

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 416 183**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

H01J 49/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2008** **E 08849452 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013** **EP 2210110**

54 Título: **Matriz de MALDI y procedimiento de MALDI**

30 Prioridad:

13.11.2007 EP 07120550

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

30.07.2013

73 Titular/es:

BIOSPARQ B.V. (100.0%)
Galileiweg 8
2333 BD Leiden, NL

72 Inventor/es:

WUIJCKHUIJSE, ARJAN LAURENS;
KIENTZ, CHARLES ELIZA y
DEGENHARDT-LANGELAAN, CARLA ELISABETH
ANNA MARIA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 416 183 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

Matriz de MALDI y procedimiento de MALDI.

5 La invención se refiere a un procedimiento de espectrometría de masas MALDI en aerosol, al uso de un compuesto específico como un material de matriz MALDI en aerosol y al uso de una composición de matriz MALDI en un procedimiento de revestimiento en la fase gaseosa.

10 La introducción de la desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) como una técnica de ionización suave en la espectrometría de masas (MS) ha revolucionado el análisis de una gran variedad de compuestos de masa alta, que incluyen polímeros bioquímicamente importantes. MALDI es un procedimiento que permite la producción de iones intactos en fase gaseosa a partir de compuestos térmicamente lábiles y no volátiles como proteínas, péptidos, oligonucleótidos, oligosacáridos, y polímeros sintéticos, con un peso molecular de entre 400 y 350 000 Da. De conformidad con el procedimiento MALDI MS, se utiliza una matriz para proteger la molécula lábil del analito de ser destruida directamente por el rayo láser.

La técnica de ionización suave de MALDI MS permite generalmente el análisis de biomoléculas. MALDI MS se utiliza por ejemplo en el análisis y la clasificación de (fracciones de) microorganismos.

15 Un análisis MALDI MS comprende dos etapas. La primera etapa involucra la preparación de una muestra mediante la mezcla del analito con un exceso molar de un material de matriz. La segunda etapa del proceso MALDI implica la desorción de porciones volumétricas de la muestra sólida mediante pulsos cortos intensos de láser. Se considera que la matriz cumple tres objetivos: el aislamiento de los analitos entre sí, la absorción de energía del láser para desorber los analitos y la promoción de la ionización. La luz láser genera la ionización de una pequeña fracción de la matriz y la muestra de analitos. Las masas moleculares de los iones en fase gaseosa resultantes se determinan generalmente mediante la aceleración de las moléculas ionizadas en un campo eléctrico y la separación de las moléculas en base a su masa en un detector de tiempo de vuelo (TOF). MALDI-TOF es un procedimiento sensible que permite la detección de cantidades muy pequeñas de un componente.

25 El material de matriz aplicado suele ser un ácido orgánico pequeño. Los materiales de matriz comúnmente utilizados incluyen ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido sinapínico), ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (α -ciano o α -matriz) y ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB). Generalmente, el material de matriz se disuelve en una mezcla con agua altamente purificada y otro compuesto orgánico (normalmente, acetonitrilo (ACN)). Normalmente, se agrega también un ácido, como ácido trifluoroacético (TFA), dado que el ácido puede suprimir la influencia perturbadora de impurezas salinas en el espectro de masas del analito. Asimismo, la disminución del pH de la solución de matriz suele resultar en una mayor calidad de la muestra, como un mayor número e intensidad de señales.

30 Posteriormente, la solución de matriz se mezcla con el analito que se desea investigar. El compuesto orgánico (por ejemplo, ACN) permite la disolución de las proteínas hidrófobas en la muestra, mientras que el agua permite la disolución de proteínas hidrófilas. En un procedimiento MALDI convencional, esta solución se coloca en una placa MALDI (generalmente, una placa de metal diseñada para dicho fin). Los disolventes se evaporan, dejando únicamente la matriz recristalizada, que tiene las proteínas de analito diseminadas en los cristales de matriz.

35 Generalmente, en la espectrometría de masas MALDI en aerosol, el desarrollo sigue dos líneas de tratamiento de muestras, ya sea con una matriz que premezcla analitos previo a la aerosolización o con un revestimiento de vuelo en tiempo real de las partículas de aerosol. El revestimiento de la matriz en vuelo permite la espectrometría de masas MALDI en aerosol en línea del bioaerosol atmosférico.

40 En el caso de MALDI de partículas únicas en aerosol en tiempo real, los aerosoles deben revestirse con material de matriz en la fase gaseosa. Por lo tanto, el material de matriz debería ser suficientemente volátil. Asimismo, una cantidad suficiente de material de matriz debería depositarse en los aerosoles. Se ha intentado en la técnica previa realizar un análisis MALDI en aerosoles, particularmente en bioaerosoles.

45 En WO-A-02/052246, por ejemplo, se describe un procedimiento MALDI MS en aerosoles, donde los aerosoles se proporcionan con una matriz MALDI mediante evaporación/condensación o sublimación/condensación. De conformidad con la presente, los aerosoles secados revestidos con la matriz MALDI pueden ionizarse con un láser pulsado. Por lo tanto, los componentes ionizados pueden analizarse mediante TOF MS.

50 La tesis de doctorado de A.L. van Wuijckhuijse "Aerosol Time-of-Flight Mass Spectrometry: An approach to detect, select and identify biological aerosols" (2003) también divulga los procedimientos MALDI MS para analitos en aerosol.

55 Para analizar los microorganismos que están comprendidos en bioaerosoles, se deberían analizar las proteínas características para la especie bacteriana o aún para la cepa bacteriana o aún para una forma de desarrollo particular. Sin embargo, la mayoría de las proteínas características (como las proteínas ribosomales en el rango de masa molecular de 1-20 kDa) están protegidas por la membrana celular, y por ende, no están disponibles para la ionización. Los bioaerosoles suelen necesitar un tratamiento en línea que permite que las proteínas estén

5 disponibles para la ionización, por ejemplo, mediante degradación parcial de la membrana celular previo a la ionización. De manera clásica, con MALDI convencional, dicho tratamiento comprende la solución de un ácido y el material de matriz MALDI en agua y acetonitrilo, seguido de la incorporación del analito de microorganismo y el posterior secado de la mezcla. El ácido degrada parcialmente la membrana celular, haciendo que las proteínas características estén disponibles para la ionización. Los parámetros importantes en este procedimiento son la relación de matriz y ácido con el analito y la forma de cristal de la matriz después del secado.

10 Queda claro que el procedimiento previamente mencionado no es adecuado para el muestreo y el análisis en tiempo real, dado que la preparación del analito implica muchas etapas y mucho tiempo. Asimismo, los inventores reconocieron que el uso de las condiciones ácidas combinadas con altas temperaturas ($> 80^{\circ}\text{C}$), necesarias para la evaporación de matriz, tiene un efecto negativo en la respuesta de detección MS de las partículas de proteína en la fase gaseosa. Por otra parte, el material de matriz se degrada más rápidamente en presencia de un ácido o condiciones ácidas acuosas.

15 Un diseño de la espectrometría de masas MALDI convencional tiene un alto rendimiento y por lo tanto, es adecuado, por ejemplo, para la identificación de bacterias a nivel de cepa. Sin embargo, el rendimiento de MALDI MS en aerosol en línea no es satisfactorio aún, particularmente, el rendimiento de MALDI MS en bioaerosol en línea de proteínas en el rango de masa molecular de 1-20 kDa.

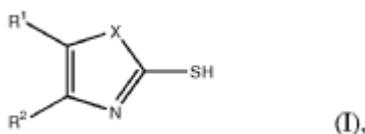
20 El revestimiento de bioaerosoles como aerosoles que comprenden microorganismos y/o proteínas, con un material de matriz MALDI adecuado permite una caracterización en línea de los bioaerosoles, que incluyen el material biológico. Los aerosoles pueden revestirse con un material de matriz mediante la condensación del material de matriz en los aerosoles de la fase gaseosa como se describe en WO-A-02/052246. Sin embargo, este procedimiento no es adecuado para la mayoría de los materiales de matriz disponibles, dado que no son muy volátiles y/o térmicamente estables a presión atmosférica. Asimismo, algunos materiales de matriz volátiles conocidos como alcohol de 3-nitrobencilo y ácido picolínico tienen una calidad de señal no satisfactoria. Existe una fuerte necesidad de materiales de matriz MALDI adecuados. Asimismo, existe una gran necesidad de un procedimiento mejorado para proporcionar aerosol con un revestimiento de material de matriz MALDI adecuado en la fase gaseosa, preferentemente a presión atmosférica. Sigue siendo un desafío proporcionar un microorganismo en fase gaseosa que contenga aerosoles con una cantidad suficiente de material de matriz para generar una alta respuesta de proteínas características, en particular aquellas dentro del intervalo de 1-20 kDa.

