las etiquetas de masa reactivas definidas anteriormente se hacen reaccionar fácil y rápidamente con una proteína para formar una proteína marcada.

En la presente invención se emplea un conjunto de dos o más etiquetas de masa. Las etiquetas en los conjuntos son etiquetas de masa isobáricas cada una con una etiqueta de masa de una masa diferente. De este modo, cada etiqueta en el conjunto se define como antes y en donde cada radical de normalización de masas asegura que una etiqueta de masa tiene una masa agregada deseada, y donde el conjunto comprende:

etiquetas de masa que tienen un radical marcador de masa, teniendo cada radical marcador de masa una masa diferente de la de todos los otros radicales marcadores de masa en el conjunto, y cada etiqueta en el conjunto tiene una masa agregada común; y donde todas las etiquetas de masa del conjunto son distinguibles entre sí mediante espectroscopía de masas.

El término "isobárica" significa que las etiquetas de masa tienen sustancialmente la misma masa agregada según se determina mediante espectrometría de masas. Típicamente, las masas moleculares medias de las etiquetas de masa isobáricas se encontrarán dentro de un intervalo de $\pm 0,5$ Da entre sí. El término "marcas" será sinónimo del término "etiquetas". En el contexto de la presente invención, el destinatario experto entenderá que el término "radical marcador de masa" y el término "grupo indicador" se pueden utilizar indistintamente.

El número de etiquetas en el conjunto no está especialmente limitado, siempre que el conjunto comprenda una pluralidad de etiquetas. Sin embargo, es preferible que el conjunto comprenda dos o más, tres o más, cuatro o más, o cinco o más etiquetas, más preferiblemente seis o más etiquetas, muy preferiblemente ocho o más etiquetas.

El término masa agregada en el presente contexto hace referencia a la masa total de la etiqueta de masa, es decir, la suma de las masas del radical marcador de masa, el conector escindible, la radical de normalización de masas y otros componentes cualesquiera de la etiqueta de masa.

La masa del radical de normalización de masas será diferente en cada etiqueta de masa en el conjunto. La masa del radical de normalización de masas en cada etiqueta de masa individual será igual a la masa agregada común menos la masa del radical marcador de masa concreto en esa etiqueta de masa y menos la masa del conector escindible.

5 Todas las etiquetas de masa en el conjunto son distinguibles entre sí mediante espectrometría de masas. Por lo tanto, un espectrómetro de masas puede discriminar entre las etiquetas de masa, es decir, los picos derivados de etiquetas de masa individuales pueden estar claramente separados entre sí. La diferencia de masa entre los radicales marcadores de masa significa que un espectrómetro de masas puede discriminar entre iones derivados de etiquetas de masa o radicales marcadores de masa diferentes.

10 La presente invención también puede emplear una matriz de etiquetas de masa, que comprende dos o más conjuntos de etiquetas de masa como se ha definido anteriormente, donde la masa agregada de cada una de las etiquetas de masa en cualquier conjunto es diferente de la masa agregada de cada una de las etiquetas de masa en cada otro conjunto en la matriz.

15 En realizaciones preferidas de la invención, en la matriz las etiquetas de masa son preferentemente todas químicamente idénticas (sustancialmente idénticas químicamente). El término "sustancialmente idénticas químicamente" significa que las etiquetas de masa tienen la misma estructura química, en la que se pueden introducir sustituciones isotópicas concretas o a la que se pueden anclar sustituyentes concretos.

20 En otras realizaciones preferidas de esta invención, las etiquetas de masa pueden comprender un grupo que potencia la sensibilidad. Las etiquetas de masa tienen preferentemente la forma:
grupo potenciador de la sensibilidad - XLM - funcionalidad reactiva

25 En este ejemplo el grupo potenciador de la sensibilidad se une usualmente al radical marcador de masa, puesto que se pretende que aumente la sensibilidad de la detección de este radical en el espectrómetro de masas. Se muestra que funcionalidad reactiva está presente y unida a un radical diferente que el grupo potenciador de la sensibilidad. Sin embargo, no se necesita limitar de este modo las etiquetas de masa y, en algunos casos el grupo potenciador de la sensibilidad puede estar unido al mismo radical como funcionalidad reactiva.

30 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para someter a ensayo un analito de baja abundancia en una muestra, cuyo método comprende el método de análisis de espectrometría de masa como se ha definido anteriormente, donde la muestra de calibración comprende una gran cantidad del analito que se va a someter a ensayo, y la muestra puede comprender el analito en baja abundancia. En este método, el analito está presente en la muestra de calibración en una cantidad tal que se puede detectar fácilmente y separar junto con el analito en la muestra mediante un método tal como electroforesis en gel mono- o bidimensional, electroforesis de flujo libre, electroforesis capilar, isoelectroenfoque off-gel o espectrometría de masas - cromatografía líquida antes de la etapa (b). Preferiblemente, el analito en la muestra es una proteína, y el analito en la muestra de calibración es una forma recombinante de la proteína en la muestra.

40 La presente invención se describirá ahora adicionalmente a modo de ejemplo solamente con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 muestra un esquema de un método de acuerdo con la presente invención.

45 La Figura 2 muestra el perfil de MS/MS de un péptido triptico de BSA. El panel superior muestra el espectro MS/MS completo. El panel inferior muestra una expansión de la región del radical marcador de masa isobárica, reflejando las diferentes intensidades la abundancia del mismo péptido en la muestra de estudio (126) y la muestra de calibración (128, 129, 130, 131).

La Figura 3 muestra la curva de calibración de cuatro puntos para un conjunto de alícuotas de albúmina de suero bovino marcadas isobáricamente en una muestra de calibración.

50 La Figura 4 muestra un esquema de un método de preparación de una muestra de plasma para su uso en la presente invención.

La Figura 5 muestra un esquema de un método de acuerdo con la presente invención en el que antes del análisis de espectrometría de masas se hace correr una mezcla que comprende una muestra y una muestra de calibración en un gel PAGE 1D, y se recoge y se digiere una aplicación apropiada sobre el gel.

55 La Figura 6 muestra un esquema de un método de acuerdo con la presente invención para someter a ensayo un analito en una pluralidad de muestras.

La Figura 7 muestra un MS acumulado desde el perfil de retención de un péptido marcado de clusterina como se describe en el Ejemplo 3 a continuación. Inserción - vista con zoom de la región m/z 915-935 que muestra el péptido de interés.

60 La Figura 8 muestra un espectro MS/MS acumulado del péptido marcado de clusterina. Inserto: Vista con Zoom situado en la región del marcador de masas.

La Figura 9 muestra una curva de calibración del péptido clusterina elegido.

La Figura 10 muestra un espectro MALDI MS/MS de péptido FQVDNNR como se describe en el Ejemplo 4 a continuación.

La Figura 11 muestra un espectro MALDI MS/MS de péptido GAYPLSIEPIGVR como se describe en el Ejemplo 4 a continuación.

La Figura 12 muestra un espectro MALDI MS/MS de péptido GQYCYELDEK como se describe en el Ejemplo 4 a continuación.

5

La presente invención se describirá ahora en detalle.

Esta invención proporciona reactivos útiles para determinar las cantidades relativas y/o absolutas de analitos tales como péptidos, proteínas, nucleótidos y ácidos nucleicos y los medios para su producción. Específicamente, esta invención se refiere a analitos y/o muestras de calibración etiquetados isobáricamente para la detección mediante espectrometría de masas en tándem y métodos asociados de análisis de muestras de ensayo a los que se han añadido dichas muestras de calibración. La cuantificación relativa y/o absoluta de los analitos es facilitada particularmente por la invención.

Esta invención proporciona nuevos métodos para someter a ensayo analitos mediante espectrometría de masas en una variedad de configuraciones que incluyen la medición de cambios en proteínas, lípidos, hidratos de carbono y ácidos nucleicos en células, tejidos y fluidos en ciencias humanas, veterinarias, vegetales, microbianas, farmacéuticas, ambientales y de seguridad.

En los métodos de acuerdo con la presente invención, la cantidad del analito en la muestra de ensayo y en cada alícuota de la muestra de calibración se determina mediante espectrometría de masas. Una función de calibración se utiliza para relacionar la cantidad de analito en la muestra de ensayo medida mediante espectrometría de masas con respecto a la cantidad real del analito en la muestra de ensayo. Esta función de calibración utiliza las cantidades de analito en cada alícuota de la muestra de calibración (tanto las cantidades reales en las alícuotas antes del análisis como las cantidades correspondientes medidas mediante espectrometría de masas) como variables.

En una realización preferida, el método comprende una etapa de elaboración de un gráfico de la cantidad del analito en cada alícuota respecto a la cantidad del analito en cada alícuota determinada mediante espectrometría de masas. Este paso puede en cambio implicar simplemente el cálculo. La cantidad de analito en la muestra se calcula a continuación midiendo la cantidad de la muestra determinada mediante espectrometría de masas frente a la curva de calibración. En el contexto de esta invención, una referencia a "una cantidad medida mediante espectrometría de masas" es típicamente una abundancia de iones, intensidad de iones, u otra señal medida mediante espectrometría de masas que se refiera a la cantidad de un analito.

Típicamente, el método comprende:

1. i) en un espectrómetro de masas seleccionar y fragmentar iones de una relación masa a carga correspondiente al analito marcado con la etiqueta de masa, detectar y la producir un espectro de masas de iones fragmento, y la identificación de los iones fragmento correspondientes a los grupos marcadores de masa de las etiquetas de masa;
2. ii) determinar la cantidad del analito en cada muestra de ensayo basándose en la cantidad de sus grupos marcadores de masa en un espectro de masas con respecto a las cantidades de los grupos marcadores de masa de las alícuotas de la muestra de calibración en el mismo espectro de masas.

En una realización concreta, el método comprende las etapas de:

1. 1. Preparar opcionalmente el material de referencia marcado isobáricamente que contiene una biomolécula de referencia o de la mezcla de biomoléculas de referencia mediante la reacción con un conjunto de etiquetas de masa según la presente invención;
2. 2. Etiquetar de una muestra en la que la cantidad de la biomolécula o mezcla de biomoléculas se va a cuantificar mediante reacción con una del mismo conjunto de etiquetas de masa utilizada en el paso 1 anterior de acuerdo con esta invención;
3. 3. Añadir una cantidad conocida del material de referencia marcado isobáricamente en la muestra de ensayo marcada isobáricamente preparada en la etapa 2;
4. 4. Separar opcionalmente electroforéticamente o cromatográficamente las biomoléculas marcadas isobáricamente;
5. 5. Ionizar las biomoléculas marcadas en un espectrómetro de masas;
6. 6. Seleccionar los iones de una masa predeterminada a la razón de carga correspondiente a la razón masa a carga de los iones preferidos de la biomolécula marcada en un analizador de masas;
7. 7. Inducir la disociación de estos iones seleccionados mediante colisión o transferencia de electrones;
8. 8. Detectar los productos de colisión para identificar iones del producto de colisión que son indicativos de las etiquetas de masa ;
9. 9. Producir una curva patrón de la intensidad de iones frente a cantidad biomolécula basándose en la intensidad de los iones del producto de colisión que son indicativos de las etiquetas de masa ;

10. 10. Calcular la abundancia absoluta o relativa de la biomolécula o mezcla de biomoléculas.

En relación con esta invención, el término "espectrometría de masas" incluirá cualquier tipo de espectrometría de masas susceptible de análisis de fragmentación. Los espectrómetros de masas adecuados para uso en la presente invención incluyen los aparatos que comprenden cualquier forma de analizador MS/MS tal como un espectrómetro de masas de cuadrupolo triple equipado con una cámara de colisión, un espectrómetro de masas de trampa de iones capaz de fragmentar iones precursores seleccionados por bombardeo con átomos rápidos, disociación inducida por colisión, disociación por transferencia de masas de electrones o cualquier otra forma de fragmentación de iones parentales, y espectrómetros de masas de ionización por desorción con láser asistida por matrices (MALDI) equipados con un analizador de tiempo de vuelo doble (TOF/TOF) y un medio de fragmentación de iones parentales.

En ciertas realizaciones, la etapa de selección de los iones de una razón de masa a carga predeterminada se lleva a cabo en el primer analizador de masas de un instrumento en serie. Los iones seleccionados se canalizan en una celda de colisión separada donde se hacen colisionar con un gas o una superficie sólida. Los productos de colisión se canalizan a continuación en un analizador de masas adicional de un aparato en serie para detectar los productos de colisión. Los aparatos en serie típicos incluyen espectrómetros de masas de triple cuadrupolo, instrumentos de sector en tandem y espectrómetros de masas de tiempo de vuelo cuadrupolares.

En otras realizaciones, la etapa de selección de los iones de una razón de masa a carga predeterminada, la etapa de colisión de los iones seleccionados con un gas y la etapa de detección de los productos de colisión se realizan en la misma zona del espectrómetro de masas. Esto se puede efectuar en analizadores de masas con trampa de iones y espectrómetros de masas de resonancia iónica en ciclotrón con transformada de Fourier, por ejemplo.

En la presente invención, se pueden emplear técnicas de ionización por desorción con láser asistida por matriz (MALDI). La MALDI requiere que la solución de biomolécula este embebida en un gran exceso molar de una "matriz" foto-excitable. La aplicación de luz láser de la frecuencia apropiada da como resultado la excitación de la matriz, que a su vez conduce a la evaporación rápida de la matriz junto con su biomolécula atrapada. La transferencia de protones desde la matriz ácida a la biomolécula da lugar a formas protonadas de la biomolécula que se pueden detectar mediante espectrometría de masas de iones positivos, en especial espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF). También es posible la espectrometría de masas de iones negativos mediante MALDI TOF. Esta técnica confiere una cantidad significativa de energía de traslación a los iones, pero no tiende a inducir una fragmentación excesiva a pesar de esto. La energía del láser y el momento de la aplicación de la diferencia de potencial utilizada para acelerar los iones de la fuente se puede utilizar para controlar la fragmentación con esta técnica. Esta técnica resulta altamente favorecida debido a su amplio intervalo de masas, debido a la prevalencia de los iones de una sola carga en su espectro y debido a la capacidad de analizar péptidos múltiples simultáneamente. La técnica TOF/TOF se pueden emplear en la presente invención.

La matriz de foto-excitable comprende un "colorante", es decir, un compuesto que absorbe fuertemente la luz de una frecuencia concreta, y que preferiblemente no irradia esa energía mediante fluorescencia o fosforescencia sino más bien disipa la energía térmica, es decir, a través de modos de vibracionales. Es la vibración de la matriz causada por la excitación del láser la que da como resultado una rápida sublimación del colorante, que simultáneamente ocupa el analito embebido en la fase de gas.

Aunque las técnicas de MALDI son útiles en el contexto de la presente invención, la invención no se limita a este tipo de técnica, y el experto en la técnica puede emplear otros mecanismos comunes en la técnica en la presente invención, si se desea. Por ejemplo se pueden emplear electropulverización o espectrometría de masas de nanoelectropulverización.

El término "analito" no es particularmente limitante, y los métodos de acuerdo con la presente invención se pueden emplear para someter a ensayo cualquier tipo de molécula siempre que se pueda analizar mediante espectrometría de masas, y sea susceptible de ser marcada mediante un etiqueta de masa isobárica con un grupo marcador de masa con masa espectrométricamente distinta. Los analitos incluyen aminoácidos, péptidos, polipéptidos, proteínas, glicoproteínas, lipoproteínas, ácidos nucleicos, polinucleótidos, oligonucleótidos, ADN, ARN, ácidos péptido-nucleicos, azúcares, almidones y carbohidratos complejos, grasas y lípidos complejos, polímeros y moléculas orgánicas pequeñas tales como fármacos y moléculas de tipo fármaco. Preferiblemente el analito es un péptido, proteína, nucleótido o ácido nucleico.

En relación con esta invención, el término proteína abarcará cualquier molécula que comprenda dos o más aminoácidos incluidos di-péptidos, tri-péptidos, péptidos, polipéptidos y proteínas.

En relación con esta invención, el término ácido nucleico abarcará cualquier molécula que comprenda dos o más bases de nucleótidos, incluyendo di-nucleótidos, tri-nucleótidos, oligonucleótidos, ácidos desoxirribonucleicos, ácidos ribonucleicos y ácidos peptidonucleicos.

En relación con esta invención, el término analito será sinónimo del término biomolécula.

Las etiquetas de masa empleadas para etiquetar los analitos en la presente invención se describirán ahora con más detalle.

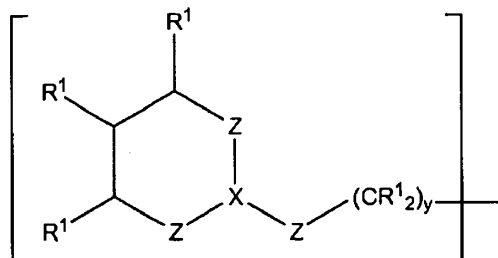
El experto en la técnica comprenderá que la naturaleza de la etiqueta de masa isobárica no es particularmente limitante. Se conocen en la técnica diversas etiquetas de masa isobáricas tales como las Etiquetas de Masa en Tándem (Thompson et al., 2003, Anal. Chem. 75 (8): 1895 a 1904 (Incorporada a la presente memoria como referencia) descritas en el documento WO 01/68664 (Incorporado a la presente memoria como referencia) y el documento WO 03/025576 (Incorporado a la presente memoria como referencia), las etiquetas iPROT descritas en el documento US 6824981 (Incorporado a la presente memoria como referencia) y etiquetas iTRAQ (Pappin et al., 2004, Methods in Clinical Proteomics Manuscript M400129-MCP200 (incorporada a la presente memoria como referencia)). Cualquiera de estas etiquetas de masa isobáricas son adecuadas para la preparación de las muestras y las muestras de calibración y para realizar los métodos de la presente invención.

Radical Marcador de Masa

En una realización preferida, la presente invención utiliza una etiqueta de masa como se ha definido anteriormente en el que el peso molecular del radical marcador de masa es de 300 Daltons o menos, preferiblemente de 250 Daltons o menos, más preferiblemente 100 a 250 Daltons, muy preferiblemente de 100-200 daltons. Los pesos moleculares particularmente preferidos del radical marcador de masa son 125, 126, 153 y 154 Daltons, o pesos en los que uno o más o todos los átomos de C^{12} se sustituyen por átomos de C^{13} , por ejemplo, para un radical marcador de masa no sustituido que tiene un peso de 125, las masas para sus contrapartes sustituidas serían 126, 127, 128, 129, 130 y 131 Daltons para la sustitución con 1, 2, 3, 4, 5 y 6 átomos de C^{13} respectivamente, y/o uno o más o todos los átomos de N^{14} son reemplazados por átomos de N^{15} .

Los componentes del radical marcador de masa de esta invención son preferiblemente resistentes a la fragmentación de manera que el sitio de fragmentación de los marcadores se puede controlar mediante la introducción de una conexión que se rompe fácilmente mediante Disociación Inducida por Colisión (CID), Disociación Inducida en Superficie, Disociación por Captura de Electrones (ECD), Disociación por Transferencia de Electrones (ETD) o Bombardeo con Átomos Rápidos. En la realización más preferida, el enlace se rompe fácilmente mediante CID.

El radical marcador de masas utilizado en la presente invención típicamente comprende el siguiente grupo:



en el que la unidad cíclica es aromática o alifática y comprende de 0 a 3 enlaces dobles de forma independiente entre dos átomos adyacentes cualesquiera; cada Z es independientemente N, $N(R^1)$, $C(R^1)$, CO, $CO(R^1)$ (es decir, $-OC(R^1)-$ o $O-C(R^1)-O-$), $C(R^1)_2$, O o S; X es N, C o $C(R^1)$; cada R^1 es independientemente H, un grupo alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado sustituido o no sustituido, un grupo cíclico alifático sustituido o no sustituido, un grupo aromático sustituido o no sustituido o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido; e y es un número entero de 0-10.

Los sustituyentes del radical marcador de masa no están particularmente limitados y pueden comprender cualquier grupo orgánico y/o uno o más átomos de cualquiera de los grupos IIIA, IVA, VA, VIA o VIIA de la Tabla Periódica, tales como B, Si, N, P, O, S o un átomo de halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br o I).

Cuando el sustituyente comprende un grupo orgánico, el grupo orgánico comprende preferiblemente un grupo hidrocarbonado. El grupo hidrocarbonado puede comprender una cadena lineal, una cadena ramificada o un grupo cíclico. Independientemente, el grupo hidrocarbonado puede comprender un grupo alifático o un grupo aromático. También independientemente, el grupo hidrocarbonado puede comprender un grupo saturado o insaturado.

Cuando el hidrocarburo comprende un grupo insaturado, éste puede comprender una o más funcionalidades alqueno y/o una o más funcionalidades alquino. Cuando el hidrocarburo comprende un grupo de cadena lineal o ramificada, éste puede comprender uno o más grupos alquilo primarios, secundarios y/o terciarios. Cuando el hidrocarburo comprende un grupo cíclico, éste puede comprender un anillo aromático, un anillo alifático, un grupo

heterocíclico, y/o derivados de anillos fusionados de estos grupos. El grupo cíclico puede comprender por tanto un grupo benceno, naftaleno, antraceno, indeno, fluoreno, piridina, quinolina, tiofeno, benzotiofeno, furano, benzofurano, pirrol, indol, imidazol, tiazol, y/o un grupo oxazol, así como regioisómeros de los grupos anteriores.

El número de átomos de carbono en el grupo hidrocarbonado no está especialmente limitado, pero preferiblemente el grupo hidrocarbonado puede comprender de 1 a 40 átomos de carbono. El grupo hidrocarbonado puede así ser un hidrocarburo inferior (1 a 6 átomos de C) o un hidrocarburo superior (7 átomos de C o más, por ejemplo, 7-40 átomos de C). El número de átomos en el anillo del grupo cíclico no está especialmente limitado, pero preferiblemente el anillo del grupo cíclico comprende de 3 a 10 átomos, tal como 3, 4, 5, 6 o 7 átomos.

Los grupos que comprenden heteroátomos descritos anteriormente, así como cualquiera de los otros grupos definidos antes, pueden comprender uno o más heteroátomos de cualquiera de los grupos IIIA, IVA, VA, VIA o VIIA de la Tabla Periódica, tales como un átomo de B, Si, N, P, O, o S o un átomo de halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br o I). De este modo, el sustituyente puede comprender uno o más de cualquiera de los grupos funcionales comunes en la química orgánica, tales como grupos hidroxil, grupos ácido carboxílico, grupos éster, grupos éter, grupos aldehído, grupos cetona, grupos amina, grupos amida, grupos imina, grupos tiol, grupos tioéter, grupos sulfato, grupos ácido sulfónico, y grupos fosfato, etc. El sustituyente puede comprender también derivados de estos grupos, tales como anhídridos de ácidos carboxílicos y haluros de ácidos carboxílicos.

