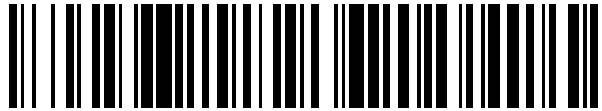


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 722**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2009 E 09749800 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013 EP 2286237**

54 Título: **Análisis de espectro de masas**

30 Prioridad:

23.05.2008 GB 0809488

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

26.02.2014

73 Titular/es:

**ELECTROPHORETICS LIMITED (100.0%)
Coveham House Downside Bridge Road
Cobham Surrey KT11 3EP, GB**

72 Inventor/es:

**BAUMANN, CHRISTIAN;
BYERS, HELEN;
SCHULZ-KNAPPE, PETER y
WARD, MALCOLM**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 444 722 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

Análisis de espectro de masas

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de análisis de un analito diana por espectrometría de masas, en particular biomoléculas, tales como ácidos nucleicos y proteínas. La invención se refiere específicamente a un procedimiento de espectrometría de masas en tándem multiplexada utilizando marcadores de masa isobáricos. La presente divulgación se refiere también a un dispositivo de espectrometría de masas para analizar uno o más analitos objetivo.

10 En la técnica se conocen diversos procedimientos para marcar moléculas de interés, incluyendo átomos radiactivos, tintes fluorescentes, reactivos luminiscentes, reactivos de captura de electrones y tintes absorbedores de luz. Cada uno de estos sistemas de marcaje tiene características que lo hacen adecuado para ciertas aplicaciones y no para otras. Más recientemente, se han producido avances en el campo de la espectrometría de masas como
15 procedimiento para detectar marcadores que están unidos de forma escindible a su molécula de interés asociada.

Para muchas aplicaciones, tales como el análisis del ácido nucleico, la estructura del analito puede determinarse a partir del marcaje indirecto. Esto es particularmente ventajoso en relación con el uso de la espectrometría de masas, porque las biomoléculas complejas, tales como el ADN, tienen espectros de masas complejos y se detectan con una
20 sensibilidad relativamente mala. Detección indirecta significa que una molécula marcadora asociada puede utilizarse para identificar el analito original, en la que el marcador está diseñado para la detección sensible y un simple espectro de masas. Espectros de masas simples significa que se pueden utilizar múltiples marcadores para analizar múltiples analitos de forma simultánea.

25 El documento PCT/GB98/00127 describe conjuntos de sondas de ácido nucleico unidas covalentemente a marcadores escindibles que son detectables por espectrometría de masas, que identifican la secuencia de la sonda de ácido nucleico unida covalentemente. Las sondas marcadas de la presente solicitud tienen la estructura Nu-L-M, en la que Nu es un ácido nucleico unido covalentemente a L, un ligador escindible, unido covalentemente a M, un
30 marcador de masa. Los ligadores escindibles preferidos en la presente solicitud se escinden dentro de la fuente de iones del espectrómetro de masas. Los marcadores de masa preferidos son éteres de poliarilo sustituidos. La presente solicitud divulga una variedad de procedimientos de ionización y análisis por analizadores de masa de cuadrupolo, analizadores de tiempo de vuelo (TOF) e instrumentos del sector magnético como procedimientos específicos para analizar marcadores de masa por espectrometría de masas.

35 El documento PCT/GB94/01675 divulga ligandos, y específicamente ácidos nucleicos, unidos de forma escindible a moléculas marcadoras de masa. Los ligadores escindibles preferidos son fotoescindibles. La presente solicitud describe espectrometría de masas de ionización por Desorción Láser Asistida por Matriz, (MALDI) Tiempo de vuelo (TOF), como un procedimiento específico para analizar los marcadores de masa por espectrometría de masas.

40 El documento PCT/US97/22639 divulga moléculas marcadoras de masa no volátiles liberables. En realizaciones preferidas estos marcadores comprenden polímeros, típicamente biopolímeros, que pueden fijarse de forma escindible a un grupo reactivo o ligando, es decir, una sonda. Ligadores escindibles preferidos parecen ser química o enzimáticamente escindibles. La presente solicitud divulga espectrometría de masas MALDI TOF como un
45 procedimiento específico para analizar los marcadores de masa por espectrometría de masas.

Los documentos PCT/US97/01070, PCT/US97/01046 y PCT/US97/01304 divulgan ligandos y específicamente ácidos nucleicos unidos de forma escindible a moléculas marcadoras de masa. Ligadores escindibles preferidos parecen ser química o enzimáticamente escindibles. Las presentes solicitudes divulgan una variedad de procedimientos de ionización y análisis por analizadores de masa de cuadrupolo, analizadores de TOF e
50 instrumentos del sector magnético como procedimientos específicos para analizar marcadores de masa por espectrometría de masas.

Ninguna de estas solicitudes en la técnica anterior menciona el uso de análisis de masas en tándem o en serie de biomoléculas marcadas.

55 Gygi et al. (Nature Biotechnology 17; 994-999, "Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags" 1999) divulgan el uso de "marcadores de afinidad codificados en isótopos" para la captura de péptidos a partir de proteínas, para permitir el análisis de la expresión proteica. En este artículo los autores describen el uso de un ligador de biotina, que es reactivo a los tiosoles, para la captura de péptidos con cisteína en su interior. Una muestra de proteína de una fuente se hace reaccionar con el ligador de biotina y se escinde con una
60 endopeptidasa. Los péptidos que contienen cisteína biotinilada pueden aislarse después sobre perlas con avidina para análisis posterior por espectrometría de masas. Dos muestras pueden compararse cuantitativamente por marcaje de una muestra con el ligador de biotina y marcaje de la segunda muestra con una forma adulterada del ligador de biotina. Cada péptido en las muestras se representa después como un par de picos en el espectro de
65 masas. La integración de los picos en el espectro de masas correspondiente a cada marcador indica los niveles relativos de expresión del péptido único a los marcadores.

La monitorización selectiva de reacción (SRM) y la monitorización de reacción múltiple (MRM) proporcionan procedimientos altamente selectivos de espectrometría de masas tándem, que tienen la capacidad de filtrar y eliminar de forma efectiva todas las moléculas y contaminantes excepto el analito deseado. Esto es particularmente beneficioso si se analizan muestras complejas que tienen a tener presentes varias especies isobáricas dentro de una ventana analítica definida. Normalmente, una combinación de selección del precursor (ion parental) en la primera etapa del espectrómetro de masas (en el presente documento denominado Q1: cuadrupolo 1, pero también equivalente para las fases respectivas en espectrómetros de masas no cuadrupolos, como trampas de iones, etc.), fragmentación del ion parental en muchos fragmentos de los cuales se selecciona uno o varios fragmentos específicos en las etapas siguientes de la medición de espectrómetro de masas (normalmente en cuadrupolo 3, Q3) y se detecta con el detector de iones. Esta selección en dos etapas asegura que se mide el analito deseado y a cualquier otra especie de ion se le reduce la intensidad. La relación señal-ruido es muy superior a los experimentos convencionales EM/EM, que seleccionan una ventana de masa en Q1, y después miden todos los fragmentos generados en el detector de iones. En principio, este sistema basado en EM puede proporcionar una absoluta especificidad estructural para el analito, y, en combinación con los patrones internos marcados con isótopos (SIS) estables adecuados, puede proporcionar una cuantificación absoluta de la concentración de analito.

En los experimentos convencionales de tipo SRM/MRM, se utiliza la referencia a un isótopo estable marcado para generar un par analito/referencia que se utilizará para la cuantificación del analito frente a la referencia. Para el análisis de proteínas, tal péptido de referencia difiere del analito que hay que medir solo por incorporación de isótopos, para hacerlo claramente diferente en masa para la selección de Q1, pero sin embargo idéntico en la composición química y en el comportamiento físico-químico. En un experimento típico, se selecciona el par analito/referencia, esto es en Q1 conectando canales de selección de masas entre estas dos masas. La posterior fragmentación de estos dos iones conduce a fragmentos con masas distintas (específicas). Después se escogen una o más masas de fragmentos adecuadas, en las que el filtro Q3 permanece en la posición de los iones del fragmento seleccionados, asegurando de este modo la transición de este ión al analizador de masas, y filtrando y eliminando otras especies de iones.

Los recientes trabajos de diseño mejoraron los marcadores de masa para la identificación de analitos por medio del uso de la espectrometría de masas se han centrado en los marcadores de masa que se identifican más fácilmente en el espectro de masas sin otros contaminantes.

El documento WO 01/68664 divulga un conjunto de dos o más marcadores de masa, comprendiendo cada marcador en el conjunto un resto marcador de masa unido por medio de un ligador escindible a un resto de normalización de masa, siendo e resto marcador de masa resistente a la fragmentación. La masa agregada de cada marcador en el conjunto puede ser la misma o diferente y la masa del resto marcador de masa de cada marcador en el conjunto puede ser la misma o diferente. En cualquier grupo de marcadores dentro del conjunto que tenga un resto marcador de masa de una masa común, cada marcador tiene una masa agregada diferente de todos las demás marcadores en dicho grupo, y en cualquier grupo de marcadores dentro del conjunto que tienen una masa agregada común, cada marcador tiene un resto de marcador de masa con una masa diferente de la de todos los demás grupos de marcadores de ese grupo, de modo que todos las marcadores de masa en el conjunto pueden distinguirse entre sí por espectrometría de masas. La presente solicitud divulga además procedimientos de análisis que comprenden la detección de un analito por medio de la identificación por espectrometría de masas de un marcador de masa o una combinación de marcadores de masa únicos del analito. Puede utilizarse espectrometría de masas tándem. Más específicamente, el espectrómetro de masas utilizado para detectar el marcador de masa puede ser un analizador de masa de triple cuadrupolo que comprenda un primer analizador para seleccionar iones de una masa o intervalo de masa concreta, un segundo analizador de masas para disociar los iones seleccionados y un tercer analizador de masas para detectar los iones resultantes.

El documento WO 03/025576 divulga un conjunto de dos o más marcadores de masa en el conjunto, comprendiendo un resto marcador de masa unido por medio de al menos un enlace amida a un resto de normalización de masa. El resto marcador de masa comprende un aminoácido y el resto de normalización de masa comprende un aminoácido. En cuanto al documento WO 1/68664, la masa agregada de cada marcador en el conjunto puede ser la misma o diferente y la masa del resto marcador de masa de cada marcador en el conjunto puede ser la misma o diferente de modo que todos los marcadores de masa en el conjunto se distinguen entre sí por espectrometría de masas. En cuanto al documento WO 1/68664, la presente solicitud también divulga un procedimiento de análisis que puede comprender espectrometría de masas tándem. La presente solicitud está específicamente dirigida a los análisis de los péptidos y marcadores de masa con restos de normalización de masa y restos de marcadores de masas que comprenden al menos un aminoácido.

El documento WO 2007/012849 divulga un marcador de masa y un marcador de masa reactivo que poseen una fórmula química general para el marcaje y la detección de una molécula biológica por medio de la espectrometría de masas. Los marcadores de masa y los marcadores de masa reactivos de la presente invención están claramente identificados en un espectro de masa y se pueden hacer reaccionar fácilmente con analitos. En cuanto al documento WO 1/68664, la presente solicitud también divulga un procedimiento de análisis que puede comprender espectrometría de masas tándem.

El desarrollo de marcadores de masa isobáricos a finales de la década de 1990 ha revolucionado el descubrimiento de biomarcadores. La capacidad de analizar múltiples muestras en número teóricamente ilimitado en un simple flujo CL-EM/EM incrementa el rendimiento mientras al mismo tiempo reduce la variabilidad analítica. Por lo tanto, permanece una necesidad de procedimientos mejorados de detección cuantitativa y de medición rutinaria de analitos por medio de espectrometría de masas en un amplio abanico de muestras

Mientras que los marcadores de masa proporcionados por los documentos WO 01/68664, WO 03/02557 y WO 2007/012849 han proporcionado procedimientos significativamente mejorados de análisis de analitos por espectrometría de masas, todavía se requiere proporcionar procedimientos mejorados para la detección de un analito por medio de la identificación, con espectrometría de masas, de dichos marcadores de masa. En particular, mientras que estos nuevos marcadores y procedimientos de análisis posibilitan el análisis simultáneo y cuantitativo de múltiples muestras sin incrementar de forma significativa la complejidad del espectro de masas, el análisis de marcadores de masa isobáricos por medio del uso de la conocida espectrometría de masas tándem puede aún proporcionar resultados inexactos para muestras complejas. Todavía existe un requisito para proporcionar procedimientos mejorados de análisis que permitan una fácil identificación de los marcadores de masa en un espectrómetro de masas y permitan una sensible determinación cuantitativa.

El documento US2004/219685 divulga procedimientos, mezclas, kits y/o composiciones para la determinación de analitos por medio del análisis de masas.

El documento WO2007/012849 divulga marcadores de masa para el marcaje y detección de una molécula biológica por espectrometría de masas.

El documento WO2006/084130 divulga composiciones y procedimientos para la detección sensible de uno o varios analitos.

Kawano et al, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 31: 23-37, 2008 divulgan la identificación de fármacos por espectrometría de masas con cromatografía de líquidos ultrarrápida/ionización por electropulverización-cuadrupolo, trampa de iones/tiempo de vuelo.

En consecuencia, es objetivo de la presente invención resolver los problemas de la técnica anterior en este campo y proporcionar procedimientos mejorados para analizar un analito diana por espectroscopia de masas.

En un primer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para analizar un analito diana; donde el procedimiento comprende:

- (a) proporcionar una pluralidad de muestras que puede comprender el analito diana, donde cada muestra está marcada de forma diferencial con un marcador de masa o una combinación de marcadores de masa, donde los marcadores de masa proceden de un conjunto de marcadores de masa, donde cada marcador de masa es un marcador de masa isobárico que comprende un grupo marcador de masa con espectrometría de masas distinta, de forma que las muestras se pueden distinguir mediante espectrometría de masas.
- (b) mezclar la pluralidad de las muestras marcadas para producir una mezcla de análisis e introducir la mezcla de análisis en un espectrómetro de masas;
- (c) seleccionar iones que tienen una primera proporción masa-carga equivalente a un ion del analito diana marcado con un número específico de los marcadores de masa;
- (d) fragmentar iones de la primera proporción masa-carga en una pluralidad de iones de fragmentos, donde la proporción de la pluralidad de iones de fragmentos comprende al menos un marcador de masa intacto.
- (e) seleccionar iones que tienen una segunda proporción masa-carga equivalente a un ion de un fragmento del analito diana que comprende al menos un marcador de masa intacto.
- (f) fragmentar iones de la segunda proporción masa-carga en una pluralidad de iones de fragmentos adicionales, donde la proporción de los iones de fragmentos adicionales son iones de los grupos marcadores de masa;
- (g) producir un espectro de masas de los iones de fragmentos adicionales producidos en la etapa (f); y
- (h) determinar a partir del espectro de masas la cantidad del analito diana en cada muestra.

El procedimiento acorde con la presente invención supera las limitaciones de la técnica cuantificando moléculas de interés utilizando muestras marcadas isobáricamente, donde el procedimiento comprende dos etapas de selección de iones de una proporción masa/carga predeterminada seguido cada uno por una etapa de fragmentación. El uso de tal procedimiento proporciona un algo grado de selectividad y, por tanto, el espectro de masas producido en la etapa final aporta resultados cuantitativos más precisos, comparados con los resultados de un experimento convencional de espectrometría de masas tándem (EM/EM).

En la espectrometría de masas tándem convencional (EM/EM) con uso de marcadores de masa isobáricos, se seleccionan primero iones equivalentes a la masa del analito diana marcado. Tras la selección, los iones de los analitos marcados se someten a fragmentación y entonces se identifican picos correspondientes al grupo de marcadores de masas de los marcadores de masa. Sin embargo, los espectros obtenidos a menudo no proporcionan una determinación cuantitativa precisa de los analitos, debido a que hay fragmentos que coeluyen de

los contaminantes que tienen la misma proporción masa/carga que la relación masa/carga seleccionada. Este problema surge al realizar análisis de mezclas complejas de proteínas. En las mezclas complejas, diferentes péptidos o fragmentos peptídicos pueden tener la misma masa que el analito diana. Estos péptidos contaminantes no se distinguirán del analito diana por EM/EM porque se seleccionarán junto con la proporción masa/carga del ion parental en la etapa de selección. Por tanto, la fragmentación de los iones parentales para liberar grupos de marcadores de masa de las marcadores de masa proporcionarán un espectro de grupos de marcadores de masa de todos los péptidos seleccionados, incluidos los péptidos contaminantes que tienen la misma masa que el analito diana.

Esta limitación de EM/EM se supera en la presente invención, debido a las etapas adicionales de selección (etapa e) y de fragmentación (etapa f). En la etapa e) de selección de la proporción masa-carga equivalente a un ion deseado de un fragmento del analito diana que comprende al menos un marcador de masa intacto garantiza que la gran mayoría, si no todas, las moléculas contaminantes en Q1 (etapa c) se eliminan del espectro de masas. Se eliminarán los péptidos contaminantes que se fragmentan en la etapa d) en una multitud de fragmentos, ninguno de los cuales tiene una proporción masa/carga equivalente a la segunda proporción masa/carga seleccionada en la etapa e). Por tanto, la liberación de grupos de marcador de masa de la etapa de fragmentación f) provienen solo del analito diana y el espectro de masas resultante aportará resultados de determinación cuantitativa con una precisión altamente mejorada sobre el analito diana. El procedimiento acorde con la presente invención resulta particularmente beneficioso para el análisis de muestras complejas, porque el grado adicional de selectividad mejora la especificidad.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención consigue generar una combinación entre la alta sensibilidad y selectividad del procedimiento SRM (monitorización de la reacción seleccionada: un analito) o MRM (monitorización de reacción múltiple: múltiples analitos) con la multiplexación en la etapa final del análisis, que se utiliza con fines de determinación cuantitativa.

La cantidad determinada en la etapa (h) puede ser la cantidad relativa del analito diana en cada muestra o la cantidad absoluta del analito diana en cada muestra.

Una ventaja adicional de la presente invención es que permite una pluralidad de muestras a analizar juntas. La pluralidad de muestras puede ser muestras de ensayo que pueden comprender el analito diana.

La expresión "muestra de ensayo" hace referencia a cualquier espécimen donde pueda estar presente un analito. La muestra de ensayo puede comprender solo un analito. Como alternativa, la muestra de ensayo puede comprender una pluralidad de analitos diferentes.

En una realización de la presente invención, una muestra es una muestra de ensayo y una muestra es una muestra de calibración, donde la muestra de calibración comprende uno o más alícuotas diferentes del analito diana, teniendo cada alícuota una cantidad conocida del analito, donde la muestra de ensayo y cada alícuota de la muestra de calibración está marcados de forma diferencial.

Cuando están presentes una o más muestras de calibración, la etapa h) en el procedimiento de acuerdo con la presente invención comprende, preferentemente calibrar la cantidad del analito en la muestra de ensayo contra las cantidades conocidas y determinadas de los analitos en uno o más alícuotas en la muestra de calibración. En una realización preferida, el procedimiento comprende una etapa de representar un gráfico de la cantidad del analito en cada alícuota frente a la cantidad del analito en cada alícuota como se determina mediante espectrometría de masas. Esta etapa puede, en su lugar, simplemente implicar el cálculo y programas matemáticos o algoritmos para realizar dichos cálculos que son bien conocidos por el experto en la técnica. La cantidad del analito en la muestra se calcula después midiendo la cantidad en la muestra determinado mediante espectrometría de masas contra el gráfico de calibración. En el contexto de la presente invención, una referencia a una "cantidad medida mediante espectrometría de masas" normalmente es abundancia de iones, intensidad iónica u otra señal medida por espectrometría de masas que se relaciona con la cantidad de un analito. Esta realización proporciona resultados de cuantificación más precisos que son independientes de las calibraciones obtenidas externamente, de modo que se proporciona un análisis fiable y mucho más sólido.

Los diferentes alícuotas tienen cada uno una cantidad diferente del analito. La expresión "cantidad conocida" significa que la cantidad absoluta, o una cantidad cualitativa del analito en cada alícuota de la muestra de calibración es conocida.

Una cantidad absoluta significa una cantidad que se conoce. Esto permite determinar la cantidad absoluta de un analito en una muestra de ensayo.

Una cantidad cualitativa en el presente contexto significa una cantidad que no se conoce en absoluto pero puede ser un intervalo de cantidades que están previstas en un sujeto que tienen un estado concreto, por ejemplo un sujeto en un estado de enfermedad o sano, o algún otro intervalo previsto dependiendo del tipo de muestra de ensayo en investigación. Cada alícuota es "diferente", ya que contiene una cantidad diferente del analito. Normalmente, esto se

consigue tomando diferentes volúmenes de una muestra estándar, especialmente para cantidades cualitativas en las que tomar diferentes volúmenes garantizará que diferentes cantidades están presentes en cada alícuota en una proporción deseada sin necesitar conocer las cantidades absolutas. Como alternativa, cada alícuota se prepara por separado y no se toma de la muestra de ensayo. En una realización, cada alícuota diferente tiene el mismo volumen, pero comprende una cantidad diferente del analito.

Preferentemente, la o cada muestra de calibración comprende dos o más alícuotas diferentes del analito diana. EL uso de dos o más alícuotas diferentes del analito diana permite la construcción de curvas estándar de múltiples puntos para cada analito sin incrementar la complejidad de la EM. La cuantificación del analito se obtiene en el espectro de masas producido en la etapa g) y el analito en la muestra y en la muestra de calibración puede cuantificarse e identificarse de forma simultánea. Como alternativa, solo la cantidad del analito se determina. Este procedimiento proporciona la medición de hasta 10, hasta 20, hasta 50 o más analitos en un único experimento.

El procedimiento de la presente invención puede comprender análisis de una pluralidad de muestras de ensayo además de una o más muestras de calibración. EN esta realización, cada una de la pluralidad de muestras de ensayo se analiza, preferentemente, para el mismo analito. Preferentemente se usa la misma muestra de calibración para cada muestra de ensayo a analizar. Normalmente, a cada muestra de ensayo diferente se añade el mismo volumen conocido de la muestra de calibración que comprende en uno o más alícuotas del analito. Este procedimiento es particularmente útil en los estudios clínicos con múltiples muestras de pacientes. Si se prepara una cantidad grande de la muestra de calibración y se toman fracciones, múltiples laboratorios pueden usar la misma muestra de calibración, lo que facilita las comparaciones en estudios cruzados y con laboratorios cruzados. Cada muestra de ensayo se puede marcar de forma diferencial con uno o más de los marcadores de masa isobáricos y combinar con una o más muestras de calibración en la etapa b) y la cantidad del analito en cada muestra se determina de forma simultánea en la etapa h). Como alternativa, cada muestra de ensayo se puede marcar con el mismo marcador de masa y las etapas b) a h) se repiten para cada muestra de ensayo diferente.

En una realización, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se puede usar para analizar una pluralidad de diferentes analitos diana. En esta realización, el procedimiento comprende una etapa de repetición de las etapas (c) a (h) para cada analito diana. En esta realización, en la que una muestra es una muestra de ensayo, una muestra de calibración se puede proporcionar para cada analito diferente. Cada muestra de calibración comprende uno o más alícuotas diferentes de un analito diana, donde la muestra de ensayo y cada alícuota de cada muestra de calibración se marcan de forma diferencial. En una realización, la pluralidad de analitos son fragmentos peptídicos de una proteína o polipéptido que se producen mediante procesamiento químico o enzimático de la proteína o polipéptido antes de la etapa (a). En una realización concreta, la pluralidad de analitos son péptidos de la misma proteína o polipéptido.

La presente invención se describirá a continuación con mayor detalle por referencia a los siguientes figuras.

La Figura 1a muestra un espectro EM/EM del péptido VATVSLPR marcado con diferentes marcadores de masa isobáricos de un conjunto de dos marcadores de masa, representando cada marcador una cantidad relativa predeterminada del péptido (la proporción de los grupos marcadores de masa que tienen masas 126:127 es 2:1) y la Figura 1b muestra un zoom de la sección del espectro de la Figura 1a que muestra los picos de los grupos marcadores de masa.

La Figura 2a muestra un espectro EM/EM/EM del ion b1 del péptido VATVSLPR marcado, como se analiza en la Figura 1; la figura 2b muestra un zoom en la sección del espectro de la Figura 2a que muestra los picos de los grupos marcadores de masa.

La Figura 3 muestra un espectro EM/EM del péptido VAFSLR marcado con diferentes marcadores de masa isobáricos de un conjunto de seis marcadores de masa, representando cada marcador una cantidad relativa predeterminada del péptido (la proporción de los grupos marcadores de masa que tienen masas 126:127:128:129:130:131 es 1:3:5:5:3:1).

La Figura 4 muestra el espectro completo de EM/EM del péptido VAFSLR marcado, como se analiza en la Figura 3.

La Figura 5a muestra un espectro EM/EM de grupos marcadores de masa distintos del péptido VAFSLR marcado, como se analiza en la Figura 3; la figura 5b muestra un espectro EM/EM/EM de grupos marcadores de masa distintos del péptido VAFSLR marcado, como se analiza en la Figura 3.

La Figura 6 muestra un espectro EM del péptido AVFSLR marcado con diferentes marcadores de masa isobáricos de un conjunto de seis marcadores de masa, representando cada marcador una cantidad relativa predeterminada del péptido (la proporción de los grupos marcadores de masa que tienen masas 126:127:128:129:130:131 es 1:1:1:4:4:4).

La Figura 7 muestra el espectro completo de EM/EM del péptido AVFSLR marcado, como se analiza en la Figura

6.

5 La Figura 8a muestra un espectro EM/EM de grupos marcadores de masa distintos del péptido AVFSLR marcado, como se analiza en la Figura 6; la figura 5b muestra un espectro EM/EM/EM de grupos marcadores de masa distintos del péptido AVFSLR marcado, como se analiza en la Figura 6.

10 La Figura 9 muestra un espectro EM del péptido FAVSLR marcado con diferentes marcadores de masa isobáricos de un conjunto de seis marcadores de masa, representando cada marcador una cantidad relativa predeterminada del péptido (la proporción de los grupos marcadores de masa que tienen masas 126:127:128:129:130:131 es 4:4:4:1:1:1).

La Figura 10 muestra el espectro completo de EM/EM del péptido FAVSLR marcado, como se analiza en la Figura 9.

15 La Figura 11a muestra un espectro EM/EM de grupos marcadores de masa distintos del péptido FAVSLR marcado, como se analiza en la Figura 9; la figura 11b muestra un espectro EM/EM/EM de grupos marcadores de masa distintos del péptido FAVSLR marcado, como se analiza en la Figura 9.

20 La Figura 12 muestra un espectro EM del péptido LAFSVR marcado con diferentes marcadores de masa isobáricos de un conjunto de seis marcadores de masa, representando cada marcador una cantidad relativa predeterminada del péptido (la proporción de los grupos marcadores de masa que tienen masas 126:127:128:129:130:131 es 5:3:1:1:3:3).

25 La Figura 13 muestra el espectro completo de EM/EM del péptido LAFSVR marcado, como se analiza en la Figura 12.

30 La Figura 14a muestra un espectro EM/EM de grupos marcadores de masa distintos del péptido LAFSVR marcado, como se analiza en la Figura 12; la figura 14b muestra un espectro EM/EM/EM de grupos marcadores de masa distintos del péptido LAFSVR marcado, como se analiza en la Figura 12.

35 La Figura 15 muestra un espectro EM de una mezcla de los péptidos VAFSLR y LAFSVR, cada uno marcado con diferentes marcadores de masa isobáricos de un conjunto de seis marcadores de masa, representado cada marcador una cantidad relativa predeterminada de un péptido (péptido VAFSLR: la proporción de los grupos marcadores de masa que tienen masas de 126:127:128:129:130:131 es 1:3:5:5:3:1; y el péptido LAFSVR: la proporción de los grupos marcadores de masa que tienen masas de 126:127:128:129:130:131 es 5:3:1:1:3:5).

La Figura 16 muestra el espectro completo de EM/EM de una mezcla de los péptidos VAFSLR y LAFSVR marcados, como se analiza en la Figura 15.

40 La Figura 17 muestra el espectro completo de EM/EM de grupos marcadores de masa distintos de una mezcla de los péptidos VAFSLR y LAFSVR marcados, como se analiza en la Figura 15.

45 La Figura 18a muestra un espectro EM/EM/EM de los grupos marcadores de masa distintos de los iones b1 de péptido VAFSLR marcado, como se analiza en la Figura 15; la figura 5b muestra un espectro EM/EM/EM de grupos marcadores de masa distintos de los iones b1 del péptido LAFSVR marcado, como se analiza en la Figura 15.

50 La Figura 19 muestra un espectro EM de una mezcla de los péptidos AVFSLR y FAVSLR, cada uno marcado con diferentes marcadores de masa isobáricos de un conjunto de seis marcadores de masa, representado cada marcador una cantidad relativa predeterminada de un péptido (péptido AVFSLR: la proporción de los grupos marcadores de masa que tienen masas de 126:127:128:129:130:131 es 1:1:1:4:4:4; y el péptido FAVSLR: la proporción de los grupos marcadores de masa que tienen masas de 126:127:128:129:130:131 es 4:4:4:1:1:1).

55 La Figura 20 muestra el espectro completo de EM/EM de una mezcla de los péptidos AVFSLR y FAVSLR marcados, como se analiza en la Figura 19.

La Figura 21 muestra el espectro completo de EM/EM de grupos marcadores de masa distintos de una mezcla de los péptidos AVFSLR y FAVSLR marcados, como se analiza en la Figura 19.

60 La Figura 22a muestra un espectro EM/EM/EM de los grupos marcadores de masa distintos de los iones b1 de péptido AVFSLR, marcado, como se analiza en la Figura 19; la figura 5b muestra un espectro EM/EM/EM de grupos marcadores de masa distintos de los iones b1 del péptido FAVSLR marcado, como se analiza en la Figura 19.

65 La Figura 23 muestra un espectro EM/EM del péptido AEFAEVSK marcado y la estructura del marcador de masa (TMT zero) usado para marcar el péptido. El péptido está marcado en el extremo N y en la lisina. Se muestran

los iones que surgen de la fragmentación del marcador de masa.

La Figura 24 muestra un espectro EM/EM del péptido VLEPTLK marcado con un conjunto de dos marcadores de masa isobáricos (TMT dúplex comprende TMT2-126 y TMT2-127), y las estructuras de los marcadores de masa usados para marcar el péptido. El péptido está marcado en el extremo N y en la lisina. Se muestran los iones que surgen de la fragmentación de los marcadores de masa.

La Figura 25a muestra el espectro EM/EM de un péptido de la seroalbúmina LVNEVTEFAK marcado con el marcador de masa TMTzero y la Figura 25b muestra el espectro EM/EM de un péptido de la seroalbúmina LVNEVTEFAK marcado con el marcador de masa TMTsixplex. El péptido de las Figuras 25a y 25b está marcado en el extremo N y en la lisina. Una diferencia de masa de 10 Da se muestra entre los péptidos marcados en las Figuras 25a y 25b.

La figura 26a muestra un zoom en la sección del espectro EM/EM de la Figura 25a que muestra el fragmento del ion y3 y la figura 26a muestra un zoom en la sección del espectro EM/EM de la Figura 25a que muestra el fragmento del ion y3. El fragmento del ion y3 conserva un marcador de masa intacto en el residuo de lisina, dando una diferencia de m/z de 5 Thomson (Th, unidad de proporción masa-carga) entre los dos iones de fragmentos marcados en las Figuras 26a y 26b.

La figura 27a muestra un zoom en la sección del espectro EM/EM de la Figura 25a que muestra el fragmento del ion y3 y la figura 26bmuestra un zoom en la sección del espectro EM/EM de la Figura 25b que muestra el fragmento del ion y3. El fragmento del ion y3 conserva un marcador de masa intacto en el residuo de lisina, dando una diferencia de m/z de 5 Thomson (Th, unidad de proporción masa-carga) entre los dos iones de fragmentos marcados en las Figuras 27a y 27.

La figura 28a muestra un zoom en la sección del espectro EM/EM de la Figura 25a que muestra el fragmento del ion b7 la figura 28b muestra un zoom en la sección del espectro EM/EM de la Figura 25b que muestra el fragmento del ion b7. El fragmento del ion b7 conserva un marcador de masa intacto en el extremo N, dando una diferencia de m/z de 5 Thomson (Th, unidad de proporción masa-carga) entre los dos iones de fragmentos marcados en las Figuras 28a y 28b.

La Figura 29a muestra un espectro EM del péptido LVTDLTK marcado con TMT zero y TMTsixplex. El péptido está marcado en el extremo N y la lisina, dando una diferencia de masa de 10 Da entre los péptidos marcados con TMT zero y TMT sixplex. Se observa una diferencia de masa de 5 Th entre los iones precursores doblemente cargados.

La Figura 29b muestra un espectro EM del péptido HPDYSWLLLR marcado con TMT zero y TMTsixplex. El péptido está marcado en el extremo N, dando una diferencia de masa de 5 Da entre los péptidos marcados con TMT zero y TMT sixplex. Se observa una diferencia de masa de 1,67 Th entre los iones precursores con carga triple.

La Figura 30 muestra un cromatograma iónico MRM de diez péptidos plasmáticos marcados con el marcador de masa TMT-zero y el marcador de masa TMTsixplex (TMT6-127).

Las Figuras 31a a d muestra un cromatograma iónico MRM de un péptido plasmático K marcado con MT-zero y TMTsixplex (TMT6 -127). Las muestras de plasma marcadas con TMT se han mezclado en diferentes proporciones.

La Figura 32 muestra un gráfico de las proporciones previstas frente a las proporciones observadas de TMTzero:TMTsixplex para el péptido K (como se muestra en las Figuras 31a a 31d). El análisis se realizó por triplicado.

Las Figuras 34a, 34b y 34c muestra disposiciones alternativas de espectrómetros de masas capaz de de EM/EM/EM.