30 El objeto de la invención es satisfacer la necesidad de materiales de matriz y las técnicas de preparación en tiempo real/directa, es decir, sin recolección previa de bioaerosol, espectrometría de masas MALDI en aerosol con una calidad de señal satisfactoria.

Otro objeto de la invención es superar los problemas que se encuentran en la ejecución de la espectrometría de masas MALDI en aerosoles, en particular, en bioaerosoles.

35 Más particularmente, la invención busca proporcionar un procedimiento adecuado para revestir una superficie de aerosol de analito MALDI con una capa de material de matriz.

La memoria descriptiva se refiere a un material de matriz para MALDI MS que comprende 2-mercapto-4,5-dialquilheteroareno de conformidad con la fórmula (I)



40 donde X se selecciona de S, O o N y donde R^1 y R^2 se seleccionan independientemente de hidrógeno, metilo, metoxi, etoxi y propoxi o donde R^1 y R^2 se unen para formar una estructura de anillo aromático opcionalmente sustituido, que comprende opcionalmente uno o más heteroátomos, o una forma tautomérica de este.

45 Los inventores descubrieron que 2-mercapto-4,5-dialquilheteroareno de fórmula (I) es un material de matriz muy adecuado para MALDI MS en aerosol. El material de matriz de 2-mercapto-4,5-dialquilheteroareno proporciona una calidad de señal excelente. La cantidad requerida de analito para un análisis MALDI se reduce significativamente. Asimismo, el material de matriz es significativamente más volátil que la mayoría de los materiales de matriz convencionales y por lo tanto, más adecuado para MALDI MS en aerosol.

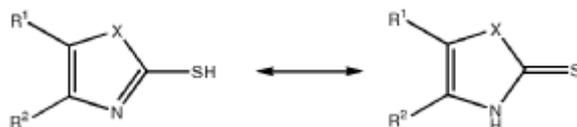
50 R^1 y R^2 pueden seleccionarse de hidrógeno, metilo, metoxi, etoxi y propoxi. Estos pequeños grupos garantizan la volatilidad deseada del material de matriz. Los grupos alcoxi pueden mejorar la volatilidad del material de matriz. R^1 y R^2 también pueden unirse para formar una o más estructuras de anillo aromático opcionalmente sustituido (incluso anillos fusionados), que comprenden opcionalmente uno o más heteroátomos. La o las estructuras de anillo

aromático pueden por ejemplo comprender un anillo aromático de 5, 6 o 7 miembros aromáticos.

Preferentemente, R^1 y R^2 son idénticos y más preferentemente R^1 y R^2 son ambos grupos metilo. X es preferentemente S.

Se han logrado muy buenos resultados con 2-mercapto-4,5-dialquiltiazol donde ambos R^1 y R^2 son grupos metilo.

- 5 Dos formas tautoméricas diferentes de 2-mercapto-4,5-dialquilheteroareno de fórmula (I) son uno, donde el protón se enlaza al átomo de azufre y tior y uno donde el protón se enlaza al átomo de nitrógeno aromático. Estas dos formas tautoméricas se muestran a continuación.

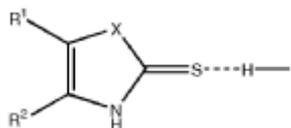


- 10 Para MALDI MS en aerosol en tiempo real, el material de matriz debería pasar a una fase gaseosa para depositar el material de matriz en aerosoles. Preferentemente, el material de matriz se deposita en el analito a presión atmosférica. Aunque el 2-mercapto-4,5-dialquilheteroareno de fórmula (I) puede convertirse en la fase gaseosa, los inventores concluyeron que la cantidad de material de matriz que puede evaporarse es limitada debido a la degradación del material mediante el calor de evaporación aplicado. Generalmente, el material de matriz comienza a degradarse a temperaturas de aproximadamente 90°C o más.

- 15 El análisis del material degradado demostró que los productos de descomposición de 2-mercapto-4,5-dialquilheteroareno de fórmula (I) comprenden conjugados del 2-mercapto-4,5-dialquilheteroareno original, donde dos moléculas se enlazan mediante el grupo tior. Algunos de los conjugados se enlazan a través de un enlace — C— S— C— mientras que otros se enlazan a través de un enlace — C— S— S— C—.

- 20 Sin limitarse a la teoría, los inventores creen que el conjugado con el enlace — C— S— C— se forma mediante reacción intermolecular de los grupos tior de dos moléculas de 2-mercapto-4,5-dialquilheteroareno diferentes bajo la liberación de H_2S . Asimismo, los inventores creen que el conjugado con el enlace — C— S— S— C— se forma mediante una reacción de oxidación de los grupos tior de dos moléculas de 2-mercapto-4,5-dialquilheteroareno diferentes bajo liberación de dos protones y dos electrones.

- 25 Los inventores descubrieron que es posible proteger al menos parcialmente los grupos tior de las moléculas de 2-mercapto-4,5-dialquilheteroareno incorporando un alcohol a la solución de matriz. El alcohol puede formar un enlace de hidrógeno con el par de electrones libres del átomo de azufre y tior de la forma tautomérica donde el protón se enlaza al nitrógeno aromático como se muestra a continuación.



- 30 Como resultado, la forma tautomérica donde el protón se enlaza al átomo de nitrógeno aromático se ve favorecida y 2-mercapto-4,5-dialquilheteroareno estará principalmente presente en esta forma tautomérica. Asimismo, la formación de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de 2-mercapto-4,5-dialquilheteroareno y las moléculas de alcohol es capaz de aumentar la volatilidad del material de matriz.

- 35 Por lo tanto, la memoria descriptiva está dirigida también a una composición de matriz para MALDI MS en aerosol en tiempo real que comprende un 2-mercapto-4,5-dialquilheteroareno de conformidad con la fórmula (I) o una forma tautomérica de este y un alcohol. Esta composición de matriz es particularmente ventajosa para MALDI MS en aerosol porque puede convertirse inmediatamente en fase gaseosa para depositar el material de matriz en los aerosoles.

- 40 Preferentemente, el peso molecular del alcohol es relativamente bajo. Los alcoholes adecuados incluyen, por ejemplo, metanol, etanol, propanol, isopropanol, *n*-butanol, *sec*-butanol, isobutanol y *terc*-butanol. Algunos alcoholes con más de un grupo hidroxilo pueden aplicarse, como por ejemplo, glicol, propan-1,2-diol, propan-1,3-diol, glicerol, butano-1,2-diol, butano-1,3-diol, butano-2,3-diol, butano-1,2,3-triol y butano-1,2,4-triol.

Aunque en general los alcoholes polihídricos, como dioles y trioles son menos volátiles que los alcoholes monohídricos, tienen la ventaja de tener grupos hidroxilo adicionales disponibles para la formación de puentes de hidrógeno.

- 45 Asimismo, el alcohol (en particular, el etanol) es capaz de degradar la membrana celular a un punto suficiente que las proteínas de interés se vuelven disponibles para la ionización. Por lo tanto, la presencia del alcohol al mismo

tiempo actúa como agente liberador para liberar las proteínas características de los microorganismos.

Una ventaja importante de la presencia de un alcohol es que el material de matriz de 2-mercapto-4,5-dialquilheteroareno no se degrada, o al menos se degrada más lento, con el calor de evaporación/sublimación aplicado. Se ha descubierto que, en combinación con un alcohol, el material de matriz de la invención mantiene su actividad durante un mayor período de tiempo, como por ejemplo, durante al menos 10 meses, preferentemente al menos 12 meses en comparación con los pocos minutos u horas en concentraciones entre bajas y cero de un alcohol, aún en una temperatura de calentamiento de por ejemplo 150°C.

El uso de temperaturas altas, como temperaturas de más de 100°C, preferentemente de más de 120°C, más preferentemente de más de 150°C también contribuye a la liberación de las proteínas características de los microorganismos, ver por ejemplo, Horneffer *et al. J.Am. Soc. Mass Spectrom.* 2004, 15(10), 1444-1454.

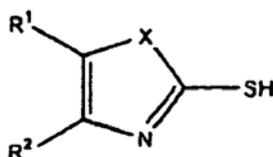
Asimismo los inventores han descubierto que es ventajoso aplicar alcoholes halogenados. Un halógeno preferido es cloro, aún más preferido es flúor. En principio, una sustitución única de halógeno en el alcohol ya otorga un efecto ventajoso.