Además, cualquier sustituyente puede comprender una combinación de dos o más de los sustituyentes y/o grupos funcionales definidos anteriormente.

El conector escindible de la etiqueta de masas utilizado en la presente invención no está especialmente limitado. Preferiblemente, el conector escindible es un conector escindible mediante Disociación Inducida por Colisión, Disociación Inducida en Superficie, Disociación por Captura de Electrones (ECD), Disociación por Transferencia de Electrones (ETD), o Bombardeo con Átomos Rápidos. En la realización más preferida, la conexión es escindible por CID. El conector puede comprender un enlace amida.

Conector

En la discusión anterior y a continuación se hace referencia a grupos conectores que se pueden utilizar para conectar moléculas de interés a los compuestos etiquetas de masa usados en esta invención. Se conoce en la técnica una variedad de conectores que se pueden introducir entre las etiquetas de masa de esta invención y su molécula biológica unida covalentemente. Algunos de estos conectores pueden ser escindibles. Se pueden utilizar como conectores oligo- o poli- etilenglicoles o sus derivados, tales como los descritos en Maskos, U. & Southern, EM Nucleic Acids Research 20: 1679 -1684, 1992. Los conectores basados en ácido succínico también se utilizan ampliamente, aunque estos son menos preferidos para aplicaciones que implican el etiquetado de oligonucleótidos, ya que éstos son generalmente bases lábiles y por tanto son incompatibles con las etapas de desprotección mediadas por bases utilizadas en diversos sintetizadores de oligonucleótidos.

El alcohol propargílico es un conector bifuncional que proporciona una conexión que es estable en las condiciones de síntesis de oligonucleótidos y es un conector preferido para su uso con esta invención en relación con las aplicaciones de oligonucleótidos. De un modo similar el 6-aminohexanol es un reactivo bifuncional útil para conectar moléculas apropiadamente funcionalizadas y también es un conector preferido,

Se puede utilizar una variedad de grupos conectores escindibles conocidos combinados con los compuestos empleados en esta invención, tales como conectores fotoescindibles. Los grupos orto-nitrobencilo son conocidos como conectores fotoescindibles, particularmente los ésteres de 2-nitrobencilo y la 2-nitrobencilaminas, que se escinden en el enlace bencilamina. Para una revisión de los conectores escindibles véase Lloyd-Williams et al, Tetrahedron 49, 11065-11133, 1993, que cubre una variedad de conectores fotoescindibles y escindibles químicamente.

El documento WO 00/02895 describe los compuestos de vinilsulfona como conectores escindibles, que son también aplicables para su uso con esta invención, particularmente en aplicaciones que implican el marcaje de polipéptidos, péptidos y aminoácidos. El documento WO 00/02895 describe el uso de compuestos de silicio como conectores que son escindibles por bases en la fase gaseosa. Estos conectores son también aplicables para su uso con esta invención, particularmente en aplicaciones que implican el marcaje de oligonucleótidos.

Radical de Normalización de Masas

La estructura del radical de normalización de la masas de la etiqueta de masa utilizada en la presente invención no está particularmente limitada siempre que sea adecuada para garantizar que la etiqueta de masa tiene una masa agregada deseada. Sin embargo, el radical de normalización de masas comprende preferiblemente un grupo alifático sustituido o no sustituido C₁-C₂₀ lineal o ramificado, y/o uno o más aminoácidos sustituidos o no sustituidos.

Preferiblemente, el radical de normalización de masas comprende un grupo alifático sustituido o no sustituido C₁-C₆, más preferiblemente un grupo alifático sustituido o no sustituido C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, aún más preferiblemente un grupo alifático sustituido o no sustituido C₁, C₂, o C₅, o un grupo metilo sustituido C₁.

5 Los uno o más aminoácidos sustituidos o no sustituidos pueden ser aminoácidos esenciales o no esenciales de origen natural cualesquiera o aminoácidos de origen no natural. Los aminoácidos preferidos son alanina, β-alanina y glicina.

10 Los sustituyentes del radical de normalización de la masa no están limitados particularmente y pueden comprender cualquier grupo orgánico y/o uno o más átomos de cualquiera de los grupos IIIA, IVA, VA, VIA o VIIA de la Tabla Periódica, tales como un átomo de B, Si, N, P, O, o S o un átomo de halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br o I).

15 Cuando el sustituyente comprende un grupo orgánico, el grupo orgánico comprende preferiblemente un grupo hidrocarbonado. El grupo hidrocarbonado puede comprender una cadena lineal, una cadena ramificada o un grupo cíclico. Independientemente, el grupo hidrocarbonado puede comprender un grupo alifático o un grupo aromático. También independientemente, el grupo hidrocarbonado puede comprender un grupo saturado o insaturado.

20 Cuando el hidrocarburo comprende un grupo insaturado, éste puede comprender una o más funcionalidades alqueno y/o una o más funcionalidades alquino. Cuando el hidrocarburo comprende un grupo de cadena lineal o ramificada, éste puede comprender uno o más grupos alquilo primarios, secundarios y/o terciarios. Cuando el hidrocarburo comprende un grupo cíclico éste puede comprender un anillo aromático, un anillo alifático, un grupo heterocíclico, y/o derivados de anillos fusionados de estos grupos. El grupo cíclico puede comprender por tanto un grupo benceno, naftaleno, antraceno, indeno, fluoreno, piridina, quinolina, tiofeno, benzotiofeno, furano, benzofurano, pirrol, indol, imidazol, tiazol, y/o oxazol, así como regioisómeros de los grupos anteriores.

25 El número de átomos de carbono en el grupo hidrocarbonado no está especialmente limitado, pero preferiblemente el grupo hidrocarbonado comprende 1 a 40 átomos de carbono. El grupo hidrocarbonado puede así ser un hidrocarburo inferior (1 a 6 átomos de C) o un hidrocarburo superior (7 átomos de C o más, por ejemplo, 7-40 átomos de C). El número de átomos en el anillo del grupo cíclico no está especialmente limitado, pero
30 preferentemente el anillo del grupo cíclico comprende de 3-10 átomos, tales como 3, 4, 5, 6 o 7 átomos.

Los grupos que comprenden los heteroátomos descritos anteriormente, así como cualquiera de los otros grupos definidos anteriormente, pueden comprender uno o más heteroátomos de cualquiera de los grupos IIIA, IVA, VA, VIA o VIIA de la Tabla Periódica, tales como un átomo de B, Si, N, P, O, o S o un átomo de halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br o I). De este modo, el sustituyente puede comprender uno o más de cualquiera de los grupos funcionales
35 comunes en la química orgánica, tales como grupos hidroxí, grupos ácido carboxílico, grupos éster, grupos éter, grupos aldehído, grupos cetona, grupos amina, grupos amida, grupos imina, grupos tiol, grupos tioéter, grupos sulfato, grupos ácido sulfónico, y grupos fosfato, etc. El sustituyente puede comprender también derivados de estos grupos, tales como anhídridos de ácido carboxílico y haluros de ácido carboxílico.

40 Además, cualquier sustituyente puede comprender una combinación de dos o más de los sustituyentes y/o grupos funcionales definidos anteriormente.

Etiqueta de Masa Reactiva

45 Los etiquetas de masa reactivas utilizadas típicamente en la presente invención para el etiquetado y la detección de una molécula biológica mediante espectroscopía de masas comprenden una funcionalidad reactiva para facilitar el anclaje o para anclar la etiqueta de masa a una molécula biológica y una etiqueta de masa como se ha definido anteriormente. En realizaciones preferidas de la presente invención, la funcionalidad reactiva permite que la etiqueta
50 de masa reaccione covalentemente con un analito, preferiblemente un aminoácido, péptido o polipéptido. La funcionalidad reactiva se puede anclar a las etiquetas de masa a través de un conector que puede ser o puede no ser escindible. La funcionalidad reactiva puede estar anclada al radical de la etiqueta de masa del marcador de masa o el radical de normalización de masas de la etiqueta de masa.

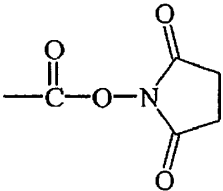
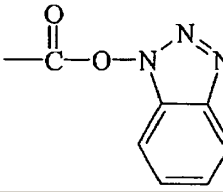
55 Se puede introducir una variedad de funcionalidades reactivas en las etiquetas de masa usadas en esta invención. La estructura de la funcionalidad reactiva no está particularmente limitada siempre que sea capaz de reaccionar con uno o más sitios reactivos en la molécula biológica que se vaya a etiquetar. La funcionalidad reactiva es preferiblemente un nucleófilo o electrófilo.

60 En las realizaciones más simples puede ser un éster de N-hidroxisuccinimida. Una etiqueta de masa activada de N-hidroxisuccinimida también se podría hacer reaccionar con hidrazina para dar una funcionalidad hidrazida reactiva, la cual se puede utilizar para etiquetar restos de azúcar oxidados con peryodato, por ejemplo. Se pueden utilizar grupos amino o tioles como funcionalidades reactivas en algunas aplicaciones. Se puede utilizar lisina para acoplar etiquetas de masa a funcionalidades carboxilo libres utilizando una carbodiimida como reactivo de acoplamiento. La

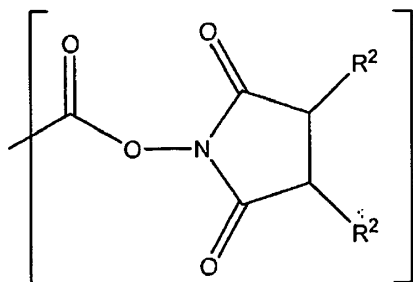
lisina también se puede utilizar como punto de partida para la introducción de otras funcionalidades reactivas en las etiquetas de masa de esta invención. La funcionalidad maleimida reactiva con tiol se puede introducir por reacción del grupo amino épsilon de la lisina con anhídrido maleico. El grupo tiol de la cisteína se puede utilizar como punto de partida para la síntesis de una variedad de compuestos alquénilsulfona, que son reactivos de marcaje de proteínas útiles que reaccionan con tioles y aminas. Se pueden utilizar compuestos tales como ácido aminohexanoico para proporcionar un espaciador entre la radical marcador de masas de masa modificada o el radical de normalización de masas y la funcionalidad reactiva.

La Tabla 1 siguiente enumera algunas funcionalidades reactivas que pueden reaccionar con funcionalidades nucleofílicas que se encuentran en las biomoléculas para generar un enlace covalente entre las dos entidades. Cualquiera de las funcionalidades enumeradas más abajo se podría introducir en los compuestos de esta invención para permitir que los marcadores de masa se unan a una molécula biológica de interés. Se puede utilizar una funcionalidad reactiva para introducir un grupo conector adicional con una funcionalidad reactiva adicional si se desea. No se pretende que la Tabla 1 sea exhaustiva y la presente invención no se limita a la utilización solo de las funcionalidades enumeradas.

Tabla 1

Funcionalidad nucleofílica	Funcionalidad reactiva	Grupo Conector Resultante
-SH	$-\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CR}_2$	$-\text{S}-\text{CR}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_2-$
$-\text{NH}_2$	$-\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CR}_2$	$-\text{N}(\text{CR}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_2)_2\text{O}-\text{NH}-\text{CR}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_2-$
$-\text{NH}_2$		$-\text{CO}-\text{NH}-$
$-\text{NH}_2$		$-\text{CO}-\text{NH}-$
$-\text{NH}_2$	$-\text{NCO}$	$-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-$
$-\text{NH}_2$	$-\text{NCS}$	$-\text{NH}-\text{CS}-\text{NH}-$
$-\text{NH}_2$	$-\text{CHO}$	$-\text{CH}_2-\text{NH}-$
$-\text{NH}_2$	$-\text{SO}_2\text{Cl}$	$-\text{SO}_2-\text{NH}$
$-\text{NH}_2$	$-\text{CH}=\text{CH}-$	$-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
$-\text{OH}$	$-\text{OP}(\text{NCH}(\text{CH}_3)_2)_2$	$-\text{OP}(=\text{O})(\text{O})\text{O}-$

En una realización preferida de la presente invención la funcionalidad reactiva comprende el grupo siguiente:



donde cada R^2 es independientemente H, un grupo alquilo C_1 - C_6 lineal o ramificado sustituido o no sustituido, un grupo cíclico alifático sustituido o no sustituido, un grupo aromático sustituido o no sustituido o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido.

- 5 Los sustituyentes de la funcionalidad reactiva no están limitados particularmente y pueden comprender cualquier grupo orgánico y/o uno o más átomos de cualquiera de los grupos IIIA, IVA, VA, VIA o VIIA de la Tabla Periódica, tales como un átomo de B, Si, N, P, O, o S o un átomo de halógeno (por ejemplo F, Cl, Br o I).

- 10 Cuando el sustituyente comprende un grupo orgánico, el grupo orgánico comprende preferiblemente un grupo hidrocarbonado. El grupo hidrocarbonado puede comprender una cadena lineal, una cadena ramificada o un grupo cíclico. Independientemente, el grupo hidrocarbonado puede comprender un grupo alifático o un grupo aromático. También independientemente, el grupo hidrocarbonado puede comprender un grupo saturado o insaturado.

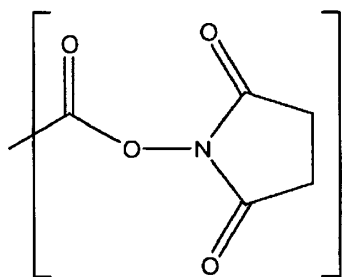
- 15 Cuando el hidrocarburo comprende un grupo insaturado, éste puede comprender una o más funcionalidades alqueno y/o una o más funcionalidades alquino. Cuando el hidrocarburo comprende un grupo de cadena lineal o ramificada, éste puede comprender uno o más grupos alquilo primarios, secundarios y/o terciarios. Cuando el hidrocarburo comprende un grupo cíclico, éste puede comprender un anillo aromático, un anillo alifático, un grupo heterocíclico, y/o derivados de anillos fusionados de estos grupos. El grupo cíclico puede comprender por tanto un grupo benceno, naftaleno, antraceno, indeno, fluoreno, piridina, quinolina, tiofeno, benzotiofeno, furano, benzofurano, pirrol, indol, imidazol, tiazol, y/u oxazol, así como regioisómeros de los grupos anteriores.

- 25 El número de átomos de carbono en el grupo hidrocarbonado no está especialmente limitado, pero preferiblemente el grupo hidrocarbonado comprende de 1 a 40 átomos de carbono. El grupo hidrocarbonado puede ser por tanto un hidrocarburo inferior (1 a 6 átomos de C) o un hidrocarburo superior (7 átomos de C o más, por ejemplo, 7-40 átomos de C). El número de átomos en el anillo del grupo cíclico no está especialmente limitado, pero preferentemente el anillo del grupo cíclico comprende de 3-10 átomos, tal como 3, 4, 5, 6 o 7 átomos.

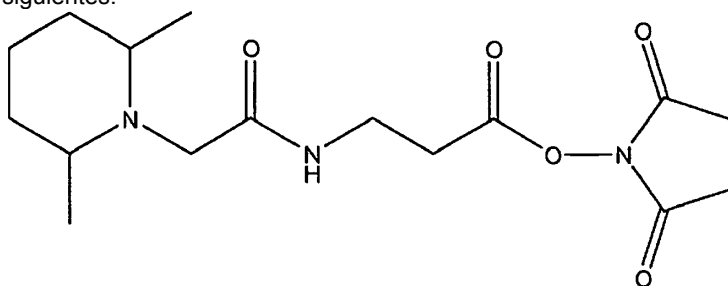
- 30 Los grupos que contienen los heteroátomos descritos anteriormente, así como cualquiera de los otros grupos definidos anteriormente, pueden comprender uno o más heteroátomos de cualquiera de los grupos IIIA, IVA, VA, VIA o VIIA de la Tabla Periódica, tales como un átomo de B, Si, N, P, O, o S o un átomo de halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br o I). Así, el sustituyente puede comprender uno o más de cualquiera de los grupos funcionales comunes en la química orgánica, tales como grupos hidroxilo, grupos ácido carboxílico, grupos éster, grupos éter, grupos aldehído, grupos cetona, grupos amina, grupos amida, grupos imina, grupos tiol, grupos tioéter, grupos sulfato, grupos ácido sulfónico, y grupos fosfato, etc. El sustituyente puede comprender también derivados de estos grupos, tales como anhídridos de ácido carboxílico y haluros de ácido carboxílico.

Además, cualquier sustituyente puede comprender una combinación de dos o más de los sustituyentes y/o grupos funcionales definidos anteriormente.

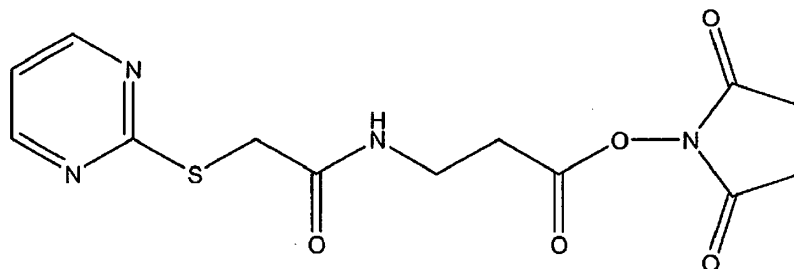
- 40 En una realización más preferida, la funcionalidad reactiva comprende el grupo siguiente:



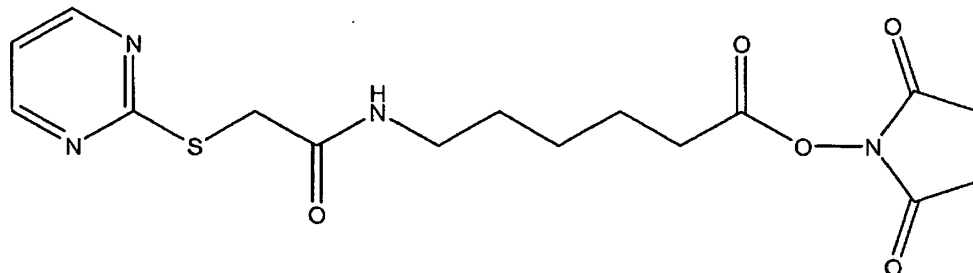
En una realización preferida de la presente invención la etiqueta de masa reactiva tiene una de las estructuras siguientes:



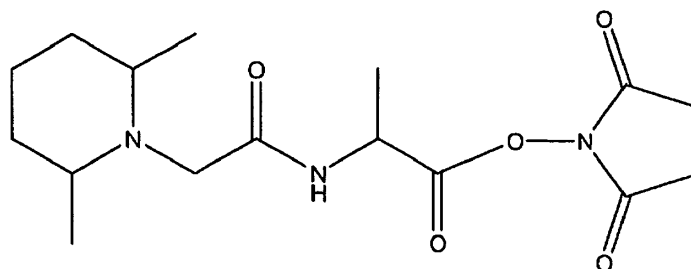
(2,5-Dioxo-pirrolidin-1-il)-éster de ácido 3-[2-(2,6-dimetil-piperidin-1-il)-acetilamino]-propanoico (DMPip-β Ala-OSu)



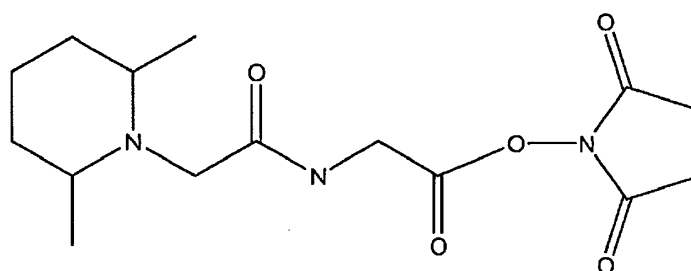
5 (2,5-Dioxo-pirrolidin-1-il)-éster de ácido 3-[2-(pirimidin-2-ilsulfanil)-acetilamino]-propanoico (Pym-beta Ala-OSu)



10 (2,5-Dioxo-pirrolidin-1-il)-éster de ácido 6-[(pirimidin-2-ilsulfanil)-acetilamino]-hexanoico (Pym-C6-OSu)



(2,5-Dioxo-pirrolidin-1-il)-éster de ácido 2-[2-(2,6-dimetil-piperidin-1-il)-acetilamino]-propanoico (DMPip-Ala-OSu)



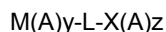
15 (2,5-Dioxo-pirrolidin-1-il)-éster de ácido [2-(2,6-dimetil-piperidin-1-il)-acetilamino]-ácido acético (Pym-Gly-OSu).

20 En el método de acuerdo con la presente invención, cada etiqueta en el conjunto tiene una masa agregada común y cada etiqueta en el conjunto tiene un radical marcador de masa de una masa única.

25 Se prefiere que, cada radical marcador de masa en el conjunto tenga una estructura básica común y cada radical de normalización de masas en el conjunto tenga una estructura básica común, y cada etiqueta de masa en el conjunto comprende uno o más radicales ajustadores de masas, estando unidos los radicales ajustadores de masas a, o situados en de la estructura básica del radical marcador de masa y/o la estructura básica del radical de normalización de masas. En esta realización, cada radical marcador de masa en el conjunto comprende un número diferente de radicales ajustadores de masas y cada etiqueta de masa en el conjunto tiene el mismo número de radicales ajustadores de masas.

A lo largo de esta descripción, mediante estructura básica común, se significa que dos o más restos comparten una estructura que tiene sustancialmente el mismo esqueleto estructural cadena principal, o núcleo. El esqueleto comprende el radical marcador de masa de la fórmula dada anteriormente o el radical de normalización de masas definido anteriormente. El esqueleto puede comprender adicionalmente varios aminoácidos unidos por enlaces amida. Otras unidades tales como unidades ariléter también pueden estar presentes. El esqueleto o cadena principal puede comprender sustituyentes pendientes del mismo, o reposiciones atómicas o isotópicas dentro del mismo, sin cambiar la estructura básica común.

En una realización preferida, el conjunto de etiquetas de masa o etiquetas reactivas de masa según la invención comprende etiquetas de masa que tienen la estructura siguiente:



donde M es un radical de normalización de masas, X es un radical marcador de masa, A es un radical ajustador de masas, L es un conector escindible, y y y z son números enteros de 0 o mayor, e y + z es un número entero de 1 o mayor. Preferiblemente M es un grupo resistente a la fragmentación, L es un conector que es susceptible a la fragmentación al colisionar con otra molécula o átomo y X es preferiblemente un grupo resistente a la fragmentación, pre-ionizado.