El término "analito" no es particularmente limitante y los procedimientos de la presente invención se pueden usar para analizar cualquier tipo de molécula siempre que se pueda analizar mediante espectrometría de masas y puede marcarse con un marcador de masa isobárico con un grupo de marcadores de masa con espectrometría de masas distinta. Los analitos incluyen aminoácidos, péptidos, polipéptidos, proteínas, glicoproteínas, lipoproteínas, ácidos nucleicos, polinucleótidos, oligonucleótidos, ADN, ARN, ácidos nucleicos peptídicos, azúcares, almidones e hidratos de carbono complejos, grasas y lípidos complejos, polímeros y moléculas orgánicas pequeñas tales como fármacos y moléculas de tipo fármaco o fragmentos de los mismos. Preferentemente, el analito es un péptido, proteína, nucleótido o ácido nucleico.

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

En relación con la presente invención, el término "proteína" abarcará cualquier molécula que comprenda dos o más

aminoácidos que incluyen dipéptidos, tripéptidos, péptidos, polipéptidos y proteínas.

En relación con la presente invención, la expresión "ácido nucleico" abarcará cualquier molécula que comprenda dos o más bases nucleotídicas, incluidos dinucleótidos, trinucleótidos, oligonucleótidos, ácidos desoxirribonucleicos, ácidos ribonucleicos y ácidos nucleicos peptídicos.

La expresión "conjunto de sixpletos de Marcadores para masas en Tándem (TMT)" hace referencia a un conjunto de seis marcadores isobáricos para masas en los que cada marcador comprende un grupo marcador para masas de mas espectrométricamente distinta. Un ejemplo de un conjunto de sixpletos de Marcadores para masas en Tándem (TMT) es TMT⁶-128, TMT⁶-129, TMT⁶-130, TMT⁶-131, donde "6" representa el número de indicadores en el conjunto y los números 128-131 tras TMT", representa la masa del grupo marcador de masas. Del mismo modo, un conjunto de Marcadores para masas en Tándem dúplex" hace referencia a un conjunto de dos marcadores isobáricos de masas. Un ejemplo de un conjunto de Marcadores para masas en Tándem dúplex es TMT²-126 y TMT²-127, , donde "2" representa el número de indicadores en el conjunto y los números 126 y 127 tras "TMT", representa la masa del grupo marcador de masas. Un conjunto de Marcadores para masas en Tándem pentaplex hace referencia a un conjunto de 5 marcadores isobáricos de masas.

El término "EM" en el contexto de la presente invención hace referencia a un procedimiento de espectrometría de masas que comprende producir iones a partir de una muestra y producir un espectro de masas de los iones.

El término "EM/EM" en el contexto de la presente invención hace referencia a un procedimiento de acuerdo con la presente invención que comprende seleccionar iones de una proporción masa:carga concreta, someter los iones seleccionados a fragmentación, por ejemplo mediante disociación inducida por colisión (DIC) y producir un espectro de masas de los iones fragmentados.

El término "EM/EM/EM" en el contexto de la presente invención hace referencia a un procedimiento de acuerdo con la presente invención que comprende las etapas (a) a (h).

En relación con la presente invención, la expresión "espectrometría de masas" incluirá cualquier tipo de espectrometría capaz de realizar análisis de fragmentación. Los espectrómetros de masas adecuados para usar en la presente invención incluyen instrumentos que comprenden cualquier forma de analizador capaz de EM/EM/EM.

En una realización, las etapas (c) a (g) del procedimiento de acuerdo con la presente invención se llevan a cabo en cuadrupolos separados en un espectrómetro de masas, En la presente realización, la etapa c) de seleccionar os iones que tienen una primera proporción masa:carga se realiza en el primer analizador de masas de un instrumento en serie (Q1) Los iones seleccionados se canalizan después en una celda de colisión aparte (Q2) donde colisionan con un gas o una superficie sólida para producir una pluralidad de iones de fragmentos en la etapa d). Los productos de la colisión de la etapa d) se canalizan después a un tercer analizador de masas (Q3), donde los iones de una segunda proporción masa-carga (iones de EM/EM) se seleccionan en la etapa e). Los iones seleccionados de la etapa e) se canalizan después en una celda de colisión aparte (Q4) donde colisionan con un gas o una superficie sólida para producir una pluralidad de iones de fragmentos en la etapa f). Los demás iones en fragmentos de la etapa f) se canalizan en un analizador de masas adicional (Q5) de un instrumento de serie en la etapa g) para detectar productos de colisión. Los instrumentos en serie típicos incluyen espectrómetros de masa de cinco cuadrupolos, instrumentos del sector en tándem y espectrómetros de masas de tiempo de vuelo (TOF).

Como alternativa, las etapas (c) a (g) del procedimiento de acuerdo con la presente invención se llevan a cabo secuencialmente en la misma zona de un espectrómetro de masas, Esto puede efectuarse, por ejemplo, en analizadores de masa con trampa de iones y espectrómetros de masas con resonancia de ciclotrón de iones con transformada de Fourier.

Los experimentos EM/EM/EM de acuerdo con la presente invención se pueden realizar usando trampas de iones 3D, instrumentos de geometría híbrida tal como una trampa de iones de cuadrupolo en combinación con un analizador TOF, así como los cuatro instrumentos del sector de mayor huella.

Wu Z., Bordas-Nagy J. y Fenselau C. (1991) "Triple mass spectrometry (MS/MS/MS) with a floated collision cell in a four-sector tandem mass spectrometer" Organic Mass Spectrometry 26, 10, 908-911 describen un procedimiento para llevar a cabo experimentos EM/EM/EM con una célula de colisión flotada eléctricamente en la tercera región sin campo en un espectrómetro de masas de doble enfoque en tándem. Los experimentos se realizaron usando un espectrómetro de masas de cuatro sectores JEOL JMS-HX110/HX110 y aunque el procedimiento implicaba calibración de la calibración de imán a todas las tensiones de aceleración, generalmente se puede aplicar a cualquier valor de la tensión de la célula de colisión.

Las trampas de iones cuadrupolo (QIT) son un medio eficaz para acumular y almacenar iones. La combinación de QIT con espectrometría de masas TOF ofrece potentes capacidades no disponibles con QIT y espectrómetro de masas TOF solos. Syagen® a ha combinado estos dispositivos en un único instrumento denominado QitTof™, que es el primer instrumento disponible en el mercado en ofrecer las ventajas de la EM de QIT EM con las velocidades

de recolección de datos de alta velocidad de TOF-EM. Shimadzu también ha desarrollado después un sistema CLEM-QIT-TOF. La Figura 34 es una ilustración esquemática de la geometría del instrumento QitTof™

5 Existen beneficios específicos de la geometría QitTof™ en comparación con otros instrumentos. La configuración QitTof™ tiene el potencial de una mayor eficiencia de transmisión de iones y permite una operación MSⁿ eficaz en comparación con la extracción ortogonal. TOF EM. El QIT proporciona la ventaja de la eyección selectiva de masas con mayor intervalo dinámico y mayor capacidad de la trampa de iones debido a la tasa de repeticiones más alta porque los iones son pulsados más que escaneados en el QIT. Este TOF proporciona la ventaja de detección de masas en múltiples canales, o que conduce a una eficiente recolección de todos los iones. Usando el analizador TOF también se consigue una mejor precisión de la masa iónica.

15 Otras diversas geometrías de instrumentos se podrían considerar para los experimentos de MS³ en la presente invención y en la Figura 34 se muestra una selección de futuras posibilidades. El funcionamiento de cada diseño es difícil de evaluar en esta etapa y requerirá más investigación. La Figure 34A representa una disposición de penta-cuadrupolo con tres cuadrupolos de barrido y dos células de colisión. Un detector multiplicador de iones normalmente se usa junto con analizadores de masas cuadrupolos. La Figura 34B representa un cuadrupolo de doble barrido con un reflectrón ortogonal TOF como analizador de la última etapa. La Figura 34 C representa un instrumento TOF de triple etapa con compuertas de iones cronometradas que permiten que los iones con un intervalo de masa especificado por el usuario entre en el primero de dos analizadores TOF lineales.

20 En la presente invención se pueden usar técnicas de Ionización por Desorción Láser Asistida por Matriz, (MALDI). La MALDI requiere que la solución con la biomolécula esté incluida en un exceso molar grande de una "matriz" fotoexcitable. La aplicación de luz láser de la frecuencia adecuada tiene como resultado la excitación de la matriz que a su vez conduce a una rápida evaporación de la matriz a lo largo de 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 con iones positivos, en particular espectrometría de masas-tiempo de vuelo (TOF). La espectrometría de masas con iones negativos también es posible mediante MALDI-TOF. Esta técnica imparte una cantidad significativa de energía traslacional a los iones, pero no tiende a inducir una fragmentación excesiva a pesar de ello. La energía láser y el momento de la aplicación de la diferencia de potencial usada para acelerar los iones de la fuente se pueden usar para controlar la fragmentación con esta técnica. Esta técnica se ve muy favorecida debido a su gran intervalo de masas debido a la prevalencia de los iones cargados solos en sus espectros y debido a la capacidad de analizar múltiples péptidos simultáneamente. En la presente invención se pueden emplear la técnica TOF-TOF.

35 La matriz fotoexcitable comprende un "pigmento", es decir, un compuesto que absorbe fuertemente la luz de una frecuencia concreta y que, preferentemente, no radia dicha energía mediante fluorescencia o fosforescencia sino que disipa la energía térmicamente, es decir a través de modos vibracionales. Es la vibración de la matriz causada por la excitación del láser lo que tiene como resultado una rápida sublimación del pigmento, que simultáneamente lleva al analito embebido en la fase de gas.

40 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, si se desea, en la presente invención un experto en la técnica puede usar otras técnicas habituales en la materia. Por ejemplo, se puede usar espectrometría de masas por electropulverización o nanoelectropulverización.

45 El procedimiento de acuerdo con la presente invención puede comprender una etapa adicional antes de la etapa (a) de marcar de forma diferencial cada muestra y, cuando hay presentes una o más muestras de calibración, cada alícuota de la muestra de calibración con uno o más marcadores isobáricos de masas. En las realizaciones en las que hay una o más muestras de calibración, el procedimiento también comprende, preferentemente una etapa adicional de combinar las alícuotas marcadas de forma diferencial para producir una muestra de calibración antes de la etapa (a).

50 El analito diana se puede unir a un marcador de masa, dos marcadores de masa o más de dos marcadores de masa. Preferentemente, el analito diana o fragmento del mismo está unido a dos marcadores de masa isobáricos. También es preferible que al menos un marcador de masa esté unido a cada extremo del analito diana. Esto es particularmente preferido cuando el analito diana es una proteína o ácido nucleico.

60 Las muestras se pueden marcar en condiciones adecuadas para controlar cuántos marcadores se unen al analito diana. Por ejemplo, se puede añadir a las muestras una cantidad excesiva de marcador para asegurar que el número máximo de marcadores se une a cada analito. Esto puede ser preferible cuando es ventajoso unir un marcador de masa a cara extremo de un analito ácido nucleico o proteína. Como alternativa, el grupo reactivo del marcador de masas y/o las condiciones para el marcaje se pueden controlar para unir un marcador de masa a un extremo preferido del analito, como al extremo C o al extremo N de una proteína.

65 Si el analito diana es una proteína o péptido, el N-terminal y el C-terminal del analito diana se marcan, preferentemente, con un marcador de masa. Preferentemente, el grupo amino en amino-terminal y el grupo Epsilon-

amina del C-terminal de la lisina de cada analito comprende, cada uno, un marcador de masa. El péptido mostrado en la Figura 25a y la Figura 26b (LVNEVTEFAK) está unido a dos marcadores, donde un marcador está unido al N-terminal de la leucina y un marcador está unido al C-terminal de la lisina.

- 5 En la etapa c) en el procedimiento de acuerdo con la presente invención, se seleccionan los iones que tiene una primera proporción masa-carga equivalente a un ion del analito diana marcado con un número específico de marcadores de masa. Los analitos diana marcados en cada muestra se seleccionan en la etapa c) porque tienen masas idénticas.
- 10 En una realización, la primera proporción masa-carga es equivalente a la proporción masa-carga del ion parental no fragmentado del analito diana marcado con un número específico de marcadores de masa. Como alternativa, la primera proporción masa-carga es equivalente a la proporción masa-carga de un ion fragmento del analito diana marcado con un número específico de marcadores de masa.
- 15 La proporción masa-carga específica seleccionada para la etapa c) depende del analito diana y el número de marcadores unidos al analito diana. El experto sería capaz fácilmente de seleccionar una primera proporción masa-carga adecuada para la etapa c). Se prefiere que los iones seleccionados en la etapa c) tengan un estado de carga 2+ o mayor.
- 20 Cuando el procedimiento de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo en, por ejemplo, una muestra que comprende una mezcla de componentes, tales como proteínas, una serie de proteínas o fragmentos de proteínas pueden tener la misma masa y, por tanto, en la etapa c) se puede seleccionar un número de iones diferentes que tienen la misma masa.
- 25 Tras la etapa c) los iones seleccionados que tienen una primera proporción masa-carga están fragmentados en la etapa d) en una pluralidad de iones de fragmentos, en la que una proporción de la pluralidad de iones de fragmentos comprende al menos un marcador de masa intacto.

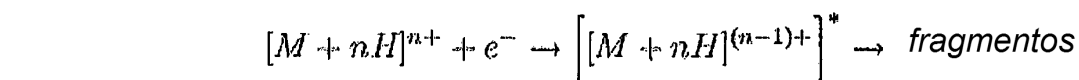
30 Una proporción de la pluralidad de iones de fragmentos que comprende al menos un marcador de masa intacto significa que más del 0% de los iones de fragmentos comprende al menos un marcador de masa intacto. La proporción de estos fragmentos proporcionados en la etapa d) es suficiente para dejar que los grupos indicadores de masa se detecten en el espectro de masas producido en la etapa g).

35 Los presentes inventores han descubierto que los analitos marcados con fragmentos de masa isobáricos en la etapa d) producen iones de fragmentos que comprenden al menos marcador de masa intacto. Este es un hallazgo importante en la presente invención porque permite una etapa de selección adicional para eliminar los contaminantes antes de la escisión del grupo indicador de masa del analito diana marcado. Esto proporciona resultados de cuantificación precisos. Los inventores han descubierto que es ventajoso que el analito diana esté unido a dos o más marcadores de masa para garantizar que al menos un marcador de masa está intacto después de la etapa d).

45 Cuando el analito diana es un péptido, los péptidos se fragmentan predominantemente en las series y y b de iones, observándose también otras formas que incluyen series a, series c, series c y series z. Las condiciones de fragmentación se pueden seleccionar en la etapa d) con el fin de controlar el tipo de iones de fragmentos producidos. Preferentemente, las condiciones de fragmentación se seleccionan para garantizar que los iones b e y son los iones de fragmentos más prominentes. Preferentemente, la energía de colisión se escogerá bastante baja para evitar la fragmentación consecutiva. Por ejemplo, se puede usar una trampa para iones para garantizar que no se produce la consecutiva.

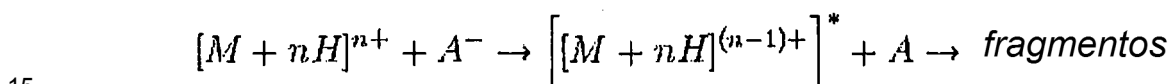
50 Normalmente, la fragmentación se debe a la disociación inducida por colisión (DIC), disociación inducida por superficie (DIS), disociación por captura de electrones (DCE), disociación por transferencia de electrones (DTE) o bombardeo rápido de átomos.

55 La disociación por captura de electrones (DCE) es un procedimiento de fragmentación de iones peptídicos o proteicos con múltiples cargas (protonados) para el análisis espectrométrico de masas en tándem (aclaración estructural). En este procedimiento, los péptidos o proteínas protonados de forma múltiple están confinados en la trampa de Penning de un espectrómetro de masas con resonancia de ciclotrón de iones por transformada de Fourier (FT-ICR) y expuestos 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 la estructura peptídica se fragmente mediante un procedimiento nonergódico (es decir, un procedimiento que no implica redistribución de la energía vibracional intramolecular).



Además, uno o más cationes proteicos se pueden neutralizar con electrones de baja energía para producir una escisión específica de los enlaces para formar productos c, c, en contraste con productos b, y formados mediante otras técnicas tales como disociación activada por colisión, DAC, también conocida como disociación inducida por colisión, DIC). Dado que los electrones térmicos introducidos en los campos RF de la trampa de iones de cuadrupolo RF 3D (QIT), tiempo de vuelo de cuadrupolo (TOF) o trampa de iones de cuadrupolo RF lineal 2D (QLT) mantienen su energía térmica únicamente para una fracción de un microsegundo y no están atrapados en estos dispositivos, la DEC sigue siendo una técnica usada exclusivamente con FTICR, el tipo de instrumentación de EM más cara.

La disociación por transferencia de electrones (DTE) es un procedimiento de fragmentación de iones peptídicos o proteicos con múltiples cargas (protonados) para el análisis espectrométrico de masas en tándem (aclaración estructural). De un modo similar a la disociación por captura de electrones (DCE), la DTE induce fragmentación de cationes (p. ej., péptidos o proteínas con múltiples cargas) transfiriendo electrones a ellos. En contraste con la DCE, la DTE no usa electrones libres pero emplea aniones radicales para este fin (p. ej., antraceno o azobenceno, que poseen afinidades electrónicas lo suficientemente bajas como para actuar como donantes de electrones.



Después de la transferencia de electrones, la DTE tiene como resultado un patrón de fragmentación similar al de la DCE, es decir la formación de los denominados iones c y z. En base al diferente modo de transferir electrones, la DTE se puede implementar en varios espectrómetros de masas de "menor coste" como instrumentos de trampa de iones de cuadrupolo (QIT) o trampa de iones de cuadrupolo RF 2D lineal (QLT), que no son adecuados para la DCE. Para una referencia adecuada, véase John E. P. Syka, Joshua J. Coon, Melanie J. Schroeder, Jeffrey Shabanowitz, and Donald F. Hunt, PNAS, Vol. 101, nº 26, pág. 9528 - 9533.

Aunque el procedimiento de fragmentación no está particularmente limitado, la realización más preferida es cuando la fragmentación se debe a una disociación inducida por colisión.

En una realización, el procedimiento de acuerdo con la presente invención comprende una etapa adicional tras la etapa (d) de producir un espectro de masas de la pluralidad de los iones de fragmentos de la etapa (d). El espectro de masas producido tras la etapa d) se puede usar para identificar el analito diana identificando uno o más iones de fragmentos característicos del analito diana en el espectro de masas. Los iones de fragmentos producidos en el espectro se pueden usar para búsqueda de bases de datos, en particular para analitos peptídicos, para determinar la identidad del analito.

La fragmentación en la etapa (d) puede escindir una proporción de grupos marcadores de masa de los indicadores y picos de masa que representan grupos de marcadores de masas se pueden ver en un espectro de masas, si se produce. No obstante, si este espectro de masas se usa para medir la cantidad del analito diana en las muestras, producirá resultados imprecisos debido a la presencia de contaminantes marcados en la etapa (d).

Tras la fragmentación en la etapa d), los iones de una segunda proporción masa-carga equivalente a un ion de un fragmento del analito diana que comprende al menos un marcador de masa intacto se selecciona en la etapa e).

Como se ha tratado anteriormente, cuando la muestra es una mezcla compleja, la etapa c) puede seleccionar una serie de iones. Incluyendo el analito diana y otros iones contaminantes que tengan la misma masa. De acuerdo con esto, el análisis de los grupos marcadores de masa de los marcadores de masa unidos a todos los iones seleccionados en la etapa c) proporcionaría resultados de cuantificación que no representan con precisión la cantidad del analito diana. Para superar esta etapa de limitación e) proporciona una etapa de selección adicional del analito diana para pasar por un análisis adicional. La proporción masa-carga equivalente a un ion de un fragmento del analito diana que comprende al menos un marcador de masa intacto garantiza que las moléculas contaminantes seleccionadas en la etapa c) se eliminan del espectro de masas.

Preferentemente, en la etapa (e), la segunda proporción masa-carga es equivalente a un ion de un fragmento del analito diana que comprende al menos un marcador de masa intacto cuyo ion de fragmento es único del analito diana.

La segunda proporción masa-carga seleccionada en la etapa e) puede ser cualquier ion de fragmento adecuado producido en la etapa d) siempre que el ion del fragmento comprenda al menos un marcador de masa intacta.

La segunda proporción masa-carga puede ser equivalente a un ion de serie a, un ion de serie b, un ion de serie c, un ion de serie x, un ion de serie y o un ion de serie z. El tipo de ion seleccionado en la etapa e) se puede elegir dependiendo de la cantidad de cada ion producido. Por ejemplo, un péptido puede fragmentarse predominantemente en iones de serie b y el ion b1 puede ser el ion más prevalente, El ion más prevalente asegurará que se produce una buena señal de grupos indicadores de masa en el espectro de masas en la etapa h).

El tipo de ion seleccionado en la etapa e) se puede elegir dependiendo del grado de selectividad requerido. Un ion de fragmento más grande seleccionado en la etapa e) proporcionará mejor selectividad por el analito diana. Por ejemplo, la selección de un ion b1 se diferenciará entre péptidos que tienen diferentes aminoácidos en el extremo N. No obstante, si se requiere más selectividad para diferenciar entre péptidos que tienen el mismo ion b1, se puede seleccionar un ion más grande, tal como un ion b2 o b3. También puede ser preferible seleccionar iones más grandes si la fragmentación en la etapa d) produce iones de diferentes series que tienen la misma masa.

El mejor tipo de ion para seleccionar en la etapa e) se puede determinar por separado del procedimiento de la presente invención, usando, por ejemplo, los resultados de datos de EM o procedimientos *in silico*.

En una realización de acuerdo con la presente invención, en la etapa e) se selecciona una segunda proporción masa-carga, tal como un ion b1 o un ion y1 y las etapas f) a h) se llevan a cabo en el ion de fragmento seleccionado. Las etapas e) a h) se pueden repetir y la segunda proporción masa-carga seleccionada en la etapa e) garantiza un ion más grande, tal como b2 o y2. Los resultados del ion más grande se pueden comparar con los resultados del ion más pequeño como comprobación, para asegurar que los resultados reflejan con exactitud la cantidad de analito diana en la muestra.

Preferentemente, la segunda proporción masa-carga es equivalente a un ion de serie y que comprende un marcador de masa intacto. Por ejemplo, el ion de serie y puede ser un ion y1, ion y2, ion y3 etc. siempre que el ion comprenda al menos un marcador de masa intacto.

En una realización preferida alternativa, la segunda proporción masa-carga es equivalente a un ion de serie b que comprende un marcador de masa intacto. Por ejemplo, el ion de serie b puede ser un ion b1, ion b2, ion b3 etc. siempre que el ion comprenda al menos un marcador de masa intacto.

Preferentemente, el ion, tal como el ion de serie y o ion de serie b, tiene una proporción masa-carga más alta en comparación con la primera proporción masa-carga es equivalente seleccionada en la etapa (a). También preferentemente es que el ion seleccionado en la etapa e) tiene un estado de carga que es uno menos en comparación con el estado de carga del ion seleccionado en la etapa c pero con una proporción masa-carga más alta en comparación con el estado de carga del ion seleccionado en la etapa c). Esto garantiza que el ion seleccionado aparece en una parte muy limpia del espectro de masas sin ningún ion contaminante, lo que proporciona una proporción señal – ruido excelente.

El número y colocación de los marcadores de masa unidos al analito diana se pueden controlar dependiendo de qué ion de fragmento se prefiera para la selección en la etapa e). Por ejemplo, cuando el analito es un péptido y es preferible seleccionar un ion de serie b, el marcaje se puede controlar para asegurar que el péptido está unido a un marcador de masa en el extremo N. Si es preferible seleccionar un ion de serie y, el marcaje se puede controlar para asegurar que el péptido está unido a un marcador de masa en el extremo C.

Puede ser preferible seleccionar un ion de serie b en la etapa e) y repetir el procedimiento seleccionando un ion de serie y en la etapa e). En esta realización, el marcaje se puede controlar para asegurar que el péptido está unido a un marcador de masa en el extremo C y en el extremo N. Por ejemplo, si el analito diana es un péptido y la función amino terminal y la función épsilon-amino en C-terminal de la lisina están unidas a marcadores de masa, se generan iones y que tienen un marcador de masa intacto en la lisina o se generan iones b que tienen un marcador de masa en N-terminal intacto.

La fragmentación de la etapa d) puede producir pseudoiones y que representan el péptido de longitud completa con la pérdida de un grupo de marcador de masa más, por ejemplo, el grupo carbonilo vecino, y apareciendo en un estado de carga de -1. Estos iones no son útiles para la selección en la etapa e), ya que contendrán contaminantes del mismo m/x y estado de carga que el analito diana, que también ha perdido solo un grupo indicador de masa, y si el analito solo está unido a un marcador de masa, este ion no produciría fragmentos que comprenden un marcador de masa intacto.

Tras la selección de iones que tienen la segunda proporción masa-carga en la etapa e), estos iones se fragmentan después en una pluralidad de iones de fragmentos adicionales en la etapa f), en la que una proporción de los iones de fragmentos adicionales son iones del grupo de marcador de masa.

Debido a la selección en la etapa e), que permite pasar los iones del analito diana para un análisis adicional, los grupos de marcadores de masa liberados de la fragmentación de la etapa f) solo proceden del analito diana y el espectro de masas resultante proporcionará resultados de cuantificación precisos para el analito diana.

Una proporción de los iones de fragmentos adicionales son iones del grupo de marcadores de masa significa que más del 0% de los iones de fragmentos del grupo marcador de masa. En la etapa g) se produce un espectro de masas de los iones de fragmentos adicionales y, por tanto, la proporción de iones del grupo marcador de masas es suficiente para permitir la determinación de la cantidad del analito diana en cada muestra del espectro de masas.

- La fragmentación en la etapa f) se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los procedimientos que se tratan anteriormente con respecto a la etapa d). La energía usada en la fragmentación en la etapa f) es, preferentemente, mayor en comparación con la energía usada en la etapa d) con el fin de garantizar que los grupos marcadores de masa se escinden del resto del marcador de masa. Es preferible usar una célula de colisión en la etapa f) no una trampa de iones porque en esta etapa es preferible estimular la fragmentación consecutiva.
- En una realización, el procedimiento de acuerdo con la presente invención comprende una etapa adicional tras la etapa (f) de seleccionar iones de un intervalo de proporciones masa-carga equivalente al intervalo de proporciones masa-carga de los grupos indicadores de masa. Esta tercera etapa de selección garantiza que solo los iones de los grupos indicadores de masa se introducen en el espectro de masas producido en la etapa g), de modo que se eliminan los contaminantes.
- Tras la fragmentación en la etapa f), se produce un espectro de masas en la etapa g) de los iones de fragmentos adicionales.
- En la etapa h), la cantidad del analito diana en cada muestra se determina del espectro de masas producido en la etapa g). Esta etapa comprende preferentemente identificar los iones de fragmentos correspondientes a los grupos de marcadores de masa de los marcadores de masa en el espectro de masas y determinar la cantidad del analito en cada muestra en base a la cantidad de sus grupos marcadores de masa en el espectro de masas. En la realización, en la que una o más muestras de calibración se analizan en la etapa h) comprende determinar la cantidad del analito en la muestra de ensayo en base a la cantidad de los grupos de marcadores de masa en el espectro de masas relacionado con respecto a las cantidades de los grupos de marcadores de masa de las alícuotas de la muestra de calibración en el mismo espectro de masas. Como se ha tratado anteriormente, la cantidad determinada de analito puede ser la cantidad absoluta, o una cantidad cualitativa del analito.
- La muestra de ensayo puede proceder 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 procedente de una planta o un animal. En una realización preferida, la muestra procede de un ser humano.
- Ejemplos de muestras de ensayo analizadas en la presente invención incluyen: Tejido de mamífero, fluidos tales como sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, líquido ocular, orina, lágrimas y exudado del conducto lagrimal, aspirados pulmonares, incluido líquido de lavado broncoalveolar, saliva, esputo, leche de mama, aspirado de pezón, semen, fluidos de lavado, extractos celulares, líneas celulares y orgánulos subcelulares, tejidos tal como tejidos de órganos sólidos, sobrenadantes de cultivos celulares o preparaciones derivadas de mamíferos, aves, insectos, anélidos, protozoos y bacterias, extractos de cultivo tisular, tejidos vegetales, fluidos vegetales, extractos de cultivos de células vegetales, bacterias, virus, hongos, caldos de fermentación, alimentos, sustancias farmacéuticas y cualquier producto intermedio.
- En una realización preferida, la muestra de ensayo es plasma de la sangre. En una realización particularmente preferida, la muestra de ensayo es plasma deplecionado. Este es plasma que se ha purificado para eliminar las proteínas plasmáticas más abundantes, tal como albúmina, para reducir la carga proteica en la muestra, de modo que se reduce el número de analitos y el contenido en proteínas totales en la muestra.
- La muestra de calibración puede ser una muestra natural, tal como un fluido corporal o un extracto tisular, o puede ser sintética, con respecto a muestra a analizar. La muestra de calibración puede comprender una proteína expresada de forma recombinante, un péptido u oligonucleótido fabricado sintéticamente. Además, es posible producir una serie de péptidos diferentes mediante expresión de proteínas recombinante en una secuencia concatenada. La solicitud de patente europea EP 1736480 divulga procedimientos de producir múltiples péptidos de referencia como una proteína recombinante concatenada para usar en experimentos de monitorización de reacción múltiple de un modo análogo a la metodología AQUA. Dichos procedimientos de producción se pueden combinar con marcadores de masa isobáricos para proporcionar las muestras de calibración de acuerdo con cualquiera de los diversos aspectos de la presente invención.
- La muestra de calibración puede ser una forma normalizada de la muestra que se va a analizar. La muestra de calibración puede comprender todos los componentes de la muestra que se va a analizar, pero en cantidades concretas. Por ejemplo, la muestra de calibración puede comprender una preparación normalizada de tejido de mamífero, fluidos tales como sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, líquido ocular, orina, lágrimas y exudado del conducto lagrimal, aspirados pulmonares, incluido líquido de lavado broncoalveolar, saliva, esputo, leche de mama, aspirado de pezón, semen, fluidos de lavado, extractos celulares, líneas celulares y orgánulos subcelulares, tejidos tal como tejidos de órganos sólidos, sobrenadantes de cultivos celulares o preparaciones derivadas de mamíferos, aves, insectos, anélidos, protozoos y bacterias, extractos de cultivo tisular, tejidos vegetales, fluidos vegetales, extractos de cultivos de células vegetales, bacterias, virus, hongos, caldos de fermentación, alimentos, sustancias farmacéuticas y cualquier producto intermedio. Si los analitos de interés son proteínas, dado que todas las proteínas en la muestra de calibración están marcadas, todo el proteoma de dicha muestra se puede usar como referencia para todas las proteínas de la muestra del estudio.

Como alternativa, la muestra de calibración puede comprender únicamente analitos a analizar 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 y exógenamente y añadir a la mezcla compleja que contiene el analito. Por ejemplo, si la muestra es una muestra de plasma pero solo se va a analizar una proteína concreta en la muestra de plasma, se puede preparar una muestra de calibración que comprenda diferentes alícuotas de la forma recombinante de la proteína.

En un procedimiento alternativo, la cantidad absoluta de un analito en cada alícuota en la muestra de calibración no se conoce. 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 calibrar la cantidad del analito en la muestra de ensayo contra 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 previsto de cantidades del analito en un sujeto que tiene un estado concreto, tal como un estado sano o enfermo. Los ensayos que proporcionan dichas muestras de calibración para una cuantificación relativa tienen una amplia gama de aplicaciones, incluyendo descubrimiento de biomarcadores, microbiología industrial, fabricación farmacéutica y alimentaria y el diagnóstico y gestión de enfermedades humanas y veterinarias.

Los experimentos de cuantificación relativa a menudo son útiles a la hora de analizar muestras biológicas complejas, tales como plasma sanguíneo. En una realización específica, una gran cantidad de plasma sanguíneo humano se divide en varias alícuotas (es decir, cuatro) y se marcan individualmente con diferentes marcadores de masa isobáricos. Por ejemplo, se podría usar el TMTsixplex para producir cuatro alícuotas marcadas de plasma sanguíneo. TMT⁶-128, TMT⁶-129, TMT⁶-130, TMT⁶-131 se utilizarían para el marcaje. Todas las muestras individuales de un estudio de plasma sanguíneo se marcan con una versión adicional diferente de este marcador de masa isobárico, es decir TMT⁶-126. Las alícuotas de plasma sanguíneo se pueden usar ahora para generar una curva de calibración, por ejemplo mezclando las cuatro alícuotas en una proporción de 0,5 a 1 a 2 a 5 µl y, después, añadir 1 µl de la muestra del estudio. Combinando la muestra con la muestra de calibración que comprende cuatro alícuotas marcadas de forma diferente, casi todos los experimentos realizados con este material tendrán como resultados grupos de cinco iones marcadores, cuatro de la muestra de calibración y uno de la muestra de ensayo. Por tanto, el proteoma completo se puede usar en una curva de calibración de cuatro puntos. Si todas las muestras de ensayo del estudio se enriquecen con la cantidad idéntica de la muestra de calibración, la cuantificación relativa en todas las muestras del estudio se hace posible. Dado que la muestra de calibración la pueden usar múltiples laboratorios, son posibles comparaciones de estudios cruzados y de laboratorios cruzados.

Aunque la cantidad absoluta de un analito podría no conocerse, el % del cambio en la cantidad se puede calcular a partir de la curva de calibración. Dependiendo de la aplicación, la proporción y anchura de la curva de calibración se pueden ajustar.

En una realización preferida, la cantidad de analito en cada alícuota diferente de la muestra de calibración se selecciona de modo que refleje la variación conocida o sospechosa del analito en la muestra de ensayo. En una realización preferida adicional más, 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 sospechadas del analito hallado en las muestras de ensayo de sujetos sanos o enfermos.