En una realización preferida, al menos el átomo de β-carbono se sustituye con uno o más átomos de halógeno. Los ejemplos adecuados de dichos alcoholes halogenados incluyen trifluoroetanol, pentafluoropropanol, y hexafluoroisopropanol. Una realización más preferida es una realización donde el alcohol se encuentra totalmente halogenado, es decir, todos los átomos de hidrógeno enlazados a carbono se sustituyen con un átomo de halógeno. Los ejemplos de alcoholes completamente halogenados incluyen triclorometanol, trifluorometanol, percloroetanol, perfluoroetanol, percloropropanol, perfluoropropanol, perclorobutanol y perfluorobutanol.

La alta capacidad de retiro de electrones de sustituyentes de halógeno aumenta la electronegatividad del grupo hidroxilo de la molécula de alcohol. Esto deriva en un enlace de hidrógeno más fuerte entre el alcohol y las moléculas de 2-mercapto-4,5-dialquiltiazol de la invención. Por lo tanto, la forma tautomérica ventajosa del material de matriz de la invención donde el protón se enlaza al átomo de nitrógeno aromático se favorece aún más. Como resultado de ello, mejora la ejecución del análisis MALDI MS en aerosol en tiempo real.

Por lo tanto, la invención está dirigida a un procedimiento de espectrometría de masas MALDI para analizar un analito en aerosol que comprende:

- Aplicar un alcohol a una concentración para generar una presión de vapor parcialmente saturada en un intervalo de temperatura de 15 a 100°C,
- Sublimar el material de matriz para la espectrometría de masas MALDI que comprende un 2-mercapto-4,5-dialquilheteroareno de conformidad con la fórmula (I)



(I),

donde X es N, S u O, y donde R¹ y R² se seleccionan independientemente de hidrógeno, metilo, metoxi, etoxi, y propoxi, o donde R¹ y R² se unen para formar una estructura de anillo aromático sustituido, que comprende opcionalmente uno o más heteroátomos,

o una forma tautomérica de este, en presencia del alcohol,

- poner en contacto el analito en aerosol con el material de matriz en la fase gaseosa
- ionizar al menos parte de dicho analito; y
- separar los componentes ionizados utilizando un espectrómetro de masas, por ejemplo, un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo.

Dado que la cantidad de material de matriz de la invención que puede sublimarse aumenta en presencia de un alcohol y dado que un alcohol es capaz de aumentar la volatilidad del material de matriz, se prefiere utilizar el compuesto de matriz de la Fórmula I en una composición con un alcohol.

Los inventores han descubierto que, de conformidad con este procedimiento, el analito en aerosol se proporciona con una capa homogénea uniforme de material de matriz. Esto resulta ventajoso dado que en homogeneidades en la superficie del analito se puede afectar negativamente el análisis MALDI. Por lo tanto, este procedimiento mejora significativamente la calidad de la señal de la espectrometría MALDI en aerosoles. Esta mejora es particularmente útil para bioaerosoles dado el análisis delicado de las proteínas características. La atmósfera al menos parcialmente

saturada con uno o más alcoholes como se describe en la presente. Preferentemente, una matriz que contiene una solución de etanol se introduce en pequeñas gotas en la zona calentada del aparato. La ventaja de esto es que existe una corriente líquida única en el espectrómetro de masas y que la concentración de la matriz puede controlarse con más precisión.

5 Durante el muestreo en aerosol en línea la presión de vapor debería mantenerse preferentemente alta. Esto puede lograrse mediante evaporación adicional del líquido como alcohol o agua.

En algunos casos, se prefiere agregar un ácido volátil a la corriente de aerosol revestida. Preferentemente, se utilizan los ácidos orgánicos volátiles (que son volátiles a una temperatura que oscila entre temperatura ambiente y 100°C) y más preferentemente el ácido trifluoroacético (TFA).

10 El analito, y preferentemente al menos una partícula en el analito, puede comprender microorganismos (que incluyen bacterias, hongos, algas, protozoos y virus) y/o proteínas (incluso toxinas) y cualquier otro material biológico, por ejemplo, linfocitos o tejido celular.

15 Preferentemente, el al menos un aerosol tiene una granulometría media como la que se mide por microscopía electrónica de transmisión de al menos 0,1 µm. Se prefiere que la granulometría media como se determina mediante microscopía electrónica de transmisión sea de 20 µm. Por lo tanto, la partícula en aerosol puede tener una granulometría media en el rango de 0,3-20 µm, preferentemente en el rango de 0,5-15 µm.

20 En una realización preferida, el analito ha sido sujeto a una selección previo al procedimiento de la invención. Un procedimiento de selección adecuado se describe, por ejemplo, en WO-A-2002/052246. De conformidad con este procedimiento, las partículas de bioaerosol se seleccionan en base al hecho de que la presencia de sustancias específicas, como aminoácidos, induce una fluorescencia característica cuando se irradia con una longitud de onda adecuada. En general, las sustancias inorgánicas y la mayoría de las orgánicas no muestran esta característica. Por lo tanto, las partículas de bioaerosol pueden seleccionarse mediante un láser excitado que genera fluorescencia de sustancias específicas en partículas de bioaerosol después de lo cual un detector selecciona las partículas de bioaerosol fluorescentes y se dispara un segundo láser para ionizar las partículas de bioaerosol seleccionadas.

25 Preferentemente, la selección comprende una selección de tamaño. El tamaño de las partículas de aerosol que comprenden bacterias y virus es menor que 20 µm. Dado que las partículas de aerosol entran en el espacio central del espectrómetro de masas a una velocidad determinada, el tamaño de las partículas de aerosol sucesivas puede determinarse a partir de la duración de una distancia conocida atravesada por una partícula de aerosol. Al dirigir el rayo láser de excitación a dos lugares sucesivos con una distancia mutua conocida, la duración arriba mencionada y por ende el tamaño de la partícula de aerosol pueden determinarse a partir de la luz dispersa y detectada por una partícula de aerosol. Esto permite la ionización selectiva de biomaterial en una ventana de tamaño específico. Por lo tanto, es posible identificar un biomaterial de tamaño específico (como una bacteria) de una mezcla de materiales diferentes.

35 La invención permite la clasificación de microorganismos (que incluyen bacterias, hongos, algas, protozoos y virus) y/o proteínas (que incluyen toxinas) o cualquier otro material biológico, por ejemplo, linfocitos o tejido celular. Las diferentes especies pueden clasificarse de conformidad con sus características espectrales. Dicha clasificación puede ser muy específica y aún es posible diferenciar entre microorganismos en diferentes estadios de desarrollo. Un procedimiento para la clasificación de biomateriales comprende obtener un espectro MALDI MS de biomateriales diferentes (como diferentes bacterias, células, virus, etc.) comparando el espectro MALDI MS obtenido con un conjunto de espectros MALDI MS; y sobre la base de dicha comparación clasificar dicho biomaterial. Se ha demostrado que es posible realizar una clasificación confiable sobre la base de una sola medición de una partícula única. Esto es particularmente útil cuando el procedimiento como se describe más arriba se utiliza para el análisis de muestras de aire con bajas concentraciones de biopartículas.

45 Asimismo, la invención permite monitorear la calidad del aire o del líquido, por ejemplo, agua, en particular, respecto de una materia particulada y microorganismos.

En otro aspecto, la invención está dirigida al uso de 2-mercapto-4,5-dialquilheteroareno de conformidad con la fórmula (I) como un material de matriz para MALDI MS en aerosol, que se sublima en presencia de un alcohol.

50 En otro aspecto, la invención está dirigida al uso de una composición de matriz como se define en la presente, sublimada en presencia de un alcohol, en un procedimiento de revestimiento de matriz en fase gaseosa, para MALDI MS.

En otro aspecto, la invención está dirigida a un procedimiento MALDI MS para analizar un analito que comprende

- aplicar un alcohol a una concentración para lograr una presión de vapor parcialmente saturada en un intervalo de temperatura de 15-100°C,
- sublimar un material de matriz que comprende 2-mercapto-4,5-dimetiltiazol en presencia del alcohol,

- poner en contacto el analito con el material de matriz;
- ionizar al menos parte de dicho analito; y
- separar los componentes ionizados utilizando un detector de tiempo de vuelo.