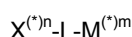
La suma de las masas de M y X es la misma para todos los miembros del conjunto. Preferiblemente M y X tienen la misma estructura básica o estructura núcleo, estando esta estructura modificada por los radicales ajustadores de masas. El radical ajustador de masas asegura que la suma de las masas de M y X sea la misma para todas las etiquetas de masa en un conjunto, pero asegura que cada X tenga una masa distinta (única).

El radical ajustador de masas (A) se selecciona preferentemente entre:

1. (A) un sustituyente isotópico situado dentro del radical marcador de masa y/o dentro de la fracción de normalización de masas, y
2. (B) átomos sustituyentes o grupos anclados al radical marcador de masa y/o unidos al radical de normalización de masas.

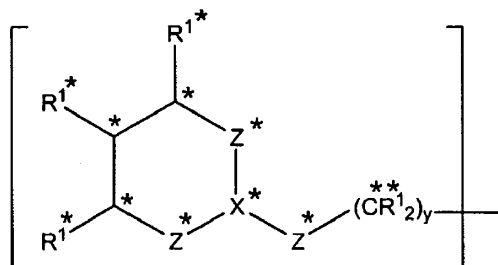
Preferiblemente, el radical ajustador de masas se selecciona entre un átomo de halógeno sustituyente, un grupo metilo sustituyente, y sustituyentes isotópicos H^2 , N^{15} , O^{18} , o C^{13} .

En una realización preferida de la presente invención, cada etiqueta de masa en el conjunto de etiquetas de masa definido anteriormente tiene la siguiente estructura:



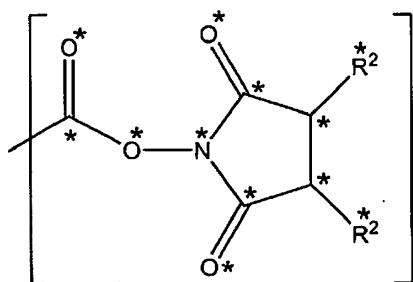
donde X es el radical marcador de masa, L es el conector escindible, M es el radical de normalización de masas, * es un radical ajustador de masa isotópica, y n y m son números enteros de 0 o mayores de tal manera que cada etiqueta en el conjunto comprende un radical marcador de masa que tiene una masa única y cada etiqueta en el conjunto tiene una masa agregada común.

Se prefiere que X comprenda los siguientes grupos:



donde R^1 , Z, X e y se definen como antes y cada etiqueta en el conjunto comprende 0, 1 o más * de manera que cada etiqueta en el conjunto comprende un radical marcador de masa tiene una masa única y cada etiqueta en el conjunto tiene una masa agregada común.

En una realización preferida adicional, las etiquetas de masa reactivas de la presente invención comprenden la grupo siguiente funcionalidad reactiva:

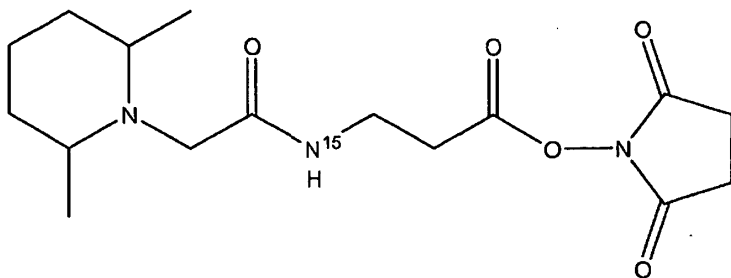
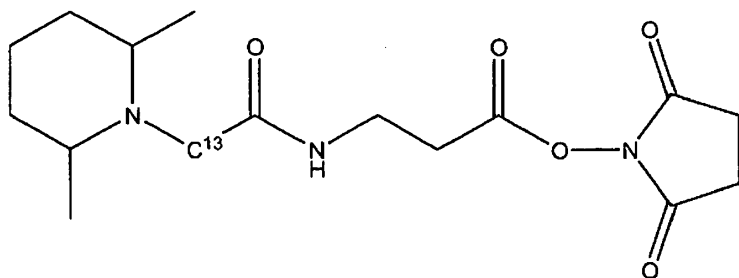


5 en la que R^2 se define como antes y el conjunto comprende 0, 1 o más * de manera que cada etiqueta en el conjunto comprende un radical marcador de masa tiene una masa única y cada etiqueta en el conjunto tiene una masa agregada común.

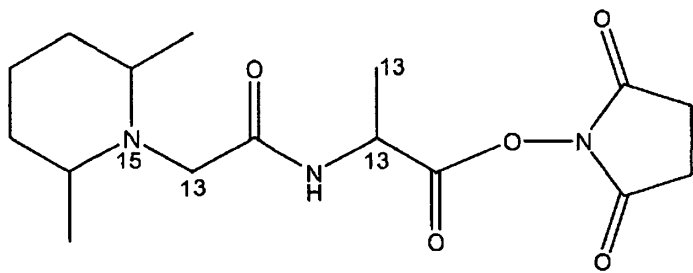
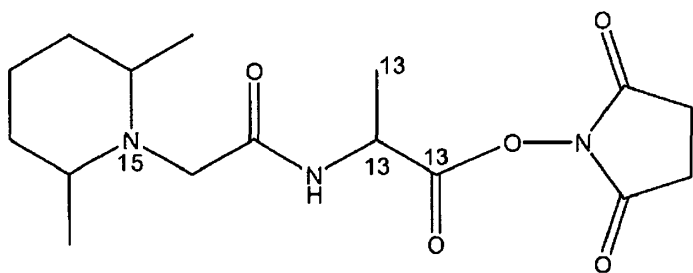
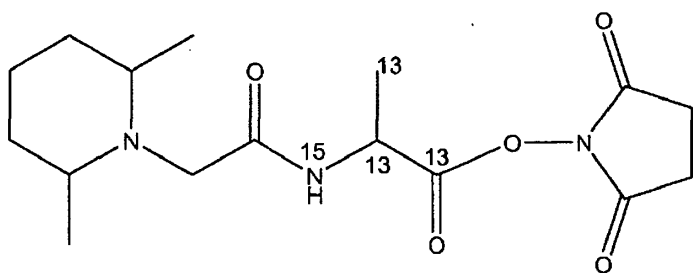
10 En todas las fórmulas preferidas anteriores, se prefiere particularmente que la especie isotópica * esté situado dentro del radical marcador de masa y/o el conector y/o el radical ajustador de masas, en lugar de en cualquier resto reactivo que está presente para facilitar el anclaje de la etiquetar a un analito. El número de sustituyentes isotópicos no está especialmente limitado y se puede determinar dependiendo de la cantidad de etiquetas en el conjunto. Típicamente, el número de especies * es 0 a 20, más preferiblemente de 0 a 15 y más preferiblemente de 1 a 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8. En un conjunto de dos etiquetas, se prefiere que el número de especies * sea 1, mientras que en un conjunto de 5 etiquetas, se prefiere que el número sea 4, mientras que en un conjunto de 6 etiquetas, se prefiere que el número es 5. Sin embargo, el número puede variar dependiendo de la estructura química de la etiqueta.

15 Si se desea, también se pueden emplear variantes isotópicas de S como radicales ajustadores de masas, si las etiquetas contienen uno o más átomos de azufre.

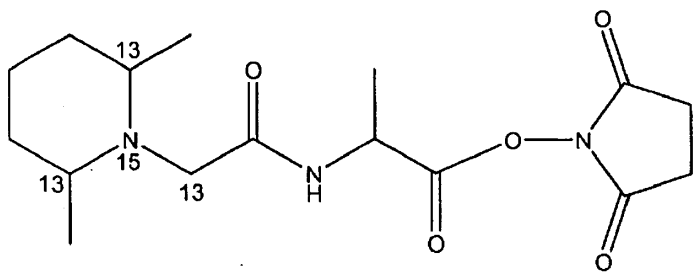
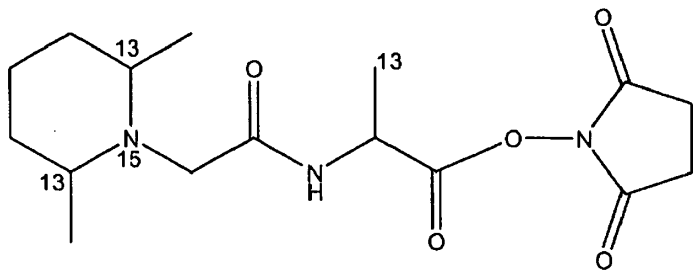
20 En una realización particularmente preferida en la que el radical ajustador de masas es N^{15} o C^{13} el conjunto de etiquetas de masa comprende dos reactivos etiquetas de masa que tienen las estructuras siguientes:



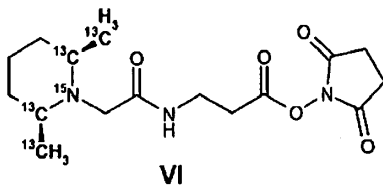
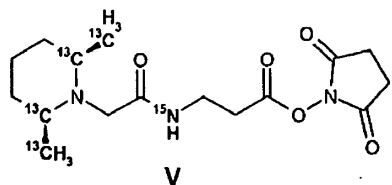
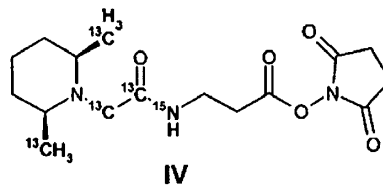
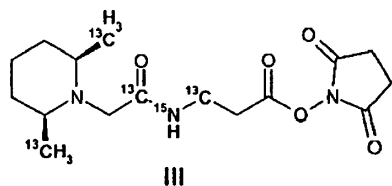
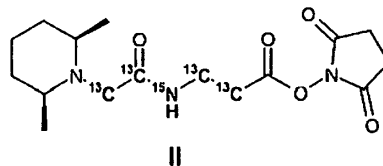
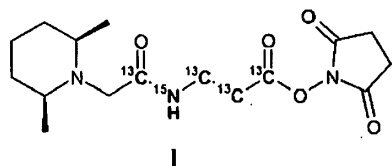
25 En una realización alternativa particularmente preferida en la que el radical ajustador de masas es N^{15} o C^{13} el conjunto de etiquetas de masa reactivas comprende el conjunto que comprende cinco etiquetas de masa que tienen las estructuras siguientes:



5



En una realización alternativa particularmente preferida en la que el radical ajustador de masas es N¹⁵ o C¹³ el conjunto de etiquetas de masa reactivas comprende seis etiquetas de masa I-VI que tienen las siguientes estructuras, o estereoisómeros de estas estructuras:



El método de acuerdo con la presente invención puede comprender una etapa adicional de separación de los componentes de las muestras antes de la etapa (a). El método también puede comprender una etapa de digestión de cada muestra con al menos una enzima para digerir los componentes de las muestras antes de la etapa (a). La etapa de digestión con enzima también puede ocurrir después de la etapa (a) pero antes de la etapa (b).

En una realización adicional, las etiquetas de masa utilizados en el método comprenden adicionalmente un ligando de captura por afinidad. El ligando de captura por afinidad de la etiqueta de masa se une a un contraligando con el fin de separar los analitos etiquetados isobáricamente de los analitos no marcados después de la etapa (a) pero antes de la etapa (b).

Ligandos de captura por afinidad son ligandos que tienen compañeros de unión altamente específicos. Estos compañeros de unión permiten que las moléculas etiquetadas con el ligando sean capturadas selectivamente por el compañero de unión. Preferiblemente, se derivatiza un soporte sólido con el compañero de unión de manera que las moléculas de ligando por afinidad etiquetadas puedan ser capturadas selectivamente sobre el soporte en fase sólida. Un ligando de captura por afinidad preferido es la biotina, que se puede introducir en las etiquetas de masa de esta invención mediante métodos convencionales conocidos en la técnica. En particular, se puede incorporar un residuo de lisina después del radical marcador de masa o resto de nominalización de masas a través del cual se puede conectar una biotina reactiva con aminas a las etiquetas de masa (véase, por ejemplo Geahlen RL et al, Anal Biochem 202 (1): 68-67, "A general method for preparation of peptides biotinylated at the carboxy terminus." 1992; Sawutz D.G. et al., Peptides 12(5): 1019-1012, "Synthesis and molecular characterization of a biotinylated analogue of [Lys]bradykinin." 1991; Natarajan S. et al., Int J Pept Protein Res 40(6): 567-567, "Site-specific biotinylation. A novel approach and its application to endothelin-1 analogues and PTH-analogue.", 1992). También es aplicable Iminobiotina. Se encuentra disponible una variedad de contra-ligandos de avidina para biotina, que incluyen avidina y estreptavidina monoméricas y tetraméricas, todos los cuales están disponibles sobre diversos soportes sólidos.

Otros ligandos de captura por afinidad incluyen digoxigenina, fluoresceína, restos nitrofenilo y diversos epítomos de péptidos, tales como el epítomo c-myc, para los que existen anticuerpos monoclonales selectivos como contraligandos. También son aplicables ligandos de unión a iones metálicos tales como hexahistidina, que se unen fácilmente a iones Ni^{2+} . Están disponibles en el mercado, por ejemplo resinas cromatográficas, que presentan iones Ni^{2+} quelados con ácido iminodiacético. Estas columnas de níquel inmovilizado se pueden utilizar para capturar etiquetas de masa. Como una alternativa adicional, una funcionalidad de captura por afinidad puede ser selectivamente reactiva con un soporte en fase sólida derivatizado apropiadamente. Se sabe que el ácido bórico, por ejemplo, reacciona selectivamente con cis-dioles próximos y ligandos químicamente similares, tales como el ácido salicilhidroxámico.

El método de acuerdo con la invención puede incluir además la etapa de separar electroforéticamente o cromatográficamente los analitos etiquetados isobáricamente después de la etapa (a) pero antes de la etapa (b). En una realización preferida, se utiliza una cromatografía de intercambio catiónico fuerte.

El término "muestra de ensayo" se refiere a cualquier espécimen en el que puede estar presente un analito. La muestra de ensayo puede comprender sólo un analito. Alternativamente, la muestra de ensayo puede comprender una pluralidad de analitos diferentes. En esta realización, una se proporciona muestra de calibración para cada analito diferente. La muestra de ensayo puede ser de una fuente natural o se puede producir sintéticamente. Un ejemplo de una muestra sintética es una mezcla de proteínas recombinantes. En una realización, la muestra de ensayo es una mezcla compleja, por ejemplo una muestra de una planta o un animal. En una realización preferida, la muestra es de un ser humano.

Los ejemplos de muestras de ensayo analizadas en la presente invención incluyen: tejido de mamífero, fluidos tales como sangre, plasma, fluido de suero cerebroespinal, fluido sinovial, fluido ocular, orina, lágrimas y exudado de conducto lagrimal, productos aspirados de pulmón incluyendo fluido de lavado broncoalveolar, leche materna, producto aspirado de pezón, semen, fluidos de lavado, extractos celulares, líneas celulares y orgánulos subcelulares, tejidos tales como tejidos de órganos sólidos, sobrenadantes de cultivos celulares o preparaciones derivadas de mamíferos, peces, aves, insectos, anélidos, protozoos y bacterias, extractos de cultivo de tejidos, tejidos vegetales, fluidos vegetales, extractos de cultivo de células vegetales, bacterias, virus, hongos, caldos de fermentación, alimentos, productos farmacéuticos y productos intermedios cualesquiera.

En una realización preferida, la muestra de ensayo es plasma sanguíneo. En una realización particularmente preferida, la muestra de ensayo es plasma sanguíneo empobrecido. Éste es el plasma sanguíneo que ha sido purificado para eliminar las proteínas más abundantes del plasma, tales como albúmina, con el fin de reducir la carga de proteína en la muestra, reduciendo por lo tanto el número de analitos en la muestra.

El término "muestra de calibración" se refiere a una muestra que comprende al menos dos alícuotas distintas del analito. Las diferentes alícuotas cada una tienen una cantidad conocida del analito. El término "cantidad conocida" significa que se conoce la cantidad absoluta, o una cantidad cualitativa del analito en cada alícuota de la muestra de calibración. Una cantidad cualitativa en el presente contexto significa una cantidad que no se conoce absolutamente, sino que puede ser un intervalo de cantidades que se espera en un sujeto que tiene un estado particular, por ejemplo, un sujeto en un estado sano o enfermo, o algún otro intervalo esperado dependiendo del tipo de muestra de ensayo bajo investigación.

Cada alícuota es "diferente", ya que contiene una cantidad diferente de analito. Típicamente esto se logra tomando diferentes volúmenes de una muestra convencional, especialmente para cantidades cualitativas donde la toma de diferentes volúmenes asegurará que están presentes cantidades diferentes en cada alícuota a una razón deseada, sin necesidad de conocer las cantidades absolutas. Como alternativa, cada alícuota se prepara por separado y no se toma de la misma muestra. En una realización, cada alícuota diferente tiene el mismo volumen, pero comprende una cantidad diferente de analito.

La muestra de calibración puede ser una muestra natural, tal como un fluido corporal o un extracto de tejido o puede ser sintética, como para la muestra que se va a someter a ensayo. La muestra de calibración puede comprender una proteína expresada de forma recombinante, péptido u oligonucleótido fabricado sintéticamente. Además, es posible producir varios péptidos diferentes mediante la expresión de proteínas recombinantes en una secuencia concatenada. La Solicitud de patente europea EP 1736480 describe métodos para producir péptidos de referencia múltiples como una proteína recombinante concatenada para su uso en experimentos de control de reacciones múltiples de una manera análoga a la metodología AQUA. Tales métodos de producción se pueden combinar con etiquetas de masa isobáricas para proporcionar las muestras de calibración de acuerdo con cualquiera de los diversos aspectos de esta invención.

La muestra de calibración puede ser una forma estandarizada de la muestra que se va a someter a ensayo. La muestra de calibración puede comprender todos los componentes de la muestra que se va a someter a ensayo, pero en cantidades concretas. Por ejemplo, la muestra de calibración puede comprender una preparación estandarizada de tejidos de mamíferos, fluidos tales como sangre, plasma, fluido de suero cerebroespinal, fluido sinovial, fluido ocular, orina, lágrimas y exudado de conducto lagrimal, incluyendo productos aspirados de pulmón incluyendo fluido de lavado broncoalveolar, leche materna, producto aspirado de pezón, semen, fluidos de lavado, extractos celulares, líneas celulares y orgánulos subcelulares, tejidos tales como tejidos de órganos sólidos, sobrenadantes de cultivos celulares o preparaciones derivadas de mamíferos, peces, aves, insectos, anélidos, protozoos y bacterias, extractos de cultivo de tejidos, tejidos vegetales, fluidos vegetales, extractos de cultivo de células vegetales, bacterias, virus, hongos, caldos de fermentación, alimentos, productos farmacéuticos y otros productos intermedios. Si los analitos de interés son proteínas, puesto que todas las proteínas en la muestra de calibración están etiquetadas, todo el proteoma de tal muestra se puede utilizar como una referencia para todas las proteínas de la muestra de estudio.

Alternativamente, la muestra de calibración puede comprender sólo analitos que se van a someter a ensayo en la muestra, y no cualquier otro componente de la muestra. La muestra de calibración que comprende uno o más analitos se puede producir y marcar isobáricamente exógenamente y añadir a la mezcla compleja que contiene el analito. Por ejemplo, si la muestra es una muestra de plasma, pero sólo se va a someter a ensayo una proteína concreta en la muestra de plasma, se puede preparar una muestra de calibración que comprende diferentes alícuotas de la forma recombinante de la proteína.

En un método de acuerdo con la invención, la cantidad de analito en cada alícuota en la muestra de calibración es una cantidad absoluta conocida. Esto permite determinar la cantidad absoluta de un analito en una muestra de ensayo en la etapa (b).

En un método alternativo, no se conoce la cantidad absoluta de un analito en cada alícuota en la muestra de calibración. En esta realización, la cantidad de analito en cada alícuota en la muestra de calibración es una cantidad cualitativa conocida. La etapa de calibración comprende la calibración de la cantidad de analito en la muestra de ensayo frente a las cantidades cualitativas y determinadas de los analitos en las alícuotas de la muestra de calibración. En una realización concreta, la cantidad cualitativa es un rango esperado de cantidades de analito en un sujeto que tiene un estado particular, tal como un estado sano o enfermo. Los ensayos que proporcionan dichas muestras de calibración para la cuantificación relativa tienen un amplio intervalo de aplicaciones, incluyendo el descubrimiento de biomarcadores, la microbiología industrial, la fabricación de fármacos y alimentos y el diagnóstico y tratamiento de enfermedades humanas y veterinarias.

Los experimentos de cuantificación relativa a menudo son útiles para analizar muestras biológicas complejas tales como el plasma sanguíneo. En una realización específica, una gran cantidad de plasma de sangre humana completa se divide en varias alícuotas (es decir, cuatro) y se etiquetan individualmente con diferentes etiquetas de masa isobáricas. Por ejemplo, se podrían utilizar los reactivos de Etiquetas de Masa en Tándem 6-plex (véase más arriba) para producir cuatro alícuotas marcadas de plasma sanguíneo. Para el marcaje se utilizarán 6TMT-128, 6TMT-129, 6TMT-130, 6TMT-131. Todas las muestras individuales de un estudio de plasma sanguíneo son marcadas con una versión diferente adicional de esta etiqueta de masa isobárica, es decir 6TMT-126. Las alícuotas de plasma sanguíneo se pueden utilizar ahora para generar una curva de calibración, por ejemplo mezclando las 4 alícuotas a una razón de 0,5 a 1 a 2 a 5 µl para producir una muestra de calibración, y añadiendo después 1 µl de la muestra de estudio. Mediante la combinación de la muestra con la muestra de calibración que comprende cuatro alícuotas marcadas diferencialmente, prácticamente todos los experimentos de MS/MS realizados con este material darán como resultado grupos de cinco iones indicadores - cuatro de la muestra de calibración y uno de la muestra. Por lo tanto, se puede utilizar todo el proteoma en una curva de calibración de 4 puntos. Si todas las muestras de plasma del estudio se enriquecen con la cantidad idéntica de la muestra de calibración, se hace posible la cuantificación relativa en todas las muestras de estudio. Dado que la muestra de calibración puede ser utilizada por varios laboratorios, son posibles comparaciones entre estudios y entre laboratorios.

Considerando que puede no conocerse la cantidad absoluta de un analito, el % de cambio de cantidad se puede calcular a partir de la curva de calibración. Dependiendo de la aplicación, se puede ajustar la proporción y la anchura de la curva de calibración.

En una realización preferida, la cantidad de analito en cada alícuota diferente de la muestra de calibración se selecciona para reflejar la variación conocida o dudosa de analito en la muestra de ensayo. En realizaciones aún más preferidas, se proporcionan alícuotas que comprenden el analito en cantidades que corresponden a los límites superior e inferior, y opcionalmente puntos intermedios dentro de un intervalo de cantidades conocidas o dudosas de analito que se encuentran en muestras de ensayo de sujetos sanos o enfermos.