Dado que cada analito se cuantifica de forma independiente de los demás analitos en la muestra, es concebible preparar múltiples conjuntos de muestras de calibración cada una a concentraciones extremadamente diferentes de las demás muestras de concentración, de modo que se potencia el intervalo dinámico del experimento. También es posible preparar una serie de biomoléculas de referencia para cada analito en las que cada biomolécula se proporciona en un intervalo de cantidades solapantes, de modo que se extiende el intervalo total de la curva estándar para un analito dado. Como ejemplo, se puede seleccionar una serie de diferentes péptidos trípticos diferentes de una proteína diana como patrones de referencia en base a su rendimiento en un espectrómetro de masas en tándem. Los péptidos de referencia se pueden seleccionar en base a la intensidad iónica del ion correspondiente al péptido en un espectro de masas o en base a la proporción señal-ruido en el área del espectro donde el ion correspondiente al péptido aparece. Como alternativa, los péptidos de referencia se pueden seleccionar de modo que se eviten los péptidos que tengan especies isobáricas. La selección de péptidos proteotípicos, es decir péptidos que solo están presentes en una proteína concreta, se ve particularmente favorecida.

Si cada péptido patrón se marca de forma independiente con hasta cinco miembros diferente de un conjunto sixplex de marcadores de masa isobáricos se puede mezclar en diferentes proporciones para proporcionar una curva estándar de cinco puntos. Los mismos marcadores de masa isobáricos se pueden usar para marcar segundos, terceros, cuartos o más péptidos estándar, cada uno de los cuales se puede mezclar en proporciones diferentes que cubran un intervalo de concentraciones diferentes a las cubiertas por cada uno de los demás péptidos de referencia para el mismo analito.

Una curva de calibración diferente se produce 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 después a partir de su respectiva curva de calibración y esto se puede relacionar de nuevo con la concentración de

la proteína diana. Para algunas de las curvas de calibración, la cantidad del péptido en la muestra de ensayo puede caer en el medio de la curva de calibración, de modo que se proporciona una determinación precisa de su cantidad real en la muestra. Para otras curvas de calibración que cubren un intervalo diferente de concentraciones, la cantidad del péptido en la muestra de ensayo puede caer fuera del intervalo de la curva de calibración. Usando

5 múltiples péptidos cada uno derivado de un único analito de interés, los inventores pueden producir múltiples curvas de calibración que pueden estar relacionadas con el mismo analito y, después, escoger 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 este modo, un amplio intervalo dinámico puede estar cubierto sin comprometer la sensibilidad del ensayo.

10 La muestra de calibración puede comprender una cantidad normal de un analito. La cantidad del analito en la muestra de calibración puede indicar que una planta, animal o, preferentemente, un ser humano está sano. Como alternativa, la muestra de calibración puede comprender un analito en una cantidad que indique la presencia y/o etapa de una enfermedad concreta. En una realización adicional, la muestra de calibración comprende un analito en una cantidad que indique la eficacia y/o la toxicidad de una terapia. Se preparan paneles estándar de marcadores conocidos de un rasgo concreto tal como la presencia y/o estadio de la enfermedad, la respuesta al tratamiento y/o la toxicidad. Las muestras de calibración que comprenden fluidos corporales o extractos tisulares marcados con un marcador de masa isobárico se pueden preparar de pacientes con una enfermedad bien caracterizada, incluyendo,

15 entre otros, tumores, neurodegeneración, enfermedades cardiovasculares, renales, hepáticas, respiratorias, metabólicas, inflamatorias e infecciosas. A múltiples muestras de ensayo se añaden cantidades conocidas de dichas muestras de un modo tal que para una serie de intensidades iónicas de los analitos en los espectros de masas se pueden normalizar en caso a la intensidad iónica de la muestra de calibración frecuente, proporcionando de este modo comparaciones más precisas entre los análisis distintos, reduciendo la variabilidad analítica del estudio.

25 En el caso de la medicina coronaria se produce sintéticamente una serie de péptidos derivados de la digestión con tripsina de marcadores de cardiopatía conocidos, tales como mioglobina, troponina-1, CK-MB, BNP, pro-BNP and NT-pro-BNP y se dividen en tres alícuotas. Cada alícuota de cada péptido de referencia se marca, por ejemplo, con uno de tres marcadores de masa isobáricos de un conjunto de dichos marcadores de masa isobáricos, en los que todos los marcadores en el conjunto tienen sustancialmente la misma masa agregada determinada mediante espectrometría de masas y en los que cada marcador en el conjunto libera un ion marcador de masa de masa única en la disociación inducida por colisión en un espectrómetro de masas. Cada molécula marcadora de masa-péptido de referencia única se añade después a una solución vehículo tal como un tampón compatible espectrométrico de masas a una concentración conocida de modo que la concentración de las tres alícuotas marcadas de forma diferente del mismo péptido de referencia son diferentes y que las diferencias abarcan las concentraciones biológicas normales de la proteína parental en pacientes con enfermedad cardíaca. El panel de péptidos de referencia resultante se añade a una proporción volumétrica definida con una muestra de ensayo que se ha marcado con un cuatro marcador de masa isobárica del mismo conjunto de marcadores de masa isobáricos usados para marcar los péptidos de referencia. La muestra enriquecida se somete después a espectrometría de masas en tándem en la que se realiza un barrido de un modo dirigido para identificar únicamente los iones precursores del tiempo de retención característico y la masa correlaciona con cada uno de los péptidos de referencia marcados isobáricamente. Para cada ion seleccionado, el espectro de masas contendrá iones marcadores derivados de los péptidos de referencia de concentración alta, media y baja y la muestra de ensayo.

35 Una curva estándar simple se construye fácilmente a partir de las intensidades iónicas del marcador peptídico de referencia y el cuarto ion marcador del mismo péptido en la muestra de ensayo se pueden leer contra la curva de calibración. Por este medio, la concentración absoluta de múltiples proteínas biológicamente relevantes se puede determinar en un único experimento. El experto conocerá que el número de proteínas diferentes para las cuales se preparan los péptidos de referencia no tienen que estar particularmente limitados y estarán en el intervalo de 1 - 100 y, lo más preferentemente, 1 - 50. De un modo similar, el número de péptidos representativos puede estar en el intervalo de 1 - 20, preferentemente 1 - 10, más preferentemente 1 - 5 y lo más preferentemente 1 - 3. El experto en la técnica entenderá que el ejemplo descrito anteriormente es un ejemplo general y los principios descritos en él se pueden aplicar a marcadores conocidos de cualquier enfermedad y aplicar para diagnósticos de enfermedades, monitorización de la progresión de la enfermedad o monitorización de la respuesta de un paciente al tratamiento.

45 Una aplicación adicional es el uso de estas muestras de calibración en los experimentos en el curso del tiempo. El "Estado" de una muestra con respecto al curso del tiempo se puede establecer si los diferentes alícuotas (cuatro) son de cuatro puntos de tiempo diferentes, tal como tiempo cero, 1 hora, 8 horas y 24 horas, en un experimento (exposición al fármaco en ratones y seres humanos, inducción de fermentación en *E.coli* y levaduras), también a una escala de tiempo más prolongada de semanas y meses para el desarrollo o la respuesta al tratamiento de enfermedades crónicas.

50 El experto en la técnica entenderá que la naturaleza del marcador de masa isobárico no es particularmente limitante. En la técnica se conocen varios marcadores de masa isobáricos adecuados, como los marcadores de masa en tándem (Thompson et al., 2003, Anal. Chem. 75(8): 1895 -1904 divulgados en los documentos WO 01/68664 y WO 03/025576, marcadores iPROT divulgados en el documento US 6824981 y marcadores iTRAQ (Pappin et al., 2004, Methods in Clinical Proteomics Manuscript M400129-MCP200). Cualquiera de estos marcadores de masa isobáricos

es adecuado para la preparación de las muestras y las muestras de calibración y la realización de los procedimientos de la presente invención.

- 5 Aunque la estructura de los marcadores de masa usados en la presente invención no está especialmente imitada, siempre que sean isobáricas y tengan grupos (restos) de marcadores de masa espectrométricamente distintos, en realizaciones preferidas el marcador de masa comprende la siguiente estructura:

X-L-M

- 10 en la que X es un resto marcador de masa, L es un ligador escindible y M es un resto de normalización de masa. L puede ser un enlace sencillo, o parte de X, o parte de M. Estos marcadores de masa pueden estar unidos en cualquier punto del analito en el ensayo o muestras de calibración, por ejemplo por M, L o X. Preferentemente, están unidos a través de M, por ejemplo el marcador comprendería la estructura:

- 15 (X-L-M)-

Normalmente, esto se efectúa incluyendo una funcionalidad reactiva en el marcador de masa para dejarlo que se una al analito, por ejemplo

- 20 X-L-M-funcionalidad reactiva

Cuando los marcadores comprenden una funcionalidad reactiva, se denominan marcadores de masa reactivos.

- 25 La funcionalidad reactiva para unir el marcador de masa al analito no está especialmente limitada y puede comprender cualquier grupo reactivo adecuado.

Con la expresión marcador de masa usada en el presente contexto se pretende hacer referencia a un resto adecuado para marcar un analito para determinación. El término marcador es sinónimo del término marcador.

- 30 Con la expresión resto de marcador de masa usada en el presente contexto se pretende hacer referencia a un resto que se va a detectar mediante espectrometría de masas. La expresión resto marcador de masa es sinónima de la expresión grupo de marcador de masa o de la expresión grupo indicador. Los componentes del resto de marcador de masa usados en la presente invención son, preferentemente, resistentes a la fragmentación de modo que el sitio de fragmentación de los marcadores se puede controlar mediante la introducción de un enlace que se rompe fácilmente mediante disociación inducida por colisión (DIC), disociación inducida por superficie (DIS), disociación por
35 captura de electrones (DCE), disociación de transferencia de electrones (DTE) o bombardeo rápido de átomos. En la forma de realización más preferida, el enlace se rompe fácilmente mediante DIC.

- 40 Con la expresión resto de normalización de masa usada en el presente contexto se pretende hacer referencia a un resto que no necesariamente se va a detectar mediante espectrometría de masas pero que está presente para asegurar que un marcador de masa tienen una masa agregada deseada. El resto de normalización de masa no está particularmente limitado estructuralmente sino que simplemente sirve para modificar la masa global del marcador de masa.

- 45 En una realización preferida, el peso molecular agregado del marcador de masa es 600 Dalton o menor, más preferentemente 500 Dalton o menor, todavía más preferentemente 400 Dalton o menor, lo más preferentemente de 300 a 400 Dalton. Pesos particularmente preferidos de los marcadores de masa son 324, 338, 339 y 380 Dalton. Estas realizaciones preferidas son particularmente ventajosas porque el tamaño pequeño de los marcadores de masa significa que el tamaño del péptido a detectar aumenta mínimamente cuando está marcado con el marcador
50 de masa.

- En una realización preferida, el peso molecular del resto marcador de masa es 300 Dalton o menor, más preferentemente 250 Dalton o menor, más preferentemente de 100 a 250 Dalton, lo más preferentemente de 100 -
55 200 Dalton. Estas realizaciones preferidas son particularmente ventajosas porque el tamaño pequeño del resto marcador de masa significa que produce un pico en la región silente de un espectro de masas, lo que permite identificar fácilmente al marcador de masas del espectro de masas y también permite una cuantificación sensible.

- 60 Pesos moleculares particularmente preferidos del resto marcador de masa son 125, 126, 153 y 154 Dalton, o pesos en los que uno o más o todos los átomos de carbono están sustituidos por átomos ^{13}C , por ejemplo para un resto marcador de masa no sustituido que tiene un peso de 125, las masas para sus homólogos sustituidos serían 126, 127, 128, 129, 130 y 131 Dalton para sustituir con 1, 2, 3, 4, 5 y 6 átomos ^{13}C , respectivamente y/o uno o más o todos los átomos ^{14}N están sustituidos por átomos ^{15}N .

- 65 La expresión región silente de un espectro de masas usado en el presente contexto se pretende hacer referencia a la región de un espectro de masas con un "ruido" de fondo bajo causado por picos relacionados con la presencia de fragmentos generados mediante fragmentación de los péptidos marcados. Por tanto, con la expresión "región

silente” se pretende hacer referencia a la región del espectro de masas con un “ruido” bajo causado por picos relacionados con el péptido que se va a detectar. Para un péptido o proteína, la región silente del espectro de masas es inferior a 200 Dalton.

- 5 Los presentes inventores también han descubierto que los marcadores de masa reactivos definidos anteriormente se hacen reaccionar fácil y rápidamente con una proteína para formar una proteína marcada.

10 En la presente invención se usa un conjunto de dos o más marcadores de masa. Los marcadores en los conjuntos son marcadores de masa isobáricos, teniendo cada marcador de masa una masa diferente. Por tanto, cada marcador en el conjunto es como se ha definido anteriormente y donde cada resto de normalización de masa garantiza que un marcador de masa tiene una masa agregada deseada y donde el conjunto comprende marcadores de masa que tienen un resto marcador de masa, teniendo cada resto marcador de masa una masa diferente de la de los demás grupos marcadores de masa en el conjunto y teniendo cada marcador en el conjunto una masa agregada común; y donde los marcadores de masa en el conjunto se pueden distinguir entre sí mediante espectroscopia de masas.

15 El término “isobárico” significa que los marcadores de masa tienen sustancialmente la misma masa agregada que se ha determinado mediante espectrometría de masas. Normalmente, las masas moleculares medias de los marcadores de masa isobáricos caerán dentro de un intervalo de $\pm 0,5$ Da de cada uno. El término “marcadores” será sinónimo del término “marcadores”. Ene el contexto de la presente invención, el destinatario experto entenderá que la expresión “resto marcador de masa” y la expresión “grupo indicador” se pueden usar de forma intercambiable.

20 El número de marcadores en el conjunto no es especialmente limitado, siempre que el conjunto comprenda una pluralidad de marcadores. No obstante, se prefiere que el conjunto comprenda dos o más, tres o más, cuatro o más, o cinco o más marcadores, más preferentemente seis o más marcadores, lo más preferentemente ocho o más marcadores.

25 La expresión masa agregada en el presente contexto hace referencia a la masa total del marcador de masa, es decir la suma de las masas del resto marcador de masa, el ligador escindible, el resto de normalización de masa y cualquier otro componente el marcador de masa.

30 La masa del resto de normalización de masa será diferente en cada marcador de masa en el conjunto. La masa del resto de normalización de masa en cada marcador de masa individual será igual a la masa agregada común menos la masa del resto marcador de masa concreto en cuanto a que el marcador de masa y menos la masa del ligador escindible.

35 Todos los marcadores de masa en el conjunto se pueden distinguir entre sí mediante espectroscopia de masas. Por tanto, un espectrómetro de masas puede discriminar entre los marcadores de masa, es decir los picos derivados de marcadores de masa individuales se pueden separar claramente unos de otros. La diferencia en masa entre los grupos marcadores de masa significa que un espectrómetro de masas puede discriminar entre iones derivados de diferentes marcadores de masa o grupos de marcadores de masa.

40 La presente invención puede también usar una matriz de marcadores de mas, que comprende dos o más conjuntos de marcadores de masa como se ha definido anteriormente, en la que la masa agregada de cada uno de los marcadores de masa en un cualquiera de los conjuntos es diferente de la masa agregada de cada uno de los marcadores de masa en todos los demás conjuntos en la matriz,

45 En realizaciones preferidas de la invención, la matriz de marcadores de masas es, preferentemente, químicamente idéntica (sustancialmente químicamente idéntica). La expresión “sustancialmente químicamente idéntica” significa que los marcadores de masa tienen la misma estructura química en la que se pueden introducir sustituciones isotópicas concretas o a la que se pueden unir sustituyentes concretos.

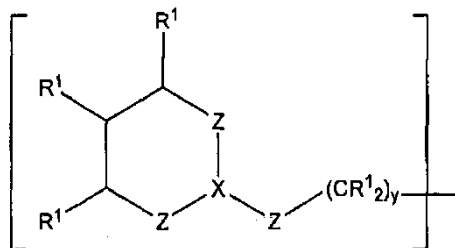
50 En realizaciones preferidas adicionales de la presente invención, los marcadores de masa pueden comprender un grupo potenciador de la sensibilidad. Los marcadores de masa son, preferentemente, de la forma:

55 grupo potenciador de la sensibilidad - X-L-M- funcionalidad reactiva

60 En este ejemplo, el grupo potenciador de la sensibilidad normalmente está unido al resto marcador de masa, ya que se pretende que incremente la sensibilidad de la detección de este resto en el espectrómetro de masas. La funcionalidad reactiva se muestra que está presente y unida a un resto diferente al del grupo potenciador de la sensibilidad. No obstante, los marcadores de masa no tienen que limitarse de este modo y, en algunos casos, el grupo potenciador de la sensibilidad puede estar unido al mismo resto que la funcionalidad reactiva.

65 Las estructuras preferidas de los marcadores de masa usados para marcar los analitos en la presente invención se describirán a continuación con mayor detalle.

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



- 5 donde la unidad cíclica es aromática o alifática y comprende de 0-3 dobles enlaces de forma independiente entre dos cualquiera átomos adyacentes; cada Z es, de forma independiente N, N(R¹), C(R¹), CO, CO(R¹) (es decir, -O-C(R¹)- o -C(R¹)-O-), C(R¹)₂, O o S; X es N, C o C(R¹); cada R¹ es de forma independiente H, un grupo alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado sustituido o insustituido, un grupo cíclico alifático sustituido o insustituido, un grupo aromático sustituido o insustituido, un grupo heterocíclico sustituido o insustituido; e y es un número entero de 0-10.
- 10 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). Por tanto, el grupo C(R¹)₂ incluye grupos tales como CH(R¹), donde un R¹ es H y el otro R¹ es otro grupo seleccionado de la definición anterior de R¹.
- 15 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 a Z no cíclico debe ser un enlace sencillo. Cuando X es C, el enlace entre X y el Z no cíclico puede ser un enlace sencillo o un doble enlace dependiendo del grupo Z no cíclico y los grupos Z cíclicos seleccionados. Cuando el grupo Z no cíclico es N o C(R¹), el enlace entre Z no cíclico y X es un enlace sencillo o si y es 0 puede ser un doble enlace dependiendo del grupo X seleccionado y el grupo al cual está unido 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 de la técnica puede seleccionar fácilmente grupos X, Z y (CR¹)₂, adecuados con las valencias correctas (enlaces sencillos o dobles) de acuerdo con la fórmula anterior.
- 20
- 25 Los sustituyentes del resto marcador de masa no están particularmente limitados y pueden comprender cualquier grupo y/o uno o más átomos de cualquiera de los grupos IIIA, IVA, VA, VIA o VIIA de la Tabla Periódica, tal como un átomo de B, Si, N, P, O, o S o un átomo de halógeno (p. ej., F, Cl, Br o I).
- 30 Cuando el sustituyente comprende un grupo orgánico, el grupo orgánico comprende, preferentemente, un grupo hidrocarburo. El grupo hidrocarburo puede comprender una cadena lineal, una cadena ramificada o un grupo cíclico. De forma independiente, el grupo hidrocarburo puede comprender un grupo alifático o uno aromático. De forma independiente, el grupo hidrocarburo puede comprender un grupo saturado o insaturado.
- 35 Cuando el hidrocarburo comprende un grupo insaturado, 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, puede comprender uno o más grupos alquilo primarios, secundarios y/o terciarios. Cuando el hidrocarburo comprende un grupo cíclico, puede comprender un anillo aromático, un anillo alifático, un grupo heterocíclico y/o derivados de anillo condensados de estos grupos. El grupo cíclico comprende 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.
- 40 El número de átomos de carbono en el grupo hidrocarburo no está especialmente limitado pero, preferentemente, el grupo hidrocarburo comprende 1-40 átomos de C. El grupo hidrocarburo puede ser, por tanto, un hidrocarburo inferior (1-6 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.
- 45 Los grupos que comprenden 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, tal como un átomo de B, Si, N, P, O, o S o un átomo de halógeno (p. ej., F, Cl, Br o I). Por tanto, el sustituyente puede comprender uno o más de cualquiera de los grupos funcionales comunes en química orgánica, tal como grupos hidroxí, grupos de ácido carboxílico, grupos éster, grupos éter, grupos aldehído, grupos cetona, grupos amina, grupos amida, grupos imina, grupos tiol, grupos tioéter, grupos sulfato, grupos de ácido sulfónico y grupos fosfato etc. El sustituyente puede también comprender derivados de estos grupos, tal como anhídridos de ácido carboxílico y haluros de ácido carboxílico.
- 50
- 55 Además, cualquier sustituyente puede comprender una combinación de dos o más de los sustituyentes y/o grupos funcionales definidos anteriormente.

El ligador escindible del marcador de masa usado en la presente invención no está especialmente limitado. Preferentemente, el ligador escindible es un ligador escindible mediante disociación inducida por colisión (DIC), disociación inducida por superficie (DIS), disociación por captura de electrones (DCE), disociación por transferencia de electrones (DTE) o bombardeo rápido de átomos. En la realización más preferida, el enlace es escindible mediante DIC. El ligador puede comprender un enlace amida.

En la discusión anterior y siguiente se hace referencia a grupos ligadores que se pueden usar para conectar moléculas de interés con los compuestos marcadores de masa usados en la presente invención. En la técnica se conocen varios ligadores que se pueden introducir entre los marcadores de masa usados en la presente invención y su molécula biológica unida de forma covalente. Algunos de estos ligadores pueden ser escindibles. Los oligo o polietilenglicoles o sus derivados se pueden usar como ligadores, tales como los divulgados en Maskos, U. & Southern, E.M. *Nucleic Acids Research* 20: 1679 -1684, 1992. Los ligadores basados en ácido succínico también se usan ampliamente, aunque estos son menos preferidos para aplicaciones que implican el marcaje de oligonucleótidos, ya que generalmente son lábiles a las bases y, por tanto, son incompatibles con las etapas de desprotección mediadas por bases usadas en una serie de sintetizadores de oligonucleótidos.

El alcohol propargílico es un ligador bifuncional que proporciona un enlace que es estable en las condiciones de síntesis de oligonucleótidos y es un ligador preferido para usar con la presente invención en relación con aplicaciones oligonucleotídicas. De un modo similar, el 6-aminohexanol es un reactivo bifuncional útil para unir moléculas funcionalizadas adecuadamente y también es un ligador preferido.

Se pueden usar diversos grupos ligadores escindibles conocidos junto con los compuestos usados en la presente invención, tales como ligadores fotoescindibles. Los grupos ortonitrobencilo se conocen como ligadores fotoescindibles, particularmente ésteres de 2-nitrobencilo y 2-nitrobencil aminas, que se escinden en el enlace bencilamina. Para una revisión de los ligadores escindibles véase Lloyd-Williams et al., *Tetrahedron* 49, 11065-11133, 1993, que cubre una diversidad de ligadores fotoescindibles y químicamente escindibles.

El documento WO 00/02895 divulga los compuestos de vinilsulfona como ligadores escindibles, que también son aplicables para uso con la presente invención, particularmente en aplicaciones que implican el marcaje de polipéptidos, péptidos y aminoácidos.

El documento WO 00/02895 divulga el uso de compuestos de silicio como ligadores que pueden escindir-se mediante una base en la fase gas. Estos ligadores también son aplicables para su uso con la presente invención, particularmente en aplicaciones que implican el marcaje de oligonucleótidos.

La estructura del resto de normalización de masa del marcador de masa usado en la presente invención no está particularmente limitada, siempre que sea adecuada para garantizar que el marcador de masa tenga una masa agregada deseada. No obstante, el resto de normalización de masa comprende, preferentemente, un grupo alifático de C₁-C₂₀ lineal o ramificado, sustituido o insustituido y/o uno o más aminoácidos sustituidos o insustituidos.

Preferentemente, el resto de normalización de masa comprende un grupo alifático de C₁-C₆ sustituido o insustituido, más preferentemente un grupo alifático de C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ C₆ sustituido o insustituido, todavía más preferentemente un grupo alifático de C₁, C₂, o C₅ sustituido o insustituido o un grupo metilsustituido en C₁.

Los uno o más aminoácidos sustituidos o insustituidos pueden ser cualquier aminoácido de origen natural o aminoácidos de origen no natural esencial o no esencial. Aminoácidos preferidos son alanina, β-alanina y glicina.

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

Cuando el sustituyente comprende un grupo orgánico, el grupo orgánico comprende, preferentemente, un grupo hidrocarburo. El grupo hidrocarburo puede comprender una cadena lineal, una cadena ramificada o un grupo cíclico. De forma independiente, el grupo hidrocarburo puede comprender un grupo alifático o uno aromático. De forma independiente, el grupo hidrocarburo puede comprender un grupo saturado o insaturado.

Cuando el hidrocarburo comprende un grupo insaturado, 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, puede comprender uno o más grupos alquilo primarios, secundarios y/o terciarios. Cuando el hidrocarburo comprende un grupo cíclico, puede comprender un anillo aromático, un anillo alifático, un grupo heterocíclico y/o derivados de anillo condensados de estos grupos. El grupo cíclico comprende 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.

El número de átomos de carbono en el grupo hidrocarburo no está especialmente limitado pero, preferentemente, el grupo hidrocarburo comprende 1-40 átomos de C. El grupo hidrocarburo puede ser, por tanto, un hidrocarburo

inferior (1-6 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.

5 Los grupos que comprenden 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, tal como un átomo de B, Si, N, P, O, o S o un átomo de halógeno (p. ej., F, Cl, Br o I). Por tanto, el sustituyente puede comprender uno o más de cualquiera de los grupos funcionales comunes en química orgánica, tal como grupos hidroxilo, grupos de ácido carboxílico, grupos éster, grupos éter, grupos aldehído, grupos cetona, grupos amina, grupos amida, grupos imina, grupos tiol, grupos tioéter, grupos sulfato, grupos de ácido sulfónico y grupos fosfato etc. El sustituyente puede también comprender derivados de estos grupos, tal como anhídridos de ácido carboxílico y haluros de ácido carboxílico.

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

20 En una realización de la presente invención, donde el procedimiento comprende una etapa de marcaje de las muestras, la etapa de marcaje comprende una etapa de hacer reaccionar el analito con un marcador de masa reactivo, donde el marcador de masa reactivo comprende un marcador de masa y una funcionalidad reactiva.

25 Los marcadores de masa reactivos normalmente usados en la presente invención para marcaje y detección de una molécula biológica mediante espectroscopia de masas comprende una funcionalidad reactiva para facilitar la unión o para unir el marcador de masa a una molécula biológica y un marcador de masa como se ha definido anteriormente. En realizaciones preferidas de la presente invención, la funcionalidad reactiva permite hacer reaccionar covalentemente el marcador de masa con un analito, preferentemente un aminoácido, péptido o polipéptido. La funcionalidad reactiva puede estar unida a los marcadores de masa mediante un ligador que puede o no ser escindible. La funcionalidad reactiva puede estar unida al resto marcador de masa del marcador de masa o el resto de normalización de masa del marcador de masa.

30 Se pueden introducir diversas funcionalidades reactivas en los marcadores de masa usados en la presente invención. La estructura de la funcionalidad reactiva no está particularmente limitada siempre que sea capaz de reaccionar con uno o más sitios reactivos sobre la molécula biológica que se va a marcar. La funcionalidad reactiva es, preferentemente, un nucleófilo o un electrófilo.

35 En las realizaciones más simples, esto puede ser un éster de N-hidroxisuccinimida. También se pudo hacer reaccionar un marcador de masa activado de una N-hidroxisuccinimida con hidrazina para dar una funcionalidad reactiva hidrazina que se puede usar para marcar restos de azúcar oxidados de peryodato, por ejemplo. Los grupos amino o tioles se pueden usar como funcionalidades reactivas en algunas aplicaciones. La lisina se puede usar para acoplar marcadores de masa a las funcionalidades de carboxilo libre usando una carbodiimida como reactivo de acoplamiento. La lisina también se puede usar como el punto de partida para la introducción de otras funcionalidades reactivas en el marcador de masa usado en la presente invención. La funcionalidad de maleimida reactiva con tiol se puede introducir mediante reacción del grupo épsilon-amino de la lisina con anhídrido maleico. El grupo tiol de la cisteína se puede usar como punto de partida para la síntesis de diversos compuestos de alquenilsulfona, que son reactivos de marcaje proteico útiles que reaccionan con tioles y aminas. Los compuestos tales como ácido aminohexanoico se pueden usar para proporcionar un espaciador entre el resto marcador de masa modificado por masa o el resto de normalización de masa y la funcionalidad reactiva.

50 La tabla 1 siguiente enumera algunas funcionalidades reactivas que se pueden hacer reaccionar con funcionalidades nucleófilas que se encuentran en biomoléculas para generar un enlace covalente entre las dos entidades. Cualquiera de las funcionalidades enumeradas más adelante podrían introducirse en los compuestos usados en la presente invención para permitir que los marcadores de masa se unan a una molécula biológica de interés. Una funcionalidad reactiva se puede usar para introducir grupos ligadores adicionales con una funcionalidad reactiva adicional si se desea. No se pretende que la Tabla 1 sea exhaustiva y la presente invención no está limitada al uso de únicamente las funcionalidades enumeradas.

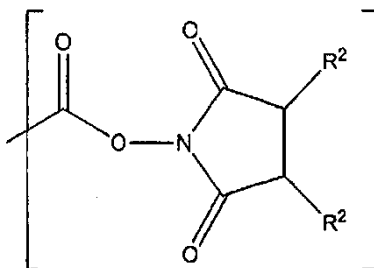
55

Tabla 1

Funcionalidad nucleófila	Funcionalidad reactiva	Grupo de unión resultante
-SH	-SO ₂ -CH=CR ₂	-S-CR ₂ -CH ₂ -SO ₂ -
-NH ₂	-SO ₂ -CH=CR ₂	-N(CR ₂ -CH ₂ -SO ₂ -) ₂ o -NH-CR ₂ -CH ₂ -SO ₂ -
-NH ₂		-CO-NH-

Funcionalidad nucleófila	Funcionalidad reactiva	Grupo de unión resultante
-NH ₂		-CO-NH-
-NH ₂	-NCO	-NH-CO-NH-
-NH ₂	-NCS	-NH-CS-NH-
-NH ₂	-CHO	-CH ₂ -NH-
-NH ₂	-SO ₂ Cl	-SO ₂ -NH-
-NH ₂	-CH=CH-	-NH-CH ₂ -CH ₂ -
-OH	-OP(NCH(CH ₃) ₂) ₂	-OP(=O)(O)O-

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



5 donde cada R² es, de forma independiente H, un grupo alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado sustituido o insustituido, un grupo cíclico alifático sustituido o insustituido, un grupo aromático sustituido o insustituido o un grupo heterocíclico sustituido o insustituido.

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

15 Cuando el sustituyente comprende un grupo orgánico, el grupo orgánico comprende, preferentemente, un grupo hidrocarburo. El grupo hidrocarburo puede comprender una cadena lineal, una cadena ramificada o un grupo cíclico. De forma independiente, el grupo hidrocarburo puede comprender un grupo alifático o uno aromático. De forma independiente, el grupo hidrocarburo puede comprender un grupo saturado o insaturado.

20 Cuando el hidrocarburo comprende un grupo insaturado, 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, puede comprender uno o más grupos alquilo primarios, secundarios y/o terciarios. Cuando el hidrocarburo comprende un grupo cíclico, puede comprender un anillo aromático, un anillo alifático, un grupo heterocíclico y/o derivados de anillo condensados de estos grupos. El grupo cíclico comprende un grupo benceno, naftaleno, antraceno, indeno, fluoreno, piridina, quinolina, tiofeno, benzotiofeno, furano, benzofurano, pirrol, indol, imidazol, tiazol y/u oxazol, así como regiosómeros de los grupos anteriores.

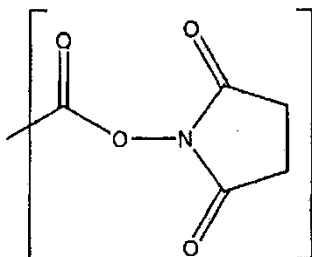
25 El número de átomos de carbono en el grupo hidrocarburo no está especialmente limitado pero, preferentemente, el grupo hidrocarburo comprende 1-40 átomos de C. El grupo hidrocarburo puede ser, por tanto, un hidrocarburo inferior (1-6 átomos de C) o un hidrocarburo superior (7 átomos de C o más, por 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 comprenden 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

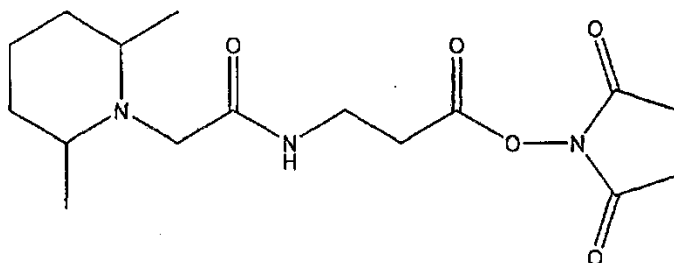
- o VIIA de la Tabla Periódica, tal como un átomo de B, Si, N, P, O, o S o un átomo de halógeno (p. ej., F, Cl, Br o I). Por tanto, el sustituyente puede comprender uno o más de cualquiera de los grupos funcionales comunes en química orgánica, tal como grupos hidroxilo, grupos de ácido carboxílico, grupos éster, grupos éter, grupos aldehído, grupos cetona, grupos amina, grupos amida, grupos imina, grupos tiol, grupos tioéter, grupos sulfato, grupos de ácido sulfónico y grupos fosfato etc. El sustituyente puede también comprender derivados de estos grupos, tal 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.