5 Aunque 2-mercapto-4,5-dialquilheteroareno y compuestos similares en general han sido conocidos como material de matriz para MALDI MS (por ejemplo, 2-mercaptobenzotiazol y sus análogos como se describe en Naxing, X. et al., 1997, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 8:116-124 y Domin, M.A. et al., 1999, Rapid Comm. Mass Spectrom. 13:222-226; y 5-etil-2-mercaptotiazol como se describe en Raju, N. P. et al., 2001, Rapid Comm. Mass Spectrom. 15:1879-1884), el compuesto específico 2-mercapto-4,5-dimetiltiazol no se ha divulgado como tal. Asimismo, se conoce en el campo que pequeños cambios en la molécula de matriz pueden derivar en efectos importantes en la aplicación de un compuesto como matriz en MALDI MS. Básicamente es impredecible si un compuesto en particular puede utilizarse como una molécula de matriz y para qué aplicaciones específicas. Actualmente se ha descubierto, como se muestra en los ejemplos, que 2-mercapto-4,5-dimetiltiazol es una molécula de matriz que es sumamente adecuada para la detección de macromoléculas biológicas como proteínas y carbohidratos comprendidos en los microorganismos. Esta utilidad de este compuesto de matriz específico permite la clasificación de microorganismos en base a sus parámetros espectrales.

Breve descripción de las Figuras

Figura 1: Diseño experimental. Véase el Ejemplo 1 para las leyendas.

Figura 2: Reproducción diaria de los espectros MALDI TOF MS en aerosol en tiempo real de células de *B. thuringiensis* mantenidas durante toda la noche en solución salina fisiológica.

20 Figura 3: Espectros MALDI TOF MS en aerosol en vuelo de esporas (A) y células (B) de *B. thuringiensis*.

Figura 4: Espectros MALDI TOF MS en aerosol en tiempo real de esporas (A): *B. globigii*, (B): *B. cereus*, y (C): *B. thuringiensis*.

Figura 5: Espectros MALDI TOF MS en aerosol en vuelo de dos cepas de *B. cereus*.

25 Figura 6: Ejemplo de diferentes huellas de células vegetativas individuales/partículas agrupadas de *B. thuringiensis* dentro de un cultivo.

Figura 7: Ejemplo de MALDI en aerosol en tiempo real c. MALDI común (estático) de células vegetativas de *B. thuringiensis* cultivadas en una placa de ágar utilizando condiciones de matriz estandarizadas.

Figura 8: Espectros MALDI TOF MS en aerosol en tiempo real de *E. herbicola* y *E. coli* cultivados en placa de ágar utilizando condiciones de matriz estandarizadas.

30 Figura 9: Espectros MALDI TOF MS en aerosol en tiempo real de (A) virus AcNPV con una banda ancha característica de 6000-12000 Da y (B) virus CpGV con grupos de señal característicos en 1 242-1 257-1 279 Da y 6 460 y 8 675 Da; (B-a) y (B-b): ampliaciones.

35 Figura 10: Espectro MALDI TOF MS en aerosol en tiempo real de toxina del cólera en agua (600 tomas/partículas sumadas) y 12 toxinas del cólera sumadas que contienen tomas seleccionadas de 600 tomas/partículas de agua del canal.

Figura 11: Espectros MALDI TOF MS en aerosol en tiempo real de líneas celulares de linfocitos B J558 y linfocitos T Jurkat.

La invención se ilustrará mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1 - reproducibilidad

40 El diseño experimental utilizado para analizar aerosoles que contienen *Bacillus thuringiensis* se muestra en la Figura 1. Las partículas de aerosol en la fase gaseosa ingresan a MALDI por el acceso (1) y son dirigidas a un tubo opcionalmente calentado (2) que comprende un líquido (como un alcohol) y posteriormente a través de un tubo (3) que comprende el material de matriz. La primera parte de este tubo se calienta, mientras que la segunda no, para que el material de matriz se deposite en la segunda parte y se forme un revestimiento en los aerosoles. Los aerosoles revestidos pasan a través de un secador (4) y un generador de haz de aerosol (5) después de lo cual los aerosoles revestidos ingresan a una sala emisora (6) donde se detectan mediante dispersión y rayos UV (7). Las proteínas de interés en los aerosoles se ionizan posteriormente mediante ionización-láser (8). Los iones obtenidos se separan en base a sus masas en el tubo TOF (9) y posteriormente se detectan en el detector (10). La adquisición y procesamiento de datos se realiza con una computadora personal (11).

50 La presión en el sistema disminuye a través de una serie de bombas de aproximadamente 100 kPa (atmosférica) en

el acceso (1), el tubo (2) y el tubo (3) a 10^5 kPa en la sala emisora (6) y el tubo TOF (9). El flujo a través del sistema se encuentra en el rango de 600-1000 ml/min.

Se registraron espectros TOF en aerosol MALDI en tiempo real de aerosoles que contienen *Bacillus thuringiensis* mediante el uso de 2-mercapto-4,5-dimetiltiazol como material de matriz.

- 5 La reproductibilidad del instrumento MALDI TOF MS en aerosol en línea que incluye una preparación de muestras en tiempo real se demuestra en la Figura 2. Los patrones de picos característicos comparables (es decir, las huellas MALDI) en la Figura 2 muestran una reproductibilidad diaria uniforme. Los resultados ilustrados en la Figura 2 se reprodujeron en experimentos idénticos con células y esporas vegetativas *B. thuringiensis* y *B. cereus* (no aparecen los datos) y se indicó que la reproductibilidad y la estabilidad del sistema son satisfactorias.

10 Ejemplo 2 — Potencial distintivo

El potencial distintivo de la invención se demostró a través de los resultados obtenidos de manera similar como se describió en el Ejemplo 1, pero con varias especies *Bacillus*, como *B. cereus* (dos cepas), *B. thuringiensis*, y *B. globigii*. De conformidad con sus secuencias ARNr16S se sugiere considerar *B. cereus* y *B. thuringiensis* como especies estrechamente relacionadas. Una de las cepas de bacterias *B. cereus* ATCC 14579 probadas tiene una similitud en *B. thuringiensis* de 99,6% en base a las sustituciones en pares y similitudes en secuencias de nucleótidos ARNr 16S. Los aerosoles de células y esporas vegetativas de las especies *Bacillus* se recubrieron en tiempo real con material de matriz como se describe en el Ejemplo 1, y el tiempo real se analizó con MALDI TOF MS en aerosol.

Células vegetativas vs. esporas

- 20 En primer lugar, se midieron las células vegetativas y las esporas de la misma especie de *B. thuringiensis*. Las diferentes huellas MALDI obtenidas como se describe en la Figura 3, entre las esporas (A) y las células vegetativas (B) de *B. thuringiensis* muestran una clara discriminación entre ambas.

Especies estrechamente relacionadas

- 25 Posteriormente, el potencial distintivo de MALDI TOF MS en aerosol se ilustró mediante los resultados de especies estrechamente relacionadas, obtenidos de las esporas de *B. thuringiensis*, *B. cereus* y *B. globigii* cultivadas en las mismas condiciones de cultivo para evitar las diferencias dependientes del cultivo. Como puede verse en la Figura 4, las especies *B. globigii* (A), *B. cereus* (B) y *B. thuringiensis* (C) muestran espectros muy característicos, que pueden utilizarse para distinguirlos inmediatamente.

- 30 En la Figura 5, el potencial distintivo se demuestra mediante los resultados de dos cepas de *B. cereus* cultivadas en las mismas condiciones de cultivo para evitar las diferencias que dependen del cultivo. Asimismo, las esporas de dos cepas de *B. cereus* pueden distinguirse entre sí como se demuestra a través de los diferentes perfiles MALDI en ambos espectros. Los resultados indican que los microorganismos estrechamente relacionados como *B. thuringiensis*, *B. globigii*, *B. cereus* (que incluyen dos cepas) pueden distinguirse entre sí aún a nivel de cepa mediante el uso de la invención.

- 35 *Separación a un nivel de partícula único dentro del cultivo bacteriano*

La separación a un nivel de partícula o célula único es posible mediante el agrupamiento de células o partículas en base al diámetro aerodinámico, la fluorescencia o la huella espectral de masa.

- 40 Con el uso de la invención, la información de espectro de masa suficiente se encuentra disponible en tomas únicas para aplicar el agrupamiento de huella. Las tomas únicas pueden ser células o esporas individuales, células o esporas agrupadas, proteínas, péptidos, medios de cultivo u otras partículas de fondo.

La Figura 6 muestra los datos de 6 tomas/partículas agrupadas en huellas de espectro de masa de *Bacillus thuringiensis*.