Debido a que cada analito se cuantifica independientemente de todos los otros analitos en la muestra, es concebible preparar varios conjuntos de muestras de calibración cada uno a concentraciones muy diferentes a todas las otras muestras de calibración, mejorando de este modo el intervalo dinámico del experimento. También es posible preparar varias biomoléculas de referencia para cada analito donde cada biomolécula se proporciona en un intervalo de cantidades solapantes ampliando así el intervalo total de la curva patrón para un analito dado. Como ejemplo, se pueden seleccionar varios péptidos tripticos diferentes de una proteína diana para su uso como patrones de referencia en base a su rendimiento en un espectrómetro de masas en tándem. Los péptidos de referencia se pueden seleccionar sobre la base de la intensidad iónica del ión correspondiente al péptido en un espectro de masas o sobre la base de la razón señal-ruído en la zona del espectro en la que aparece el ión correspondiente al péptido. Alternativamente, los péptidos de referencia se pueden seleccionar de modo que se eviten los péptidos que tienen especies isobáricas. La selección de péptidos proteotípicos, es decir péptidos que sólo están presentes en una proteína concreta se ve particularmente favorecida.

Si cada péptido patrón se marca independientemente con hasta cinco miembros diferentes de un conjunto séxtuplex de etiquetas de masa isobáricas éstas se pueden ser mezclar en diferentes proporciones para proporcionar una curva patrón de cinco puntos. Se pueden utilizar las mismas etiquetas de masa isobáricas para etiquetar segundos,

terceros, cuartos o más péptidos patrón cada uno de los cuales se puede mezclar en diferentes proporciones cubriendo un intervalo de concentraciones diferente del cubierto por cada uno de los otros péptidos de referencia para el mismo analito.

- 5 Se produce una curva de calibración diferente para cada péptido derivado de la proteína diana, cubriendo cada curva de calibración un intervalo diferente de concentraciones. La concentración de cada péptido se determina a partir de su curva de calibración respectiva, y esta se puede volver a relacionar con la concentración de la proteína diana. Para algunas de las curvas de calibración, la cantidad de péptido en la muestra de ensayo puede encontrarse en el medio de la curva de calibración, proporcionando una determinación exacta de su cantidad real en la muestra.
- 10 Para otras curvas de calibración que cubren un intervalo de concentraciones diferente, la cantidad de péptido en la muestra de ensayo puede estar fuera del intervalo de la curva de calibración. Mediante el uso de múltiples péptidos derivados cada uno de un solo analito de interés, los autores de la presente invención pueden producir múltiples curvas de calibración que pueden estar relacionados con el mismo analito y a continuación elegir la calibración más precisa para determinar la concentración del analito en la muestra de ensayo a partir de la concentración de uno o más de los péptidos. De esta manera puede cubrirse un amplio intervalo dinámico sin comprometer la sensibilidad del ensayo.

- La muestra de calibración puede comprender una cantidad normal de un analito. La cantidad de analito en la muestra de calibración puede indicar que una planta, animal, o preferiblemente un ser humano está sano.
- 20 Alternativamente, la muestra de calibración puede comprender un analito en una cantidad que indica la presencia y/o la fase de una enfermedad en particular. En una realización adicional, la muestra de calibración comprende un analito en una cantidad que indica la eficacia y/o la toxicidad de un tratamiento. Se preparan paneles patrón de los marcadores conocidos de un rasgo particular tal como la presencia y/o fase de la enfermedad, respuesta a la terapia, y/o toxicidad. Las muestras de calibración comprenden fluidos corporales o extractos de tejidos marcados
- 25 con una etiqueta de masa isobárica se podrían preparar a partir de pacientes con una enfermedad bien caracterizada que incluyen pero no se limitan a enfermedades tumorales, neurodegenerativas, cardiovasculares, renales, hepáticas, respiratorias, metabólicas, inflamatorias e infecciosas. Se añaden cantidades conocidas de tales muestras a las muestras de ensayo múltiples de manera que para una serie de análisis se pueden normalizar las intensidades iónicas de en la exploración MS/MS basándose en la intensidad iónica de la muestra de calibración común, proporcionando de ese modo comparaciones más precisas entre los análisis separados, reduciendo la variabilidad analítica del estudio.
- 30

- En el caso de la medicina coronaria se produce sintéticamente una serie de péptidos derivados de la digestión triptica de marcadores de enfermedades cardíacas conocidos como la mioglobina, la troponina I, CK-MB, BNP, pro-BNP y NT-pro-BNP y se divide en tres alícuotas. Cada alícuota de cada péptido de referencia se marca con una de las tres etiquetas de masa isobárica de un conjunto de tales etiquetas de masa isobáricas en el que todas las etiquetas del conjunto tienen sustancialmente la misma masa agregada según se determina mediante espectrometría de masas y en el que cada etiqueta en el conjunto libera un ión indicador de masas de masa única en una disociación inducida por colisión en un espectrómetro de masas. Cada molécula de péptido-etiqueta de masa
- 40 de referencia única se añade a continuación a una solución de vehículo como tampón compatible de MS a una concentración conocida de manera que la concentración de las tres alícuotas marcadas diferencialmente del mismo péptido de referencia son diferentes, y que las diferencias abarcan la concentraciones biológicas normales de la proteína parental en pacientes con la enfermedad cardíaca. El panel de péptidos de referencia resultante se añade a una razón volumétrica definida con una muestra de ensayo que se ha marcado con una cuarta etiqueta de masa isobárica del mismo conjunto de etiquetas de masa isobáricas utilizado para etiquetar los péptidos de referencia. Las
- 45 muestra añadida se somete a continuación a espectrometría de masas en tándem en la que la exploración de sondeo se realiza de una manera dirigida a identificar sólo aquellos iones precursores de tiempo de retención y masa característicos que se correlacionan con cada uno de los péptidos de referencia marcados isobáricamente. Para cada ión seleccionado la exploración mediante MS/MS contendrá iones indicadores derivados de los péptidos de referencia de alta, media y baja concentración y la muestra de ensayo.
- 50

- Se puede construir fácilmente una curva patrón sencilla a partir de las intensidades de iones indicadores de péptidos de referencia y se puede leer el cuarto ión indicador del mismo péptido en la muestra de ensayo frente a la curva de calibración. Por este medio, la concentración absoluta de múltiples proteínas biológicamente relevantes se puede
- 55 determinar en un solo experimento de MS/MS. El experto en la técnica será consciente de que no se necesita que el número de proteínas diferentes para los que se preparan péptidos de referencia sea particularmente limitado y estará en el intervalo de 1 a 100 y más preferiblemente de 1 a 50. Del mismo modo el número de péptidos representativos puede estar en el intervalo de 1 a 20, preferiblemente de 1 a 10, más preferiblemente de 1 a 5 y más preferiblemente de 1 a 3. El experto en la técnica entenderá que el ejemplo descrito anteriormente es un ejemplo
- 60 general y los principios aquí descritos pueden aplicarse a marcadores conocidos de cualquier enfermedad y aplicarse para el diagnóstico de la enfermedad, el seguimiento del progreso de la enfermedad o el seguimiento de la respuesta de un paciente al tratamiento .

Una aplicación adicional es en el uso de estas muestras de calibración en experimentos de lapso tiempo. El "estado" de una muestra con respecto a la evolución en el tiempo se puede establecer si las (4) alícuotas diferentes son de 4 puntos temporales diferentes, tales como tiempo cero, 1 hora, 8 horas, y 24 horas en un experimento (sensibilización al fármaco en ratones y en el hombre, inducción de la fermentación en *E. coli* y levadura), también en una escala temporal más larga de semanas y meses para el desarrollo o la respuesta al tratamiento de enfermedades crónicas.

En un aspecto adicional de la invención, una de las alícuotas de la muestra de calibración comprende un analito en una cantidad que sirve como desencadenante durante un análisis de MS o durante la exploración no MS/MS para iniciar una exploración de MS/MS.

Una exploración no MS/MS es aquella en la que no se selecciona ningún ión concreto con una determinada razón m/z en un analizador de masas en un espectrómetro de masas, sino que se fragmentan esencialmente la totalidad de los analitos para producir un espectro de fragmentos inespecíficos. Típicamente, esto implica permitir que todos los iones pasen desde un primer analizador de masas a una celda de colisión, donde se produce CID en todos los analitos en la muestra en lugar de un ión seleccionado concreto como en un MS/MS convencional. Aunque el espectro de MS/MS no será específico para un analito concreto, el ión indicador del desencadenante se puede utilizar como un indicador de que un analito de interés está entrando en este momento en el espectrómetro de masas. En una realización preferida, la presencia de un ión indicador del desencadenante indica que un analito de interés está eluyendo de una columna de LC durante el LC-MS. Esto "desencadenaría" la ejecución de un experimento de MS/MS predefinido.

Este desencadenante puede no ser necesariamente un analito marcado con un etiqueta de masa isobárica. El desencadenante puede ser cualquier otro analito marcado que eluye simultáneamente, o sustancialmente eluye simultáneamente con el analito marcado de interés durante el LC-MS. La etiqueta del analito desencadenante puede tener una masa diferente a la de las etiquetas de masa isobáricas de la muestra de calibración. Por ejemplo, en una realización, la muestra de calibración comprende alícuotas de un analito etiquetado diferencialmente con etiquetas de masa isobáricas, y comprende adicionalmente una alícuota del analito que está marcado con un etiqueta de masa químicamente idéntica pero isotópicamente distinta, preferiblemente con una diferencia de masa de 5 Da de la de las etiquetas de masa isobáricas. La etiqueta de masa isotópicamente distinta podría servir entonces como "desencadenante". Durante la fase de MS del análisis cada analito presente en la muestra de calibración que porte las etiquetas isotópicamente distintas e isobáricas aparecerá como un par de picos separados por la diferencia de masa entre las etiquetas isotópicamente distintas e isobáricas y donde el analito que porta la etiqueta isotópicamente distinta está presente en una cantidad fácilmente detectable. El espectrómetro de masas se programa para realizar un experimento de MS/MS dedicado sobre el analito marcado isobáricamente en tales pares, iniciando así el análisis cuantitativo de los analitos de interés.

En una realización preferida, el desencadenante de la etiqueta de masa isotópicamente distinta no comprende sustituyentes isotópicos, y las etiquetas de masa isobáricas comprenden una pluralidad de sustituyentes isotópicos, preferiblemente sustituyentes isotópicos H^2 , N^{15} , O^{18} , o C^{13} . Esto proporciona una diferencia de masa entre los analitos de la muestra de calibración etiquetados con etiquetas de masa isobáricas y el analito marcado con la etiqueta desencadenante. Puesto que la etiqueta desencadenante no comprende sustituyentes isotópicos, esta etiqueta se puede utilizar en grandes cantidades si fuera necesario sin la necesidad de marcaje isotópico costoso.

La presente invención también proporciona un método para aumentar la detectabilidad de los analitos de baja abundancia en una muestra. Para una proteína con baja abundancia de interés se puede expresar una proteína recombinante de referencia y después marcar con una etiqueta de masa isobárica. Una muestra de ensayo se marca a continuación con un segundo miembro del mismo conjunto de etiquetas de masa isobáricas y se añade a la muestra de ensayo una gran cantidad de la proteína de referencia recombinante marcada isobáricamente a una concentración tal que sea fácilmente detectable por cualquier método elegido que podría incluir electroforesis en gel mono- o bi-dimensional, electroforesis de flujo libre, electroforesis capilar, isoelctroenfoque off-gel y LC-MS/MS, LC-MS" y/o LC-TOF/TOF. Después de la detección del material de referencia marcado isobáricamente se realiza una exploración MS/MS o un análisis TOF/TOF y se cuantifican las masas indicadoras del material de referencia y de la muestra de ensayo. Mediante el uso de varios miembros de un conjunto de etiquetas de masa isobáricas es posible proporcionar una curva de calibración multipunto con más concentraciones fisiológicamente relevantes y así mejorar la precisión global de los análisis. También se puede utilizar una etiqueta no isobárica para etiquetar el analito desencadenante en esta realización si puede detectarse junto con los analitos marcados de interés, por ejemplo si el analito desencadenante y los analitos marcados isobáricamente aparecen en la misma aplicación sobre un gel o eluyen simultáneamente durante un LC-MS.

La invención se describe mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1. Preparación de un patrón cuantitativo absoluto de cuatro puntos para la albúmina de suero bovino

Para demostrar el principio de la invención, se preparó un conjunto de reactivos de referencia para la albúmina de suero bovino (BSA). Se disolvió en tampón 1 miligramo de BSA, se redujo, se alquiló y a continuación se digirió con tripsina. El experto en la técnica apreciará que se puede utilizar cualquier método adecuado de preparación de péptidos tripticos compatibles para el análisis mediante espectrometría de masas en tándem.

La digestión triptica se dividió en cuatro alícuotas y cada alícuota se marcó con un miembro diferente de las etiquetas TMT séxtuplex del documento WO 2007/012849 por lo que la primera alícuota fue marcada con la etiqueta TMT cuyo radical marcador de masa tiene una masa de 128 Da, la segunda alícuota con la etiqueta TMT cuyo radical marcador de masa tiene una masa de 129 Da, la tercera alícuota con la etiqueta TMT cuyo radical marcador de masa tiene una masa de 130 Da y la alícuota final con la etiqueta TMT cuyo radical marcador de masa tiene una masa de 131 Da. El marcaje se realizó mediante la adición de cada una de las respectivas soluciones de partida de reactivos de etiquetas TMT (60 mM en acetonitrilo) a la muestra respectiva para dar una concentración final de reactivo TMT 15 mM. Las muestras fueron incubadas a continuación a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente, cada muestra se trató para revertir las reacciones secundarias parciales y reunir las muestras marcadas mediante la adición de una provisión de hidroxilamina (50% p/v en agua) para cada muestra de proteína (hasta alcanzar una concentración final de hidroxilamina de 0,25% [p/v]) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min.

Para proporcionar la BSA patrón de referencia se mezclaron las diferentes alícuotas de productos digeridos marcados con TMT para dar las concentraciones finales siguientes:

128-TMT	15,6 $\mu\text{g ml}^{-1}$
129-TMT	46,9 $\mu\text{g ml}^{-1}$
130-TMT	140,6 $\mu\text{g ml}^{-1}$
131-TMT	421,9 $\mu\text{g ml}^{-1}$

Para cada análisis se añaden 10 μl de material de referencia a la muestra analítica proporcionando cantidades de referencia de 0,156, 0,469, 1,406 y 4,219 μg .

Ejemplo 2. Análisis de soluciones de albúmina de suero bovino mediante espectrometría de masas en tándem

La precisión de la cuantificación del patrón de BSA preparado en el Ejemplo 1 se determinó mediante el análisis de una serie de soluciones de BSA de concentración conocida a las que se añadió la solución de BSA patrón.

Se prepararon soluciones individuales de BSA en [Tampón] y se trataron como se ha descrito anteriormente para preparar los productos digeridos tripticos. Cada digestión triptica se marcó esencialmente como se ha descrito anteriormente utilizando la etiqueta TMT cuyo radical marcador de masa tiene una masa de 126 Da.

Antes del análisis mediante espectrometría de masas en tándem se añadieron 10 μl de solución de partida patrón de BSA a 10 μl de cada solución de BSA marcada con 126-TMT y el volumen total se inyectó en la fuente de ionización del espectrómetro de masas de electropulverización QTOF II.

Protocolo de LC-ESI-MS

Los datos de MS/MS se generaron a través de la línea de los autores de la presente invención que consiste en una columna RP-C18 Waters Cap-LC con 75 μm , 150 mm con un tamaño de partícula de 3 μm , una velocidad de flujo de 300 $\mu\text{l/min}$ acoplada a Micromass QTOF II. Los experimentos de MS/MS se realizaron mediante la adquisición de datos dependiente (DDA). Durante su funcionamiento, los experimentos de MS/MS se realizaron utilizando el tiempo de adquisición de 1,0 segundos para una exploración de MS seguida de 4 exploraciones mediante MS/MS consecutivas de las cuatro especies iónicas más abundantes de 1,4 seg. cada una. La Figura 2 muestra un perfil de MS/MS para un péptido triptico AEFVEVTK de BSA. El panel superior muestra el espectro MS/MS completo. El panel inferior muestra el zoom de la región del radical marcador de masa isobárico y las diferentes intensidades que reflejan la diferente abundancia del mismo péptido en la muestra de estudio (126) y el material de referencia (128, 129, 130 y 131).

Los espectros de MS/MS son analizados a continuación mediante SequestTM y se ajustan a una versión actual de la base de datos IPI. La ID de proteínas (número de acceso además de la secuencia parcial según se extrae de la exploración mediante MS/MS), los tiempos de retención, así como las intensidades del ión indicador de todos los indicadores (126, 128, 129, 130 y 131 Da) son exportados a una hoja de cálculo de Excel.

Dependiendo de las condiciones experimentales y del comportamiento individual de un péptido durante el análisis, se realiza la selección de los péptidos 1, 4, 10 o más para participar en la cuantificación. Preferiblemente, se

excluyen los péptidos con los indicadores de baja intensidad si su precisión y calidad analítica son cuestionables, así como los péptidos en los que los indicadores están fuera de los umbrales de intensidad definidos.

Los resultados del análisis de 10 µl de una solución de BSA que contiene 100 µg ml⁻¹ de BSA marcada con 126-TMT enriquecida con 10 µl del patrón de referencia de BSA de cuatro puntos descrito anteriormente se muestran en la Tabla 2.

La curva patrón para este experimento se calculó añadiendo todas las intensidades radical marcador de masas TMT de los péptidos tripticos derivados de BSA (128, 129, 130 y 131 Da, respectivamente) para cada cantidad de referencia de BSA y trazando la intensidad iónica añadida frente a cantidad de BSA absoluta inyectada. La curva patrón se muestra en la Figura 3. Para calcular la cantidad de BSA en la muestra analítica se añadieron las intensidades iónicas de todas las intensidades del radical marcador de masas de TMT de 126 Da y este valor se comparó con el de la curva patrón. Esto produjo una cantidad de BSA calculada inyectada de 0,892 g (un péptido atípico descartado para el análisis). Si se usaran los datos para los péptidos individuales el intervalo calculado sería de 0,751 a 1,016 µg de BSA.

Tabla 2 intensidad iónica relativa, características de la pendiente y cálculo de la cantidad absoluta de péptidos en la muestra de ensayo - referencia de BSA de cuatro puntos

Secuencia de péptidos de BSA	Tiempo de retención del pico (min)		Muestra la intensidad de iones	Intensidad iónica de Referencia				Características de la pendiente (y = mx + b)			Concentración de péptido absoluta (Entrada actual 1 µg)
	inicio	fin		126 Da	128 Da	129 Da	130 Da	131 Da	m	b	
KAJ EFVEVTK.L	36,16	36,16	489,39	84,34	225,73	690,79	1971,28	464,4	17,3	1,000	1,016
KAJ FDEK.L	28,66	28,66	222,49	46,29	101,51	396,07	1079,19	256,3	5,3	0,998	0,847
KAJ WSVAR.L	30,11	30,11	807,32	142,32	354,13	1285,76	3567,41	847,2	13,7	0,999	0,937
KKJ VPQVSTPTLVEVSR.N	35,92	35,92	29,43	14,26	45,00	148,96	421,26	100,1	1,0	0,999	0,284
KLJ GEYGFQNALIVR.Y	49,69	49,69	14,22	0,00	8,16	23,76	64,49	-	-	-	-
KLJ GEYGFQNALIVR.Y	53,12	53,12	2,10	0,00	0,00	0,00	19,12	-	-	-	-
KLJ VNELTEFAK.T	52,92	52,92	19,45	0,00	5,11	34,80	103,88	-	-	-	-
KLJ VTDLTK.V	39,48	39,48	410,41	77,59	241,53	715,05	2075,43	490,3	11,3	1,000	0,814
KQJ NCDQFEK.L	26,67	26,67	214,62	31,42	112,63	285,43	1013,20	241,8	17,1	0,997	0,958
KQJ TALVELLK.H	50,03	50,03	144,95	29,74	77,77	288,61	810,59	193,2	-0,2	0,999	0,751
KQJ TALVELLK.H	51,63	51,63	12,19	0,00	0,00	29,65	87,27	-	-	-	-
KVJ LTSSAR.Q	23,30	23,30	259,29	57,48	154,79	412,19	1249,77	293,1	10,7	1,000	0,848
KYJ LYEIAR.R	40,62	40,62	221,01	31,09	101,50	332,90	955,92	227,5	-0,0	1,000	0,972

Ejemplo 3. Análisis de una muestra de plasma para detectar un biomarcador de proteína candidato específico.

Se utilizaron 10 muestras de plasma humano bruto.

El analito de interés que se va a cuantificar mediante el uso de la invención fue la proteína clusterina. Como referencia se utilizó un péptido de clusterina con la secuencia de aminoácidos representada más abajo:

VTTVASHTSDSDVPSGVTEVVVK

Este péptido tiene un peso molecular de 2313,17 Da (monoisotópico) o 2314,53 Da (promedio). Este péptido corresponde a los residuos 386-408 de la entrada SwissProt (CLUS_HUMAN), y es una parte de la cadena α de clusterina madura que tiene un peso molecular de 25878 Da. Se estima que el péptido contiene 3x contraiones de TFA, provocando un aumento del peso molecular de 2655 g/mol cuando se genera la provisión de péptidos.

Generación de la muestra de calibración a partir del péptido

Se obtuvo una provisión de péptidos de 1 µg/µl a partir de 1,66 mg de péptido. Se marcaron 4 porciones de 200 µL cada una con TMT6-128, TMT6-129, TMT6-130 y TMT6-131 respectivamente. Los péptidos se trataron con NH₂OH para revertir el posible marcaje de Tirosina, Serina y Treonina. Las muestras de péptidos marcados diferencialmente se mezclaron a continuación a una razón 1:2:4:8. La Figura 6 muestra un esquema de la metodología utilizada. El análisis inicial por LC-MS/MS mostró que el sobremarcaje parcial no fue revertido completamente, y por lo tanto fue necesario un segundo tratamiento. La muestra de calibración se diluyó en un factor de 528 antes de mezclar con las muestras de plasma marcadas con TMT6-128.