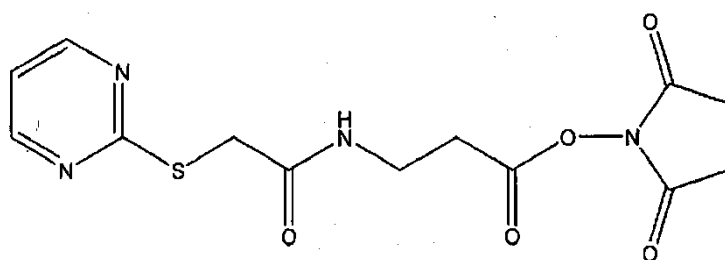
- En una realización más preferida, la funcionalidad reactiva comprende el grupo siguiente:



- En una realización preferida de la presente invención, el marcador de masa reactivo tiene una de las estructuras siguientes:

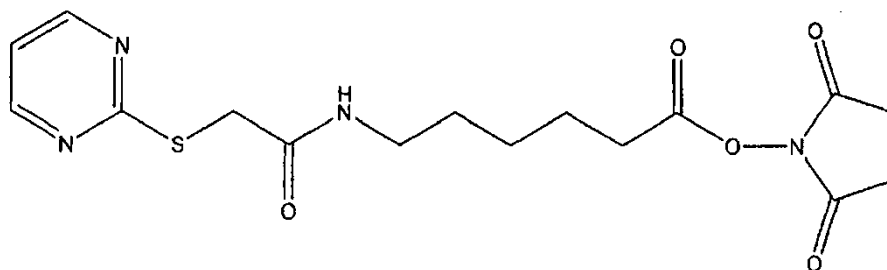


- (2,5-dioxo-pirrolidin-1-il)-éster de ácido 3-[2-(2,6-dimetil-pipendin-1-il)-acetilamino]-propanoico (DMPip-βAla-OSu)

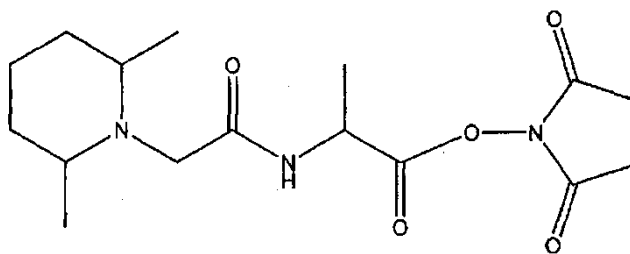


- (2,5-dioxo-pirrolidin-1-il)-éster de ácido 3-[2-(pirimidin-2-ilsulfanil)acetilamino]-propanoico (Pym-βAla-OSu)

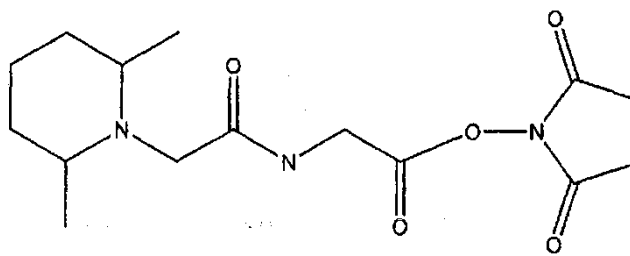
25



- (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)



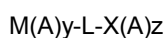
(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il)-éster de ácido 2-[2-(2,6-Dimetil-piperidin-1-il)-acetilamino]-acético (Pym-Gly-OSu).

En el procedimiento de acuerdo con la presente invención, cada marcador en el conjunto tiene una masa agregada común y cada marcador en el conjunto tiene un resto marcador de masa de una masa única.

Se prefiere que cada resto de marcador de masa en el conjunto tiene una estructura básica común y cada resto de normalización de masa en el conjunto tiene una estructura básica común y cada marcador de masa en el conjunto comprende uno o más restos ajustadores de masa, estando los restos ajustadores de masa unidos a la estructura básica del resto marcador de masa o situados dentro de ella y/o la estructura básica del resto de normalización de masa. En la presente realización, cada resto marcador de masa en el conjunto comprende un número diferente de restos ajustadores de masa y cada marcador de masa en el conjunto tiene el mismo número de restos ajustadores de masa.

A lo largo de la presente descripción, por estructura básica común se entiende que dos o más restos comparten una estructura que sustancialmente tiene el mismo esqueleto estructural, armazón o núcleo. El esqueleto comprende el resto marcador de masa de la fórmula proporcionada en lo que antecede o el resto de normalización de masa como se ha definido anteriormente. El esqueleto puede comprender adicionalmente un número de aminoácidos unidos por enlaces amida. También pueden estar presentes otras unidades tal como unidades de ariléter. El esqueleto o armazón puede comprender sustituyentes colgantes del mismo, o sustituciones atómicas o isotópicas dentro del mismo, sin cambiar la estructura básica común.

En una realización preferida del conjunto de marcadores de masa o de marcadores de masa reactivos de acuerdo con la invención comprende marcadores de masa que tienen la estructura siguiente:



en la que M es un resto de normalización de masa, X es un resto marcador de masa, A es un resto ajustador de masa, L es un ligador escindible, e y z son números enteros de 0 o mayores, e y+z es un número entero de 1 o mayores. Preferentemente, M es un grupo resistente a la fragmentación, L es un ligador que es susceptible a la fragmentación por colisión con otra molécula o átomo y X es, preferentemente, un grupo resistente a la fragmentación preconizado.

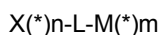
La suma de las masas de M y X es la misma para todos los miembros del conjunto. Preferentemente, M y X tienen la misma estructura básica o estructura central, estando esta estructura modificada por los restos ajustadores de masa. El resto ajustador de masa garantiza que la suma de las masas de M y X es la misma para todos los marcadores de masa en un conjunto, pero garantiza que cada X tienen una masa distinta (única).

El resto ajustador de masa (A) se selecciona, preferentemente, de:

- (a) un sustituyente isotópico situado dentro del resto marcador de masa y/o dentro del resto de normalización de masa, y
- (b) átomos o grupos sustituyentes unidos al resto marcador de masa y/o unidos al resto de normalización de masa.

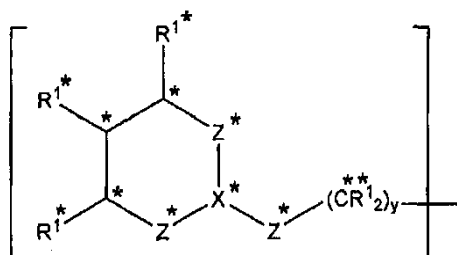
Preferentemente, el resto ajustador de masa se selecciona de un átomo de halógeno sustituyente, un sustituyente grupo metilo y sustituyentes isotópicos ^2H , ^{15}N , ^{18}O , o ^{13}C .

5 En una realización preferida de la presente invención, cada marcador de masa en el conjunto de los marcadores de masa como se ha definido anteriormente tiene la estructura siguiente:



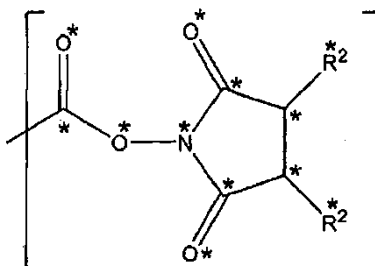
10 En la que X es el resto marcador de masa, L es el ligador escindible, M es el resto de normalización de masa, * es un resto ajustador de masa isotópico y n y m son números enteros de 0 o mayores de forma que cada marcador en el conjunto comprende un resto marcador de masa que tiene una masa única y cada marcador en el conjunto tiene una masa agregada común.

15 Se prefiere que X comprenda el grupo siguiente:



20 donde R^1 , Z, X e y son como se ha definido anteriormente y cada marcador en el conjunto comprende 0, 1 o más * de forma que cada marcador en el conjunto comprende un resto marcador de masa que tiene una masa única y cada marcador en el conjunto tiene una masa agregada común.

En una realización preferida adicional, los marcadores de masa reactivos usados en la presente invención comprenden la siguiente funcionalidad que comprende el grupo de funcionalidad reactiva siguiente:

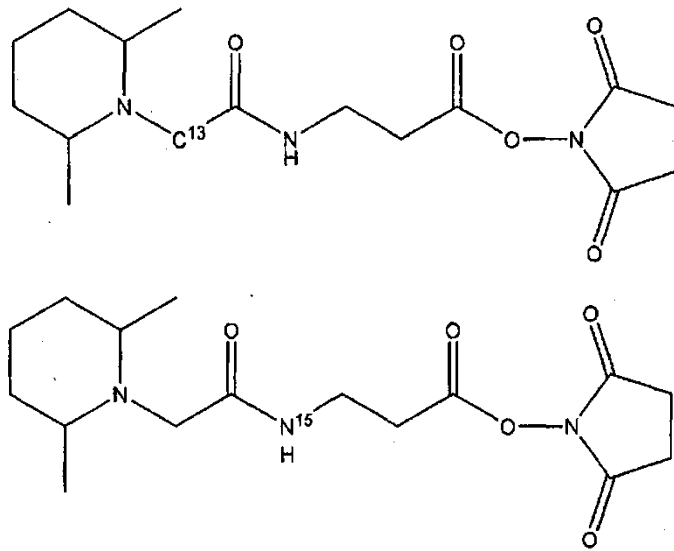


25 donde R^2 es como se ha definido anteriormente y el conjunto comprende 0, 1 o más * de forma que cada marcador en el conjunto comprende un resto marcador de masa que tiene una masa única y cada marcador en el conjunto tiene una masa agregada común.

30 En todas las fórmulas preferidas anteriores, es particularmente preferido que la especie isotópica * se sitúe dentro del resto marcador de masa y/o el ligador y/o el resto ajustador de masa, en lugar de en cualquier resto reactivo que está presente para facilitar la unión del marcador a un analito. El número de sustituyentes isotópicos no está especialmente limitado y se puede determinar en función del número de marcadores en el conjunto. Normalmente, el número de * especies es de 0-20, más preferentemente de 0-15 y, lo más preferentemente, de 1-10, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8. En un conjunto de dos marcadores, se prefiere que el número de * especies sea 1, mientras que en un conjunto de 5 marcadores se prefiere que el número sea 4, mientras que en un conjunto de 6 marcadores se prefiere que el número sea 5. No obstante, el número se puede modificar dependiendo de la estructura química del marcador.

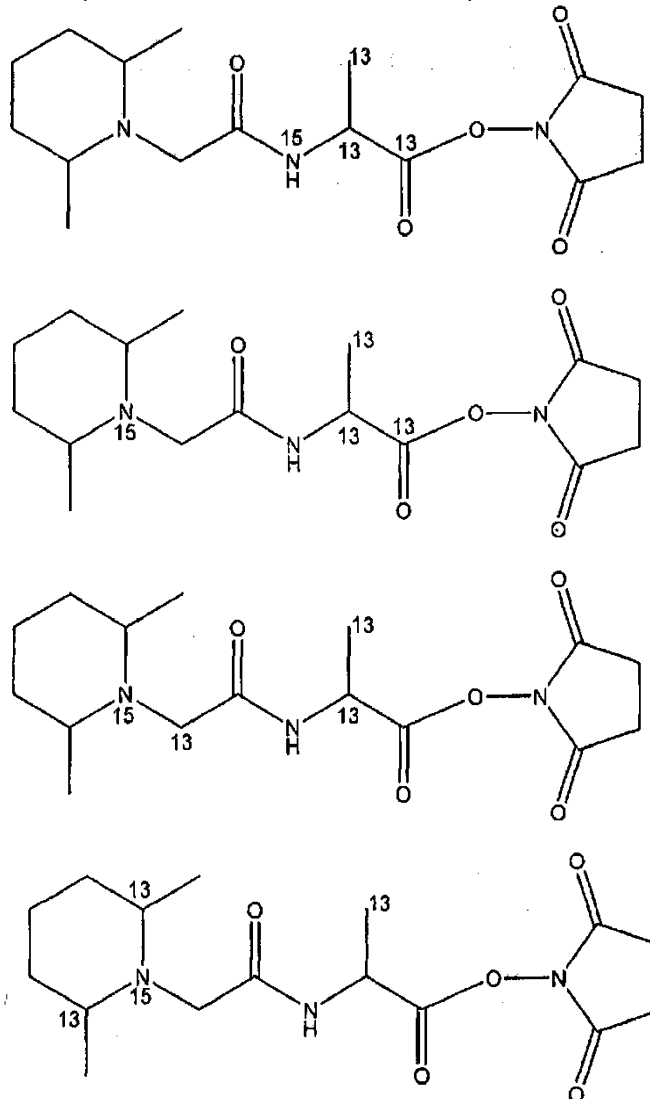
40 Si se desea, las variantes isotópicas de S también se pueden usar como restos ajustadores de masa, si los marcadores contienen uno o más átomos de azufre.

45 En una realización particularmente preferida, en la que el resto ajustador de masa es ^{15}N o ^{13}C , el conjunto de marcadores de masa reactivos comprende dos marcadores de masa que tienen las estructuras siguientes:



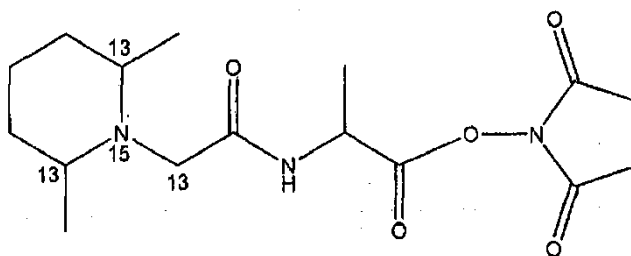
5 Los marcadores de masa anteriores forman un ejemplo de un conjunto de marcadores de masa en tándem dúplex.

En una realización particularmente alternativa, en la que el resto ajustador de masa es ^{15}N o ^{13}C , el conjunto de marcadores de masa reactivos comprende cinco marcadores de masa que tienen las estructuras siguientes:



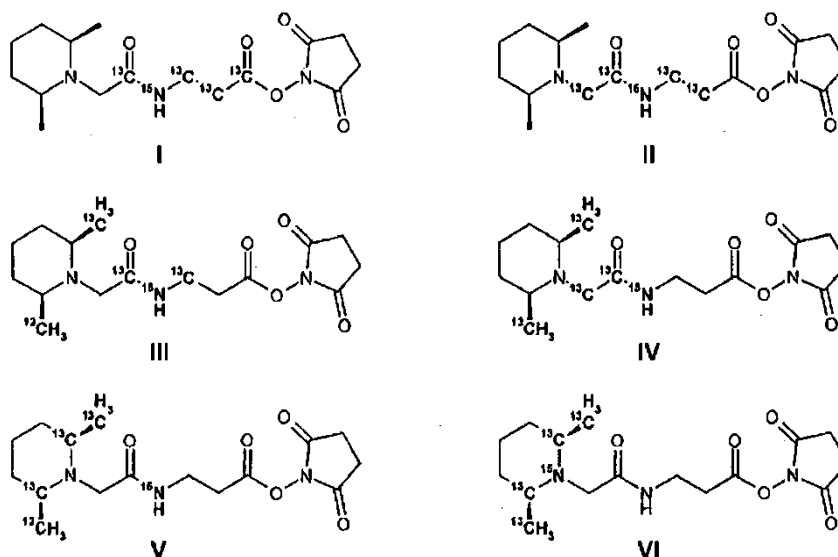
10

15



Los marcadores de masa anteriores forman un ejemplo de un conjunto de marcadores de masa en tándem fiveplex.

- 5 En una realización particularmente alternativa, en la que el resto ajustador de masa es ^{15}N o ^{13}C , el conjunto de marcadores de masa reactivos comprende seis marcadores de masa I-VI que tienen las estructuras siguientes, o estereoisómeros de estas estructuras:



- 15 Los marcadores de masa anteriores forman un ejemplo de un conjunto de marcadores de masa en tándem sixplex.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención puede comprender una etapa adicional de separar el analito diana o un fragmento del mismo de otros componentes en las muestras. Esta etapa de separar puede llevarse a cabo antes de la etapa (a), después de la etapa (a) pero antes de la etapa (b) o durante la etapa (b).

El procedimiento puede también comprender una etapa de digerir cada muestra con al menos una enzima para digerir componentes de las muestras. Esta etapa de digerir puede llevarse a cabo antes de la etapa (a), después de la etapa (a) pero antes de la etapa (b) o durante la etapa (b). En una realización, las muestras se marcan con los marcadores de masa isobáricos antes de la digestión. En otra realización, las muestras se marcan después de la digestión.

En una realización adicional, los marcadores de masa usados en el procedimiento comprenden además un ligando de captura por afinidad. El ligando de captura por afinidad del marcador de masa se une a un contraligando para separar los analitos marcados isobáricamente de los analitos no marcados antes de la etapa (a), después de la etapa (a) pero antes de la etapa (b) o durante la etapa (b). El ligando de captura por afinidad proporciona un medio de enriquecimiento de los analitos de interés, aumentado de este modo la sensibilidad analítica.

Los ligandos de captura por afinidad son ligandos que tienen parejas de unión altamente específicas. Estas parejas de unión permiten que las moléculas marcadas con el ligando sean capturadas de forma selectiva por la pareja de unión. Preferentemente, un soporte sólido se deriva con la pareja de unión de modo que las moléculas marcadas con el ligando de afinidad se pueden capturar de forma selectiva sobre el soporte en fase sólida. Un ligando de captura por afinidad preferido es biotina, que se puede introducir en los marcadores de masa usados en la presente invención mediante procedimientos estándar conocidos en la técnica. En concreto se puede incorporar un residuo de lisina después del resto marcador de masa o el resto de normalización de masa mediante lo cual una biotina reactiva con amina se puede unir a los marcadores de masa (véase, por ejemplo, Geahlen R.L. 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 se puede aplicar iminobiotina. Se dispone de diversos contraligandos de avidina para la biotina, que incluyen avidina y estreptavidina monoméricas y tetraméricas, todas ellas disponibles en una serie de soportes sólidos.

5 Otros ligandos de captura por afinidad incluyen digoxigenina, fluoresceína, restos de nitrofenilo y una serie de epítomos peptídicos, tales como el epítomo c-myc, para el cual existen anticuerpos monoclonales selectivos como contraligandos. Como alternativa, un anticuerpo u otro agente de unión con especificidad para la estructura del
10 marcador de masa se puede producir mediante procedimientos conocidos para un experto en la técnica. Después, se puede construir una matriz de afinidad uniendo dicho agente de unión sobre un soporte sólido tal como una esfera, pocillo o superficie plana en un dispositivo de flujo lateral. Los analitos marcados se purifican después poniéndolos en contacto con la matriz de afinidad en condiciones por las cuales los analitos marcados de masa están unidos por los agentes de unión y se retienen, mientras que todos los materiales no marcados se eliminan mediante, por ejemplo, lavado. Por último, los analitos capturados se pueden recuperar ajustando las condiciones a las que favorecen la liberación del analito marcado de masa capturado tal como un pH bajo o niveles elevados de
15 sal. Preferentemente, las condiciones de pH bajo se usan para evitar la necesidad de la posterior eliminación de los iones de sal que pueden interferir con la EM. Los ligandos de unión a iones metálicos, tal como hexahistidina, que se une fácilmente a iones de Ni^{2+} , también son aplicables. Por ejemplo, las resinas cromatográficas, que presentan iones de Ni^{2+} quelados con ácido iminodiacético están disponibles comercialmente. Estas columnas de níquel inmovilizado se pueden usar para capturar los marcadores de masa. Como alternativa adicional, una funcionalidad de captura de afinidad puede ser reactiva selectivamente con un soporte de fase sólida adecuadamente derivatizado. Por ejemplo, se sabe que el ácido borónico reacciona de forma selectiva con c-dioles vecinos y ligandos químicamente similares, tal como ácido salicilhidroxámico.

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

30 En un aspecto adicional de la invención, una de las muestras comprende un alícuota desencadenante que comprende un analito desencadenante. El analito desencadenante está marcado, preferentemente, con un marcador de masa no isobárico y el procedimiento comprende una etapa adicional después de la etapa (b) y antes de la etapa (c) de detectar iones que tienen una proporción carga-masa equivalente a la proporción carga-masa del analito desencadenante, donde cuando se detectan iones que tienen una proporción carga-masa equivalente a la proporción carga-masa del analito desencadenante, se inicia la etapa (c) en el m/z de la primera proporción carga-masa. La cantidad del analito desencadenante en el alícuota desencadenante es suficiente para servir como desencadenante durante la etapa de detección. Preferentemente, uno de los alícuotas de la muestra de calibración es el alícuota desencadenante.

40 La etapa de detectar iones que tienen la proporción carga-masa equivalente a la proporción carga-masa del analito desencadenante puede comprender barrido iónico de precursores. Normalmente, esto implica dejar que todos los iones pasen de un primer analizador de masas a una célula de colisión, en la que se produce DIC en todos los analitos en la muestra en lugar de un ion seleccionado concreto como en la EM/EM convencional. El analizador de masas final se fija para detectar únicamente el ion indicador del desencadenante, que se puede usar como indicador de que un analito de interés está entrando en el espectrómetro de masas en cualquier punto de tiempo concreto. Cuando el ion indicador del desencadenante se detecta, el espectrómetro de masas se fija para realizar el
45 procedimiento de la presente invención en el o los analitos diana de interés, incluyendo adquisición a través del intervalo m/z completo de los grupos marcadores de masa presentes.

50 En una realización preferida, la presencia de un ion indicador del desencadenante indica que un analito de interés está eluyendo de una columna de CL. Esto "desencadenaría" la ejecución de un experimento EM/EM/EM previamente definido de acuerdo con la presente invención.

55 El alícuota desencadenante puede estar marcado con un marcador de masa isobárico. Como alternativa, el desencadenante puede no ser un analito marcado con un marcador de masa isobárico. El desencadenante puede ser cualquier otro analito marcado que co-eluye o sustancialmente co-eluye con el analito marcado de interés durante la CL. El marcador del analito desencadenante puede tener una masa diferente a la de los marcadores de masa isobáricos de la muestra de calibración. Por ejemplo, en una realización, la muestra de calibración comprende alícuotas de un analito marcado diferencialmente con marcadores de masa isobáricos y comprende además un alícuota del analito que está marcado con un marcador de masa químicamente idéntico pero isotópicamente distinto, preferentemente con una diferencia de masa de 5 Da con respecto a la de los marcadores de masa isobáricos. El
60 marcador de masa isotópicamente distinto podría servir como "desencadenante". Durante la fase EM del análisis, cada analito presente en la muestra de calibración que porta los marcadores isotópicamente distintos e isobáricos aparecerán como un par de picos separados por la diferencia de masas entre los marcadores isotópicamente distintos e isobáricos y donde el analito portador del marcador isotópicamente distinto está presente en una cantidad fácilmente detectable. El espectrómetro de masas está programado para realizar un experimento EM/EM/EM exclusivo sobre el analito marcado isobáricamente en dichos pares, desencadenando de este modo el análisis
65 cuantitativo de los analitos de interés.

En una realización preferida, el desencadenante marcador de masa isotópicamente distinto comprende sustituyentes no isotópicos y los marcadores de masa isobáricos comprenden una pluralidad de sustituyentes isotópicos, preferentemente los sustituyentes isotópicos ^2H , ^{15}N , ^{18}O , o ^{13}C . Esto proporciona una diferencia de masa entre los analitos de la muestra de calibración marcada con marcadores de masa isobáricos y el analito marcado con el marcador desencadenante. Dado que el marcador desencadenante no comprende sustituyentes isotópicos, este marcador se puede usar en grandes cantidades si se requiere sin la necesidad de costoso marcaje con isótopos.

La cantidad de analito en el alícuota desencadenante es, preferentemente, más grande que la cantidad de analito presente en las otras muestras, incluyendo las muestras de ensayo y las muestras de calibración. Una cantidad más grande del analito desencadenante en comparación con los analitos en las otras muestras garantiza que el analito desencadenante se detectará primero y, después, desencadenará un barrido para la selección de iones que tienen la primera proporción masa-carga en la etapa (c) de acuerdo con el procedimiento de la presente invención. Preferentemente, la proporción de la cantidad del analito en el alícuota desencadenante en comparación con la cantidad de analito en las demás muestras es de 2:1 o más, más preferentemente 3:1 o más, más preferentemente 9:1 o más y lo más preferentemente 27:1 o más. Una cantidad mayor del analito en el alícuota desencadenante en comparación con el analito en las otras muestras es ventajosa porque facilita la detección del analito desencadenante. Por ejemplo, cuando se muestra en las Figuras 31a a 31d, cuanto mayor es la proporción del alícuota desencadenante ((TMT⁰) en comparación con plasma marcado con (TMT⁰), mayor es el periodo de tiempo entre la detección del desencadenante y la siguiente, bordes principales de cada pico mostrados en el cromatograma.

Como se describe en el presente documento, un dispositivo de espectrometría de masas para analizar uno o más analitos diana, donde el dispositivo comprende:

- (i) un medio para introducir dos o más muestras, que puede comprender el uno o más analitos diana, donde cada muestra está marcada de forma diferencial con un marcador de masa o una combinación de marcadores de masa, donde cada marcador de masa es un marcador de masa isobárico que comprende un grupo marcador de masa con espectrometría de masas distinta.
- (ii) un medio para seleccionar iones que tienen una primera proporción masa-carga equivalente a un analito diana marcado con un número específico de los marcadores de masa.
- (iii) un medio para fragmentar iones de la primera proporción masa-carga en una pluralidad de iones de fragmentos, donde la proporción de la pluralidad de iones de fragmentos comprende al menos un marcador de masa intacto.
- (iv) un medio para seleccionar iones que tienen una segunda proporción masa-carga equivalente a un fragmento del analito diana que comprende al menos un marcador de masa intacto.
- (v) un medio para fragmentar iones de la segunda proporción masa-carga en una pluralidad de iones de fragmentos adicionales, donde la proporción de los iones de fragmentos adicionales son iones de grupos marcadores de masa de los marcadores de masa; y
- (vi) un medio adecuado para seleccionar los iones de un intervalo de proporciones masa-carga equivalentes al intervalo de proporciones masa-carga de los grupos marcadores de masa y adecuados para producir un espectro de masas de los grupos marcadores de masa.

El dispositivo descrito es ventajoso porque el medio para seleccionar iones (ii), (iv) y (vi) solo se requiere para seleccionar una proporción masa-carga específica o un intervalo de las proporciones masa-carga pequeño. Esto permite al dispositivo que la fabricación sea simple y fácil y de un tamaño relativamente pequeño.- El dispositivo se puede fabricar para análisis de un analito diana específico y, por tanto, el medio para seleccionar iones en las etapas (ii) and (iv) solo tienen que ser capaces de seleccionar la primera las proporción masa-carga y la segunda proporción masa-carga para el analito diana específico. Por tanto, el dispositivo puede ser adecuado para, por ejemplo, usarse en el centro de atención con fines diagnósticos y eliminará la necesidad de enviar las muestras a laboratorios y reducirá el tiempo requerido para el diagnóstico.

El dispositivo descrito es adecuado para llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con la presente invención, donde el procedimiento comprende una tercera etapa de seleccionar iones equivalentes al intervalo de los grupos marcadores de masa. De acuerdo con lo anterior, la discusión anterior sobre el procedimiento de la presente invención que incluye las muestras, analitos, marcadores de masa, etapas de selección, etapas de fragmentación, que producen un espectro de masas y cuantifican el analito diana también se aplica al dispositivo usado en la presente invención,

El medio adecuado para seleccionar los iones de los grupos marcadores de masa selecciona un intervalo de proporciones masa-carga que depende del intervalo de masa de los grupos marcadores de masa en los marcadores de masa usados para marcar el uno o más analitos diana. De acuerdo con lo anterior, este intervalo no está particularmente limitado. El medio adecuado para seleccionar los iones de los grupos marcadores de masa puede, por ejemplo, seleccionar un intervalo de 15 Th de las proporciones carga-masa, un intervalo de 8Th de las proporciones carga-masa, intervalo de 5Th de las proporciones carga-masa o un intervalo de 3Th de las proporciones carga-masa.

Cuando el medio adecuado para seleccionar los iones de los grupos marcadores de masa selecciona un intervalo de 8 Th , el intervalo puede ser de 124 a 131.

5 Cuando el medio adecuado para seleccionar los iones de los grupos marcadores de masa selecciona un intervalo de 6 Th , el intervalo puede ser de 126 a 131, que corresponde a las masas de los grupos marcadores de masa del conjunto TMTsixplex de marcadores de masa tratados anteriormente.

10 Cuando el medio adecuado para seleccionar los iones de los grupos marcadores de masa selecciona un intervalo de 5 Th , el intervalo puede ser de 126 a 130 Th , que corresponde a las masas de los grupos marcadores de masa del conjunto fiveplex de marcadores de masa tratados anteriormente.

15 Cuando el medio adecuado para seleccionar los iones de los grupos marcadores de masa selecciona un intervalo de 2 Th , el intervalo puede ser de 126 a 127, que corresponde a las masas de los grupos marcadores de masa del conjunto TMTduplex de marcadores de masa tratados anteriormente.

20 El medio para seleccionar iones, donde una primera proporción masa-carga se fija para seleccionar iones equivalentes a un analito diana marcado con un número específico de marcadores de masa, como se ha tratado anteriormente con respecto al procedimiento de acuerdo con la presente invención. La primera proporción masa-carga depende de la masa del analito diana y de los marcadores de masa o la combinación de marcadores de masa unidos. Como se ha tratado anteriormente con respecto al procedimiento de acuerdo con la presente invención, la primera proporción masa-carga puede ser equivalente a la proporción masa-carga del ion parental no fragmentado del analito diana marcado con un número específico de marcadores de masa. Como alternativa, en una realización, la primera proporción masa-carga es equivalente a la proporción masa-carga de un ion fragmento del analito diana marcado con un número específico de marcadores de masa.

25 El medio para seleccionar iones que tienen una primera proporción masa-carga es, preferentemente, capaz de seleccionar iones inferior o igual a 1500 m/z. La anchura del haz de iones resultante es, preferentemente, ajustable (adaptable) a determinada medida para permitir que el haz iónico seleccionado abarque un intervalo de masas seleccionado, por ejemplo intervalo de 50 Dalton, intervalo de 20 Dalton o , intervalo de 5 Dalton. Más preferentemente, el haz iónico seleccionado tiene una resolución unitaria y solo abarca 1 Dalton. Lo más preferentemente, la anchura de los iones seleccionado se ajusta a menos de 0,1 Dalton.

30 El medio para seleccionar iones que tienen una segunda proporción masa-carga se fija para seleccionar iones equivalentes a un fragmento del analito diana que comprende al menos un marcador de masa intacto. La segunda proporción masa-carga depende de la masa del analito diana y del ion de fragmentos seleccionado que comprende al menos un marcador de masa intacto. Preferentemente, la segunda proporción masa-carga es equivalente a un ion de un fragmento del analito diana que comprende al menos un marcador de masa intacto que es único del analito diana. Como se tratado anteriormente con respecto al procedimiento de acuerdo con la presente invención, la segunda proporción masa-carga puede ser equivalente a un ion de serie a, un ion de serie b, un ion de serie c, un ion de serie x, un ion de serie y o un ion de serie z. Preferentemente, la proporción masa-carga es un ion y o un ion b que tiene una proporción masa-carga más alta en comparación con la primera proporción masa-carga.

35 El medio para seleccionar iones que tienen una segunda proporción masa-carga más es, preferentemente, capaz de seleccionar únicamente iones menores o iguales a 1.500 Dalton. El medio para seleccionar iones que tienen una segunda proporción masa-carga más es, la proporción es, preferentemente, la única adecuada para seleccionar iones sobre un intervalo de 50 Dalton, más preferentemente de más de 20 en el intervalo de 20 Dalton,

40 El dispositivo descrito puede comprender un medio adicional de producir un espectro de masas de la pluralidad de iones de fragmentos desde los iones de la primera proporción masa-carga. Como se ha tratado anteriormente con respecto al procedimientos de acuerdo con la presente invención, en un dispositivo descrito por los medios (ii), (iii), (iv), (v) and (vi) y se separar cuadrupolos en el espectrómetro de masas. En un dispositivo alternativo, los medios (II), (III), (IV), (V) y (VI), (VII) pueden incluir una cualquiera o más de las características siguientes.

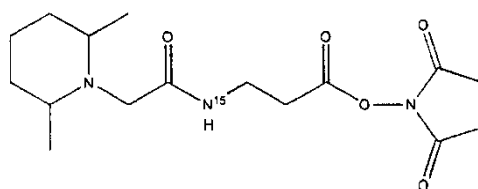
45 El dispositivo comprende trampas con iones, incluyendo tiras no iónicas e incluye las trampas iónicas tales como ABI 4000 QTRAP, Orbitraps, QIT-Tof de Kratos (Cuadrupol-Iontrap-Tof). Los tipos de dispositivos tratados tratados anteriormente que se pueden usar para llevar el procedimiento de la presente invención también se pueden usar en el dispositivo usando en la presente invención.

La invención se describirá mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

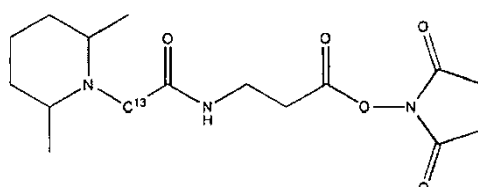
60 **Ejemplo 1. Análisis EM/EM Y EN/EM/EM del péptido marcado VATVSLPR**

Para demostrar el principio de la invención, incluida la generación de grupos indicadores de masa de los marcadores de masa durante el análisis EM/EM y EM/EM/EM se prepararon dos muestras de un péptido VATVSLPR. Una muestra se marcó con y la otra muestra se marcó con TMT²-127.

65



TMT²-126 (mass of reporter group)



TMT²-127 (mass of reporter group)

5 Después, las dos muestras se mezclaron en una proporción 2:1 de TMT²-126:TMT²-127.

La mezcla de muestras se analizó mediante EM/EM usando LCQ deca (Thermo). La figura 1a muestra el perfil EM/EM, donde el ion b1 (325) representa el ion b1 del péptido (V) unido a un marcador de masa intacto y el ion b2 (396) representa el ion b2 del péptido (VA) unido a un marcador de masa intacto. La figura 1b muestra un zoom de los grupos marcadores de masa (126 y 127) que se han escindido del resto de marcadores de masa. Los picos de los grupos marcadores de masa en la figura 1b muestran la proporción correcta para la cantidad de cada muestra 2:1,

Después, el ion b1 se seleccionó y se sometió a fragmentación usando LCQ deca (Thermo) (EM/EM/EM). La Figura 2a muestra el espectro EM/EM/EM del ion b1 fragmentado donde el pico en 226 es de un marcador de masa intacto y el pico en 297 es del ion a1. La figura 2b muestra un zoom de los grupos marcadores de masa (126 y 127) del espectro EM/EM/EM que muestra que la proporción correcta de 2:1 está conservada. Esto muestra que una proporción del ion de fragmento producido en EM/EM comprendía marcadores de masa intactos que después se pudieron seleccionar en EM/EM/EM para la posterior fragmentación para liberar grupos marcadores de masa.