Ejemplo 3 - MALDI TOF MS en aerosol c. MALDI TOF MS común

- 45 Para MALDI TOF MS en aerosol, el soporte de MALDI TOF MS común es fundamental para crear una base de datos microbiana. A pesar de las diferencias distintivas entre ambas técnicas – es decir, la morfología de matriz y la ionización en vuelo desconocidas – se obtuvieron espectros comparables si la fórmula de matriz de la invención se utiliza tanto con MALDI TOF MS común y MALDI TOF MS en aerosol. La Figura 7 muestra un ejemplo de espectros obtenidos de células vegetativas de *B. thuringiensis* cultivadas en una placa de ágar durante una semana y registradas con ambas técnicas.

- 50 Se encontraron los mismos grupos pico en: 4 710, 4816, 7 242, 7 385 y 8 259 Da en ambos espectros. La buena similitud entre los resultados de MALDI común y MALDI TOF MS en aerosol se confirmó también con microorganismos gramnegativos como genómovares *Pseudomonas stutzeri*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* y

Erwinia herbicola y virus de la Polihedrosis Nuclear *Autographa californica* (AcNPV) y virus de la granulosis *Cydia pomonella* y bacteriófagos MS2 (no se muestran los datos).

Ejemplo 4 — Otras especies microbianas

Microorganismos gram negativos

- 5 Junto con las especies *Bacillus* gram positivo el microorganismo gram negativo como los genomovares *Pseudomonas stutzeri* (11 especies), *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* y *Erwinia herbicola* otorgan espectros distintivos. La Figura 8 muestran un ejemplo de *E. coli* en comparación con *E. herbicola*.

Virus

- 10 Se probaron los siguientes virus: el bacteriófago MS2 y los virus Baculo, virus de la Polihedrosis Nuclear *Autographa californica* (AcNPV) y el virus de la granulosis *Cydia pomonella*. El bacteriófago MS2 representa un virus tipo ARN. Los virus Baculo son virus de ADN de doble cadena (ADNs). Los espectros idénticos se obtuvieron con MALDI TOF MS en aerosol y MALDI TOF MS común. En el caso de MS2, se detectaron las señales de iones $[M+H]^+$ (m/z 13 726) y $[M+2H]^{+2}$ (m/z 6 865) de la proteína de la cápside 13 kDa (no se muestran los datos).

- 15 Los bacteriófagos específicos para otras especies bacterianas suelen tener proteínas de la cápside de diferente peso molecular y por lo tanto muestran una señal MALDI diferente.

La diferencia entre los espectros de los virus Baculo es evidente (ver Figura 9). Los espectros MALDI TOF MS en aerosol del virus AcNPV (A) contienen una banda ancha característica de 6000-12000 Da probablemente parte de la envoltura principal de glicoproteína. El virus CpGV (B) muestra grupos de señales característicos en 1242-1257-1279Da y 6460 y 8675 Da.

20 Ejemplo 5 — Análisis de muestra líquida

- Junto con la aplicabilidad directa de la invención a muestras en aerosol también se pueden manejar muestras líquidas como agua, fluidos corporales y sangre en volúmenes bajos de 50-200 μ l. Los fluidos toman la forma de aerosol mediante el uso del nebulizador Meinhard que proporciona un aerosol con un gas portador de aire filtrado. El aerosol generado se reviste en tiempo real mediante el uso de la invención y las partículas individuales pueden analizarse a través de la selección de diámetro aerodinámico y/o fluorescencia y/o huella de MALDI TOF MS.

Toxina en agua de canal

La Figura 10 muestra el resultado de la toxina del cólera que contaminó (100 μ g/ml) en el agua de canal. El agua de canal se filtró en un filtro de 0,2 μ m para eliminar las partículas microbianas y se aerolizaron 60 μ m del agua y se analizó en línea.

- 30 La toxina del cólera consiste de una subunidad A con una masa molecular de 24 kDa y 5 subunidades B de 12 kDa. Los espectros de masa de la referencia en agua y agua de canal contaminada muestran la masa característica de la subunidad B de la toxina del cólera. En el caso del agua del canal, 12 espectros de tomas únicas agrupados que contienen un espectro de masas de la toxina del cólera son suficientes para indicar la presencia de la toxina del cólera cuando se seleccionaron de una base de 600 tomas/partículas de agua del canal.

Linfocitos T y B

- 35 Los linfocitos T y B constituyen los componentes celulares principales de la respuesta inmune adaptativa. Los linfocitos T están involucrados en la inmunidad mediada por linfocitos mientras que los linfocitos B son responsables principalmente de la inmunidad humoral (relacionada con anticuerpos). Forman linfocitos de la memoria que recuerdan el patógeno para permitir la producción más rápida de anticuerpos en caso de infecciones futuras. El potencial para analizar linfocitos B y T intactos fue estudiado en linfocitos T Jurkat y linfocitos B J558. Se introdujeron pequeñas cantidades de aproximadamente 50 μ l con un nebulizador Meinhard. La Figura 11 muestra los espectros de masa agrupados promedio MALDI TOF MS en aerosol de los linfocitos T Jurkat y linfocitos B J558.

Conclusión

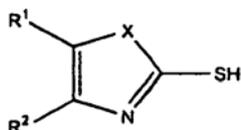
- 45 Los ejemplos anteriores demuestran la capacidad genérica para generar huellas MS discriminatorias a partir de materiales de origen biológico. La invención ha demostrado ser una herramienta rápida y veloz para la discriminación sencilla de especies hasta un nivel de cepa.

- 50 Cuando se utilizan las condiciones de matriz de muestra de la invención, los resultados MALDI serán casi idénticos a MALDI común, lo que indica la disponibilidad del soporte necesario de MALDI común para crear bases de datos y el uso de estas bases de datos para interpretación. La invención, en comparación a MALDI común tiene una gran ventaja de no ser influenciada o verse mínimamente influenciada por la presencia de bases inorgánicas o biológicas naturales debido al análisis en un nivel de partícula único en lugar del material volumétrico.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de espectrometría de masas MALDI para analizar un analito en aerosol que comprende:
- aplicar un alcohol en una concentración para lograr una presión de vapor al menos parcialmente saturada en un intervalo de temperatura de 15 – 100°C.

- 5 - sublimar el material de matriz para la espectrometría de masas MALDI que comprende 2-mercapto-4,5-dialquilheteroareno de conformidad con la fórmula (I)



(I),

- 10 donde X es N, S u O y donde R¹ y R² se seleccionan independientemente de hidrógeno, metilo, metoxi, etoxi y propoxi o donde R¹ y R² se unen para formar una estructura de anillo aromático opcionalmente sustituido, que comprende opcionalmente uno o más heteroátomos, o una forma tautomérica de este en presencia de alcohol,

- poner el analito de aerosol en contacto con el material de matriz en la fase gaseosa
- ionizar al menos parte de dicho analito; y
- separar los componentes ionizados utilizando un espectrómetro de masas, por ejemplo, un espectrómetro de masas en tiempo de vuelo.

- 15 2. Un procedimiento de conformidad con la reivindicación 1, donde R¹ y R² son iguales.

3. Un procedimiento de conformidad con la reivindicación 1 o 2 donde R¹ y R² son grupos metilo.

4. Un procedimiento de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde X es S.

5. Un procedimiento de conformidad con la reivindicación 1, donde el alcohol se selecciona del grupo que consiste de metanol, etanol, propanol, isopropanol, *n*-butanol, *sec*-butanol, isobutanol y *terc*-butanol.

- 20 6. Un procedimiento de conformidad con la reivindicación 1, donde el alcohol es un alcohol polihídrico, como un diol o un triol.

7. Un procedimiento de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde dicho alcohol es halogenado, como clorado o fluorado.

- 25 8. Un procedimiento de conformidad con las reivindicaciones 1 a 7, donde al menos un átomo de β-carbono del alcohol se sustituye con al menos un átomo de halógeno.

9. Un procedimiento de conformidad con las reivindicaciones 1 a 8, donde dicho alcohol está totalmente halogenado.

- 30 10. Un procedimiento de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde dicho aerosol tiene una granulometría media como se mide por microscopía electrónica de transmisión de al menos 0,1 μm, preferentemente 0,3-20 μm y más preferentemente 0,5-15 μm.

11. Un procedimiento de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde dicho analito comprende material biológico, preferentemente microorganismos y/o proteínas.

12. Un procedimiento de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde dicho analito ha sido sometido a una selección de granulometría antes de entrar en contacto con dicho material de matriz.