Procesamiento de las muestras de plasma

Diez muestras de plasma fueron de una cohorte elegida basándose en su contenido de clusterina según se determina mediante ELISA. Se diluyeron 1,66 µL de cada muestra de plasma con 198,33 µL de tampón (TEAB 100 mM, SDS al 0,1%, pH 8,5), proporcionando 142 – 200 µg de proteína en total (concentración de proteína de 0,71 a 1,00 µg/µL). Cada muestra de plasma se marcó con TMT6-126, y se llevó a cabo un tratamiento con NH₂OH de acuerdo con las condiciones optimizadas. Después se añadieron 4µL de muestra de calibración diluida a 10% de cada muestra. La muestra se purificó a continuación mediante cromatografía de fase inversa, así como de intercambio catiónico fuerte.

LC-MS/MS

Se llevó a cabo el LC-MS/MS utilizando una CapLC acoplada a un espectrómetro de masas QTOF-2® (Waters, Manchester, UK)

Se inyectaron 5 µl de la muestra purificada por ciclo (correspondiente a 40 nL de plasma crudo). La Figura 7 muestra el espectro de masas del perfil de retención del péptido marcado de clusterina. A continuación se llevó a cabo la adquisición de MS/MS dirigida utilizando listas incluidas que contenían m/z del péptido marcado con TMT de clusterina. Se realizó la optimización de los parámetros de la energía de colisión para obtener el aumento de las intensidades iónicas del grupo de marcadores de masa. La Figura 8 muestra el espectro MS/MS del péptido marcado de clusterina. La región del espectro de MS/MS que muestra los iones marcadores de masa se muestra en forma de recuadro.

Análisis de los datos

Se realizó la acumulación manual de todas las exploraciones de MS/MS correspondientes para obtener 1 archivo de MS/MS por ciclo. A continuación se realizó el procesamiento y la ID del pico, utilizando metodologías convencionales. Se generó una curva de calibración para cada archivo de MS/MS basándose en las intensidades iónicas de los marcadores de masas de 128 - 131 (regresión lineal) (Figura 9). La cantidad de péptido presente en cada muestra se determinó a continuación utilizando la curva de calibración (Tabla 3). Por último, se calculó la concentración de clusterina por muestra en µg/ml basándose en el peso molecular de cadena α de clusterina.

Tabla 3

ID de la muestra	Código Experimental	R cuadrado de la curva de calibración	cantidad calculada del péptido de la muestra de plasma en la columna (fmol)	concentración de péptido en las muestras de plasma (nmol/mL)	concentración de clusterina en las muestras de plasma (mg/mL) *
PRG042	ZP191-1	0,996	291	7,0	182
TLS712	ZP191-2	1,000	236	5,7	148
LND0137	ZP191-3	0,995	247	6,0	155
THSA046	ZP191-4	0,997	180	4,4	113
THSA034	ZP191-5	0,999	199	4,8	125
THSM044	ZP191-6	0,986	208	5,0	130
THSC021	ZP191-7	0,994	195	4,7	122
LDZC004	ZP191-8	0,995	197	4,8	124
THSA023	ZP191-9	0,987	327	7,9	205
K708A	ZP191-10	0,995	178	4,3	111

Ejemplo 4. Preparación de un patrón de referencia cualitativo del proteoma completo

En muchas circunstancias, por ejemplo en los flujos de trabajo de descubrimiento de biomarcadores tempranos, no es esencial tener patrones de referencia cuantitativos absolutos, sino más bien un patrón representativo y uniforme que cubre todo el proteoma que se vaya a analizar en el que se desconoce la cantidad absoluta de cualquier analito dado pero se considera que está en el intervalo normal de la muestra de referencia. Un ejemplo de tal patrón de proteoma completo es el plasma humano. Utilizando la presente invención es posible preparar un plasma patrón de referencia universal y uniforme en el que están presentes todas las proteínas y/o péptidos en forma de patrones cualitativos múltiples etiquetados isobáricamente. Cuando tal patrón se añade a una muestra analítica en la que todas las proteínas y/o péptidos se han marcado con un miembro diferente del mismo conjunto de etiquetas isobáricas es posible realizar ensayos de MS/MS cuantitativos en todos los iones precursores detectados en el MS y determinar la abundancia relativa del analito en la muestra analítica en comparación con el patrón de referencia.

El destinatario experto entendería bien que este concepto puede ser aplicado a cualquier patrón cualitativo, incluyendo pero no limitado a plasma completo o empobrecido, suero, fluido cerebro espinal, fluido sinovial, orina, semen, producto aspirado de pezón, producto homogeneizado de tejido, sobrenadante de cultivo celular, extractos celulares, fracciones subcelulares, preparaciones de membrana, etc. y que los materiales de referencia individuales que representan un tipo específico de la muestra se puede preparar por ejemplo para normalizar los estudios de biomarcadores a través de ensayos clínicos multicéntricos.

Como ejemplo de tal material de referencia se realizó la preparación de un plasma de referencia humano. Utilizando 4 etiquetas masas isobáricas diferentes, el plasma se marcó y se mezcló para crear una mezcla de calibración del proteoma del plasma completo. Después de la separación cromatográfica mediante 1. Intercambio catiónico fuerte (SCX) en 24 fracciones y 2. HPLC de fase inversa en 480 aplicaciones en un objetivo MALDI de acero inoxidable. Las aplicaciones se analizaron con posterioridad mediante MS y MS/MS en un espectrómetro de masas 4800 MALDI Tof/Tof (Applied Biosystems, EE.UU.).

Materiales y Métodos

Se adquirió plasma humano de Dade Behring (Plasma Patrón). El plasma se enriqueció con dos proteínas:

- 1) Ribonucleasa A. Tipo I-AS: De Páncreas Bovino (Sigma, R-5503), PM 13,7 kDa, pl 9,6; pureza 85%. Se disolvieron 1,8 mg en 170 µl de agua; se añadieron 10 µl de esta solución a 1 ml de plasma antes del empobrecimiento de las proteínas muy abundantes.
- 2) inhibidor de tripsina, Tipo I-S: De soja (Sigma, T-9003); PM 20,1 kDa; pl 4,5; contenido de proteína 90%; Cadena α PM 20090 Da; Cadena β PM 20036 Da; Cadena γ PM 20163 Da. Se disolvieron 8,8 mg en 196 µl de agua; Se añadieron 10 µl de esta solución a 1 ml de Plasma antes del empobrecimiento de las proteínas muy abundantes.

Antes del marcaje de la masa isobárica se empobrecieron seis proteínas muy abundantes (humana albúmina, IgG, Antitripsina, IgA, transferrina y haptoglobina) utilizando una Columna Agilent MARS 4,6 x 100 mm de alta capacidad (Part-Nr. 518-5.333) en una HPLC BioCAD Vision de Applied Biosystems.

Reducción, Alquilación y Digestión con Tripsina

El tratamiento de proteínas se realizó siguiendo los protocolos normalizados. La proteína se diluyó a una solución de proteína de 1 g/L de pH 7,5 en tampón de Borato 100 mM y dodecilsulfato de sodio al 0,1%. La reducción de las cisteínas con TCEP 1 mM se realizó durante 30 min a temperatura ambiente. Las cisteínas se alquilaron con yodoacetamida durante una hora a temperatura ambiente. Se añadieron 440 µg de tripsina y se incubaron durante 18-24 horas a 37°C.

Ensamblaje de una proporción 1:2:4:8 y Etiquetado con TMT⁶

Después de la digestión triptica el plasma empobrecido se dividió en cuatro alícuotas que se etiquetaron de forma independiente con reactivos TMTsixtuplex de etiquetas isobáricas diferentes TMT⁶-128, TMT⁶-129, TMT⁶-130 y TMT⁶-131. Después del etiquetado las alícuotas se mezclaron volumétricamente a la razón 1:2:4:8 respectivamente para generar una mezcla de calibración de 4 puntos de plasma (Figura 1). Para determinar la cobertura del proteoma del material de referencia, éste se sometió a cromatografía multidimensional y análisis de espectrometría de masas en tándem

Recogida de 24 Fracciones de intercambio catiónico fuertes

Antes de la espectrometría de masas se realizó una primera separación en una HPLC BioCAD Visión de Applied Biosystems en una columna SCX (Poly LC d.i. 4,6 x 100 mm; Polysulfoethyl A). La muestra se atrapó en una Precolumna Waters Sunfire RP (d.i. 4,0 x 10 mm), y se hizo eluir con un pulso de Acetonitrilo al 50% a la columna SCX. La precolumna se desconecta cuando comienza el gradiente de elución de la SCX. El gradiente SCX se formó

con disolventes C (Agua 75% acetonitrilo 25% + KH_2PO_4 5 mM, pH 3) y D (Agua 75% Acetonitrilo 25% + KH_2PO_4 5 mM, pH 3 + KCl 500 mM, pH 3) 0 a 50% en 30 minutos. Se obtuvieron 24 fracciones de SCX de esta etapa de separación. Cada fracción se sometió posteriormente a separación de fase inversa.

5 HPLC de Fase Inversa

El segundo sistema de separación fue una cromatografía de fase inversa en un Sistema Waters nanoAQUITY UPLC. Debido al desacoplamiento de la cromatografía y las mediciones de MS en el flujo de trabajo MALDI las condiciones de HPLC se podrían optimizar para obtener una capacidad de alto pico. Columna: D.I. 75 μm x 250 mm cargada con material de carga 1,7 μm BEH 130 C18 (Waters parte Nr.: 186003545). Temperatura de horno para la columna 60°C. Se inyectaron directamente 5 μl de cada fracción SCX sin ninguna precolumna sobre la columna de UPLC.

Gradiente:

15 Tabla 4

Tiempo (min)	% Acetonitrilo
1. Inicial	5
02/31/00	5
3. 150,00	25
4. 210,00	50
5. 220,00	95
6. 225,00	95
7. 226,00	5

Aplicación de la diana MALDI

20 La columna de separación del Sistema UPLC nanoACQUITY está acoplada a la entrada de un aplicador Dionex Probot para fraccionar los péptidos en las preparaciones de MALDI en una diana de muestra de MALDI en un formato de microtitulación para el aparato de MALDI 4800 Tof/Tof. En una diana MALDI se pueden recoger 1920 fracciones individuales. Se prepararon cuatro cromatogramas RP cada uno con 480 puntos por diana MALDI. La aplicación comienza a un tiempo de retención de 50 minutos y termina a un tiempo de retención de 210 min con una duración de la aplicación de 20 segundos por aplicación. En el aplicador del flujo de eluyente de 0,35 μl por minuto se mezcla con un flujo de solución de matriz MALDI (solución de 5 g/L de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo al 80%, agua al 19,8%, de ácido trifluoroacético al 0,2%) de 0,6 μl por minuto. Cada preparación MALDI tiene un volumen de aproximadamente 330 nL.

30 Análisis MS y MS/MS MALDI en el aparato 4800 Tof/Tof

Las aplicaciones se realizaron en dos modos en el aparato 4800 Tof/Tof. En una primera ronda en el modo Reflector se registraron espectros MS convencionales. Se sumaron 1.000 disparos MALDI para cada espectro MS individual. Los espectros se calibraron internamente con la señal del trímero de la matriz a m/z 568,138 Th. La herramienta de interpretación del soporte lógico del aparato "Explorer Serie 4000" generó una lista precursora de experimentos MS/MS usando una estrategia de LC MALDI que incluye el cálculo de los perfiles de elución de los picos de los péptidos (fracción con respecto a la tolerancia de la masa de la fracción 100 ppm, exclusión de precursores en resolución 200). Se permitió seleccionar hasta cinco precursores por aplicación para el posterior análisis MS/MS. La adquisición MS/MS estuvo en primer lugar en los precursores más fuertes. Se adquirieron 1.000 disparos de láser por espectro. Los espectros MS/MS se calibraron internamente con el valor de la masa teórica del ión fragmento TMT^6 -131 131,1387 Th.

Búsqueda en la base de datos MASCOT para la Identificación

45 La búsqueda en la base de datos con 15818 consultas se realizó con la versión 2.1.04 de MASCOT. Las proteínas humanas se identificaron en una búsqueda con la Base de datos IPI Humana (IPI_Human_20071024, 68348 secuencias; 28969400 residuos). Ambas proteínas añadidas no estaban presentes en la base de datos IPI humana; se buscaron en la base de datos Swissprot usando la clave de taxonomía "Otros mamíferos". Las áreas de los picos de las masas 126, 127, 128, 129, 130, 131 fueron extraídos del Comparador TOFTOF del Cuadro de herramientas de Sequest.

Resultados

Análisis Cuantitativo

5 La cuantificación de los picos indicadores en las masas 128, 129, 130 y 131 Da se realizó a través de la Extracción de las áreas de los Picos de la base de datos GPS Oracle. Después del cálculo del área de los picos, se realizó el análisis de regresión con el fin de verificar la calidad de la curva de calibración (razón 1:2:4:8). Cada experimento MS/MS de los péptidos se comprobó mediante el análisis de los picos indicadores para el ajuste a una línea recta. Se realizó una regresión lineal para cada espectro MS/MS.

10 Las figuras 10, 11 y 12 muestran ejemplos representativos de un espectro MS/MS. En la vista ampliada, se observa la secuenciación de los iones b e y. En el inserto se despliega un zoom que muestra la región indicadora con los indicadores en m/z 128, 129, 130 y 131 con sus razones 1:2:4:8.

15 El análisis de regresión mostró que 12.000 espectros MS/MS cumplen ciertos valores de R^2 (ver Tabla 5):

Tabla 5: Distribución del valor R^2 de 12.000 espectros MS/MS a partir de plasma de calibración TMT de 4 puntos.

R^2	Nr. de MS/MS	en %
0,999	2368	17,0
0,995	6439	46,1
0,99	8589	61,6
0,98	10439	74,8
0,97	11361	81,4
0,96	11926	85,5
0,95	12308	88,2
0,94	12571	90,1
0,93	12805	91,8
0,92	12970	93,0
0,91	13124	94,1
0,9	13247	94,9
0,7	13835	99,2
0,6	13875	99,4
0,5	13904	99,6

20 Resumen

En total, se generaron aproximadamente 12.000 espectros MS/MS que mostraron intensidades de iones informadores que cumplían los criterios de intensidad para la cuantificación. Los espectros MS/MS MALDI ToFToF muestran el ión fragmento etiqueta TMT con una buena intensidad para permitir la cuantificación. La serie de ión y b en los espectros MS/MS de los péptidos se utilizaron para la identificación de los péptidos. La búsqueda en la base de datos con umbrales conservativos produjo 141 identificaciones de proteínas humanas en la base de datos IPI Humana. Ambas proteínas añadidas se encontraron usando la base de datos Swissprot y filtrando especies relacionadas. Entre las proteínas humanas identificadas había por ejemplo Clusterina encontrada con espectros 18 MS/MS y cobertura de secuencia de 25%. El análisis de regresión muestra que más de la mitad de los espectros de MS/MS tienen un valor de R^2 mejor que 0,99. El 90% tiene un valor de R^2 mejor que 0,94.

Además de las proteínas añadidas, se identificaron 141 proteínas humanas cuando se aplicó un umbral de puntuación péptido de 20 y se aplicó un umbral de proteína mayor que 45 (Tabla 6).

Base de datos	: IPI humana 20071024 (68348 secuencias; 28969400 residuos)
Éxitos significativos:	
	1. IPI00164623 Gene_Symbol = C3 Proteína de 187 kDa
	2. IPI00478003 Gene_Symbol = A2M Precursor de alfa-2-macroglobulina
3.	IPI00022229 Gene_Symbol = APOB Precursor de apolipoproteína B-100
4.	IPI00021885 Gene_Symbol = FGA Precursor de la cadena alfa de la Isoforma 1 del fibrinógeno
5.	IPI00298497 Gene_Symbol = FGB Precursor de la cadena beta del fibrinógeno
6.	TPI00414283 Gene_Symbol = FN1 Preproteína de la isoforma 4 de la fibronectina 1
7.	IPI00418163 Gene_Symbol C4B =; C4A C4B1
8.	IPI00215894 Gene_Symbol = KNG1 Precursor de la isoforma de BPM del quinínogeno-1
9.	IPI00017601 Gene_Symbol = CP Precursor de ceruloplasmina
10.	IPI00032328 Gene_Symbol = KNG1 Precursor de la Isoforma de APM del quinínogeno-1
11.	IPI00305461 Gene_Symbol = IT1H2 Precursor de la cadena pesada H2 del inhibidor de tripsina inter-alfa
12.	IPI00021891 Gene_Symbol = FGG Precursor de la cadena gamma de la isoforma Gamma-B del fibrinógeno
13.	IPI00021841 Gene_Symbol = APOA1 Precursor de la apolipoproteína AI
14.	IPI00292530 Gene_Symbol = IT1H1 Precursor de la cadena pesada 1H del inhibidor de tripsina inter-alfa
15.	IPI00029739 Gene_Symbol = CFH Precursor de la Isoforma 1 del factor H del complemento
16.	IPI00218192 Gene_Symbol = ITIH4 Precursor de la cadena pesada H4 de la isoforma 2 de Inhibidor de tripsina inter-alfa
17.	IPI00550991 Gene_Symbol = SERPINA3 Precursor de alfa-1-antiquimotripsina
18.	IPI00019591 Gene_Symbol = CFB Precursor de la isoforma 1 del factor B del Complemento (Fragmento)
19.	IPI00294193 Gene_Symbol = ITIH4; TMEM110 Precursor de cadena pesada H4 de la isoforma 1 del Inhibidor de tripsina inter-alfa
20.	IPI00026314 Gene_Symbol = GSN Precursor de la isoforma 1 de gelsolina
21.	IPI00022895 Gene_Symbol = A1BG Precursora de la alfa-1B-glicoproteína
22.	IPI00793618 Gene_Symbol = C3 Proteína de 13 kDa
23.	IPI00022488 Gene_Symbol = HPX Precursor de Hemopexina
24.	IPI00641737 Gene_Symbol = HP Precursor de haptoglobina
25.	IPI00022391 Gene_Symbol = APCS Precursor del componente amiloide P sérico
26.	IPI00019580 Gene_Symbol = PLG Precursor del plasminógeno
27.	IPI00298828 Gene_Symbol = APOH Precursor de la beta-2-glicoproteína 1
28.	IPI00019568 Gene_Symbol = F2 Precursor de protrombina (Fragmento)
29.	IPI00218732 Gene_Symbol = PON1 Paraoxonasa/arilesterasa 1 sérica
30.	IPI00022431 Gene_Symbol = AHSG Precursora de la alfa-2-HS-glicoproteína
31.	IPI00032291 Gene_Symbol = C5 Precursor del complemento C5
32.	IPI00829768 Gene_Symbol = IGHM Proteína IGHM
33.	IPI00477090 Gene_Symbol = IGHM Proteína IGHM
34.	IPI00844156 Gene_Symbol = SERPINC1 Proteína SERPINC1
35.	IPI00032179 Gene_Symbol = SERPINC1 Variante de antitrombina III

36.	IPI00304273 Gene_Symbol = APOA4 Precursor de apolipoproteína A-IV
37.	IPI00022426 Gene_Symbol = AMBP Precursora de la proteína AMBP
38.	IPI00298971 Gene_Symbol = VTN Precursor de vitronectina
39.	IPI00025426 Gene_Symbol = PZP Precursor de la proteína de zona del embarazo
40.	IPI00022371 Gene_Symbol = HRG Precursor de la glicoproteína rica en histidina
41.	IPI00022394 Gene_Symbol = C1QC Precursor del subcomponente de la subunidad C del complemento C1q
42.	IPI00477597 Gene_Symbol = HPR Precursor de la isoforma 1 de la proteína relacionada con la haptoglobina
43.	IPI00021857 Gene_Symbol = APOC3 Precursor de la apolipoproteína C-III
44.	IPI00555812 Gene_Symbol = GC Precursor de la proteína de unión a vitamina D
45.	IPI00291262 Gene_Symbol = CLU Precursor de clusterina
46.	IPI00029863 Gene_Symbol = SERPINF2 Precursor de la alfa-2-antiplasmina
47.	IPI00021842 Gene_Symbol = APOE Precursor de apolipoproteína E
48.	IPI00017696 Gene_Symbol = C1S Precursor del subcomponente C1s del complemento
49.	IPI00291866 Gene_Symbol = SERPING1 Precursor del inhibidor de proteasa plasmática C1
50.	IPI00021727 Gene_Symbol = C4BPA Precursor de la cadena alfa de la proteína unión a C4b
51.	IPI00006114 Gene_Symbol = SERPINF1 precursor del factor derivado del epitelio pigmentario
52.	IPI00011261 Gene_Symbol = C8G Precursor de la cadena gamma del componente del complemento C8
53.	IPI00186903 Gene_Symbol = APOL1 Precursor de la isoforma 2 de la apolipoproteína-L1
54.	IPI00021854 Gene_Symbol = APOA2 Precursor de la apolipoproteína A-II
55.	IPI00293925 Gene Symbol = FCN3 Precursor de la isoforma 1 de la Ficolina-3
56.	IPI00292950 Gene Symbol = SERPIND1 Precursor del cofactor de la 2 heparina
57.	IPI00386879 Gene_Symbol = IGHA1 ADNc FLJ14473 fis, clon MAMMA1001080, muy similar a prot SNC73 de Homo sapiens
58.	IPI00007221 Gene_Symbol = SERPINA5 Precursor del inhibidor de la serina proteasa plasmática
59.	IPI00385264 Gene_Symbol = - Proteína de enfermedades de la cadena pesada mu de Ig
60.	IPI00006662 Gene_Symbol = APOD Precursor de la apolipoproteína D
61.	IPI00303963 Gene_Symbol = C2 Precursor del complemento C2 (Fragmento)
62.	IPI00291867 Gene_Symbol CFI = Precursor del factor I del complemento
63.	IPI00022395 Gene Symbol = C9 Precursor del componente C9 del complemento
64.	IPI00430820 Gene_Symbol = IGKV1-5 Proteína IGKV1-5
65.	IPI00009920 Gene_Symbol = C6 Precursor del componente C6 del complemento
66.	IPI00020996 Gene_Symbol = IGFALS Precursor de la cadena lábil al ácido del complejo factor de crecimiento de tipo insulínico-proteína de unión
67.	IPI00032220 Gene_Symbol = AGT Precursor de angiotensinógeno
68.	IPI00168728 Gene_Symbol = IGHM Proteína FLJ00385 (Fragmento)
69.	IPI00019581 Gene_Symbol F12 = Precursor del factor de coagulación XII
70.	IPI00020986 Gene_Symbol = LUM Precursor de lumicano
71.	IPI00294395 Gene_Symbol = C8B Precursor de la cadena beta del componente C8 del complemento
72.	IPI00654888 Gene_Symbol = KLKB1 Proteína no caracterizada KLKB1
73.	IPI00299503 Gene_Symbol = GPLD1 Precursor de isoforma 1 de la fosfolipasa D específica de