Ejemplo 2. Análisis EM/EM Y EN/EM/EM de mezclas de péptidos isobáricos marcados

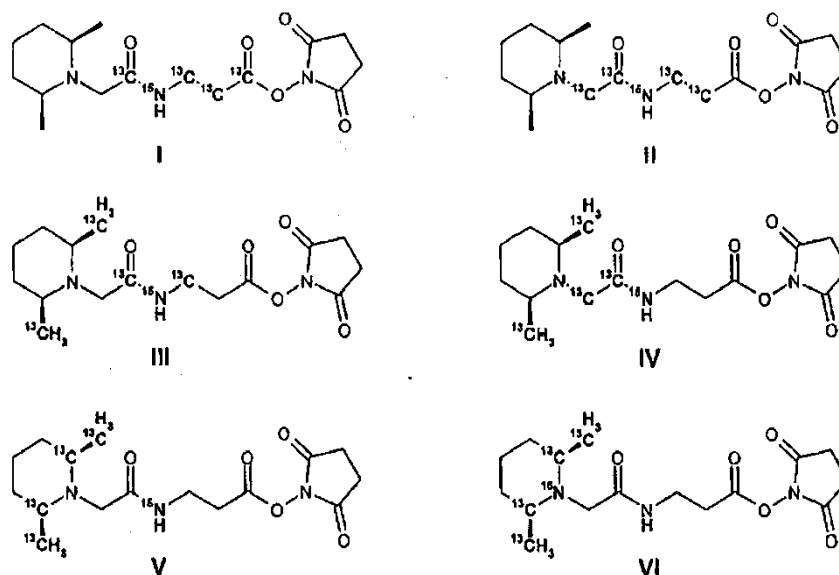
Para demostrar el principio de la invención, incluida la generación de grupos indicadores de masa de los marcadores de masa durante el análisis EM/EM y EM/EM/EM usando marcadores de masa isobáricos permite una cuantificación precisa de analitos en una mezcla compleja, se prepararon las siguientes soluciones peptídicas.

Tabla 2

SIXPLEX							
pep	sec	126	127	128	129	130	131
1	VAFSLR	1	3	5	5	3	1
2	AVFSLR	1	1	1	4	4	4
3	FAVSLR	4	4	4	1	1	1
6	LAFSVR	5	3	1	1	3	5

Se prepararon muestras separadas de cada péptido 1, 2, 3 y 6 y cada una redividió en seis alícuotas. Cada alícuota comprendía una cantidad predeterminada del péptido y la proporción relativa de cada péptido en cada alícuota se muestra en la tabla anterior. Por ejemplo, el péptido 1 se dividió en seis alícuotas que tienen una proporción relativa del péptido de 1:3:5:5:3:1. Cada uno de los seis alícuotas para cada péptido se marcó con un marcador de masa TMTsixplex diferente. Las estructuras de los marcadores de masa usados para marcar los alícuotas peptídicas se muestran a continuación: TMT⁶-126 (I), TMT⁶-127 (II), TMT⁶-128 (III), TMT⁶-129 (IV), TMT⁶-130 (V) y TMT⁶-131 (VI).

Cada péptido está unido a un marcador de masa en el extremo N y en cada residuo de lisina.



5

Los seis alícuotas del péptido 1 se mezclaron después (en lo sucesivo en el presente documento denominados mezcla de péptido 1) y se analizaron primero mediante EM, después mediante EM/EM y después el ion b1 se seleccionó para EM/EM/EM. Esto se repitió para cada mezcla peptídica individual. Los espectros EM, EM/EM Y EN/EM/EM para cada mezcla peptídica se tratan más adelante.

10

Péptido 1

La figura 3 muestra un espectro EM de la mezcla del péptido 1, donde el ion 2^+ precursor en m/z 461 y el ion precursor 1^+ en m/z 921 es el péptido 1 unido a un marcador de masa. Los picos en m/z 461 y m/z 921 muestran el péptido en dos estados de carga diferentes.

15

La figura 4 muestra un espectro EM/EM de la mezcla del péptido 1, donde el ion b1 en m/z 329 es TMT⁶-130 (V) unido a un marcador de masa intacto.

20

La Figura 5^a muestra un zoom del espectro EM/EM de la Figura 4 que muestra los picos de los seis grupos de marcadores de masa diferentes. La proporción correcta de 1:3:5:5:3:1 se muestra mediante las alturas de los picos.

La Figura 5b muestra un zoom del espectro de EM/EM/EM tras la selección del ion b-1 unido a un marcador de masa intacto y la fragmentación adicional. La proporción correcta de 1:3:5:5:3:1 también se muestra mediante las alturas de los picos para los grupos marcadores de masa en EM/EM/EM.

25

Péptido 2

La figura 6 muestra un espectro EM de la mezcla del péptido 2, donde el ion 2^+ precursor en m/z 461 y el ion precursor 1^+ en m/z 921 es el péptido 2 unido a un marcador de masa.

30

La figura 7 muestra un espectro EM/EM de la mezcla del péptido 2, donde el ion b1 en m/z 301 es A unido a un marcador de masa intacto.

35

La Figura 8a muestra un zoom del espectro EM/EM de la Figura 7 que muestra los picos de los seis grupos de marcadores de masa diferentes. La proporción correcta de 1:1:1:4:4:4 se muestra mediante las alturas de los picos.

40

La Figura 8b muestra un zoom del espectro de EM/EM/EM tras la selección del ion b-1 unido a un marcador de masa intacto y la fragmentación adicional. La proporción correcta de 1:1:1:4:4:4 también se muestra mediante las alturas de los picos para los grupos marcadores de masa en EM/EM/EM.

Péptido 3

La figura 9 muestra un espectro EM de la mezcla del péptido 3, donde el ion 2^+ precursor en m/z 461 y el ion precursor 1^+ en m/z 921 es el péptido 3 unido a un marcador de masa.

45

La figura 10 muestra un espectro EM/EM de la mezcla del péptido 3, donde el ion b1 en m/z 377 es F unido a un marcador de masa intacto.

50

La Figura 11a muestra un zoom del espectro EM/EM de la Figura 10 que muestra los picos de los seis grupos de marcadores de masa diferentes. La proporción correcta de 4:4:4:1:1:1 se muestra mediante las alturas de los picos.

5 La Figura 11b muestra un zoom del espectro de EM/EM/EM tras la selección del ion b-1 unido a un marcador de masa intacto y la fragmentación adicional. La proporción correcta de 4:4:4:1:1:1 también se muestra mediante las alturas de los picos para los grupos marcadores de masa en EM/EM/EM.

Péptido 6

10 La figura 12 muestra un espectro EM de la mezcla del péptido 6, donde el ion 2^+ precursor en m/z 461 y el ion precursor 1^+ en m/z 921 es el péptido 3 unido a un marcador de masa.

15 La figura 13 muestra un espectro EM/EM de la mezcla del péptido 6, donde el ion b1 en m/z 343 es L unido a un marcador de masa intacto.

La Figura 14a muestra un zoom del espectro EM/EM de la Figura 13 que muestra los picos de los seis grupos de marcadores de masa diferentes. La proporción correcta de 5:3:1:1:3:5 se muestra mediante las alturas de los picos.

20 La Figura 14b muestra un zoom del espectro de EM/EM/EM tras la selección del ion b-1 unido a un marcador de masa intacto y la fragmentación adicional. La proporción correcta de 5:3:1:1:3:5 también se muestra mediante las alturas de los picos para los grupos marcadores de masa en EM/EM/EM.

25 Los análisis anteriores mediante EM, EM/EM y EM/EM/EM de las mezclas peptídicas 1, 2, 3 y 6 muestran que en el EM se muestran iones precursores comunes porque ambos péptidos y los marcadores de masa son todos isobáricos. En EM/EM se producen diferentes fragmentos del ion b1 tras una etapa de fragmentación, en la que los iones b1 están unidos a un marcador de masa intacto. Cada péptido produce un ion b1 diferente. En EM/EM/EM. la selección de la proporción masa-carga del ion b1 unido a un marcador de masa intacto seguido de fragmentación genera picos correspondientes a los grupos marcadores de masa, donde los picos de los seis grupos marcadores de masa diferentes corresponden a la proporción correcta de la mezcla peptídica marcada mostrada en la Tabla 2 anterior,

Después, se llevaron a cabo análisis EM, EM/EM y EN/EM/EM en las siguientes mezclas peptídicas:

35 Péptido 1 y péptido 6

La mezcla de seis alícuotas del péptido 1 se mezcló con la mezcla de seis alícuotas del péptido 6 y se analizó como en lo que antecede.

40 La figura 15 muestra el espectro EM de la mezcla del péptido 1 y el péptido 6, en el ambos péptidos tienen el mismo ion 2^+ precursor en m/z 461 y el ion precursor 1^+ en m/z 921 representa cada péptido unido a un marcador de masa.

45 La figura 16 muestra un espectro EM/EM de la mezcla del péptido 1 y el péptido 6, donde el ion b1 en m/z 329 es del péptido 1 y el ion b1 en m/z 343 es del péptido 6.

50 La figura 17 muestra un zoom del espectro EM/EM de la figura 16 que muestra los picos de los seis grupos de marcadores de masa diferentes tanto del péptido 1 como del péptido 6. La altura de los seis picos para cada grupo marcador de masa no corresponde a la proporción correcta para cada péptido 1 o péptido 6. Esto es porque en Hem/EM se seleccionaron ambos péptidos isobáricos y, por tanto, los grupos indicadores de masa son de ambos péptidos marcados.

55 La Figura 18a muestra un zoom del espectro de EM/EM/EM tras la selección del ion b-1 para el péptido 1 y la fragmentación adicional. La proporción correcta de 1:3:5:5:3:1 se muestra mediante las alturas de los picos para los grupos marcadores de masa porque solo el péptido 1 tienen un ion b1 de masa 329 y, por tanto, los grupos marcadores de masa solo son del péptido 1.

60 La Figura 18b muestra un zoom del espectro de EM/EM/EM tras la selección del ion b-1 para el péptido 6 y la fragmentación adicional. La proporción correcta de 5:3:1:1:3:5 se muestra mediante las alturas de los picos para los grupos marcadores de masa porque solo el péptido 6 tienen un ion b1 de masa 343 y, por tanto, los grupos marcadores de masa solo son del péptido 6.

Péptido 2 y péptido 3

65 La mezcla de seis alícuotas del péptido 2 se mezcló con la mezcla de seis alícuotas del péptido 3 y se analizó como en lo que antecede.

La figura 19 muestra el espectro EM de la mezcla del péptido 2 y el péptido 3, en el ambos péptidos tienen el mismo ion 2^+ precursor en m/z 461 y el ion precursor 1^+ en m/z 921 representa cada péptido unido a un marcador de masa.

5 La figura 20 muestra un espectro EM/EM de la mezcla del péptido 2 y el péptido 3, donde el ion b_1 en m/z 301 es del péptido 2 y el ion b_1 en m/z 377 es del péptido 3.

10 La figura 21 muestra un zoom del espectro EM/EM de la figura 20 que muestra los picos de los seis grupos de marcadores de masa diferentes tanto del péptido 2 como del péptido 3, La altura de los seis picos para cada grupo marcador de masa no corresponde a la proporción correcta para cada péptido 2 o péptido 3. Esto es porque en Hem/EM se seleccionaron ambos péptidos isobáricos y, por tanto, los grupos indicadores de masa son de ambos péptidos marcados.

15 La Figura 22a muestra un zoom del espectro de EM/EM/EM tras la selección del ion b_1 para el péptido 2 y la fragmentación adicional. La proporción correcta de 1:1:1:4:4:4 se muestra mediante las alturas de los picos para los grupos marcadores de masa porque solo el péptido 2 tienen un ion b_1 de masa 301 y, por tanto, los grupos marcadores de masa solo son del péptido 2.

20 La Figura 22b muestra un zoom del espectro de EM/EM/EM tras la selección del ion b_1 para el péptido 3 y la fragmentación adicional. La proporción correcta de 4:4:4:1:1:1 se muestra mediante las alturas de los picos para los grupos marcadores de masa porque solo el péptido 1 tienen un ion b_1 de masa 377 y, por tanto, los grupos marcadores de masa solo son del péptido 3.

25 Los análisis anteriores mediante EM, EM/EM y EM/EM/EM de las mezclas peptídicas 1 y 6 y la mezcla peptídica 2 y 3 muestra la cuantificación mediante EM/EM es imprecisa cuando una mezcla compleja del péptido se analiza comprendiendo péptidos isobáricos. No obstante, este problema se supera mediante la selección del ion b_1 para un péptido, donde el ion b_1 comprende un marcador de masa intacto y sometiendo al ion b_1 a fragmentación para liberar los grupos marcadores de masa. Las alturas de los picos de los grupos marcadores de masa tras EM/EM/EM muestran la proporción correcta de cada marcador que representa cada alícuota del péptido. La etapa de la
30 selección del ion b_1 y la fragmentación se puede repetir después para cada péptido en la mezcla,

Ejemplo 3. Análisis EM/EM del péptido marcado AEFAEVSK

35 El péptido AEFAEVSK se marcó con el marcador de masa TMTzero (la estructura de este marcador se muestra en la figura 23) y se analizó mediante EM/EM. El péptido se marca con dos marcadores, uno en la lisina del extremo N y uno en el extremo C. La Figura 23 muestra el espectro completo de EM/EM del péptido marcado. El pico marcado A (126) representa el m/z del grupo marcador de masa. El pico marcado B (225) representa el m/z del marcador de masa completo. El pico marcado C (1175,7 y estado de carga 1) es un pseudoion y que representa el m/z del péptido y una porción del marcador de masa, una pérdida de carga de 1 y una pérdida de masa de 153 Da, lo que tiene
40 como resultado la pérdida de un grupo marcador de masa y el grupo carbonilo vecino. Generalmente, esta pérdida puede haberse producido en el marcador amino terminal así como en el marcador de lisina. Dado que el péptido tiene un marcador de masa en el extremo N y un marcador de masa en la lisina del extremo C, todavía hay presente un marcador de masa intacto en el pseudoion y tras el análisis EM/EM.

45 Ejemplo 4. Análisis EM/EM del péptido marcado VLEPTLK

El péptido VLEPTLK se marcó con TMTduplex (TMT^2 -126 and TMT^2 -127, como se muestra en la Figura 24) y se analizó mediante EM/EM. El péptido se marca con dos marcadores, uno en la lisina del extremo N y uno en el extremo C. La Figura 24 muestra el espectro completo de EM/EM del péptido marcado. Los picos marcados A (126 y 127) representan el m/z del grupo marcador de masa. El pico marcado B (226) representa el m/z del marcador de masa completo. El pico marcado C (1096,7) y el pico marcado D (1095,7) representan los pseudoiones y para cada péptido marcado diferente, como se muestra en la Figura 24, mediante pérdida de 153 Da (TMT^2 -126) y pérdida de 154 Da (TMT^2 -127) Generalmente, esta pérdida puede haberse producido en el marcador amino terminal así como en el marcador de lisina. Dado que el péptido tiene un marcador de masa en el extremo N y un marcador de masa en la lisina del extremo C, todavía hay presente un marcador de masa intacto en el péptido tras el análisis EM/EM.
55

Ejemplo 5. Análisis EM/EM del péptido marcado LVNEVTEFAK

60 EL péptido LVNEVTEFAK se marcó con dos marcadores de masa. Un alícuota se marcó con TMTzero (grupo indicador de masa de 126 Da y estructura mostrada en la Figura 23) y un alícuota se marcó con TMTsixplex (TMT^6 -131). En cada alícuota, el péptido se marca con dos marcadores, uno en el extremo N y uno en la lisina C-terminal.

65 La Figura 25a muestra el espectro EM/EM del péptido marcado con TMTzero y la Figura 25b muestra el espectro EM/EM del péptido marcado con TMTsixplex (TMT^6 -131). Existe una diferencia de masa de 10 Th debido a la unión de dos marcadores de masa en cada péptido.

La Figura 26a muestra un zoom de ion y3 de la Figura 25a y la Figura 26b muestra un zoom del ion y3 de la Figura 25b. Cada ion y3 comprende un marcador de masa intacto, como se muestra con la diferencia 5 Th entre el ion y3 en la figura 26a y la Figura 26b.

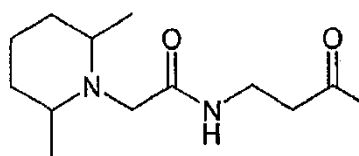
5 La Figura 27a muestra un zoom de ion y5 de la Figura 25a y la Figura 27b muestra un zoom del ion y5 de la Figura 25b. Cada ion y5 comprende un marcador de masa intacto, como se muestra con la diferencia 5 Th entre el ion y5 en la Figura 27a y el ion y5 en la Figura 27b.

10 La Figura 28 a muestra un zoom de ion b7 de la Figura 25a y la Figura 28b muestra un zoom del ion b7 de la Figura 25b. Cada ion b7 comprende un marcador de masa intacto, como se muestra con la diferencia 5 Th entre el ion b7 en la Figura 28a y el ion b7 en la Figura 28b.

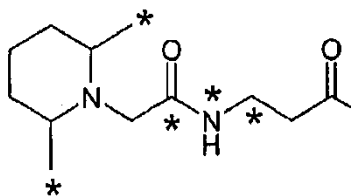
15 Las Figuras 26 a 28 muestran que después del EM/EM, una serie de iones de fragmentos diferentes del péptido todavía comprenden un marcador de masa intacto y, por tanto, cualquiera de estos iones se puede seleccionar en EM/EM/EM y se fragmentará a proporcionar grupos indicadores de masa adecuados para la cuantificación precisa del péptido.

Ejemplo 6. Análisis EM/EM del péptido marcado LVTDLTK

20 EL péptido LVTDLTK se marcó con dos marcadores de masa. Un alícuota del péptido se marcó con el marcador de mas TMTzero (masa total 224 Da) y un alícuota se marcó con TMTsixplex (TMT⁶-128, masa total 229 Da). Los péptidos marcados con TMTzero y TMT⁶-128 tienen dos marcadores de masa unidos, uno en el extremo N y uno en la lisina, dando una diferencia de masa de 10 Da entre los dos péptidos marcados.



TMT⁰ - Tag mass 224 Da



TMT⁶128 - Tag mass 229 Da

25 Los alícuotas marcados de forma diferente se mezclaron después y se analizaron con EM. La Figura 29^a muestra un espectro de masas de los iones precursores doblemente cargados en m/z 619,4 (péptido marcado con TMTzero) y m/z 624,4 (péptido marcado con TMT⁶-128). Una diferencia de masa de 10 Da entre los dos péptidos marcados da una diferencia en m/z de 5 Th entre los precursores doblemente cargados.

Ejemplo 7. Análisis EM/EM del péptido marcado HPDYSVLLLLR

35 El péptido HPDYSVLLLLR se marcó con dos marcadores de masa TMTzero y TMT⁶-128, como se describe en el ejemplo 6. Los péptidos marcados TMTzero y TMT⁶-128 tienen un marcador unido en el extremo N, dando una diferencia de masa de 5 Da entre los dos péptidos marcados.

40 La Figura 29b muestra el espectro EM de los iones precursores con carga triple en m/z 512,62 (péptido marcado con TMTzero) y m/z 514,30 (péptido marcado con TMT⁶-128). Una diferencia de masa de 5 Da entre los dos péptidos marcados da una diferencia en m/z de 1,66 Th entre los precursores con carga triple.

Ejemplo 8. Análisis de péptidos plasmáticos marcados mediante cromatografía y MRM

45 Los péptidos plasmáticos A a M, como se muestra en la tabla 3 siguiente, se marcaron con marcadores de masa TMTzero and TMT⁶-127. Las muestras de péptido marcado se mezclaron en una proporción de 1:1 y, en el primer caso, se analizaron mediante adquisición de datos independiente (ida) en un 4000 QTRAP para obtener información sobre el ion del fragmento EM/EM. Esto se realizó para determinar transiciones Q1 (ion precursor seleccionado en la etapa c) del procedimiento de acuerdo con la presente invención) y Q3 (EM/EM del ion de fragmento seleccionado en la etapa e) óptimos para las versiones marcadas con TMTzero y TMT⁶-127 de los péptidos seleccionados para su análisis posterior en las etapas f) a h) (EM/EM/EM). La energía de colisión para fragmentar el péptido para la detección óptima de la transición Q3 también se determinó.

55 Antes del análisis mediante espectrometría de masas, la muestra del péptido marcado se resuelve mediante cromatografía en fase inversa en interfaz con el espectrómetro de masas. Las propiedades cromatográficas (tiempo de retención) se definieron a partir del análisis ida.

- La Tabla 3 enumera las transiciones Q1 y Q4 diferentes para un conjunto de péptidos marcados con TMTzero y TMT⁶-127, el estado de carga de los iones precursores marcados y el tiempo de retención para cada péptido también se proporcionan. Las transiciones Q1 y Q3 varían entre las versiones marcadas con TMTzero y TMT⁶-127 del péptido; esto depende del número de marcadores unidos al ion precursor y su estado de carga (transición Q1) y el número de marcadores unidos al ion de fragmento (transición Q3). En todos los casos, las transiciones Q3 tenían una sola carga. La información enumerada en la Tabla 3 se requirió para la detección de los péptidos seleccionados mediante el procedimiento de acuerdo con la presente invención.
- La Figura 30 muestra el cromatograma iónico MRM para los péptidos marcados con TMTzero y TMT⁶-127 de la Tabla 3, en la que los péptidos marcados se pasaron por un gradiente de 30 minutos con 1 µg de la carga proteica o/c (500 ng de cada alícuota de péptido marcado). Se puede ver a partir de la Figura 30 que los péptidos marcados, mezclados en una proporción 1:1, eluyen de forma simultánea.

Tabla 3

	Proteína	Secuencia peptídica	Estado de carga	Tiempo de retención (min)	CE	Q1 TMTzero	Q3 TMTzero	Q1 TMT ⁵ -127	Q3 TMT ⁵ -127
A	Albúmina	^{TMT} LVTDLTK ^{TMT}	2	31,9	34	619,38	585,40 (y3)	624,38	590,40 (y3)
B	Albúmina	^{TMT} LVNEVTEFAK ^{TMT}	2	35,3	43	799,48	819,46 (y5)	804,48	824,46 (y5)
C	Albúmina	^{TMT} LVNEVTEFAK ^{TMT}	2	35,3	43	799,48	589,38 (y3)	804,48	594,38 (y3)
D	IgG	^{TMT} ALPAPIEK ^{TMT}	2	29,3	35	643,90	878,55 (y6)	648,90	883-55(y6)
E	Serotransferina	^{TMT} SASDLWDNLK ^{TMT}	2	34,1	46	849,47	598,40 (y3)	854,47	603,40 (y3)
F	Haptoglobulina	^{TMT} ILGGHLDK ^{TMT}	3	10,5	32	457,94	670,42(y4)	461,31	675,42 (y4)
G	Complemento C3	^{TMT} SLSPYVIVPLK ^{TMT}	2	20,7	60	925,55	581,41 (y3)	930,55	586,41 (y3)
H	α2 Macroglobulina	^{TMT} LVHVEEPTETVR	3	6,8	38	590,66	839,44 (y7)	592,33	839,44 (y7)
I	Albúmina	^{TMT} FQNALLR	2	13,9	43	592,90	1031,76 (pseudoy)	595,90	1034-7(seudoy)
J	Albúmina	^{TMT} FQNALLR	2	13,9	43	592,90	798,50 (b5)	595,40	803,50 (b5)
K	IgG	^{TMT} LTVDKMT	2	9,0	29	512,29	653,39 (b4)	517,29	658,39 (b4)
L	IgG	^{TMT} DTLMISR	2	10,0	40	530,30	906,60(pseudoy)	532,80	909,30(seudoy)
M	IgG	^{TMT} DTLMISR	2	10,0	40	530,30	685,40 (b4)	532,80	690,40 (b4)

Ejemplo 9

- Para demostrar la precisión y la reproducibilidad de la cuantificación usando péptidos marcados con TMTzero y TMTsixplex) combinados con MRM, los péptidos plasmáticos marcados con TMTzero y TMT⁶-127 se mezclaron en proporciones diferentes y se evaluaron las transiciones MRM de las transiciones peptídicas marcadas A-M (Tabla 3). Las muestras marcadas con TMTzero:TMT⁶-127 se combinaron en proporciones 1:1, 3:1, 9:1 y 27:1; cada proporción se analizó por triplicado. Las Figuras 31a a d muestran los cromatogramas iónicos MRM para un péptido K seleccionado en diferentes proporciones medidas.
- Las proporciones se compararon para todas las transiciones peptídicas A-M (Tabla 3) extrayendo las áreas de los picos para cada transición MRM de TMTzero y TMT⁶-127 usando una herramienta de integración de picos automática BioAnalyst®. La tabla 4 muestra las proporciones medias observadas (media de tres mediciones) para todos los péptidos seleccionados y el coeficiente de la varianza para cada uno. Los péptidos se enumeran en el orden del tiempo de retención en la columna de fase inversa (1-13 numerados entre paréntesis). Se puede observar que las proporciones medias observadas se correlacionan muy bien con las proporciones previstas. Adicionalmente, el 82% de las proporciones observadas tienen coeficientes de variación inferiores al 5% (mediciones por triplicado). Las proporciones observadas que mostraron las desviaciones mayores con respecto a las proporciones previstas y tenían coeficientes de variación más altos se pudieron explicar, ya que estas mediciones procedían de los péptidos más hidrófobos (tiempos de retención más altos). Para estos péptidos se observa un deterioro en la forma del pico debido a la unión más fuerte de estos péptidos a la resina de fase inversa y las concentraciones más altas de acetonitrilo, el disolvente en elución, requerida para su elución causando inestabilidad de la electropulverización. Por tanto, los péptidos con tiempos de retención anteriores son óptimos para el enfoque.
- Mostrado en la Figura 32, tomando el péptido K como ejemplo, las proporciones observadas se correlacionaban muy bien con las proporciones previstas. Se mostró una relación lineal sobre las áreas del pico que varía de 2×10^4 a 8×10^5 ($R^2=0,9998$). También se observó un bajo coeficiente de variación en los análisis por duplicado (Tabla 4).

Tabla 4

Péptido	Proporción prevista TMTzero: TMT ⁶ -127	Proporción media observada TMTzero: TMT ⁶ -127	CV (%)	Péptido	Proporción prevista TMTzero: TMT ⁶ -127	Proporción media observada TMTzero: TMT ⁶ -127	CV (%)
H (1)	1:1 3:1 9:1 27:1	1,0:1 2,9:1 8,7:1 23,1:1	0,81 2,16 5,90 1,53	F (5)	1:1 3:1 9:1 27:1	0,8:1 2,1:1 7,4:1 23,7:1	2,85 0,68 1,52 3,88
K (2)	1:1 3:1 9:1 27:1	0,9:1 2,5:1 8,6:1 26,5:1	0,72 0,24 0,56 0,85	D (6)	1:1 3:1 9:1 27:1	0,8:1 2,3:1 8,0:1 25,7:1	2,01 2,18 2,56 2,16
L (3)	1:1 3:1 9:1 27:1	0,9:1 2,6:1 8,4:1 26,0:1	0,71 0,86 1,47 1,67	A (7)	1:1 3:1 9:1 27:1	1,0:1 2,6:1 8,5:1 27,4:1	1,32 0,42 2,90 2,49
M (4)	1:1 3:1 9:1 27:1	0,8:1 2,2:1 8,6:1 24,5:1	0,60 0,93 0,56 0,85	J (8)	1:1 3:1 9:1 27:1	0,9:1 2,6:1 8,4:1 27,9:1	0,58 1,11 2,50 2,69
E (9)	1:1 3:1 9:1 27:1	1,0:1 2,8:1 9,5:1 32,6:1	0,81 2,16 5,90 1,53	C (12)	1:1 3:1 9:1 27:1	0,9:1 2,5:1 8,7:1 26,8:1	4,19 9,05 3,04 7,20
I (10)	1:1 3:1 9:1 27:1	0,8:1 2,2:1 7,5:1 23,8:1	1,32 1,87 3,34 1,51	G (13)	1:1 3:1 9:1 27:1	0,9:1 2,7:1 9,2:1 13,1:1	2,34 13,19 21,94 8,06
B (11)	1:1 3:1 9:1 27:1	0,9:1 2,5:1 8,4:1 25,5:1	4,23 7,19 4,98 5,33				

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para analizar un analito diana, donde el procedimiento comprende:

- 5 (a) proporcionar una pluralidad de muestras que puede comprender el analito diana, donde cada muestra está marcada de forma diferencial con un marcador de masa o una combinación de marcadores de masa, donde los marcadores de masa proceden de un conjunto de marcadores de masa, donde cada marcador de masa es un marcador de masa isobárico que comprende un grupo marcador de masa con espectrometría de masas distinta, de forma que las muestras se pueden distinguir mediante espectrometría de masas.
- 10 (b) mezclar la pluralidad de las muestras marcadas para producir una mezcla de análisis e introducir la mezcla de análisis en un espectrómetro de masas;
- (c) seleccionar iones que tienen una primera proporción masa-carga equivalente a un ion del analito diana marcado con un número específico de los marcadores de masa;
- 15 (d) fragmentar iones de la primera proporción masa-carga en una pluralidad de iones de fragmentos, donde la proporción de la pluralidad de iones de fragmentos comprende al menos un marcador de masa intacto.
- (e) seleccionar iones que tienen una segunda proporción masa-carga equivalente a un ion de un fragmento del analito diana que comprende al menos un marcador de masa intacto;
- (f) fragmentar iones de la segunda proporción masa-carga en una pluralidad de iones de fragmentos adicionales, donde la proporción de los iones de fragmentos adicionales son iones de los grupos marcadores de masa;
- 20 (g) producir un espectro de masas de los iones de fragmentos adicionales producidos en la etapa (f); y
- (h) determinar a partir del espectro de masas la cantidad del analito diana en cada muestra.

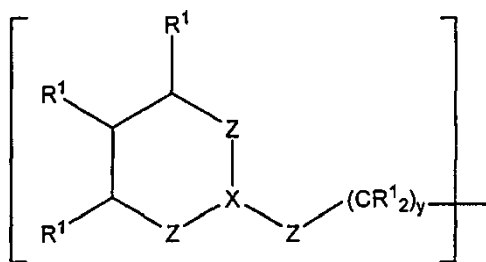
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde una muestra es una muestra de ensayo y una muestra es una muestra de calibración, donde la muestra de calibración comprende uno o más alícuotas diferentes del analito diana, teniendo cada alícuota una cantidad conocida del analito, donde la muestra de ensayo y cada alícuota de la muestra de calibración está marcados de forma diferencial,
- 25 y/o donde la pluralidad de las muestras puede comprender una pluralidad de diferentes analitos diana y el procedimiento comprende una etapa de repetir etapas (c) a (h) para cada analito diana, preferentemente donde una muestra es una muestra de ensayo y una muestra de calibración se proporciona para cada analito diferente, donde cada muestra de calibración comprende uno o más alícuotas diferentes de un analito diana, donde la muestra de ensayo y cada alícuota de cada muestra de calibración se marcan de forma diferencial.
- y/o donde la o cada muestra de calibración comprende dos o más alícuotas diferentes del analito diana.
- y/o donde una pluralidad de las muestras de ensayo se analizan para determinar un analito, preferentemente donde cada una de la pluralidad de muestras de ensayo se analiza para el mismo analito y/o preferentemente donde cada muestra de ensayo se marca de forma diferencial con uno o más de los marcadores de masa isobáricos,
- 30 y/o donde el procedimiento comprende una etapa adicional antes que la etapa (a) de cada muestra de ensayo marcada de forma diferencial y cada alícuota de la muestra de calibración con uno o más marcadores de masa isobáricos, preferentemente donde el procedimiento comprende una etapa adicional de combinar los alícuotas marcados de forma diferencial para producir una muestra de calibración antes de la etapa (a),
- 40 y/o donde la pluralidad de las muestras son muestras de ensayo,
- y/o donde la cantidad determinada en la etapa (h) es la cantidad relativa del analito diana en cada muestra o donde la cantidad determinada en la etapa (h) es la cantidad absoluta del analito diana en cada muestra,
- y/o donde el procedimiento comprende una etapa adicional tras la etapa (d) de producir un espectro de masas de la pluralidad de iones de fragmentos de la etapa (d), preferentemente donde la identidad del analito diana se determina identificando uno o más iones de fragmentos característicos del analito diana en el espectro de masas.
- 45 y/o donde el procedimiento comprende una etapa adicional tras la etapa (f) de seleccionar iones de un intervalo de proporciones masa-carga equivalente al intervalo de proporciones masa-carga de los grupos indicadores de masa,
- y/o donde en la etapa (c), la primera proporción masa-carga es equivalente a la proporción masa-carga del ion parental no fragmentado del analito diana marcado con un número específico de marcadores de masa o donde en la etapa ©, la primera proporción masa-carga es equivalente a la proporción masa-carga de un ion de fragmento del analito diana marcado con un número específico de marcadores de masa.
- y/o donde en la etapa (e), la segunda proporción masa-carga es equivalente a un ion de un fragmento del analito diana que comprende al menos un marcador de masa intacto cuyo ion de fragmento es único del analito diana,
- y/o donde en la etapa (e), la segunda proporción masa-carga es la proporción masa-carga de un ion de serie y que comprende un marcador de masa intacto o donde la etapa (e), la segunda proporción masa-carga es la proporción masa-carga de un ion de serie b que comprende un marcador de masa intacto, preferentemente donde el ion de serie y y el ion de serie b tiene una proporción masa-carga más alta en comparación con la primera proporción masa-carga seleccionada en la etapa (c)
- 50 y/o donde el analito diana se selecciona de una proteína, un polipéptido, un péptido, un aminoácido o un ácido nucleico, o fragmentos de los mismos,
- 60 y/o donde las etapas (c) a (g) se llevan a cabo en cuadrupolos separados en un espectrómetro de masas o donde las etapas (c) a (g) se llevan a cabo secuencialmente en la misma zona de un espectrómetro de masas,
- y/o donde una de las muestras comprende una alícuota desencadenante que comprende un analito desencadenante y el procedimiento comprende una etapa adicional después de la etapa (b) y antes de la etapa (c) de detectar iones que tienen una proporción carga-masa equivalente a la proporción carga-masa del analito desencadenante, donde cuando se detectan iones que tienen una proporción carga-masa equivalente a la proporción carga-masa del analito
- 65

desencadenante, se inicia la etapa (c), preferentemente donde el analito desencadenante en el alícuota desencadenante está marcado con un marcador de masa isobárico, o donde el analito desencadenante en el alícuota desencadenante está marcado con un marcador de masa que es químicamente idéntico pero isotópicamente distinto y diferente en masa de los marcadores de masa isobáricos de los otros analitos en las muestras.