- 35 13. Un procedimiento para clasificar biomateriales que comprende:

- obtener un espectro de masas MALDI de biomateriales diferentes mediante el uso de un procedimiento de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12;
- comparar el espectro MALDI MS obtenido con una bibliografía de espectros MALDI MS; y
- en base a dicha comparación clasificar dicho biomaterial.

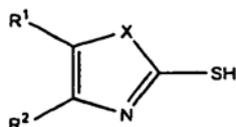
- 40 14. El procedimiento de espectrometría de masas MALDI para analizar un analito que comprende:

- aplicar un alcohol en una concentración para lograr una presión de vapor al menos parcialmente saturada

en un intervalo de temperatura de 15 a 100°C,

- sublimar un material de matriz que comprende 2-mercapto-4,5-dimetiltiazol en presencia del alcohol,
- poner en contacto el analito con el material de matriz;
- ionizar al menos parte de dicho analito; y

- 5
- separar los componentes ionizados utilizando un detector de tiempo de vuelo.
15. El uso de 2-mercapto-4,5-dimetiltiazol como un material de matriz para la espectrometría de masas MALDI, que se sublima en presencia de un alcohol.
16. El uso de una composición de matriz que comprende un 2-mercapto-4,5-dialquiheteroareno de conformidad con la fórmula (I)



(I),

- 10
- donde X es N, S u O y donde R¹ y R² se seleccionan independientemente de hidrógeno, metilo, metoxi, etoxi y propoxi o donde R¹ y R² se unen para formar una estructura de anillo aromático opcionalmente sustituido, que comprende opcionalmente uno o más heteroátomos, o una forma tautomérica de este,

sublimados en presencia de un alcohol,

- 15
- en un procedimiento de revestimiento de la matriz en fase gaseosa para la espectrometría de masas MALDI.
17. El uso de conformidad con la reivindicación 15 o 16, donde el alcohol se elige del grupo que consiste de metanol, etanol, propanol, isopropanol, *n*-butanol, *sec*-butanol, isobutanol, y *terc*-butanol.
18. El uso de conformidad con la reivindicación 16, donde el alcohol es un alcohol halogenado.