	fosfatidilinositol glicanos
74.	IPI00022429 Gene_Symbol = ORM1 Glicoproteína ácida alfa-1
75.	IPI00296608 Gene_Symbol = C7 Precursor del componente C7 del complemento
76.	IPI00009793 Gene_Symbol C1RL = Proteína de tipo complemento C1r
77.	IPI00019943 Gene_Symbol = AFM Precursor de afamina
78.	IPI00022417 Gene_Symbol = LRG1 Precursor de la alfa-2-glicoproteína rica en leucina
79.	IPI00296165 Gene_Symbol = C1R; C17orf13; LOC442122; ACYP1; RP11-114H20.1 Precursor del subcomponente C1r del complemento
80.	IPI00020091 Gene_Symbol = ORM2 Precursor de la alfa-1-glucoproteína ácida 2
81.	IPI00328609 Gene_Symbol = SERPINA4 Precursor de calistatina
82.	IPI00011264 Gene_Symbol = CFHR Precursor de la proteína 1 relacionada con el factor H del complemento
83.	IPI00179330 Gene_Symbol = UBB; UBC; RPS27A Precursor de la proteína ribosomal S27a y ubiquitina
84.	IPI00011252 Gene_Symbol = C8A Precursor de la cadena alfa del componente C8 del complemento
85.	IPI00019399 Gene_Symbol = SAA4 Precursor de la proteína del amiloide A-4 sérico
86.	IPI00163207 Gene_Symbol = PGLYRP2 Precursor de la isoforma 1 de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa
87.	IPI00022420 Gene Symbol = RBP4 Precursor de la proteína de unión a retinol en plasma
88.	IPI00791350 Gene_Symbol = CLEC3B Proteína de 11 kDa
89.	IPI00218413 Gene_Symbol = BTD Precursor de biotinidasa
90.	IPI00294004 Gene_Symbol = PROS1 Precursor de la proteína S dependiente de vitamina K
91.	IPI00009028 Gene Symbol = CLEC3B Precursor tetranectina
92.	IPI00382480 Símbolo Gene = - Región BRO de cadena pesada V-III de Ig
93.	IPI00296176 Gene_Symbol = F9 Precursor del factor de coagulación IX
94.	IPI00477992 Gene_Symbol = C1QB componente 1 del complemento, subcomponente q, precursor de la cadena B
95.	IPI00154742 Gene_Symbol = IGL @ Proteína IGL @
96.	IPI00292946 Gene_Symbol = SERPINA7 Precursor de globulina de unión a tiroxina
97.	IPI00382938 Gene_Symbol = IGLV4-3 Proteína IGLV4-3
98.	IPI00299778 Gene_Symbol = PON3 Paraoxonasa/lactonasa 3 sérica
99.	IPI00410714 Gene_Symbol = HBA2; HBA1 Subunidad alfa de hemoglobina
100.	IPI00296534 Gene_Symbol = FBLN1 Precursor de la Isoforma D-1 de la fibulina
101.	IPI00027235 Gene_Symbol = ATRN Precursor de la isoforma 1 de la atractina
102.	IPI00029193 Gene_Symbol = HGFAC Precursor del activador del factor de crecimiento de hepatocitos
103.	IPI00807428 Gene_Symbol = - Proteína putativa no caracterizada
104.	IPI00022463 Gene_Symbol = TF Precursor de serotransferrina
105.	IPI00019576 Gene_Symbol F10 = Precursor del factor de coagulación X
106.	IPI00794397 Gene_Symbol = CHMP4A Proteína 4A modificadora de cromatina
107.	IPI00022733 Gene_Symbol = PLTP Proteína de 45 kDa
108.	IPI00024825 Gene_Symbol = PRG4 Precursor de la isoforma A de proteoglicano-4
109.	IPI00216882 = Gene_Symbol MASP1 isoforma 3 de lectina serina proteasa 1 de unión a manano
110.	IPI00387115 Gene_Symbol = - SIE de la región V-III de la cadena kappa de Ig

111.	IPI00003590 Gene_Symbol = QSOX1 Precursor de la isoforma 1 de la Sulfidril oxidasa 1
112.	IPI00022432 Gene_Symbol = TTR Precursor de la transtiretina
113.	IPI00029061 Gene_Symbol = SEPP1 Precursor de la selenoproteína P
114.	IPI00028413 Gene_Symbol = ITIH3 Precursor de la cadena pesada H3 del inhibidor de inter-alfa-tripsina
115.	IPI00479116 Gene_Symbol = CPN2 Precursor de la subunidad 2 de carboxipeptidasa N
116.	IPI00178926 Gene_Symbol = IGJ Cadena J de inmunoglobulina
117.	IPI00166729 Gene_Symbol = AZGP1 alfa-2-glicoproteína 1, cinc
118.	IPI00445707 Gene_Symbol = MAEA ADNc FLJ43512 fis, clon PERIC2004028, moderadamente similar al ARNm de la proteína EMP de eritroblastos/macrófagos de Mus musculus
119.	IPI00329775 Gene_Symbol = CPB2 Precursor de la isoforma 1 de carboxipeptidasa B2
120.	IPI00008603 Gene Symbol = ACTA2 Actina de músculo liso aórtico
121.	IPI00384938 Gene_Symbol = IGHG1 Proteína DKFZp686N02209 putativa no caracterizada
122.	IPI00784822 Gene_Symbol = IGHV4-31 Proteína IGHV4-31
123.	IPI00027482 Gene_Symbol = SERPINA6 Precursor de globulina de unión a corticosteroides
124.	IPI00795068 Gene_Symbol = RRBP1 Homólogo de 180kDa de la proteína 1 de unión al ribosoma
125.	IPI00025204 Gene_Symbol = CD5L Precursor del antígeno similar CD5
126.	IPI00003351 Gene_Symbol = ECM1 Precursor de la proteína 1 de la matriz extracelular
127.	IPI00163446 Gene_Symbol = IGHD Proteína IGHD
128.	IPI00010252 Gene_Symbol = TRIM33 Isoforma alfa de ubiquitina E3-proteína ligasa TRIM33
129.	IPI00041065 Gene_Symbol = HABP2 Precursor de la proteína 2de unión a ácido hialurónico
130.	IPI00297550 Gene_Symbol = F13A1 Precursor de la cadena A del factor de coagulación XIII
131.	IPI00005439 Gene_Symbol = FETUB Precursor de Fetuina B
132.	IPI00064667 Gene_Symbol = CNDP1 Precursor de la Beta-Ala-His dipeptidasa
133.	IPI00018305 Gene_Symbol = IGFBP3 Precursor de la proteína 3 de unión al factor de crecimiento de tipo insulínico
134.	IPI00023019 Gene_Symbol = SHBG Precursor de la isoforma 1 de globulina de unión a hormonas sexuales
135.	IPI00382748 Gene_Symbol = HYI Isoforma 3 de la hidroxipiruvato isomerasa putativa
136.	IPI00004798 Gene_Symbol = CRISP3 Precursor de la proteína secretora rica en cisteína 3
137.	IPI00032956 Gene_Symbol = KIAA1166 isoforma 1 del antígeno 127 asociado a carcinoma hepatocelular
138.	IPI00022434 Gene Symbol = ALB Proteína ALB no caracterizada
139.	IPI00009276 Gene_Symbol = PROCR Precursor del receptor endotelial de proteína C
140.	IPI00030739 Gene_Symbol = APOM Apolipoproteína M
141.	IPI00032311 Gene_Symbol = LBP Proteína prec de unión lipopolisacáridos
Tabla 6	

REIVINDICACIONES

1. Un método para someter a ensayo un analito, cuyo método comprende:
 - a) combinar una muestra de ensayo, que puede comprender el analito, con una muestra de calibración que comprende al menos dos alícuotas diferentes del analito, teniendo cada alícuota una cantidad diferente conocida del analito, donde la muestra y cada alícuota se etiquetan diferencialmente con una o más etiquetas de masa isobáricas cada una con un grupo marcador de masa de masa espectrométricamente distinta, de manera que la muestra de ensayo y cada alícuota de la muestra de calibración se pueden distinguir mediante espectrometría de masas;
 - b) determinar mediante espectrometría de masas la cantidad de analito en la muestra de ensayo y la cantidad de analito en cada alícuota en la muestra de calibración, y calibrar la cantidad de analito en la muestra de ensayo frente a las cantidades conocidas y determinadas de los analitos en las alícuotas de la muestra de calibración.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la muestra de ensayo puede comprender una pluralidad de diferentes analitos y se proporciona una muestra de calibración para cada analito diferente, y donde la etapa (b) se repite para cada analito diferente, preferiblemente donde la pluralidad de analitos son fragmentos peptídicos de una proteína o polipéptido que se producen por transformación química o enzimática de la proteína o polipéptido antes de la etapa (a), y/o donde las diferentes alícuotas de cada muestra de calibración se seleccionan de manera que cada muestra de calibración proporciona un intervalo de cantidades de analito que son diferentes al intervalo de cantidades de analito en otras muestras de calibración.
3. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde se somete a ensayo una pluralidad de muestras de ensayo para un analito, preferiblemente donde cada una de la pluralidad de muestras de ensayo se somete a ensayo para determinar el mismo analito, y/o donde cada una de las muestras de ensayo se etiqueta diferencialmente con una o más de las etiquetas de masa isobáricas y se combina con una sola muestra de calibración en la etapa (a), y la cantidad del analito en cada muestra se determina de forma simultánea en la etapa (b), o alternativamente donde cada muestra de ensayo se etiqueta con la misma etiqueta de masa, y las etapas (a) y (b) se repiten para cada muestra diferente, preferiblemente donde se utiliza la misma muestra de calibración para cada muestra de ensayo que se va a someter a ensayo.
4. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde el método comprende una etapa adicional antes de la etapa (a) para etiquetar diferencialmente cada muestra de ensayo o cada alícuota de la muestra de calibración con una o más etiquetas de masa isobáricas, preferiblemente donde el método comprende una etapa adicional de combinación de las alícuotas etiquetadas diferencialmente para producir una muestra de calibración antes de la etapa (a).
5. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde la etapa (b) comprende:
 - i) en un espectrómetro de masas seleccionar y fragmentar iones de una razón masa a carga correspondiente al analito etiquetado con la etiqueta de masa, detectar y producir un espectro de masas de iones fragmento, e identificar los iones fragmento correspondientes a los grupos marcadores de masa de las etiquetas de masa;
 - ii) determinar la cantidad del analito en cada muestra de ensayo basándose en la cantidad de sus grupos marcadores de masa en un espectro de masas con respecto a las cantidades de los grupos marcadores de masa de las alícuotas de la muestra de calibración en el mismo espectro de masas.
6. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde la cantidad de un analito en cada alícuota en la muestra de calibración es una cantidad absoluta conocida, preferiblemente donde la cantidad absoluta de un analito en una muestra de ensayo se determina en la etapa (b).
7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la cantidad de analito en cada alícuota en la muestra de calibración es una cantidad cualitativa conocida, preferiblemente donde la cantidad cualitativa es un intervalo esperado de cantidades de analito en un sujeto que tiene un estado particular, y/o donde la etapa de calibración comprende la calibración de la cantidad de analito en la muestra de ensayo frente a las cantidades cualitativas y determinadas conocidas de los analitos en las alícuotas de la muestra de calibración, más preferiblemente donde se determina el cambio porcentual en la cantidad de analito en la muestra de ensayo.
8. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde la cantidad de analito en cada alícuota diferente se selecciona para reflejar la variación conocida o dudosa de la cantidad de analito en la muestra de ensayo, preferiblemente donde se proporcionan alícuotas que comprenden el analito en cantidades que corresponden a los límites superior e inferior, y opcionalmente puntos intermedios dentro de un intervalo de las cantidades conocidas o dudosas del analito encontrado en las muestras de ensayo de sujetos sanos o enfermos.

9. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde las diferentes cantidades de analito presentes en las diferentes alícuotas corresponden a la cantidad conocida o dudosa de analito presente en una muestra de ensayo que ha sido incubada durante diferentes periodos de tiempo.

5 10. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde las alícuotas se toman de una muestra que es una forma normalizada de la muestra de ensayo.

11. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde la muestra de ensayo y/o las alícuotas de la muestra de calibración son de una planta o un animal, preferiblemente donde el animal es un ser humano.

10 12. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde la muestra de calibración comprende un analito en una cantidad que indica la eficacia y/o toxicidad de una terapia, y/o donde la muestra de ensayo y/o la muestra de calibración comprenden tejido humano o animal, sangre, plasma, suero, fluido cerebroespinal, fluido sinovial, fluido ocular, orina, lágrimas, exudados de conducto lagrimal, material de aspirados pulmonares, leche materna, material de aspirado de pezón, semen, fluido de lavado, extracto celular, extracto de cultivo de tejido, tejido vegetal, fluido vegetal, extracto de cultivo de células vegetales, una muestra bacteriana, una muestra de virus, un hongo, caldo de fermentación, un alimento o una composición farmacéutica, y/o donde el analito comprende una proteína, un polipéptido, un péptido, un aminoácido o un ácido nucleico, un ácido peptid nucleico, un azúcar, almidón, un carbohidrato complejo, un lípido, un polímero, o fragmentos de los mismos.

20 13. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que incluye adicionalmente la etapa de separar electroforéticamente o cromatográficamente los analitos etiquetados isobáricamente después de la etapa (a) pero antes de la etapa (b).

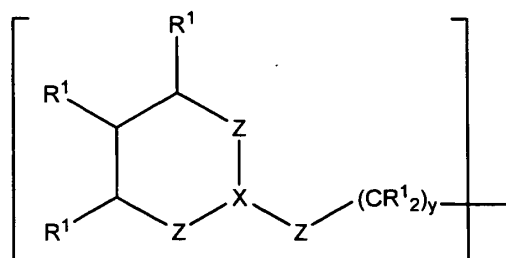
25 14. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde la muestra de calibración comprende una alícuota adicional que comprende el analito en una cantidad que sirve como desencadenante durante una exploración MS o durante una exploración no MS/MS para iniciar una exploración MS/MS, donde preferiblemente el analito en la alícuota adicional está marcado con un etiqueta de masa isobárica, o alternativamente, donde el analito en la alícuota adicional está marcado con un etiqueta de masa que es químicamente idéntica a pero isotópicamente distinta y diferente en su masa de las etiquetas de masa isobáricas de los otros analitos en la muestra de calibración.

35 15. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde el analito en la muestra es una proteína, y el analito en la muestra de calibración es una forma recombinante de la proteína en la muestra.

16. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde la etiqueta de masa comprende la siguiente estructura:

X-L-M

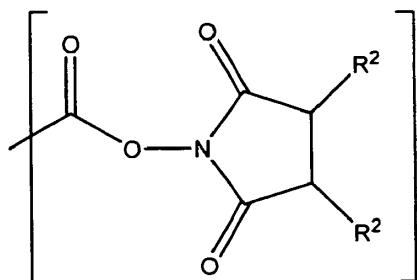
40 donde X es un radical marcador de masa que comprende el siguiente grupo:



45 donde la unidad cíclica es aromática o alifática y comprende de 0 a 3 enlaces dobles independientemente entre dos átomos adyacentes cualesquiera; cada Z es independientemente N, N(R¹), C(R¹), CO, CO(R¹), C(R¹)₂, O o S; X es N, C o C(R¹); cada R¹ es independientemente H, un grupo alquilo C1-C6 lineal o ramificado sustituido o no sustituido, un grupo cíclico alifático sustituido o no sustituido, un grupo aromático sustituido o no sustituido o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido; e y es un número entero de 0 a 10, L es un conector escindible y M es un radical de normalización de masas, donde preferiblemente el conector escindible que ancla el radical marcador de masa al radical de normalización de masas es un conector escindible mediante colisión, más preferiblemente donde el conector es escindible mediante CID, ETD, ECD o SID utilizando espectrometría de masas.

55 17. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, donde la etapa de etiquetado comprende una etapa en la que se hace reaccionar el analito con un etiqueta de masa reactiva, donde la etiqueta de masa reactiva comprende una etiqueta de masa y una funcionalidad reactiva, preferiblemente donde la funcionalidad reactiva es capaz de

reaccionar con cualquier grupo amino en un polipéptido y comprende un nucleófilo o un electrófilo, más preferiblemente donde la funcionalidad reactiva comprende el siguiente grupo:



5 donde cada R^2 es independientemente H, un grupo alquilo C1-C6 lineal o ramificado sustituido o no sustituido, un grupo cíclico alifático sustituido o no sustituido, un grupo aromático sustituido o no sustituido o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido.

10 18. Un método de acuerdo con la reivindicación 16 o la reivindicación 17, donde la etiqueta de masa es una etiqueta de masa de un conjunto de dos o más etiquetas de masa, donde cada radical de normalización de masas asegura que una etiqueta de masa tiene una masa agregada deseada, y donde el conjunto comprende:

15 etiquetas de masa que tienen un radical marcador de masa, teniendo cada radical marcador de masa una masa diferente de la de todos los otros radicales marcadores de masa en el conjunto, y teniendo cada etiqueta en el conjunto una masa agregada común.

y donde todas las etiquetas de masa del conjunto son distinguibles entre sí mediante espectrometría de masas,

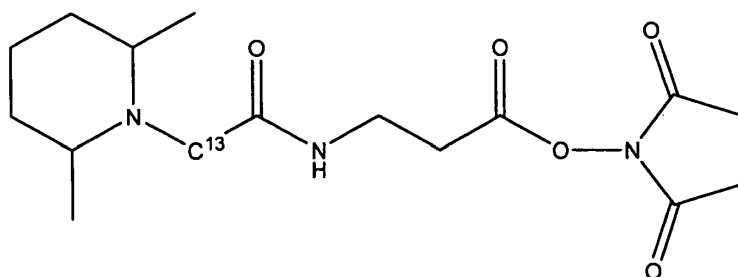
y preferiblemente donde cada etiqueta de masa en el conjunto tiene un radical ajustador de masas, seleccionado entre:

20 (a) un sustituyente isotópico situado dentro del radical marcador de masa y/o dentro de la fracción de normalización de masas, y

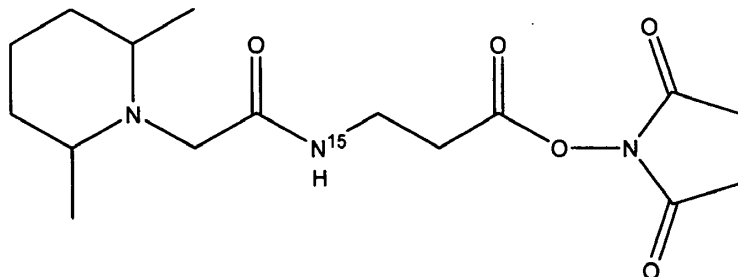
(b) átomos sustituyentes o grupos anclados al radical marcador de masa y/o anclados al radical de normalización de masas,

y/o adicionalmente preferiblemente donde el radical ajustador de masas se selecciona entre un átomo de halógeno sustituyente, un grupo metilo sustituyente, y sustituyentes isotópicos H^2 , N^{15} , C^{13} u O^{18} ,

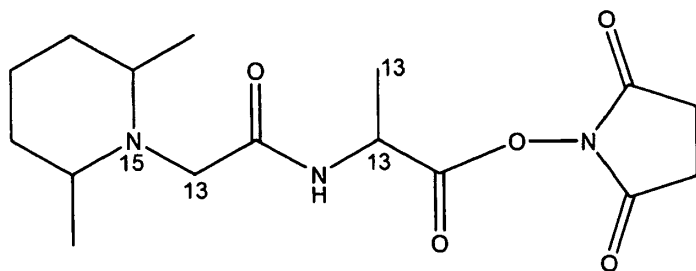
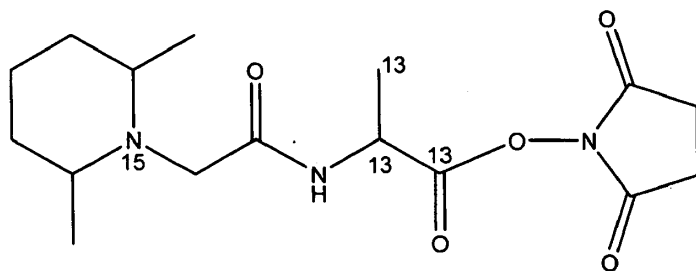
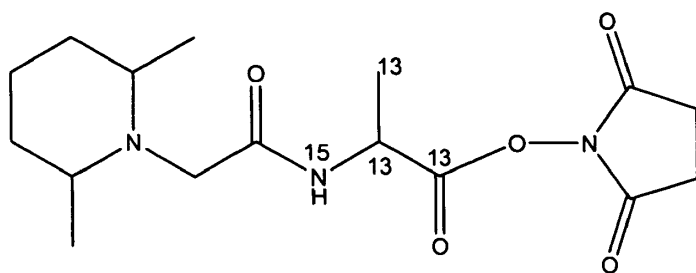
25 y más preferiblemente donde el radical ajustador de masas es N^{15} o C^{13} y el conjunto comprende dos etiquetas de masa que tienen las estructuras siguientes:



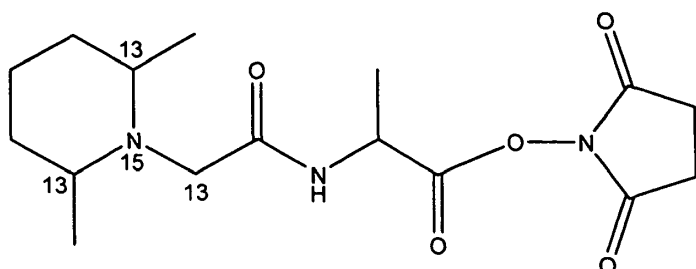
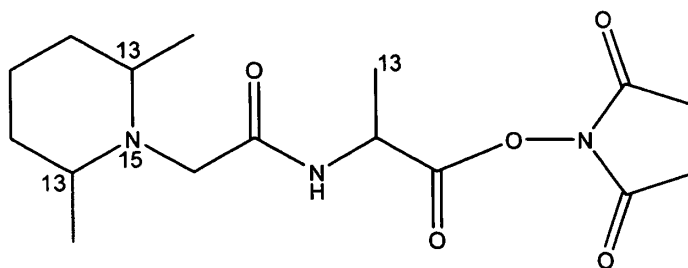
30



o, alternativamente, más preferiblemente donde el radical ajustador de masas es N^{15} y C^{13} y el conjunto comprende cinco etiquetas de masa que tienen las estructuras siguientes:

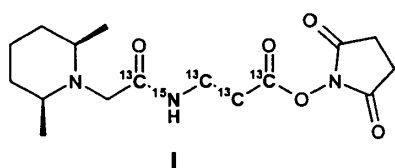


5

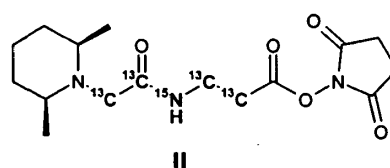


10

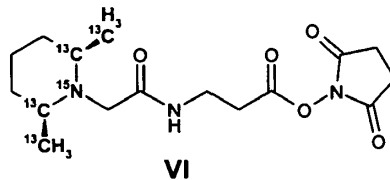
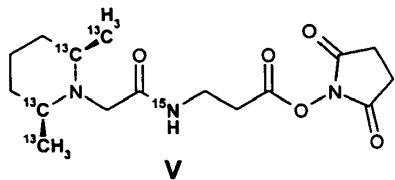
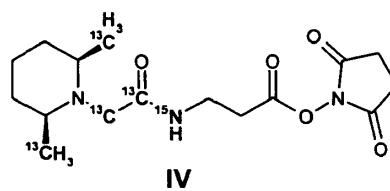
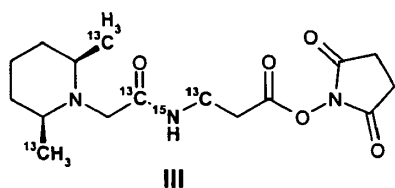
o alternatively todavía más preferiblemente donde el radical ajustador de masas es N^{15} y C^{13} y el conjunto comprende seis etiquetas de masa que tienen las estructuras siguientes:



1



11



5

19. Una muestra de calibración para su uso en un análisis de espectrometría de masas para un analito que comprende al menos dos alícuotas diferentes del analito, teniendo cada alícuota una cantidad diferente conocida del analito donde cada alícuota está etiquetada diferencialmente con un etiqueta de masa isobárica como se define en cualquiera de las reivindicaciones 16 y 18.