3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el marcador de masa comprende la estructura siguiente:

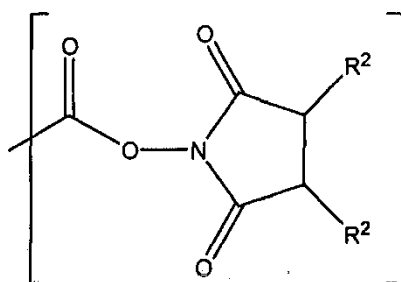
10 X-L-M

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



15 donde la unidad cíclica es aromática o alifática y comprende de 0-3 dobles enlaces de forma independiente entre dos cualquiera átomos adyacentes; cada Z es, de forma independiente N, N(R¹), C(R¹), CO, CO(R¹) (es decir, -O-C(R¹)- o -C(R¹)-O-), C(R¹)₂, O o S; X es N, C o C(R¹); cada R¹ es de forma independiente H, un grupo alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado sustituido o insustituido, un grupo cíclico alifático sustituido o insustituido, un grupo aromático sustituido o insustituido, un grupo heterocíclico sustituido o insustituido; e y es un número entero de 0-10, L es un ligador escindible y M es un resto de normalización de masa, preferentemente donde el ligador escindible que une el resto marcador de masa al resto de normalización de masa es un ligador escindible mediante colisión, preferentemente donde el ligador es escindible mediante DIC, DTE, DCE o DIS usando espectrometría de masas.

25 4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, donde la etapa de marcaje comprende una etapa de hacer reaccionar el analito con un marcador de masa reactivo, donde el marcador de masa reactivo comprende un marcador de masa y una funcionalidad reactiva, preferentemente donde la funcionalidad reactiva es capaz de reaccionar con cualquier grupo amino en el polipéptido y comprende un nucleófilo o un electrófilo.
30 y/o preferentemente, donde el marcador de masa es un marcador de masa reactivo para marcar y detectar un polipéptido mediante espectrometría de masas, donde el marcador de masa comprende una funcionalidad reactiva para unir el marcador de masa al polipéptido, donde la funcionalidad reactiva comprende el grupo siguiente:



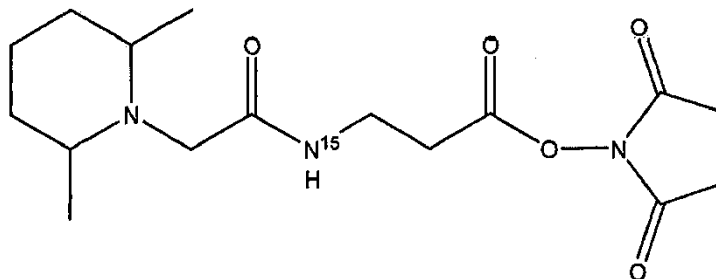
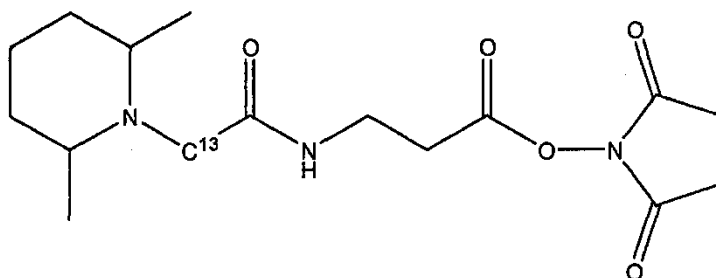
35 donde cada R² es, de forma independiente H, un grupo alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado sustituido o insustituido, un grupo cíclico alifático sustituido o insustituido, un grupo aromático sustituido o insustituido o un grupo heterocíclico sustituido o insustituido.

40 5. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-4, donde el marcador de masa es un marcador de masa de un conjunto de dos o más marcadores de masa, donde cada resto de normalización de masa garantiza que un marcador de masa tiene una masa agregada deseada y donde el conjunto comprende marcadores de masa que tienen un resto marcador de masa, teniendo cada resto marcador de masa una masa diferente de la de los demás grupos marcadores de masa en el conjunto y teniendo cada marcador en el conjunto una masa agregada común; y donde los marcadores de masa en el conjunto se pueden distinguir entre sí mediante espectroscopia de masas,
45

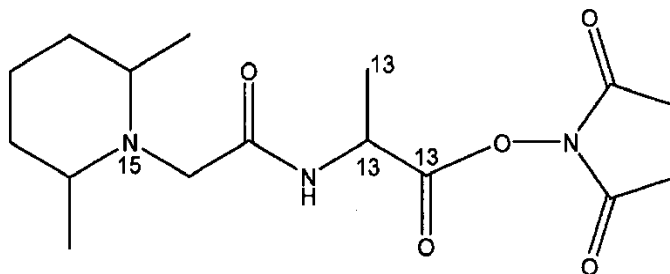
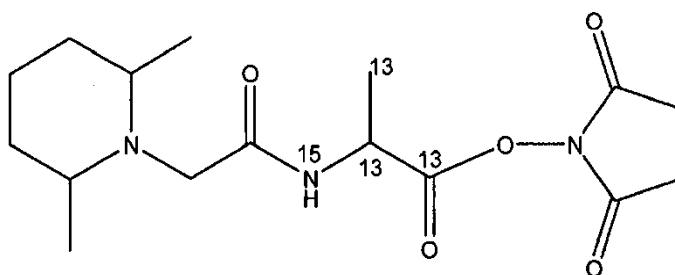
preferentemente, donde cada marcador de masa en el conjunto tiene un resto ajustador de masa, seleccionado de:

- (a) un sustituyente isotópico situado dentro del resto marcador de masa y/o dentro del resto de normalización de masa, y
 5 (b) átomos o grupos sustituyentes unidos al resto marcador de masa y/o unidos al resto de normalización de masa.

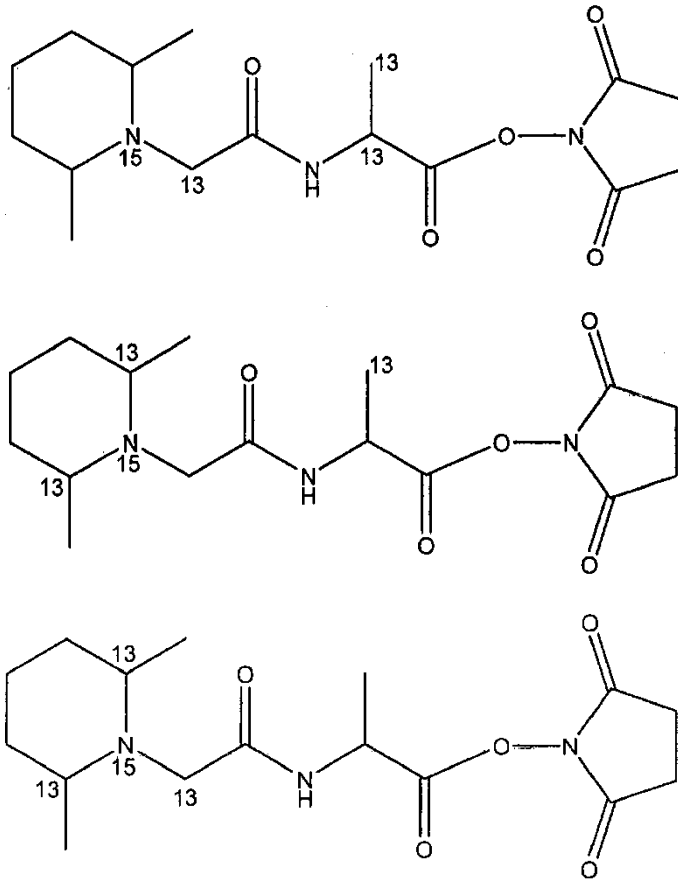
- más preferentemente, donde el resto ajustador de masa se selecciona de un sustituyente átomo de halógeno, un grupo metilo sustituyente y sustituyentes isotópicos ^2H , ^{15}N , ^{13}C o ^{18}O , más preferentemente donde el resto ajustador de masa es ^{15}N o ^{13}C y el conjunto comprende dos marcadores de masa que tienen las estructuras siguientes:



- 15 más preferentemente, donde el resto ajustador de masa es ^{15}N and ^{13}C y el conjunto comprende cinco marcadores de masa que tienen las estructuras siguientes:

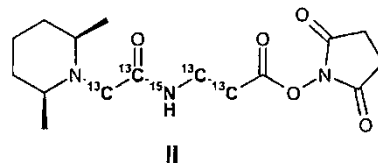
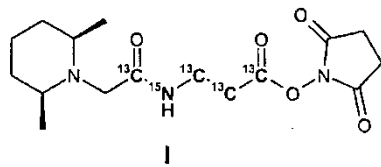


20

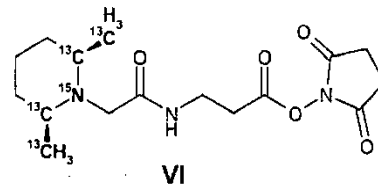
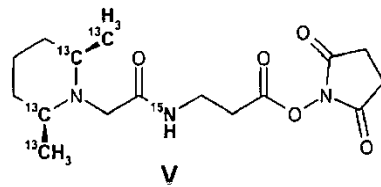
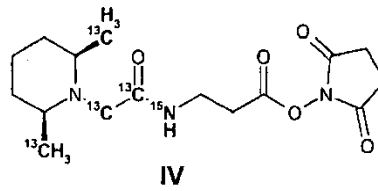
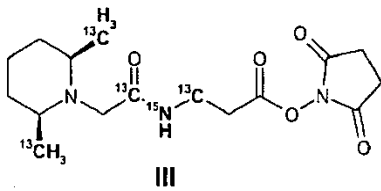


5

6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, donde el resto ajustador de masa es ^{15}N y ^{13}C y el conjunto comprende seis marcadores de masa que tienen las estructuras siguientes:



10



15

Figura 1a

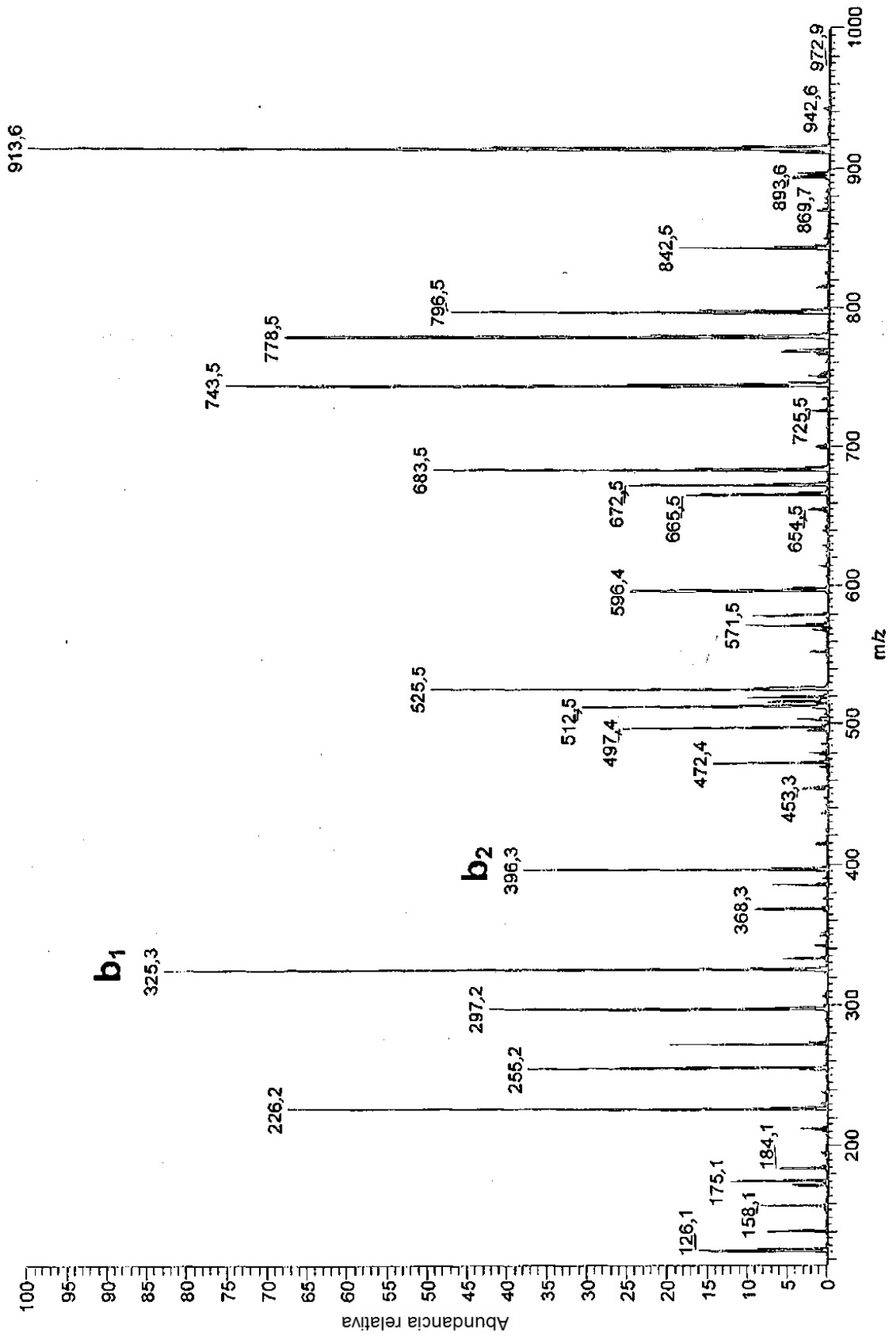
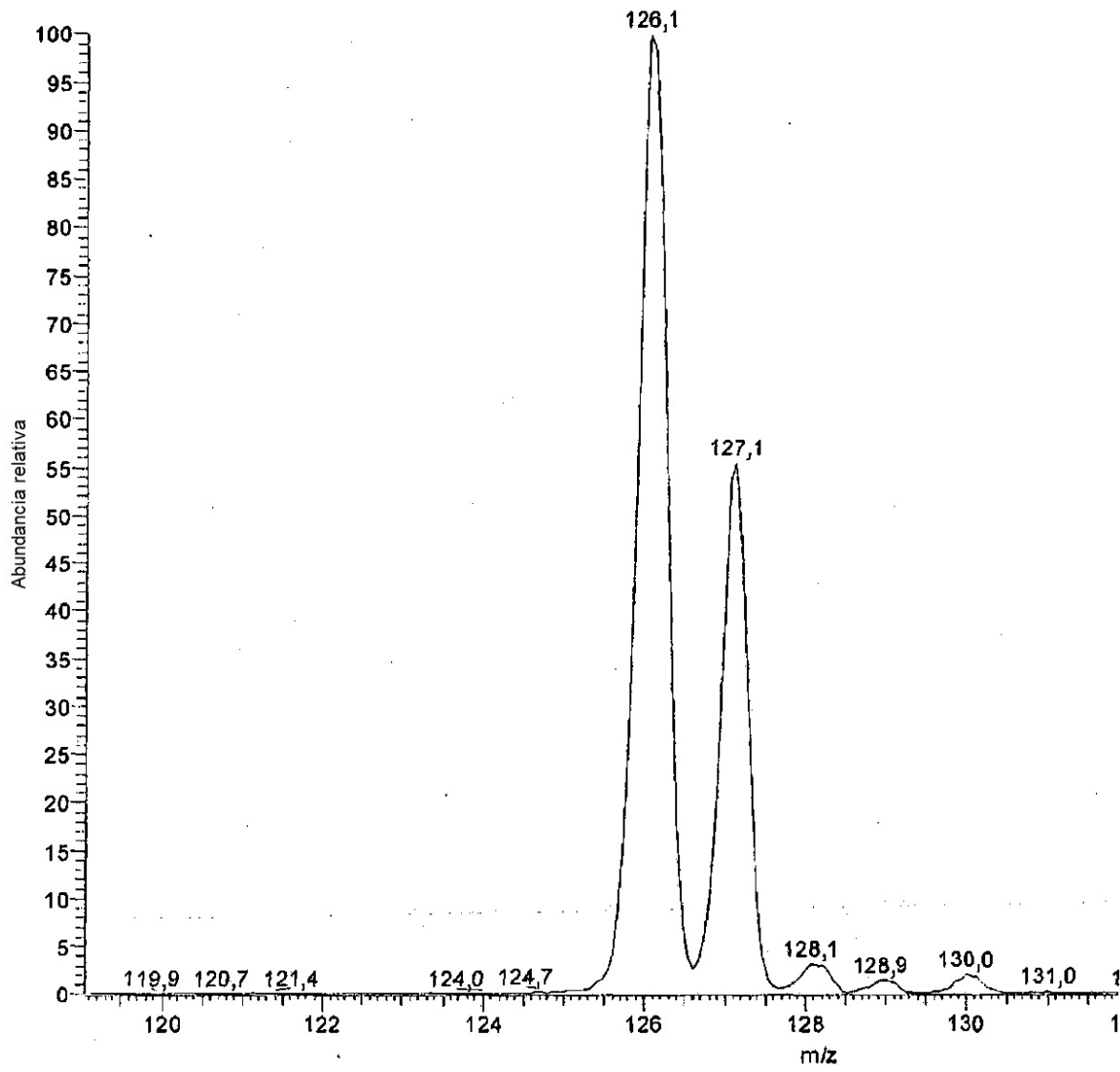


Figura 1b



Zoom en la región indicada
(proporción 2:1)

Figura 2a

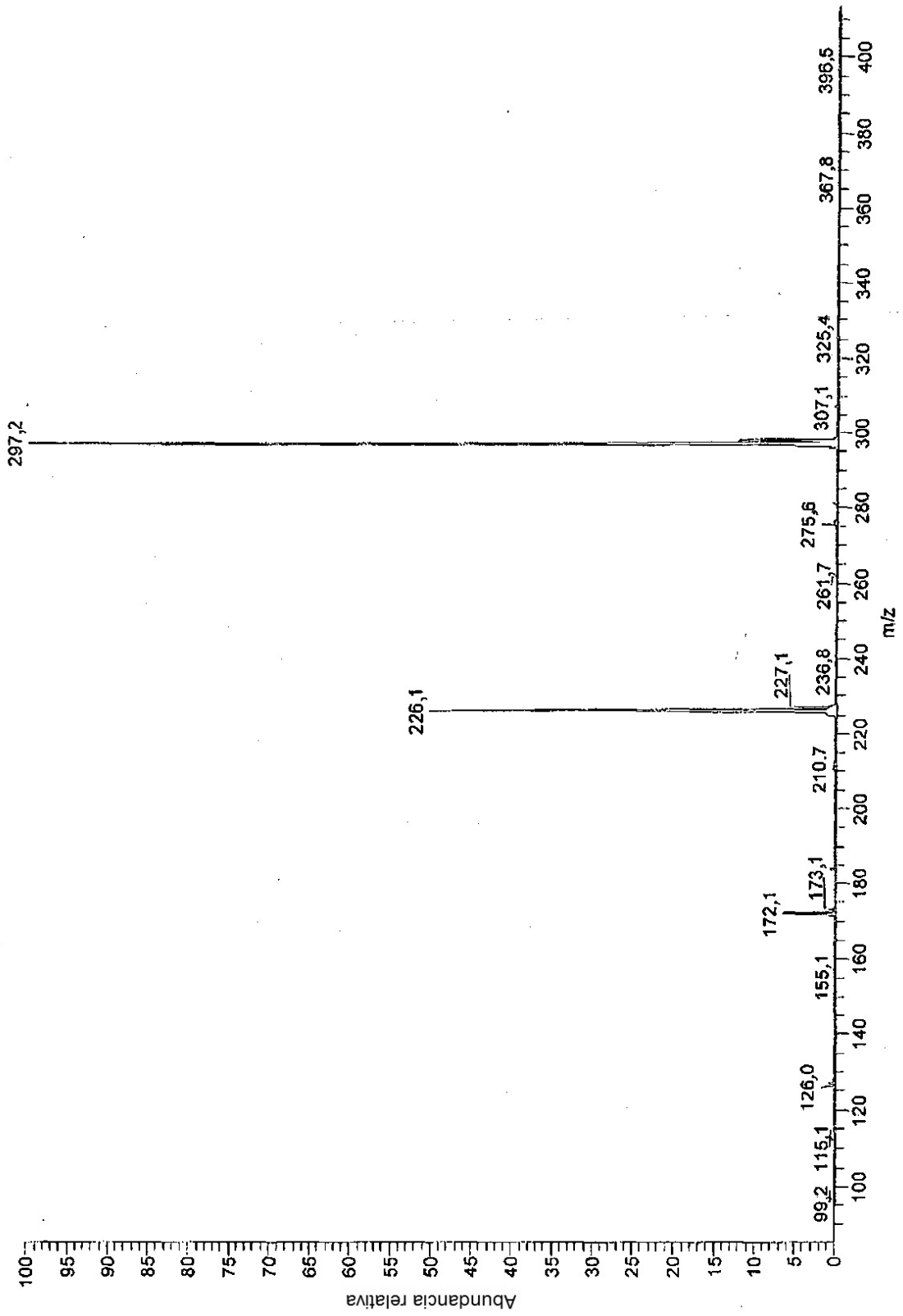


Figura 2b

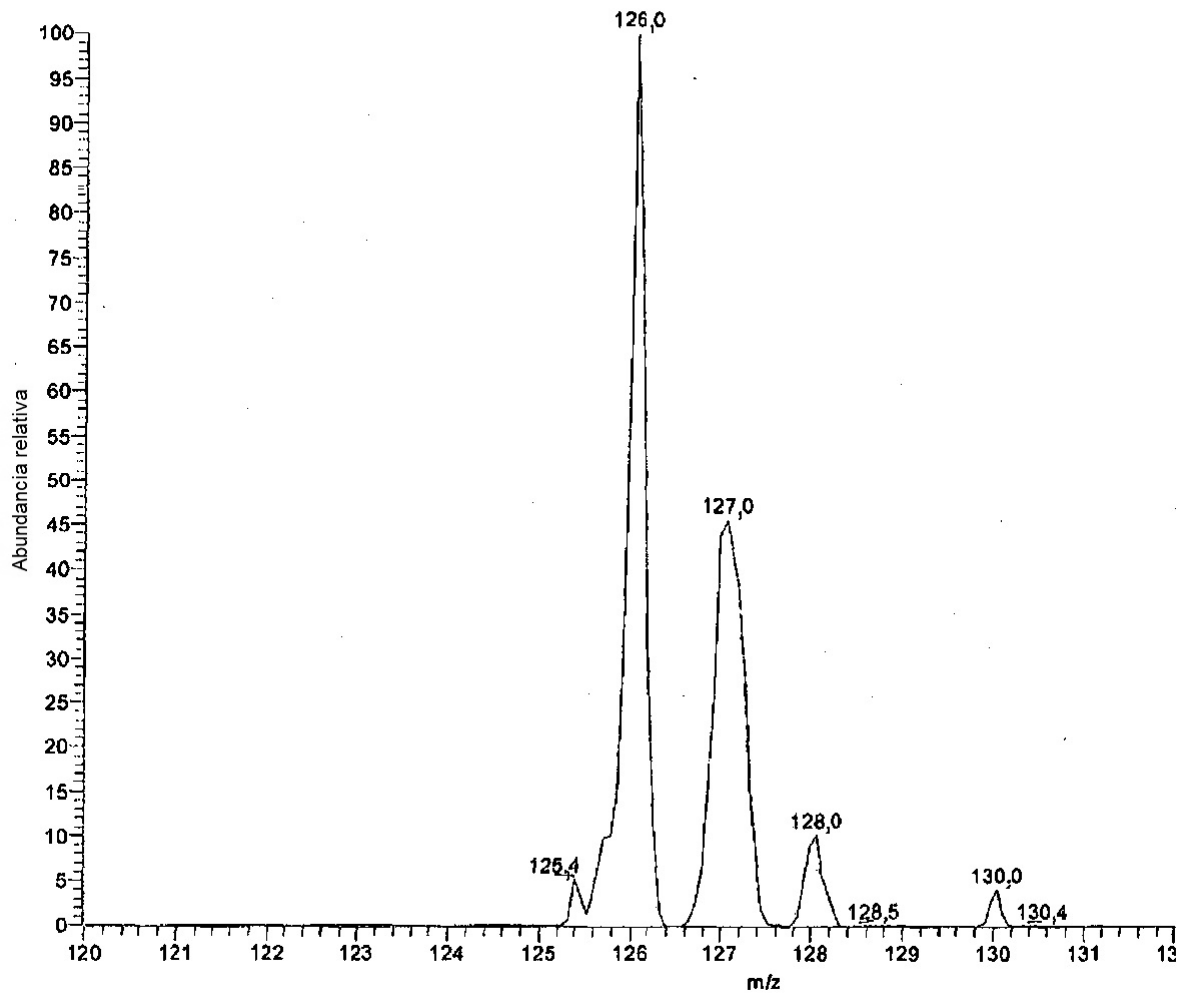
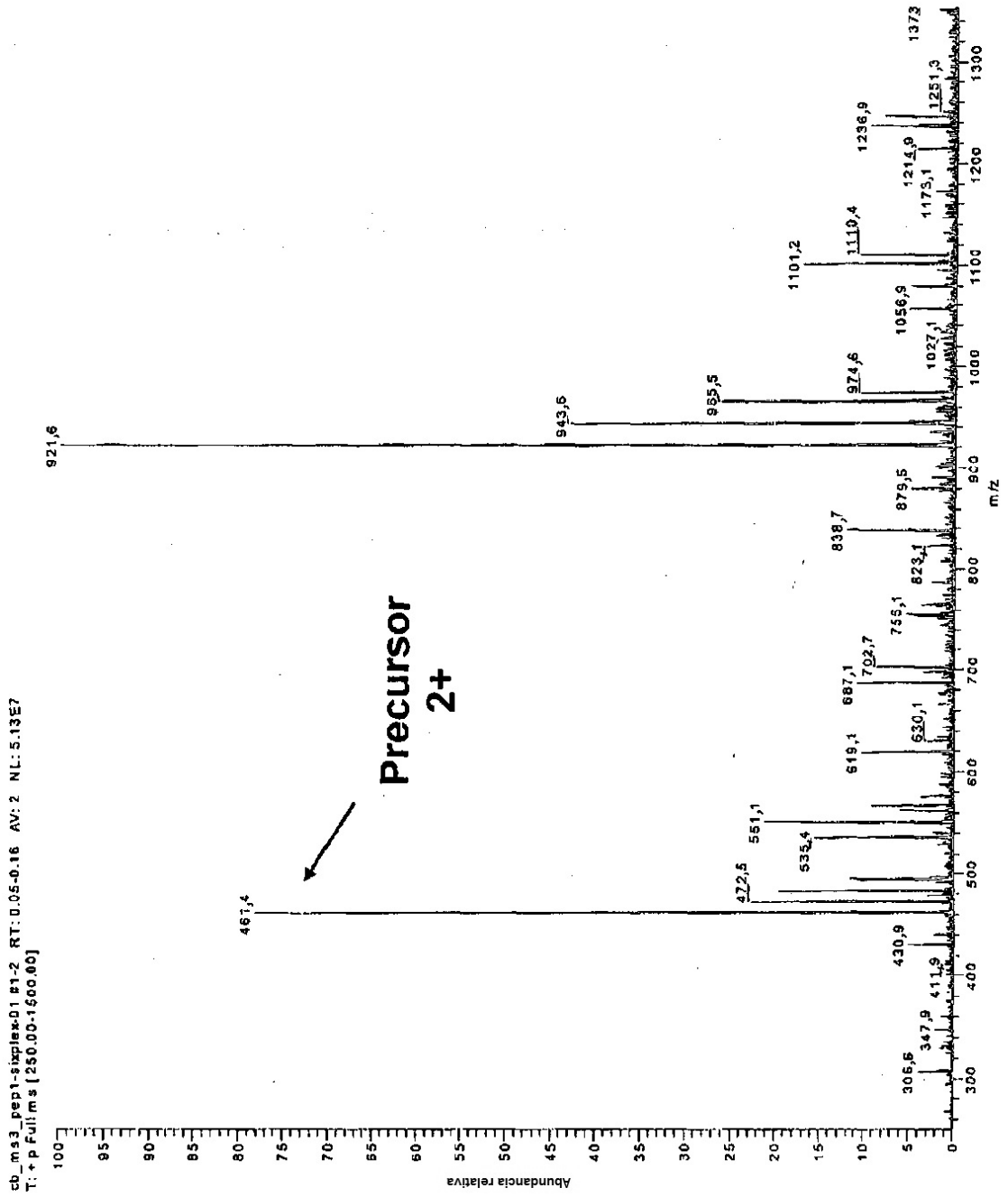
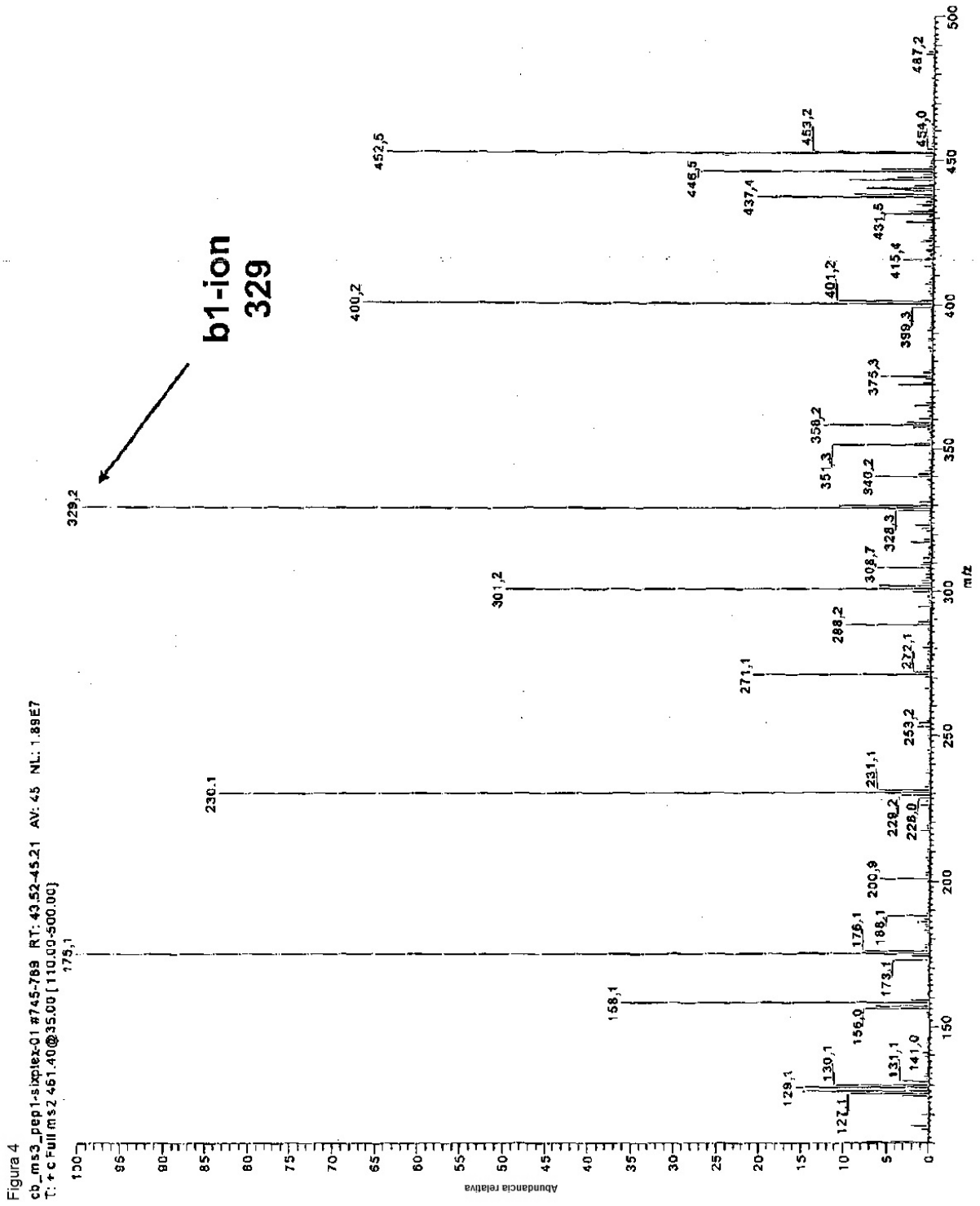