20

Figura 1

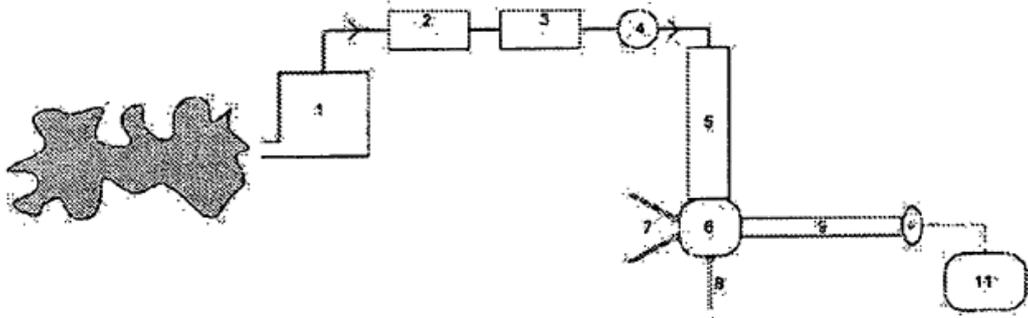


Figura 2

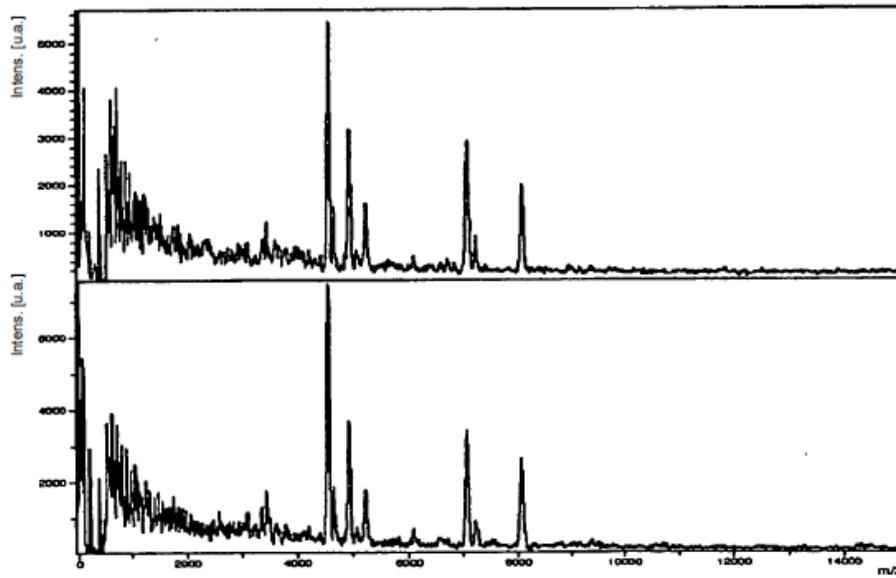


Figura 3

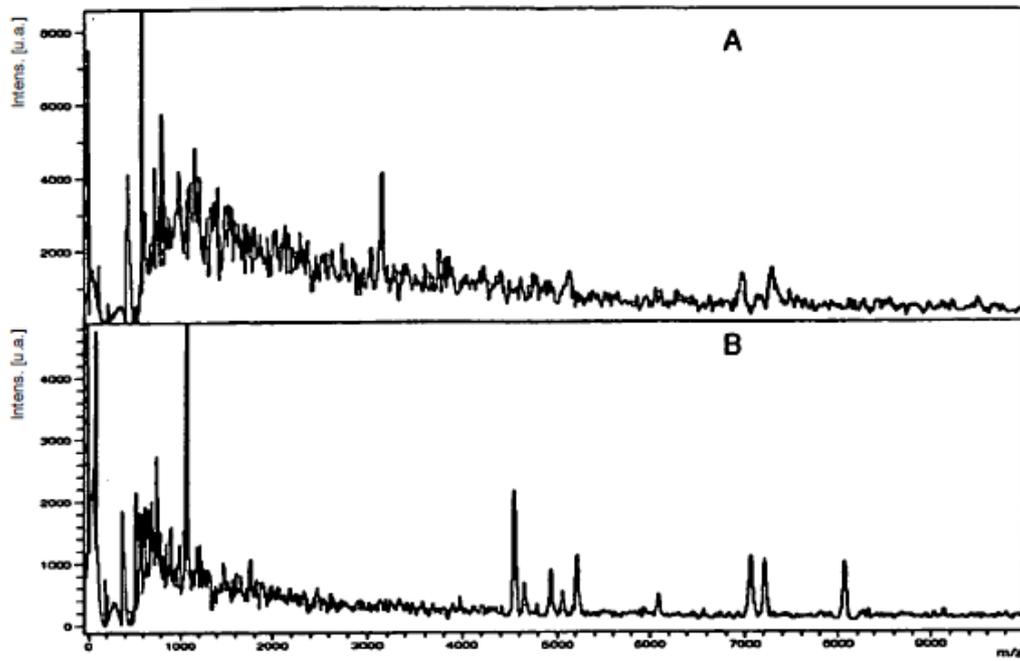


Figura 4

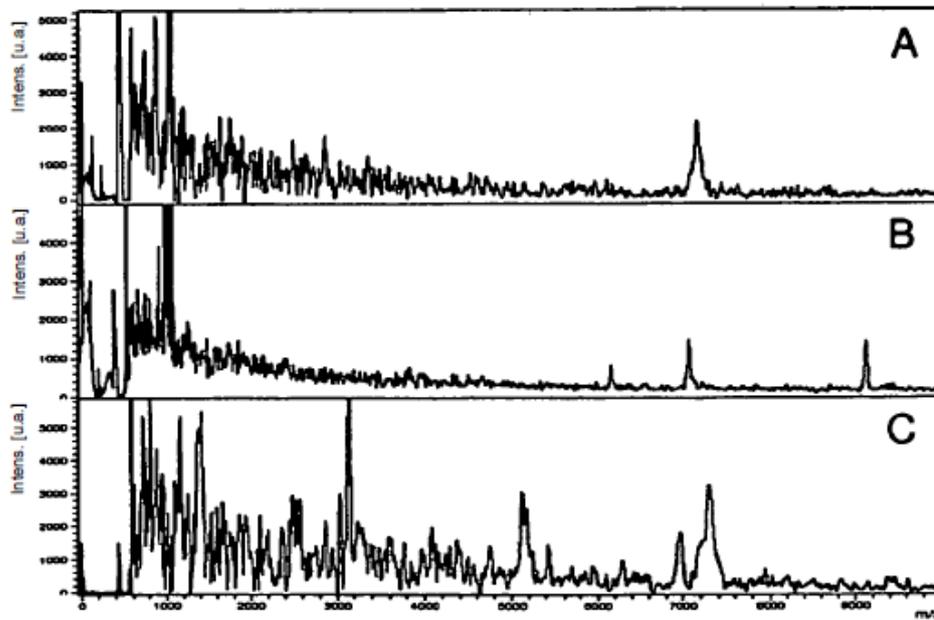


Figura 5

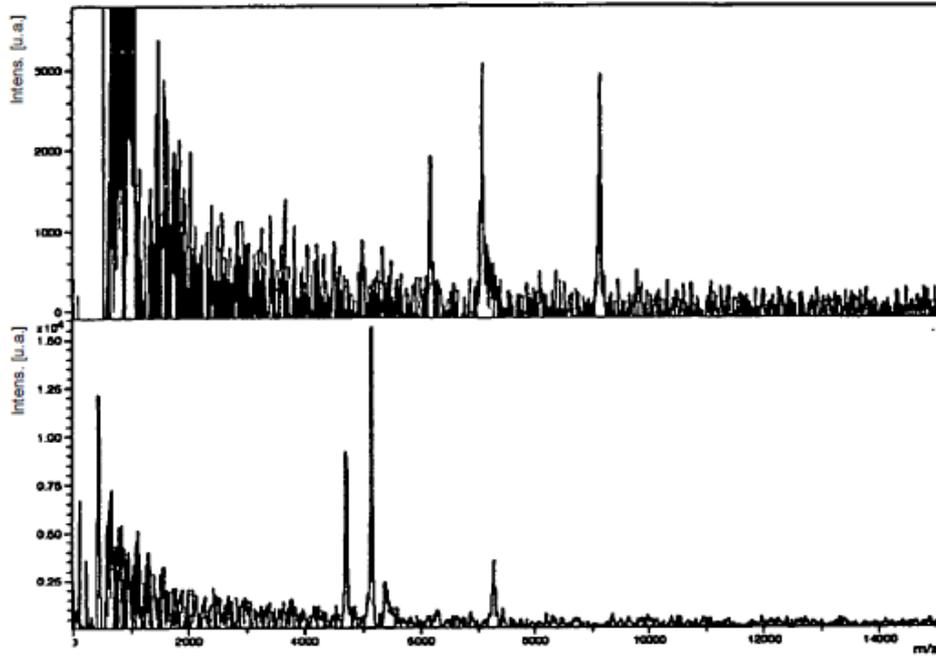


Figura 6