10

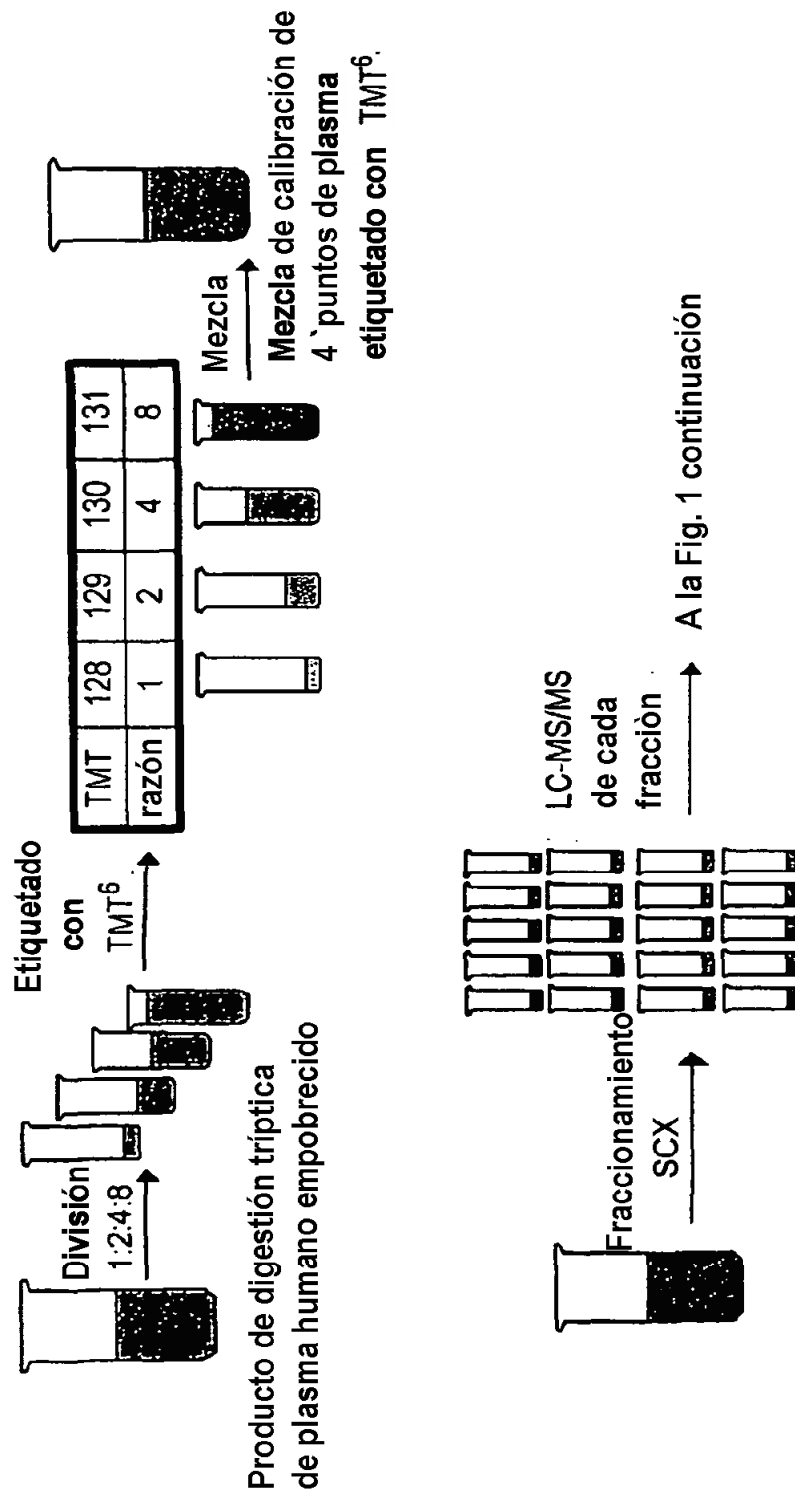


FIG. 1

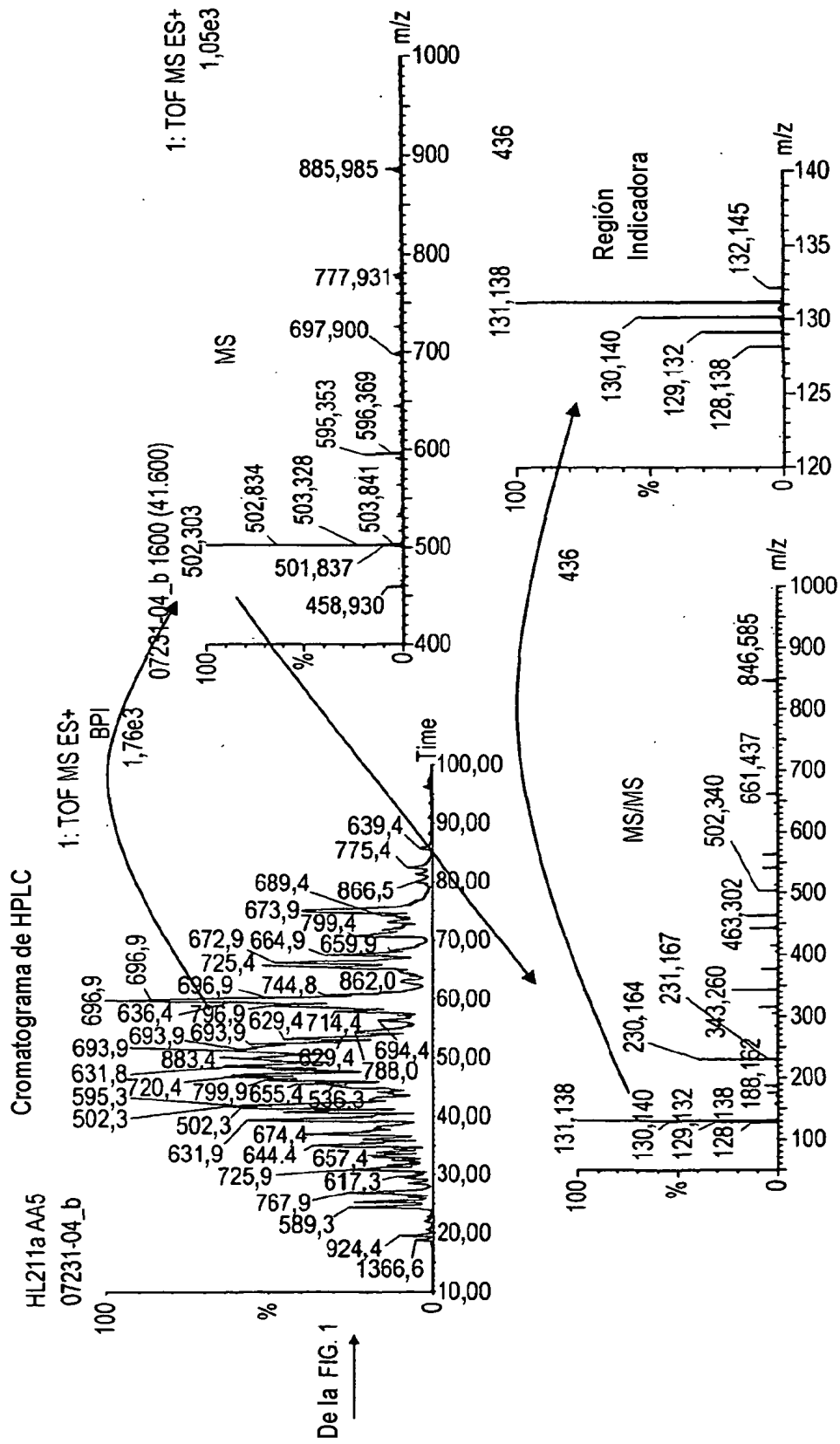


FIG. 1 (Continuación)

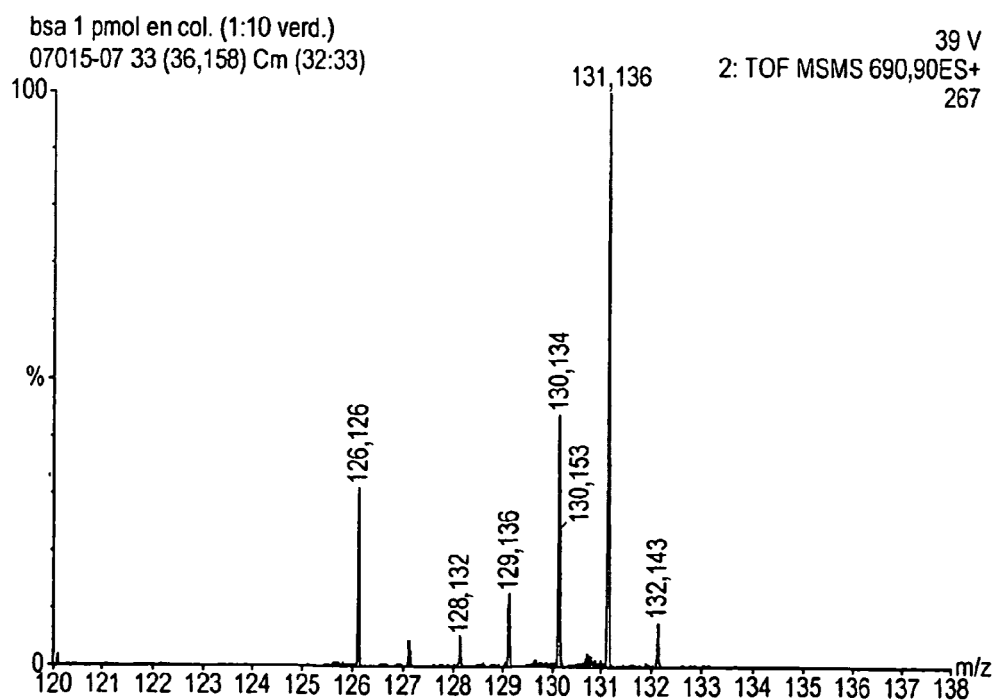
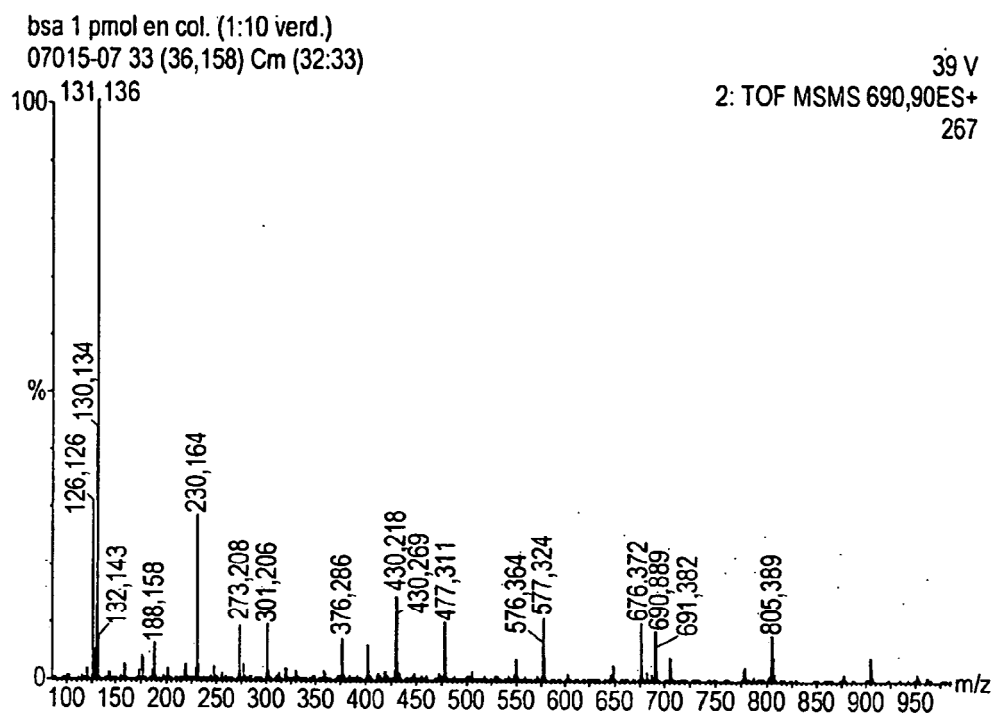