Figura 3





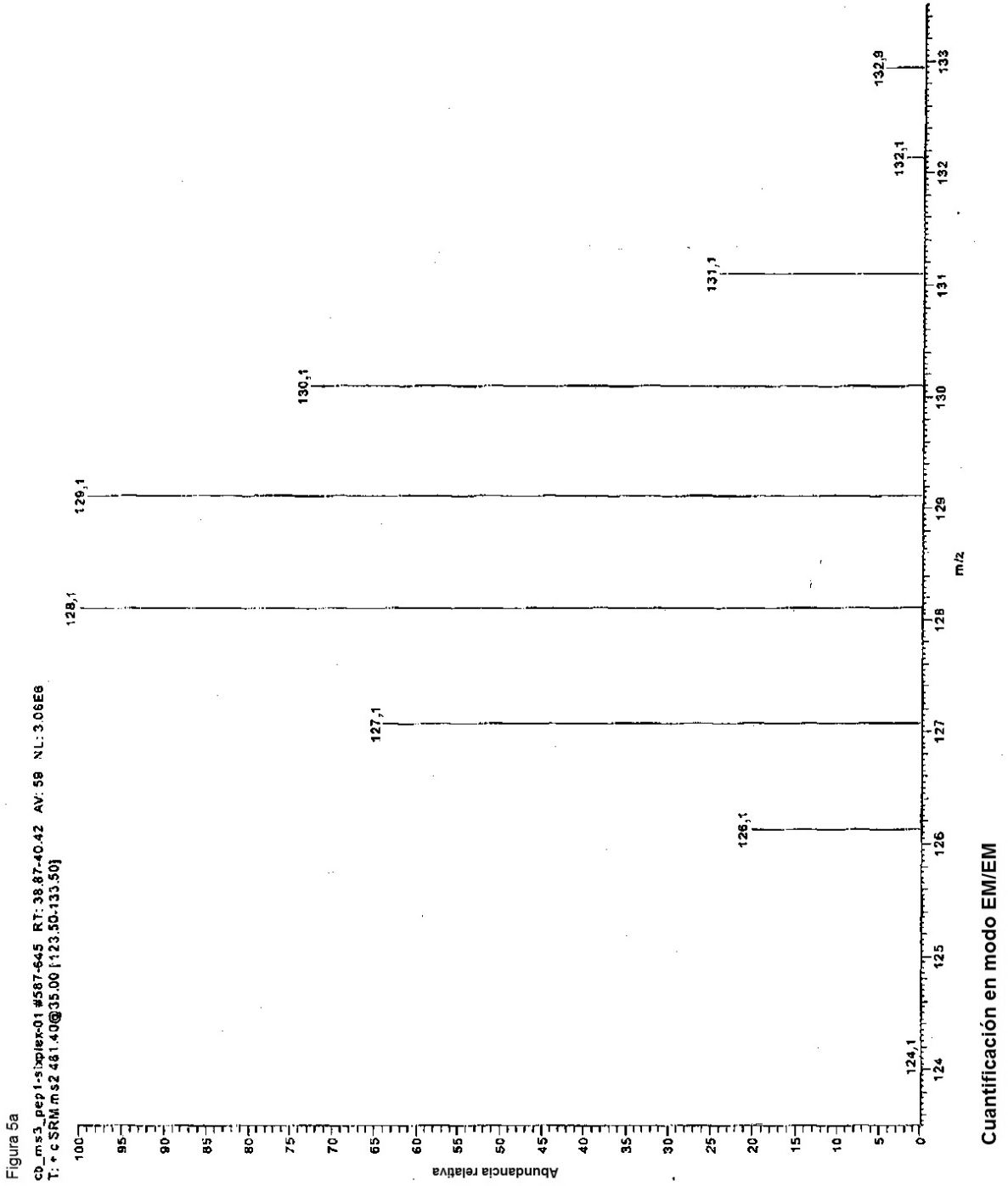
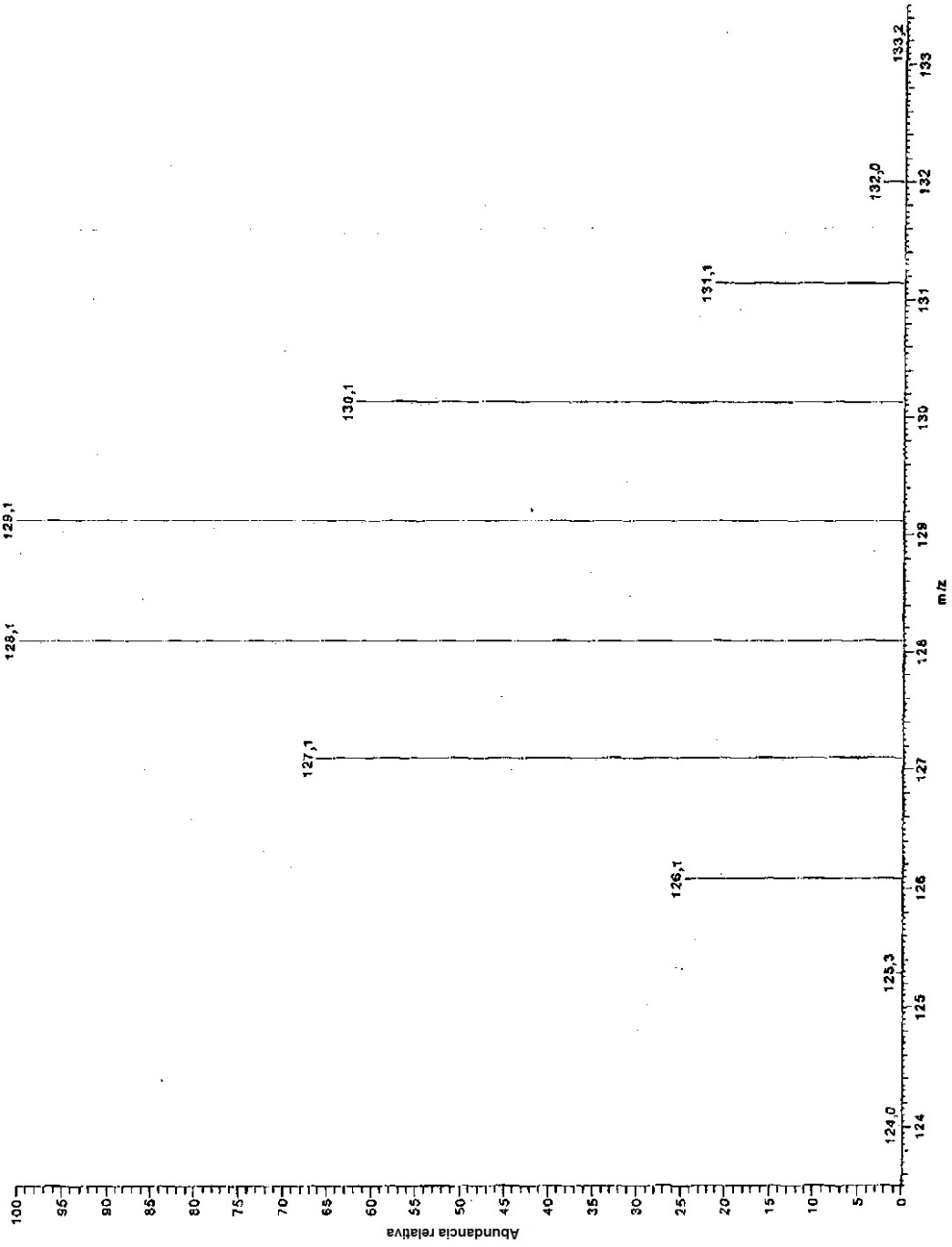
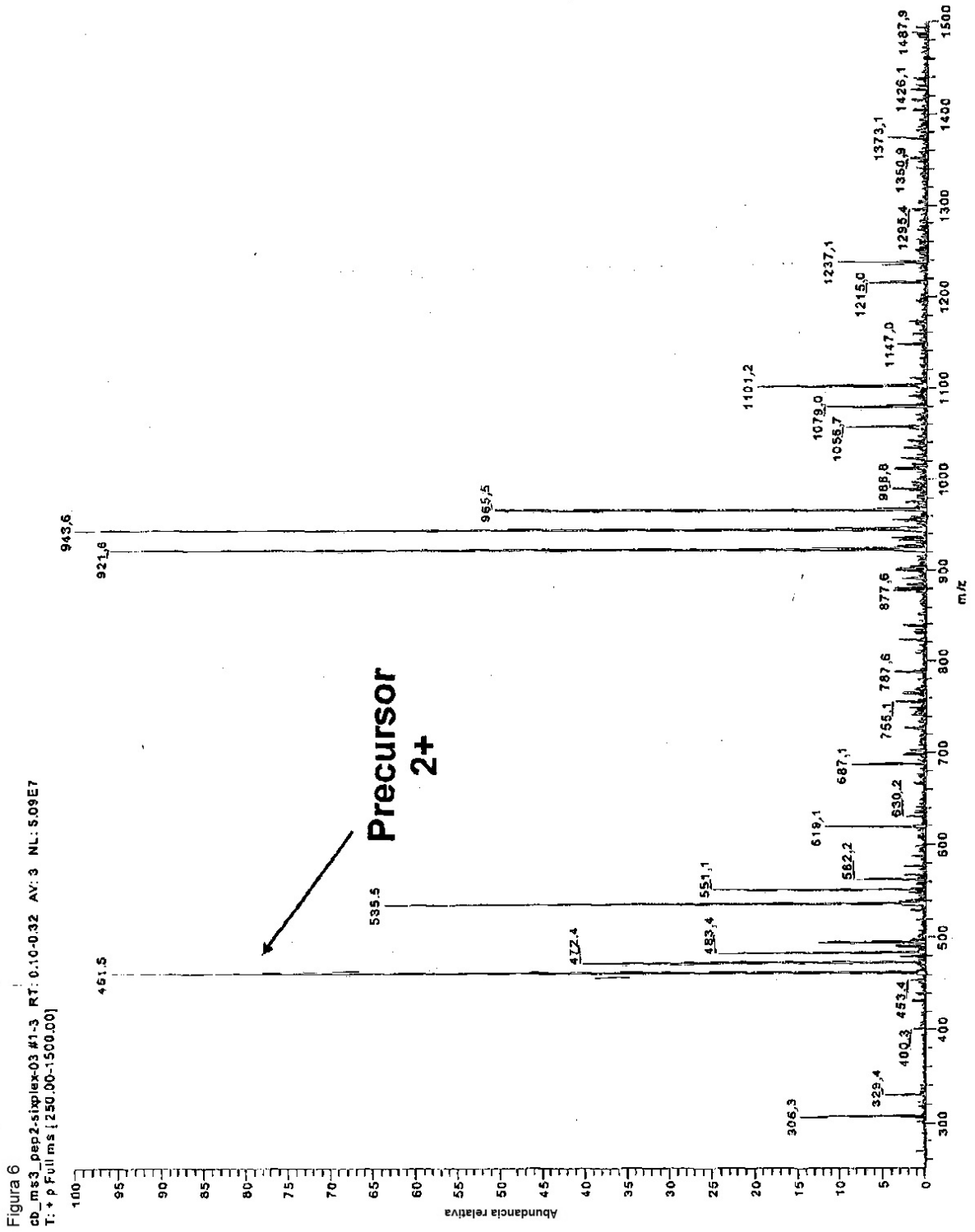


Figura 5b

cd_ms3_pept1-splex-01 #358-514 RT: 29.81-36.07 AV: 157 NL: 4.45E4
T: * c CRM ms3 451.40@35.00 329.20@35.00 [123.50-133.50]



Cuantificación en modo EM/EM/EM b1-ion



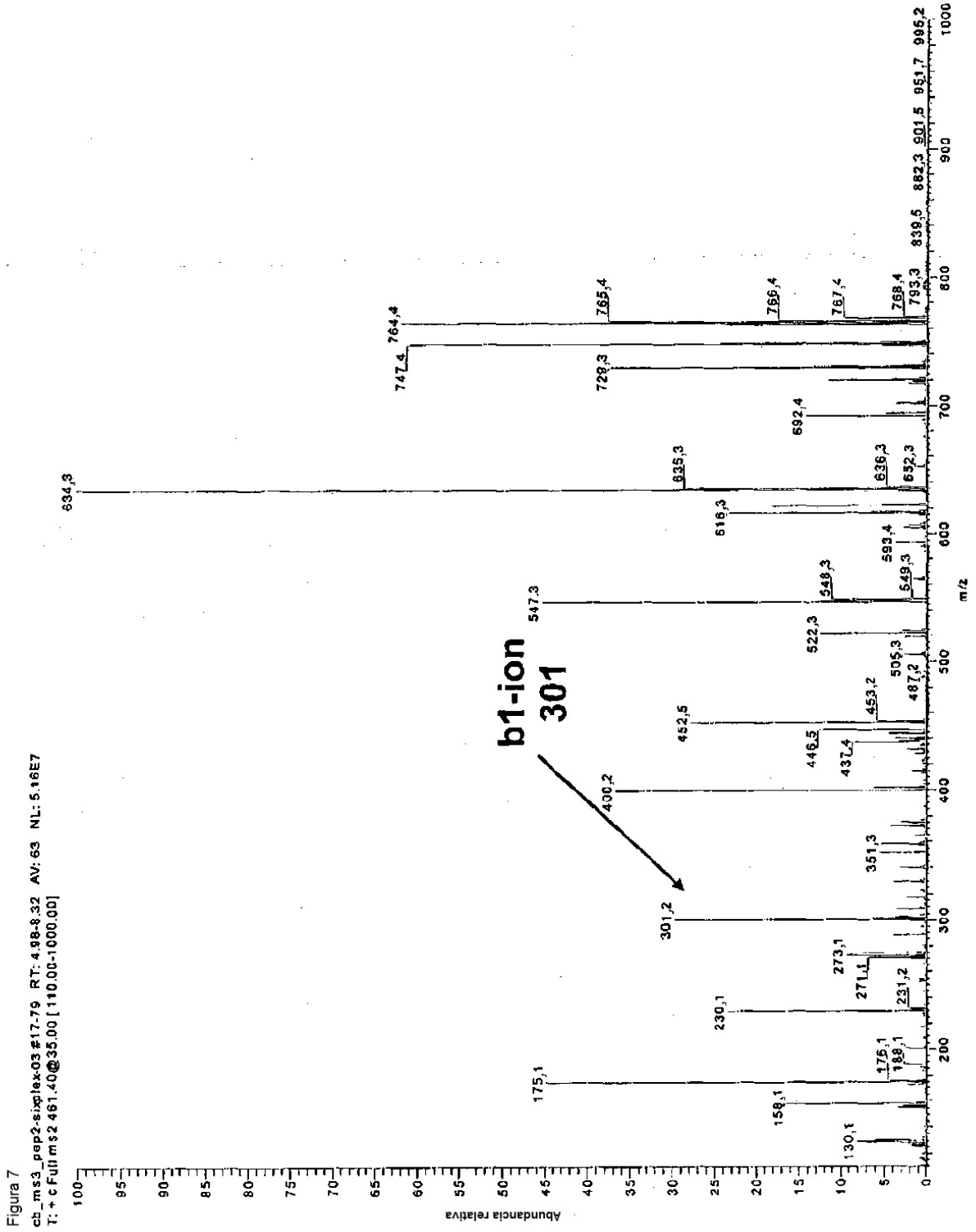


Figura 8a

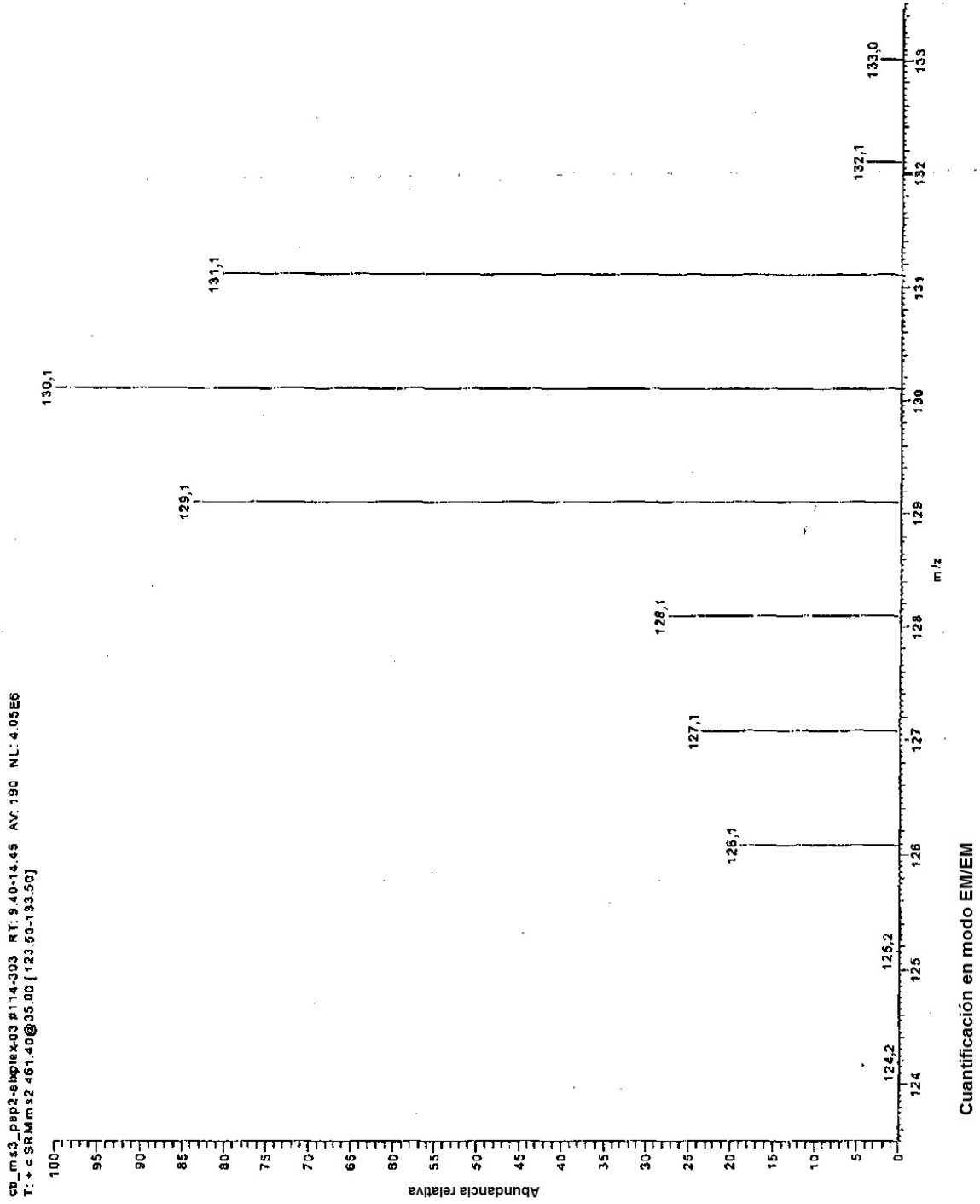
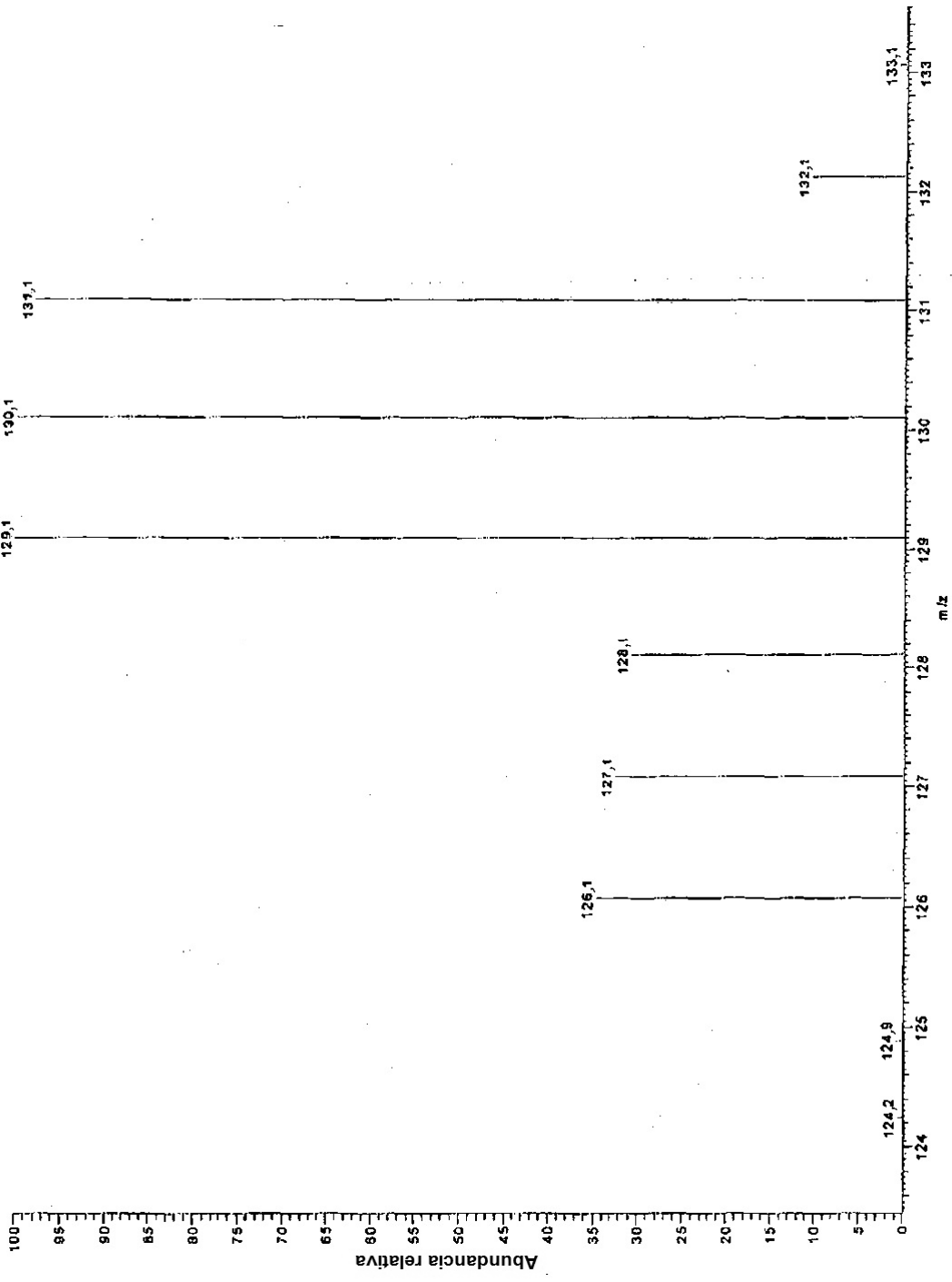


Figura 8b

cb_ms3_rep2-1116-033 #518-033 RT: 21.71-26.83 AV: 116 NL: 8.27E3
T: + c CRM.ms3 481.40@35.00 501.20@35.00 [123.50-133.50]



Cuantificación en modo EM/EM b1-ion

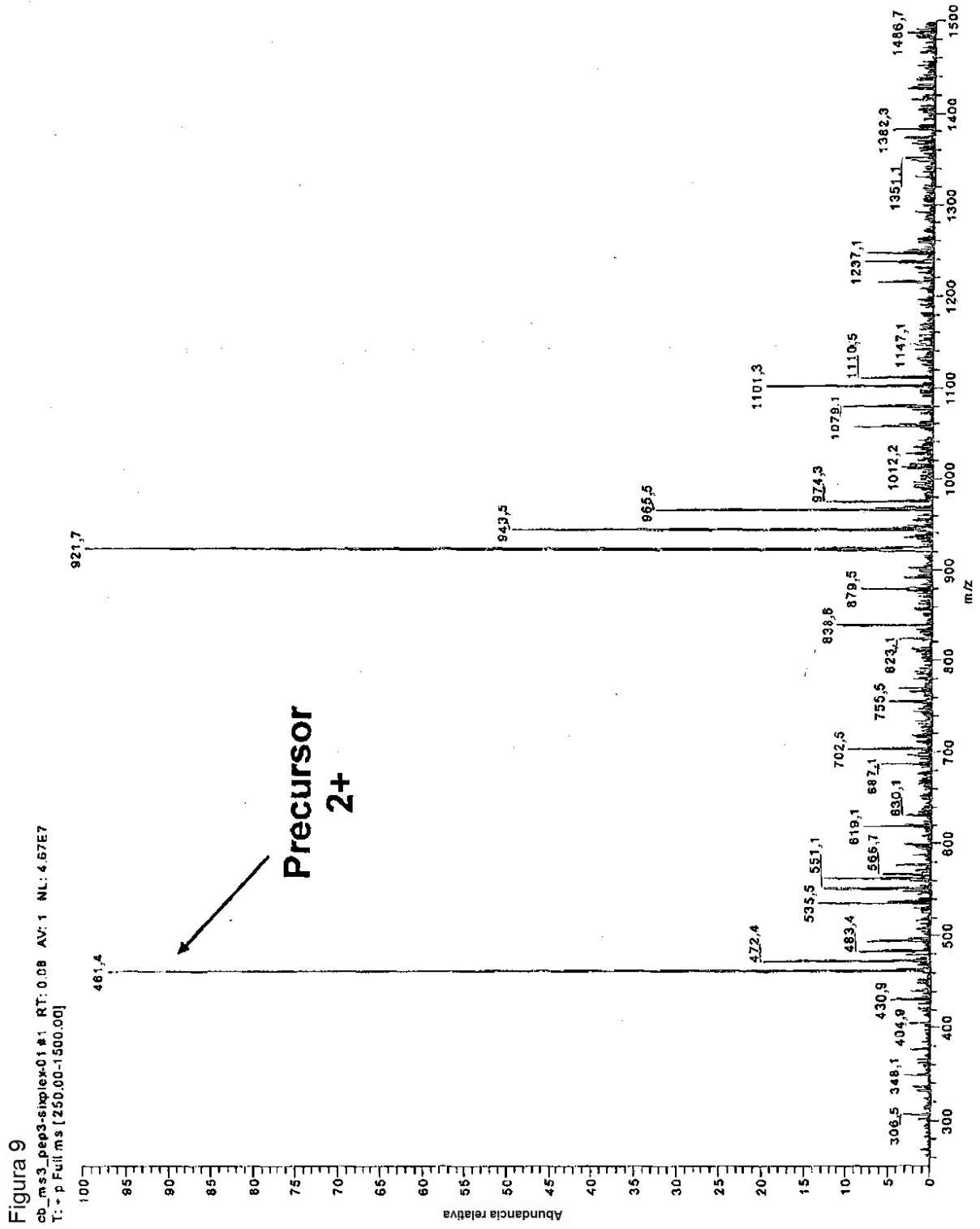


Figura 10

cb_m63_pep3-simplex-01_#689-877 RT: 34.53-44.64 AV: 189 NL: 4.02E7
T: + c Full m/z 2.461.40@35.00 [110.00-1000.00]

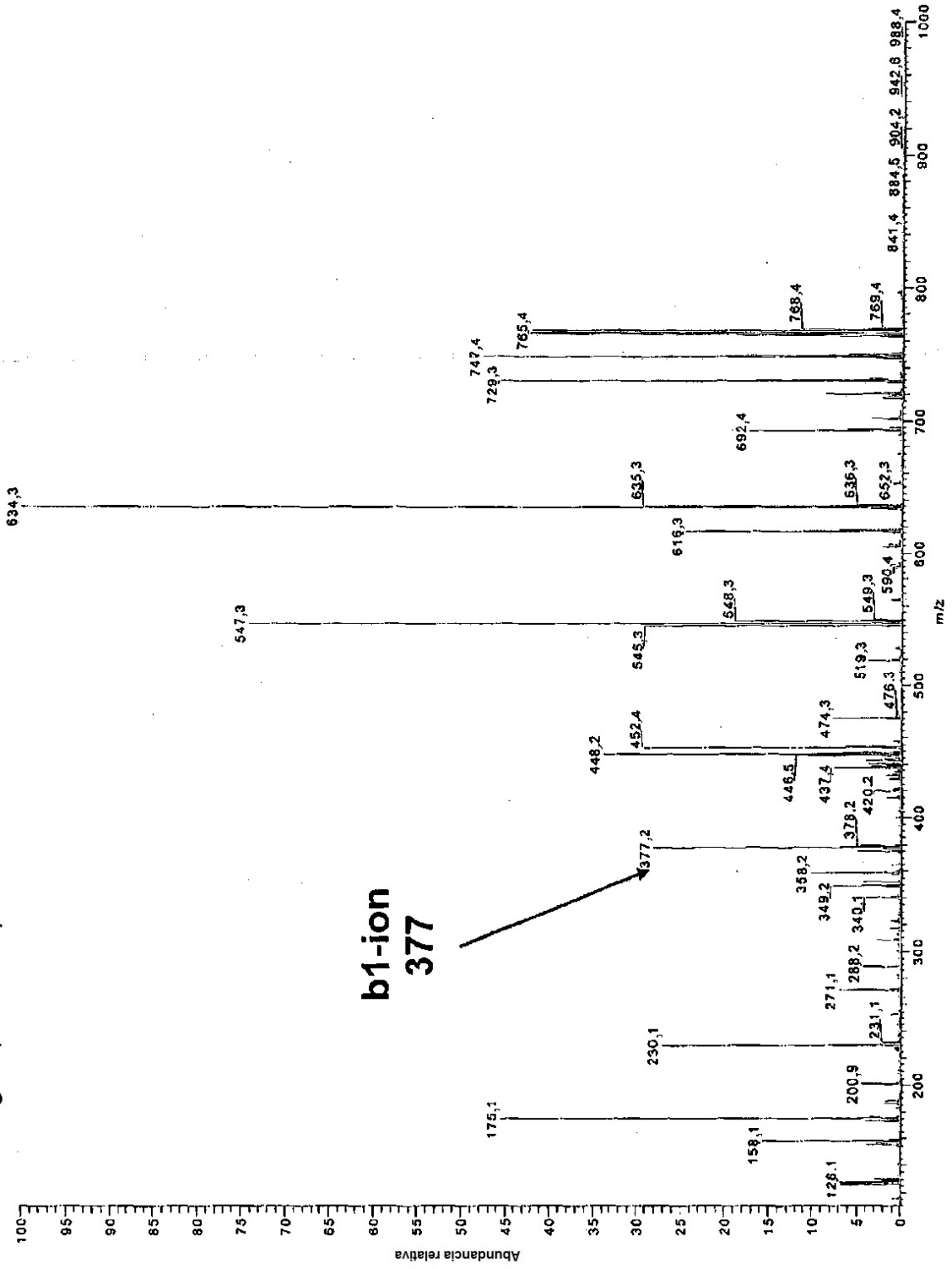
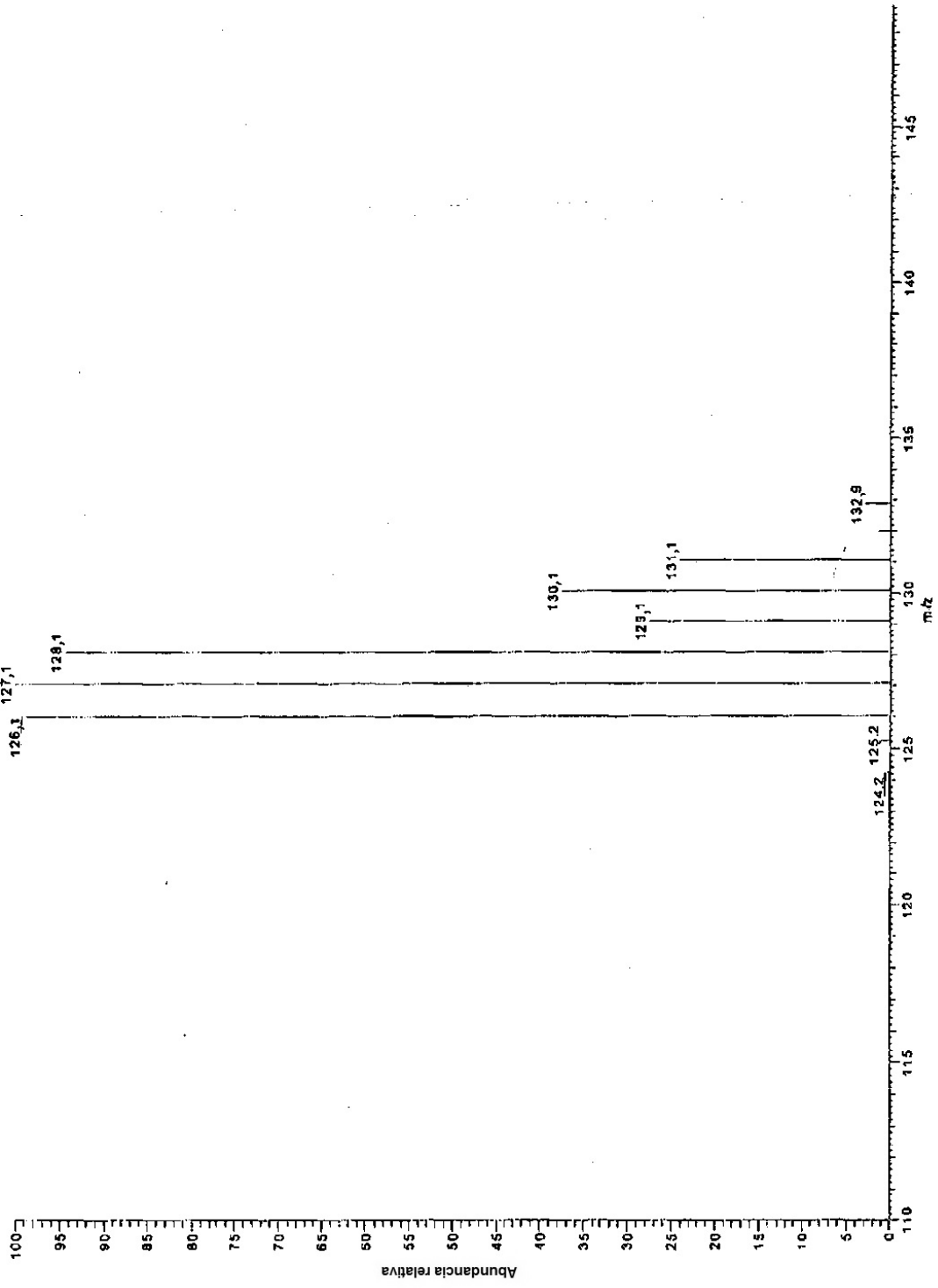
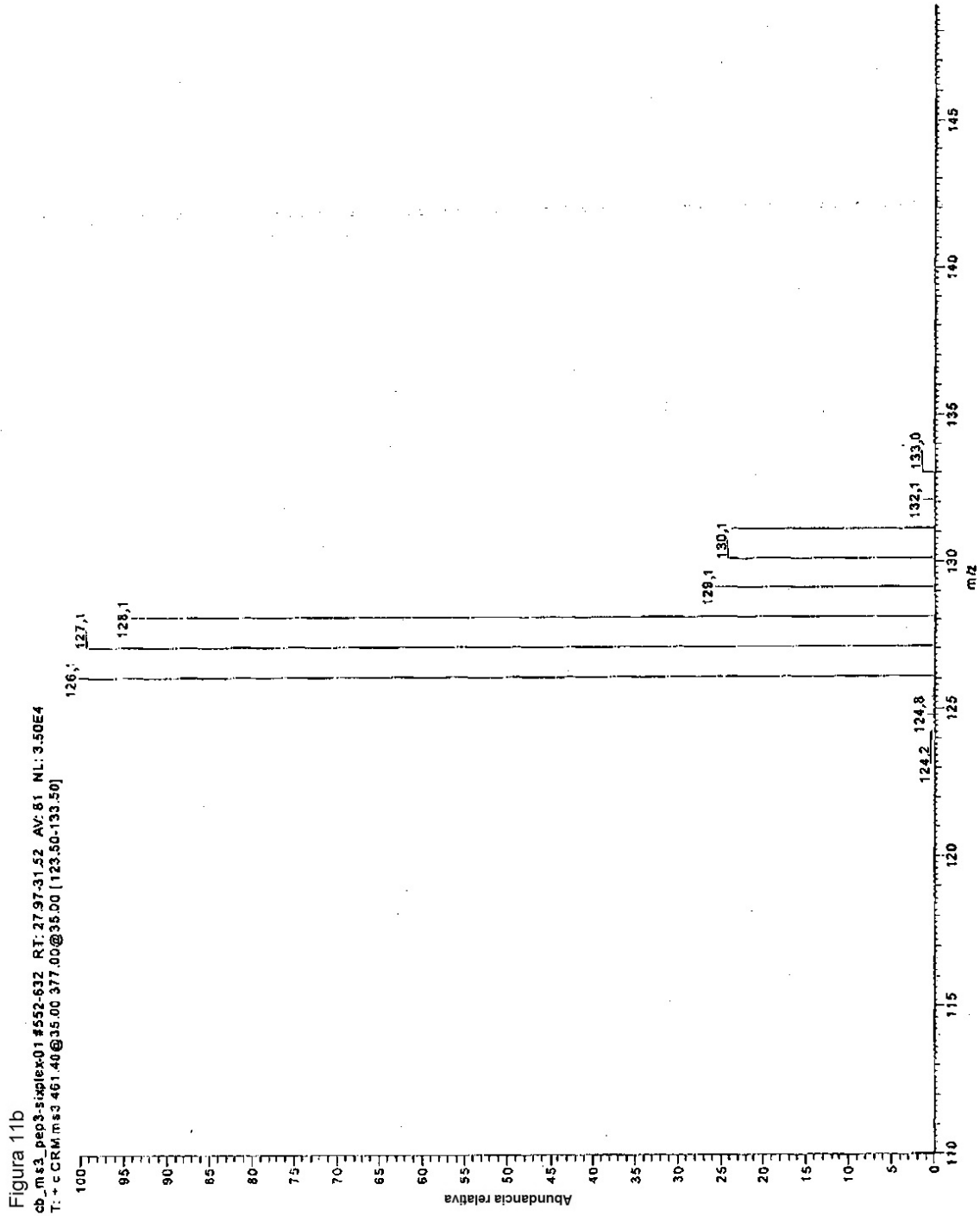