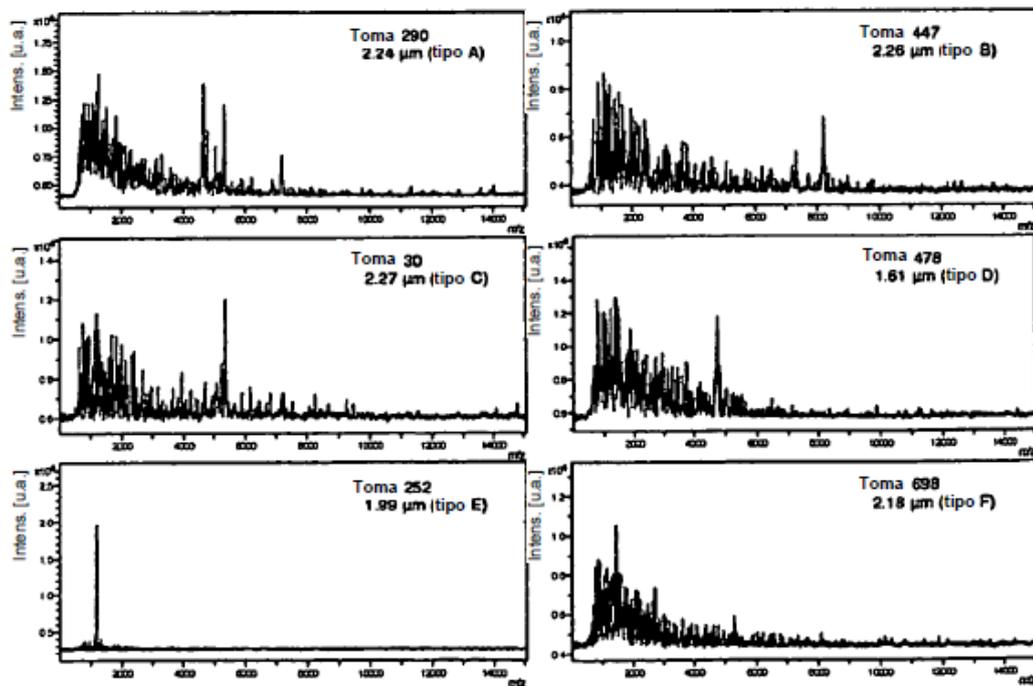


Figura 7

MALADI estático c. MALADI en tiempo real

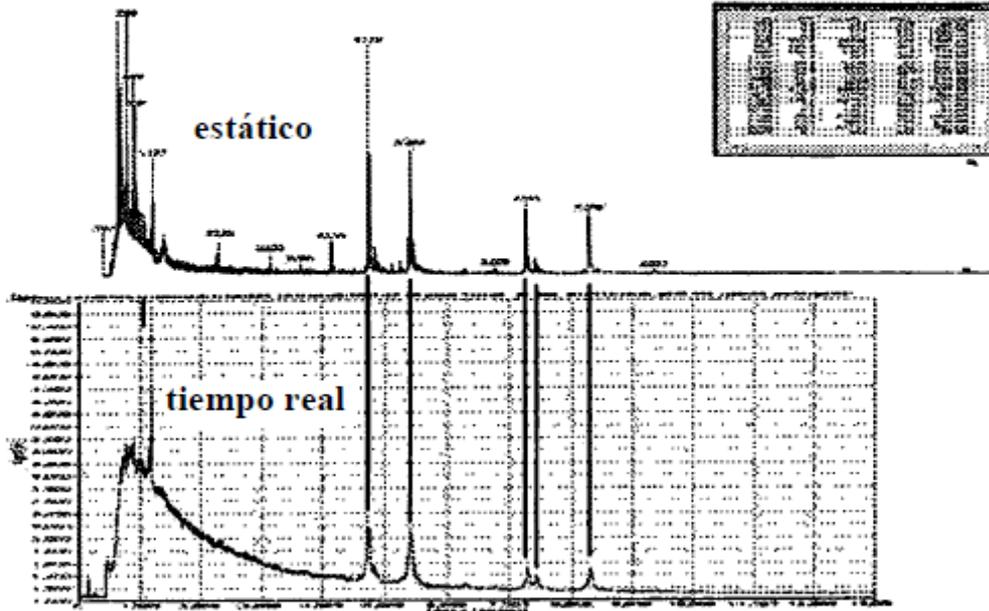


Figura 8

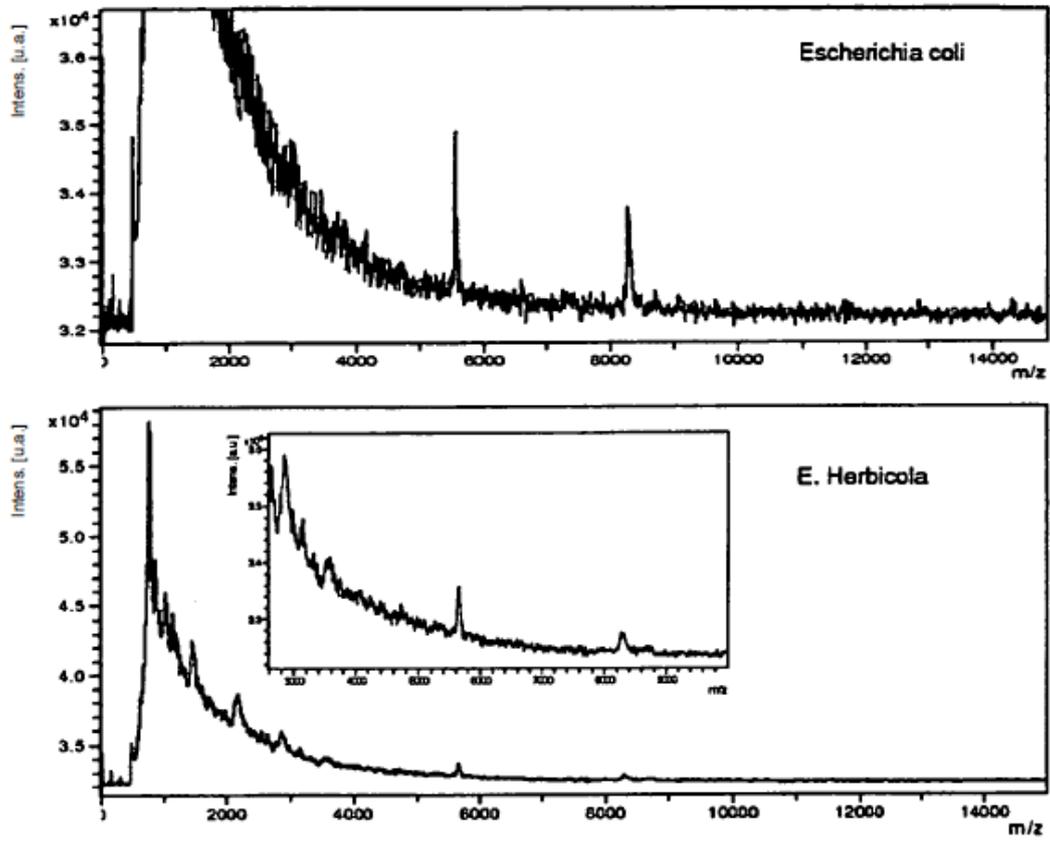


Figura 9

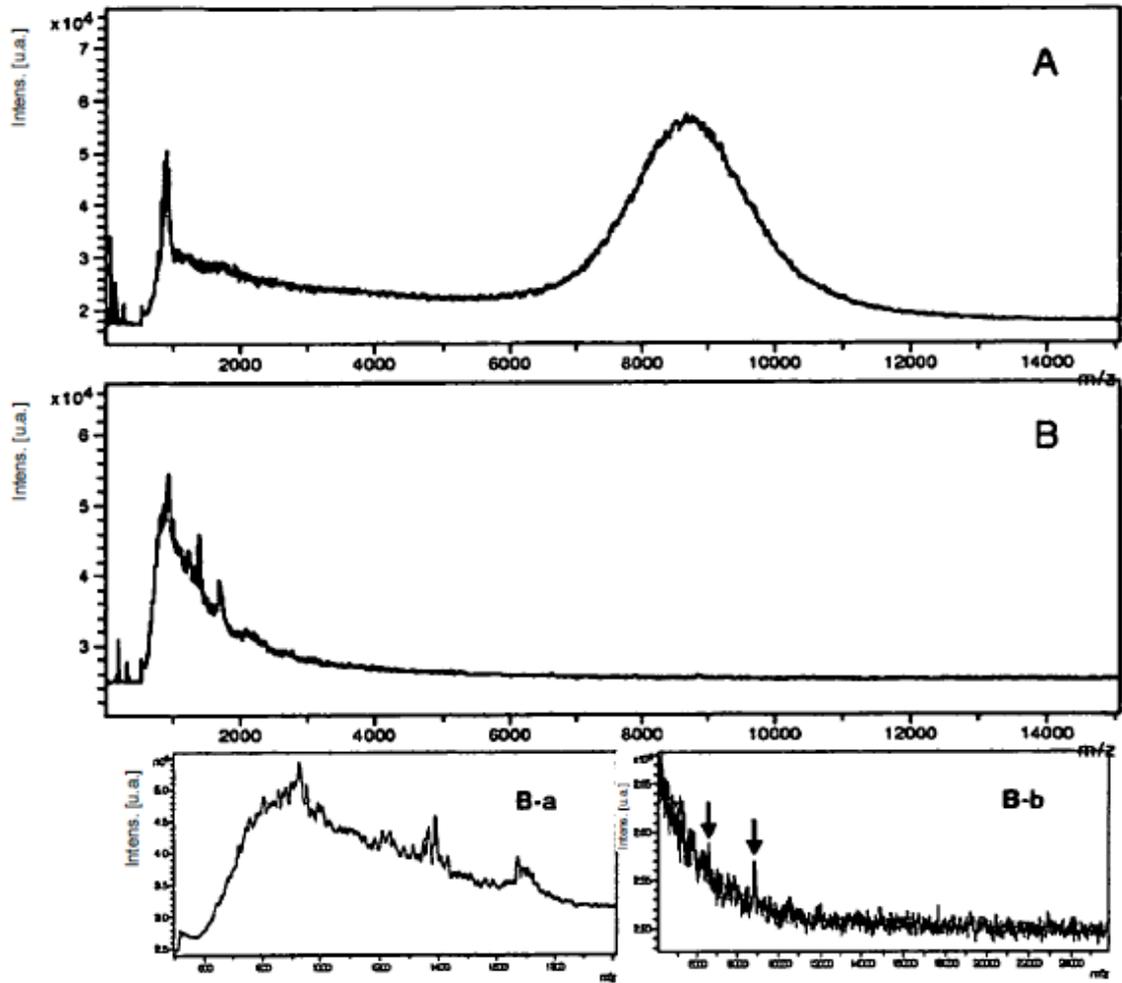


Figura 10

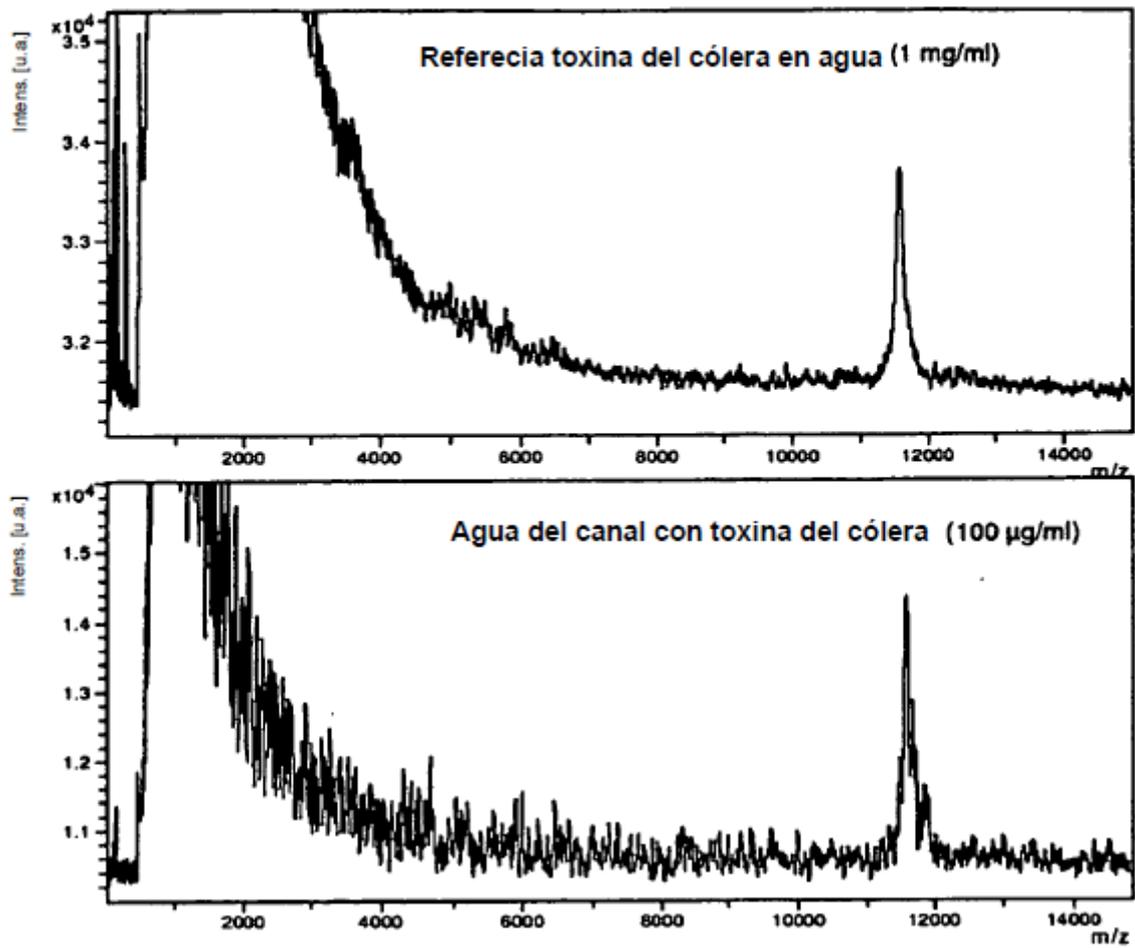


Figura 11