FIG. 2

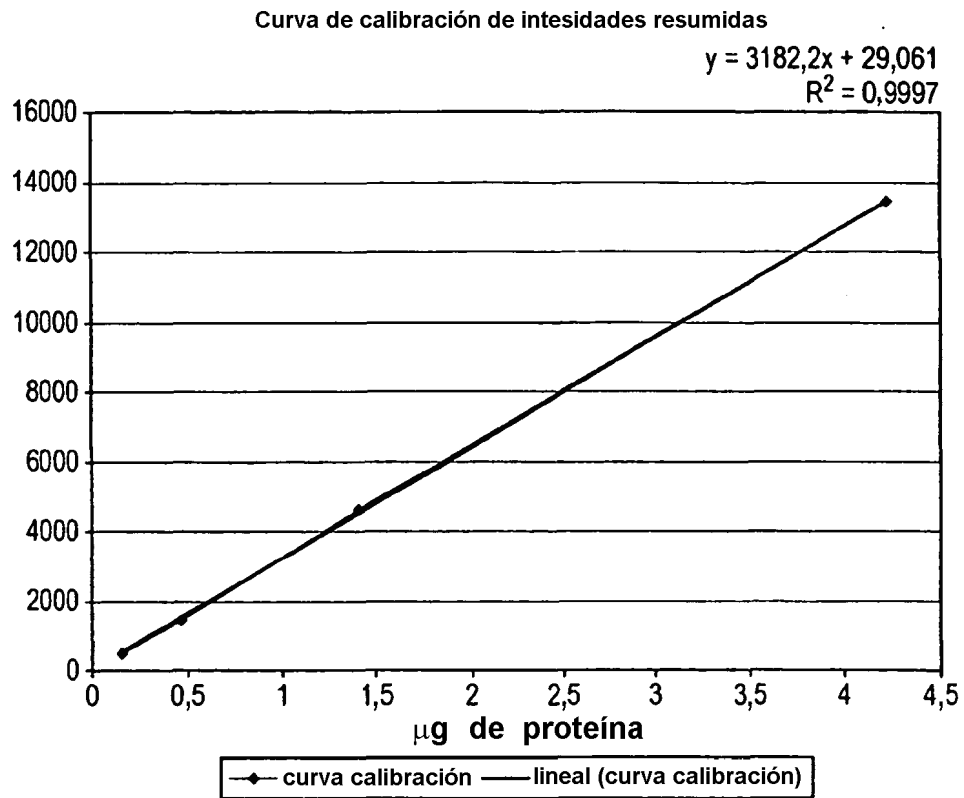


FIG. 3

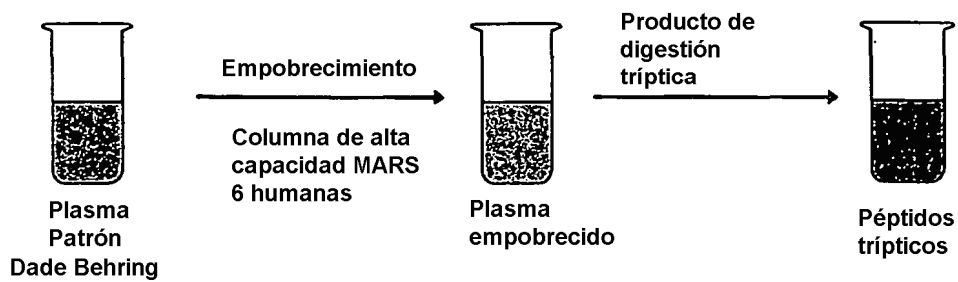


FIG. 4

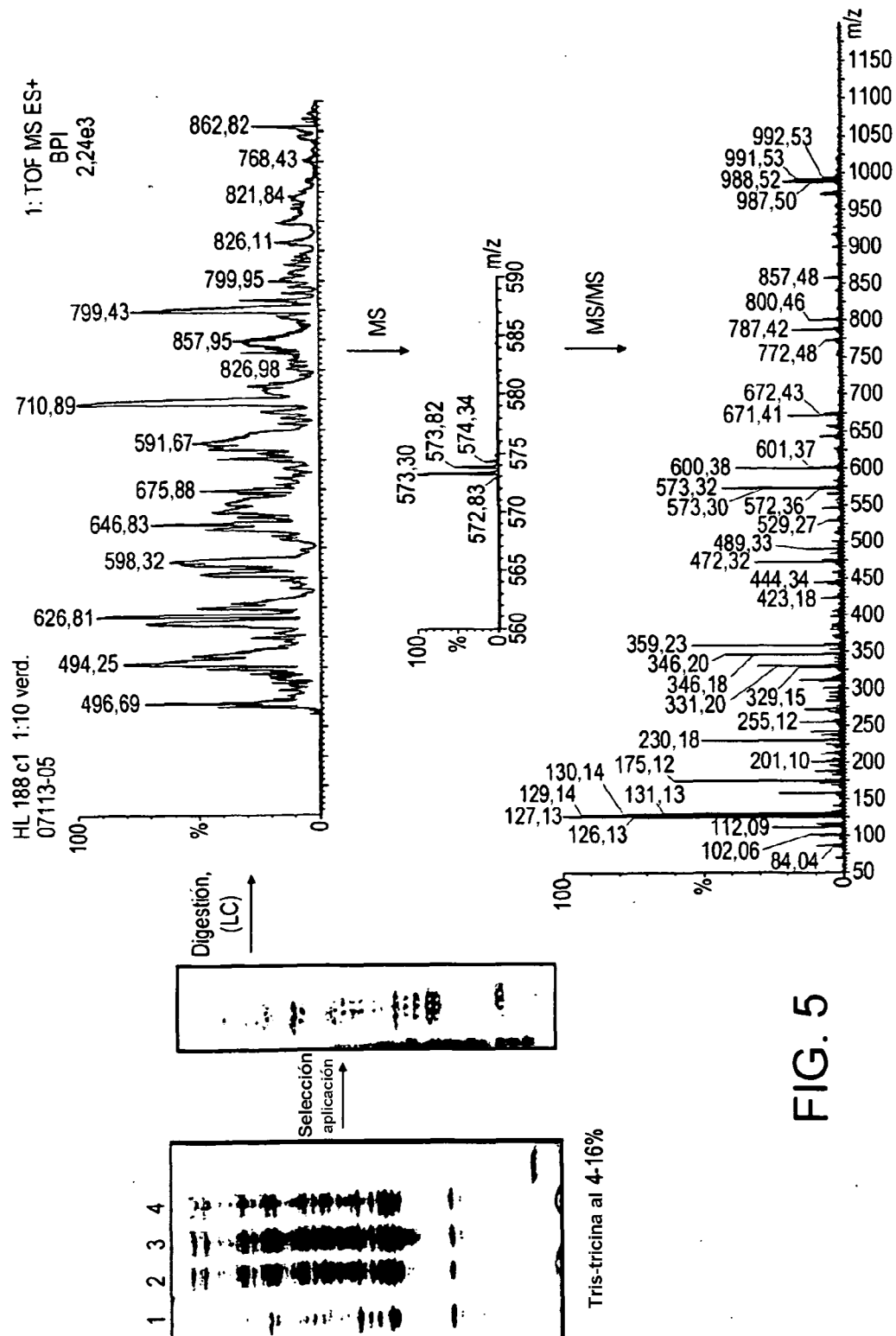


FIG. 5

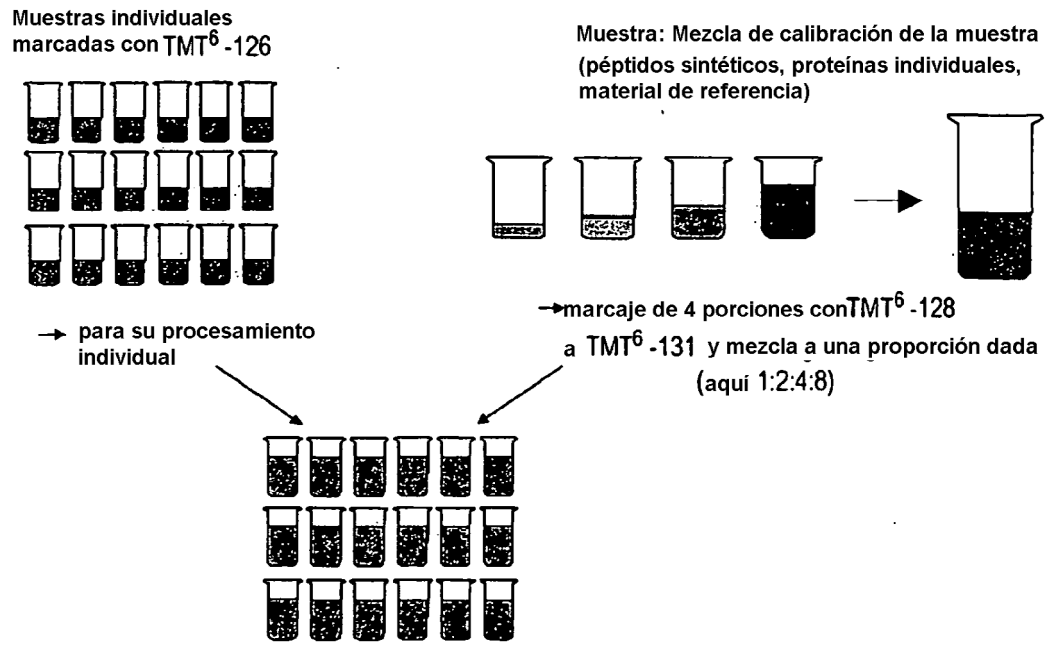


FIG. 6

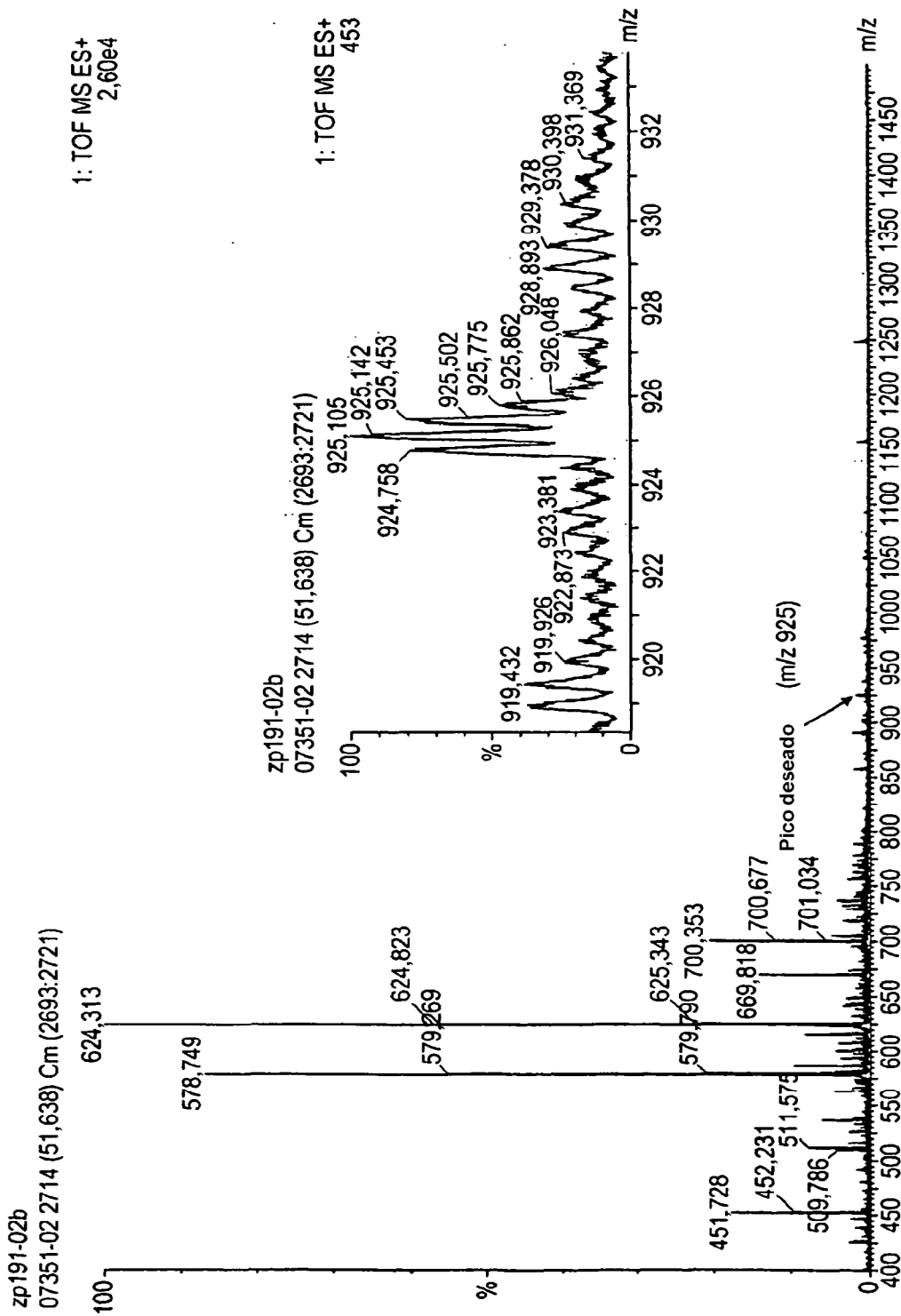
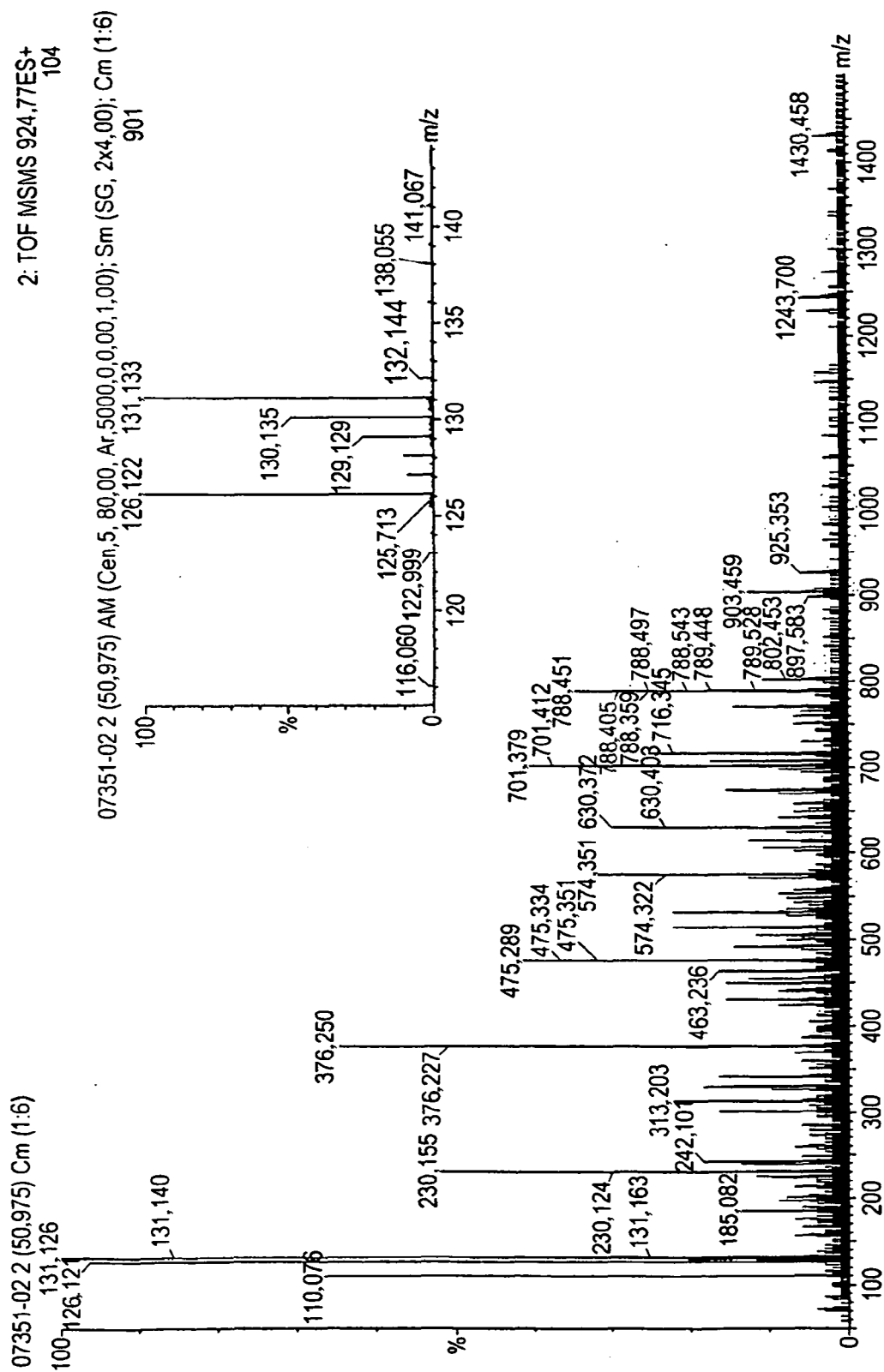


FIG. 7



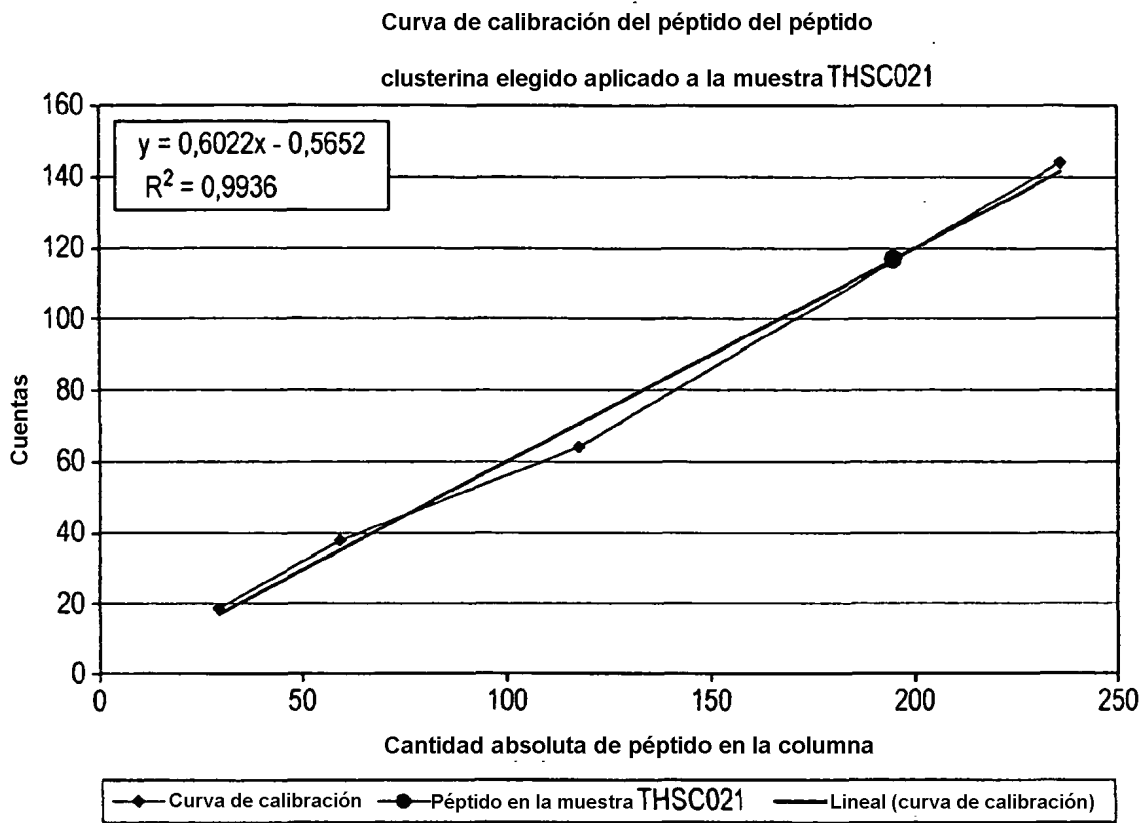


FIG. 9

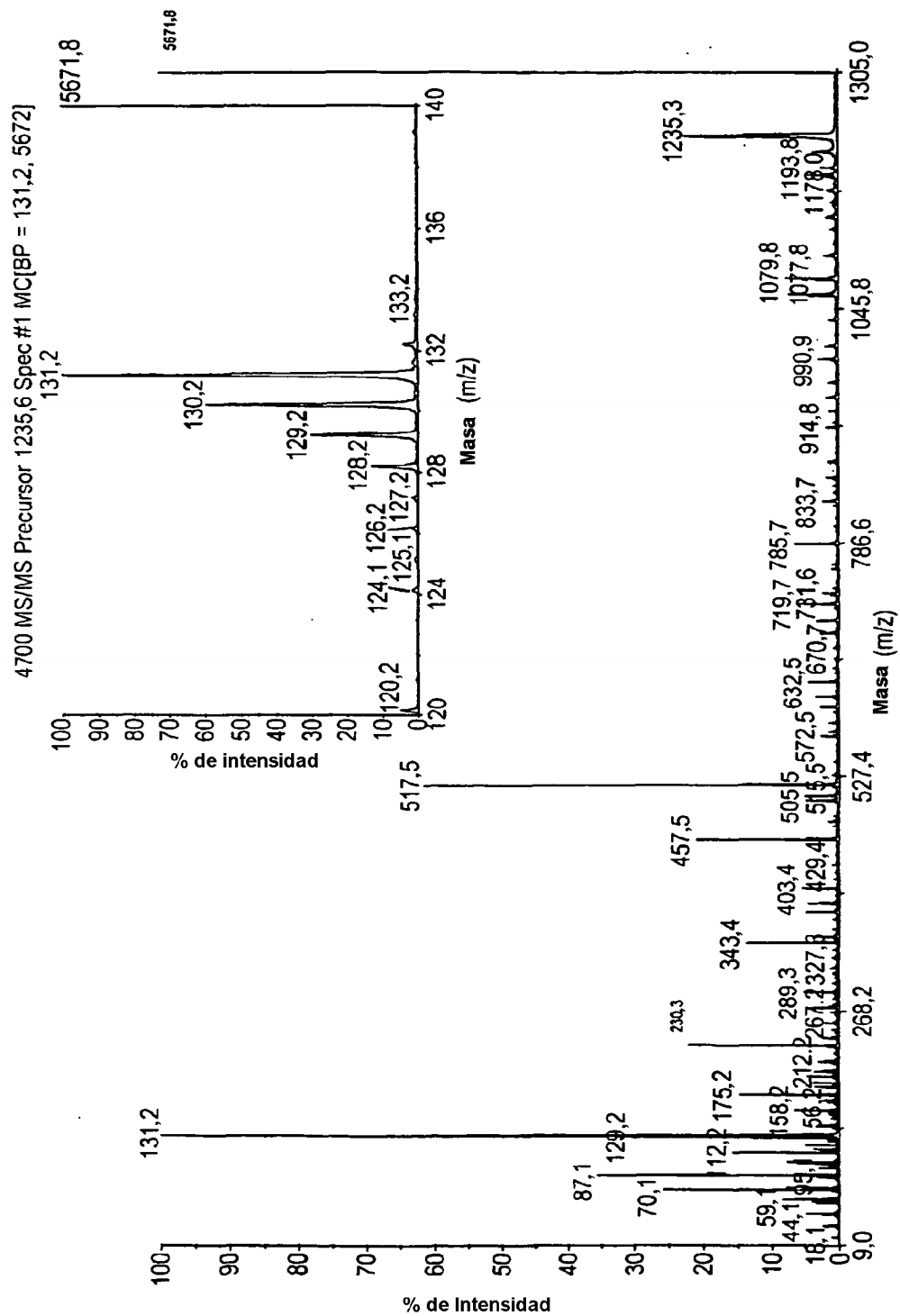


FIG. 10

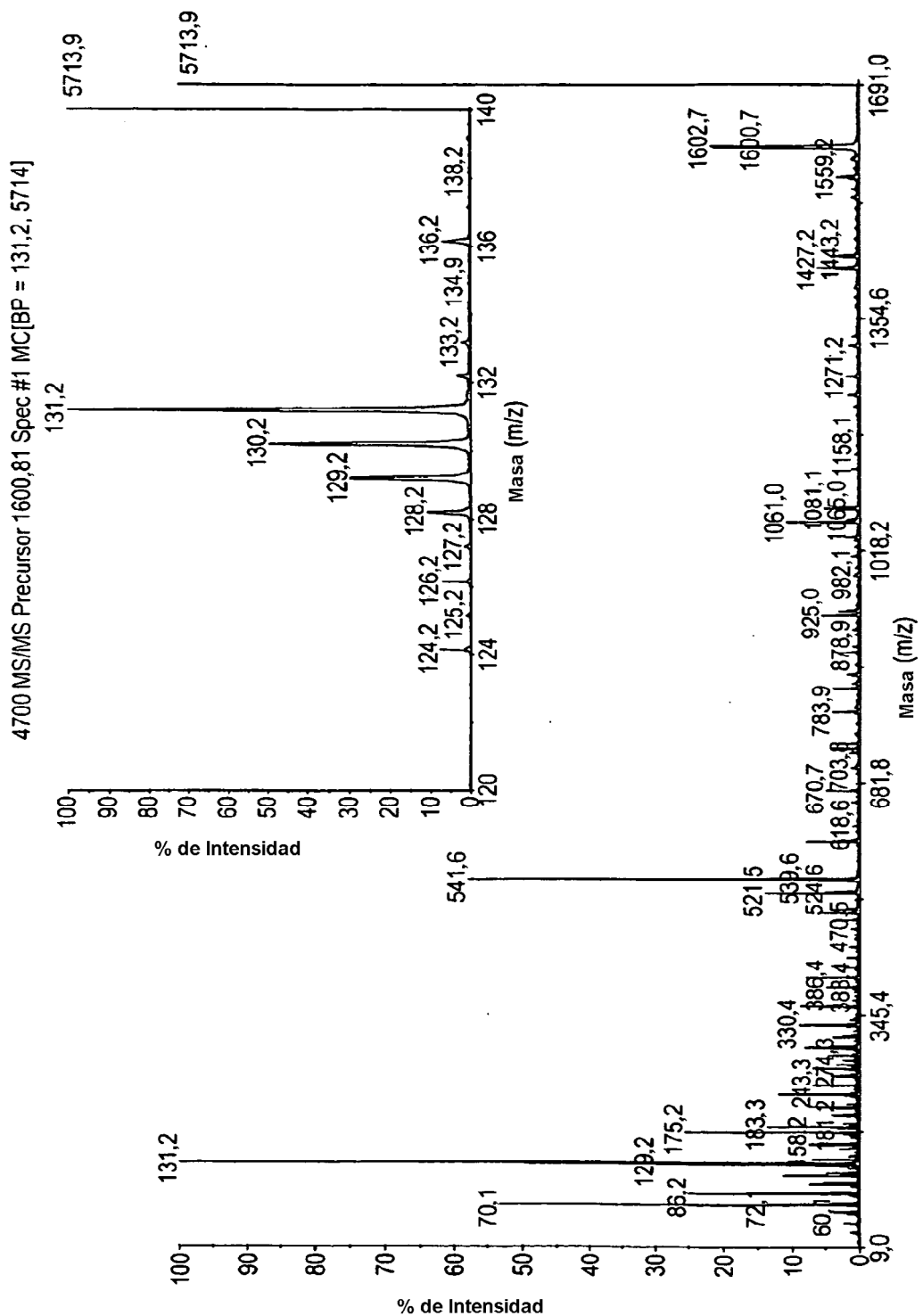


FIG. 11

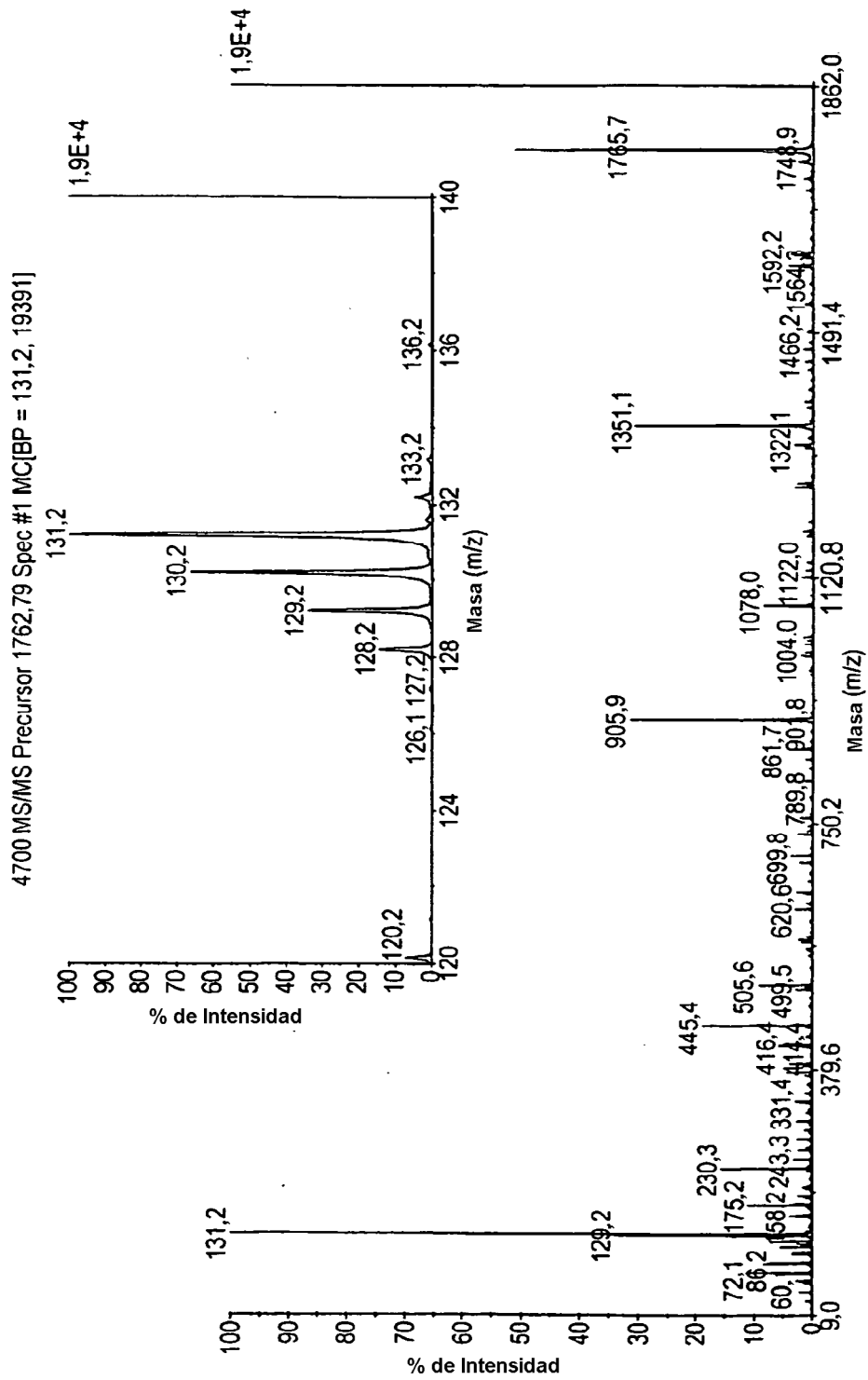


FIG. 12