Figura 11a

cb_ms9_pps3-sj016x-01 #356.450 RT: 21.60-24.11 AV: 95 NL: 2.87E8
T: * c SRM m/z 2.461.40@35.00 [123.50-133.50]



Cuantificación en modo EM/EM



Cuantificación en modo EM/EM/EM b1-ion

Figura 12
cb_ms3_pep6-sample01 #1-2 RT: 0.03-0.15 AV: 2 NL: 1.06E8
T: + p Full ms (250.00-1500.DJ)

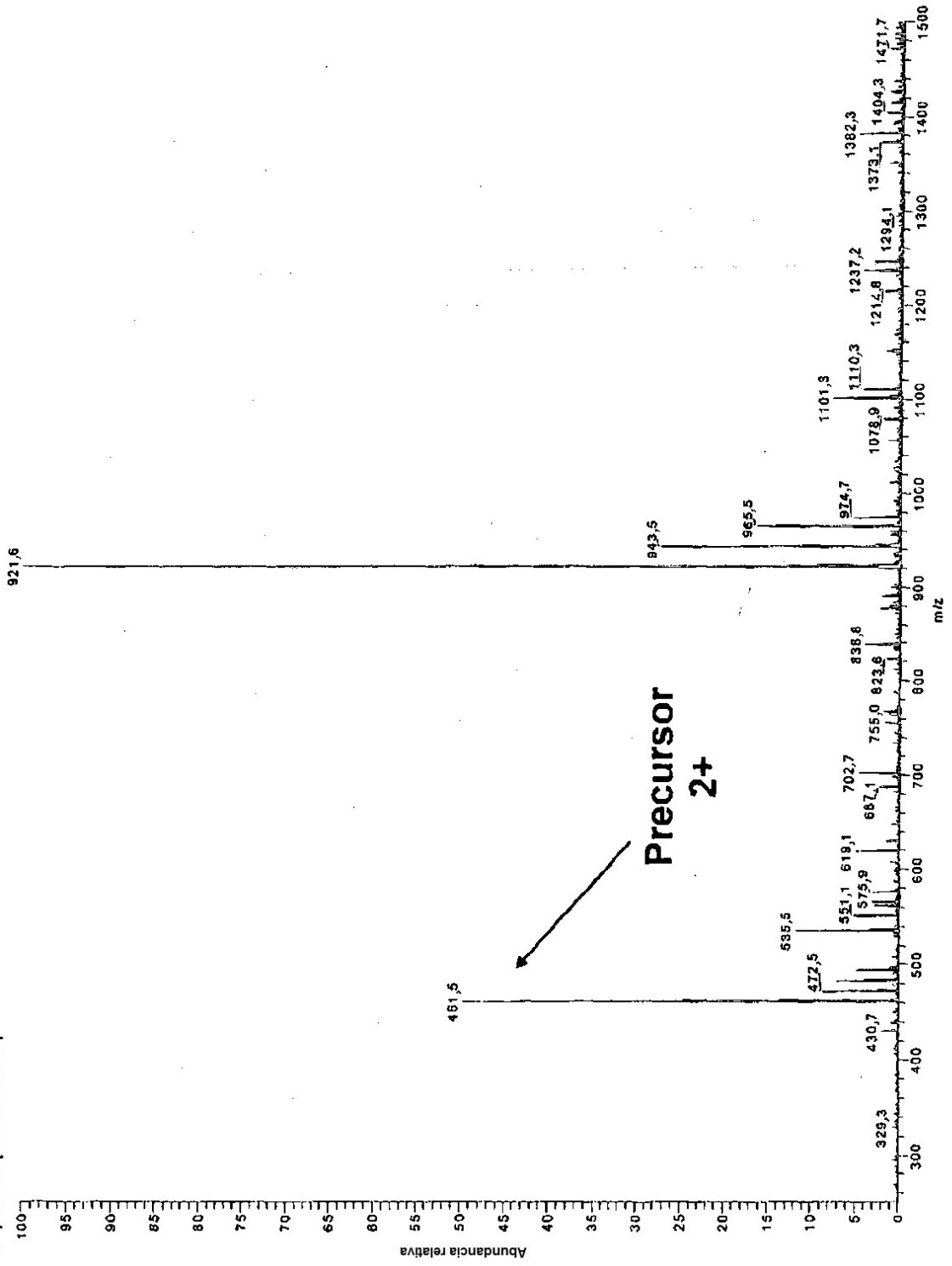
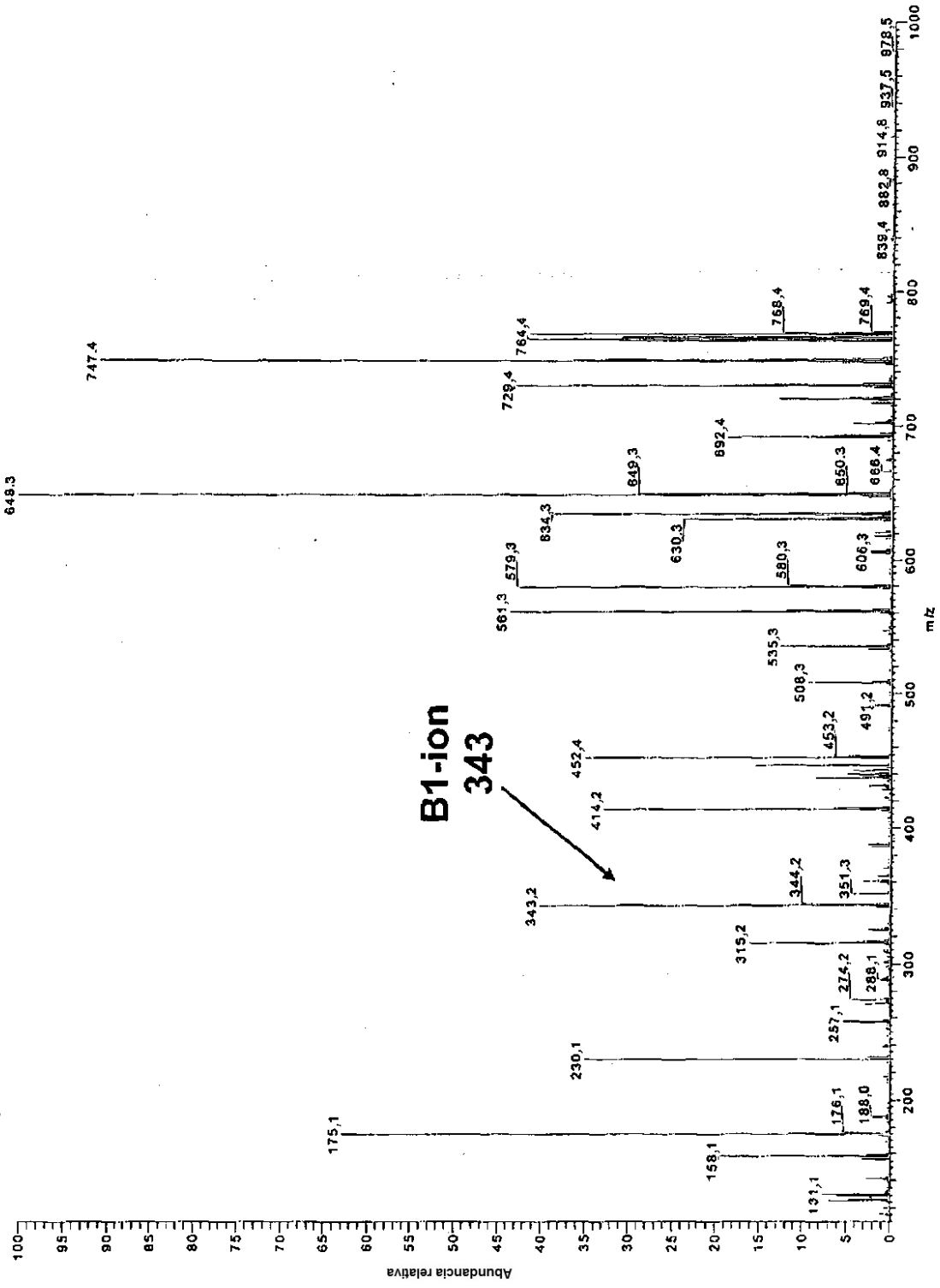


Figura 13

cb.ms3_pep6-simlex-01#98-172 RT: 7.02-10.95 AM: T4 NL: 374E7
Y: -c Full m/z 2.461.40@35.00 [110.00-1000.00]



B1-ion
343

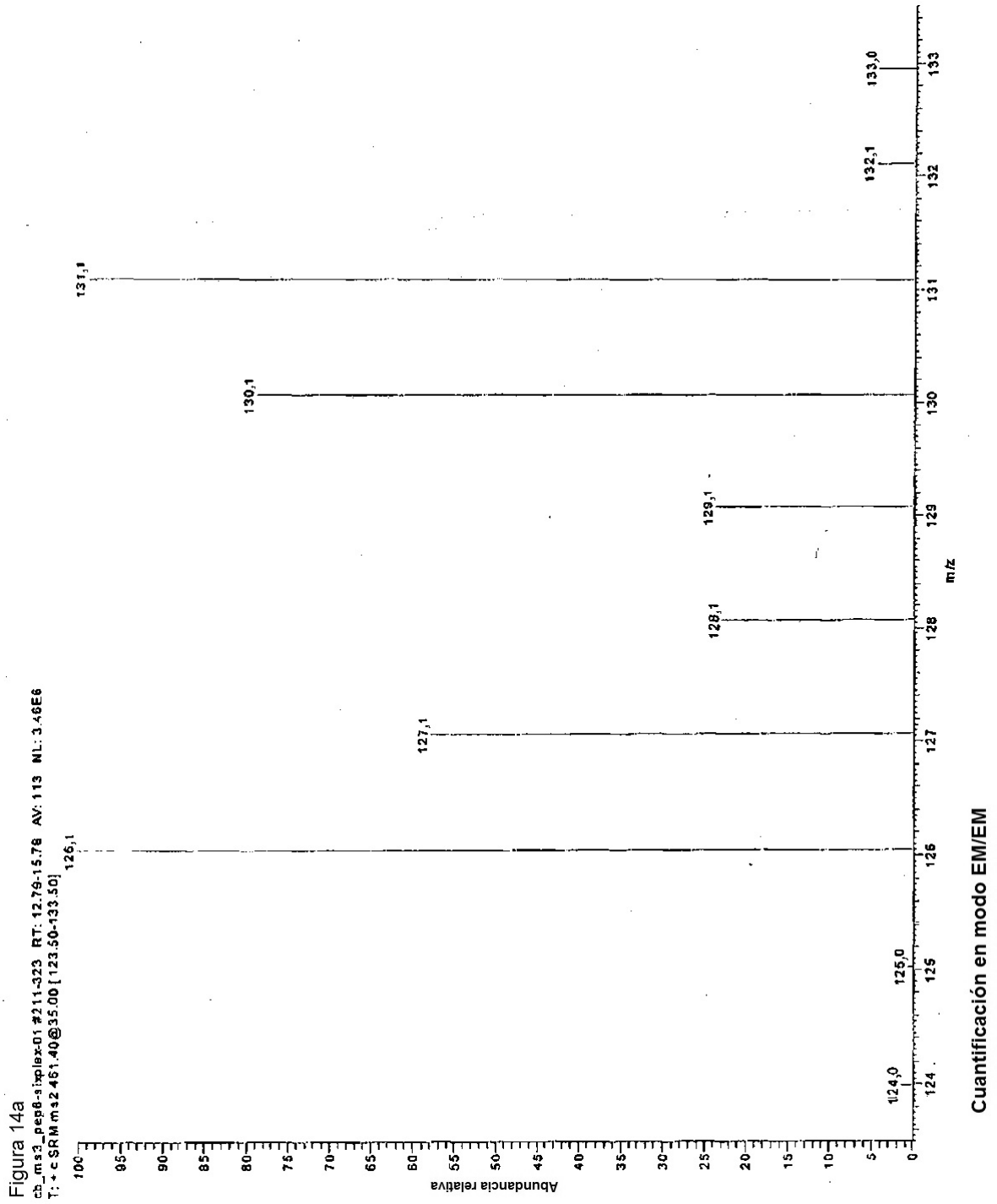
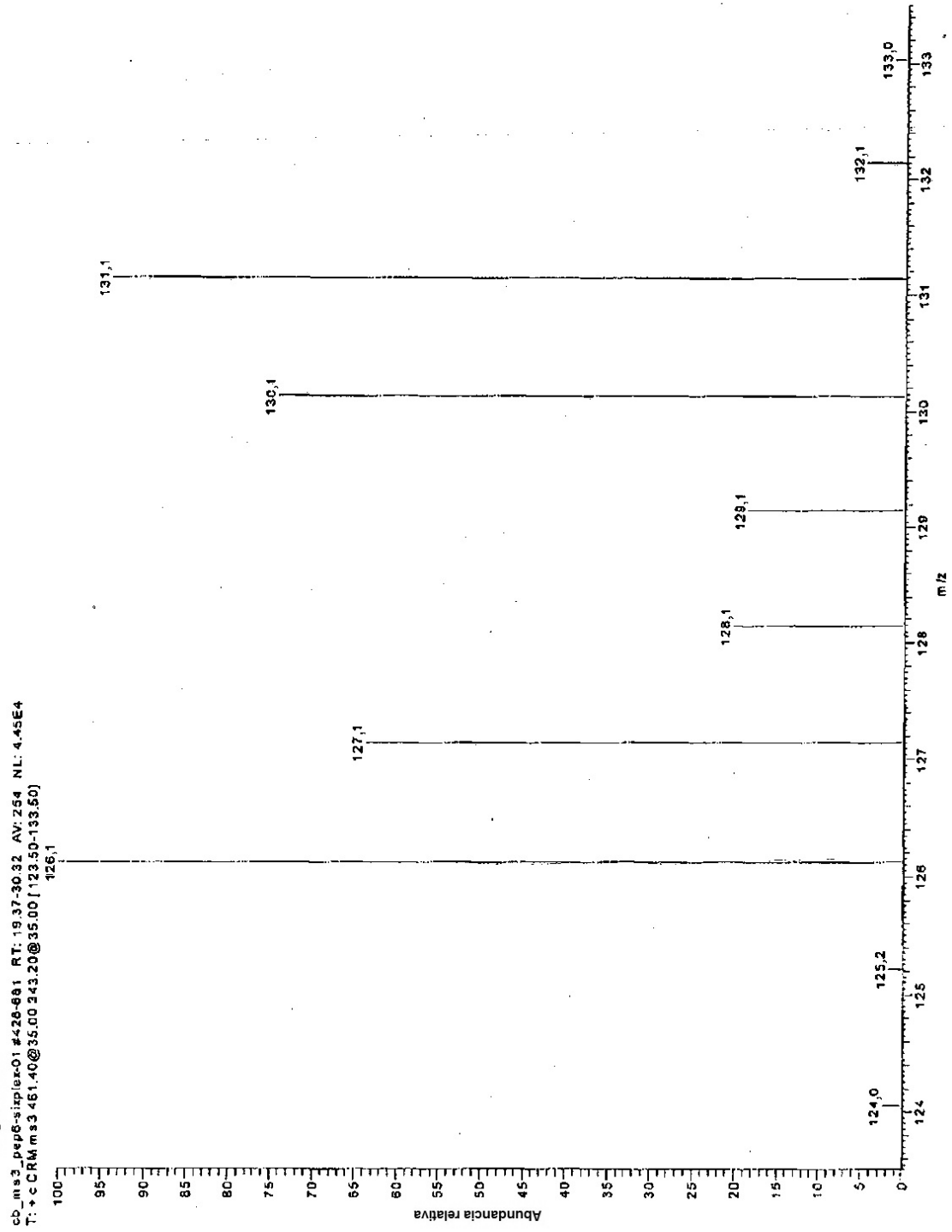


Figura 14b



Cuantificación en modo EM/EM/EM b1-ion

Figura 15
cb_ms3_pep1-6-sixplex-01 #2 RT: 0.17 AV: 1 NL: 7.76E7
T: P Full MS (250.00-1500.00)

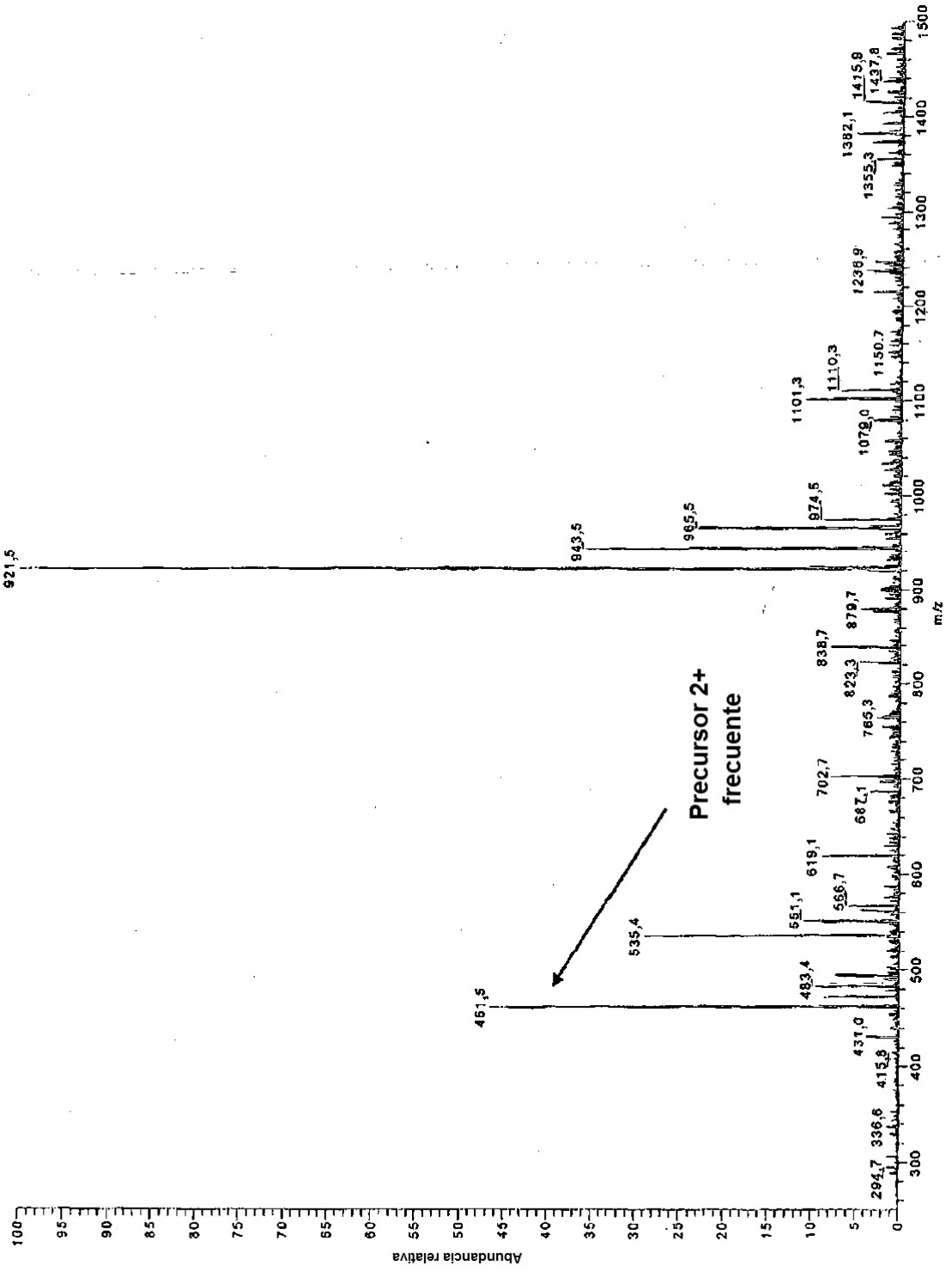


Figura 16

cb.ms3_pept1-6-s:plex-01 #16-74 RT: 1.08-4.21 AV: 58 NL: 2.90E7
 T: *c:Full.ms2.461.40@35.00 [110.00-1000.00]

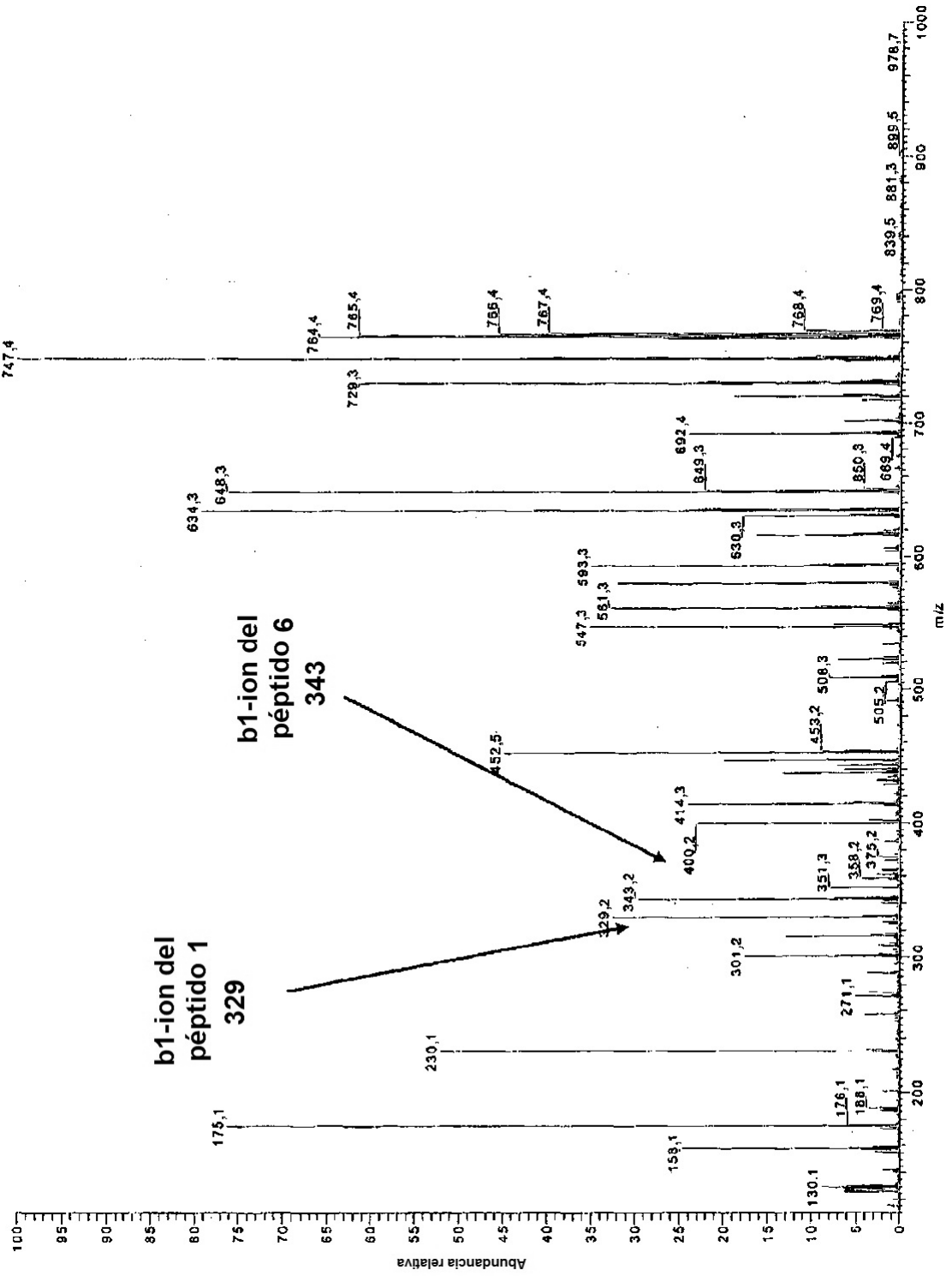
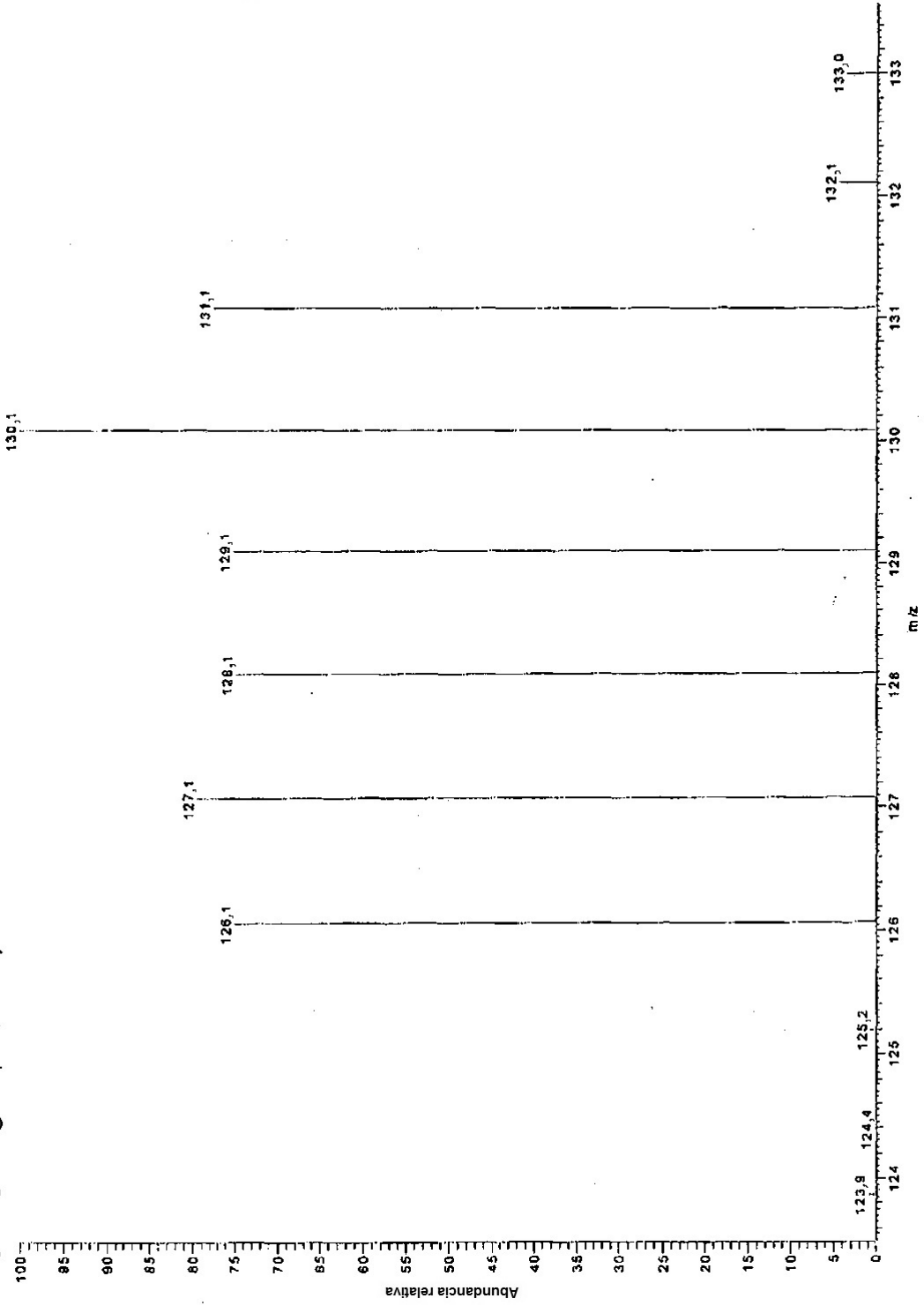


Figura 17

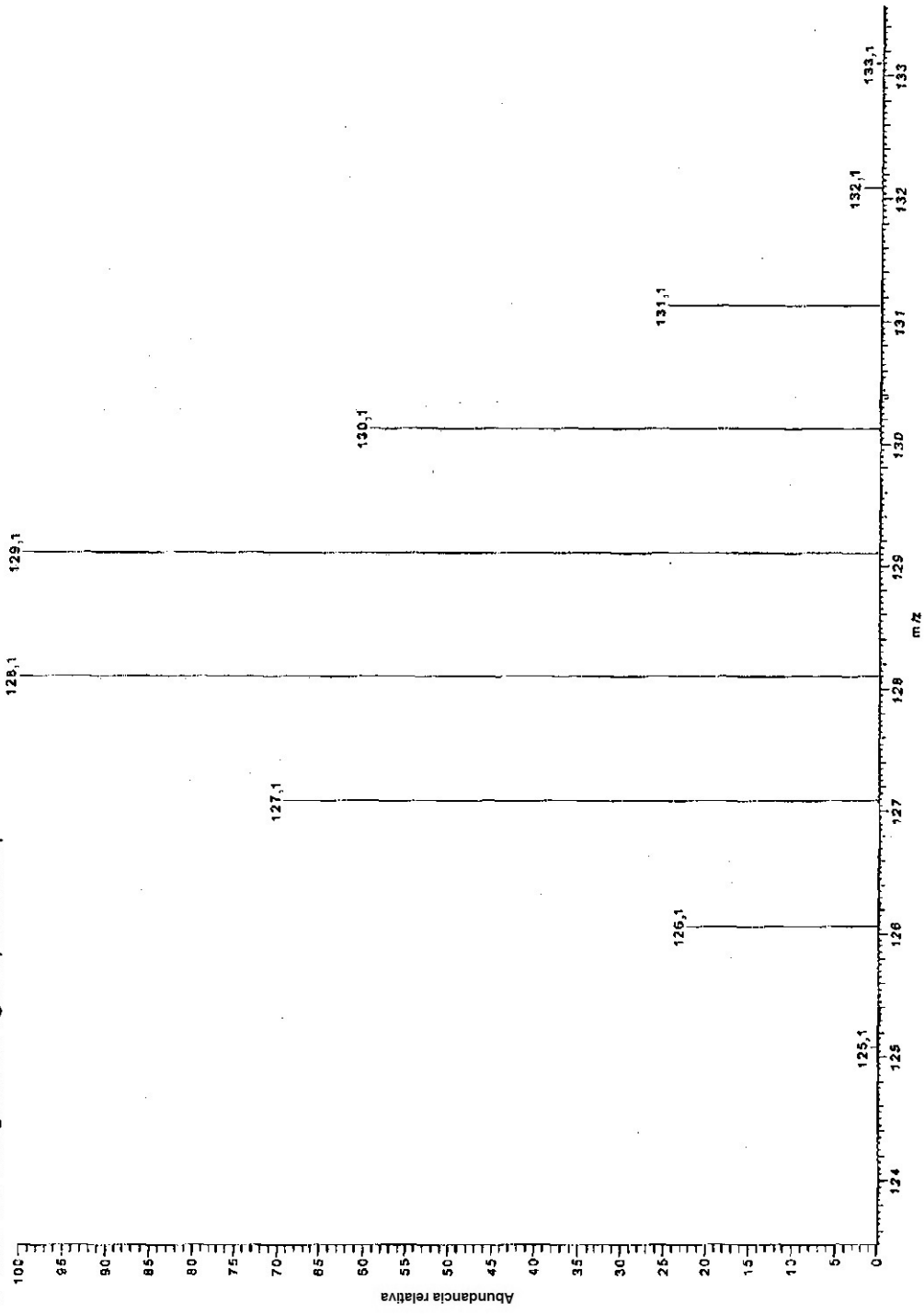
cb_m93_pep16-sim16x01#143-318 RT: 6.65-11.34 AV: 176 NL: 1.8356
T: +cSRM.ms2.461.40@35.00 [129.50-133.50]



Cuantificación en modo EM/EM: cuantificación mixta, dado que los dos péptidos isobáricos se seleccionaron->proporción fals

Figura 18a

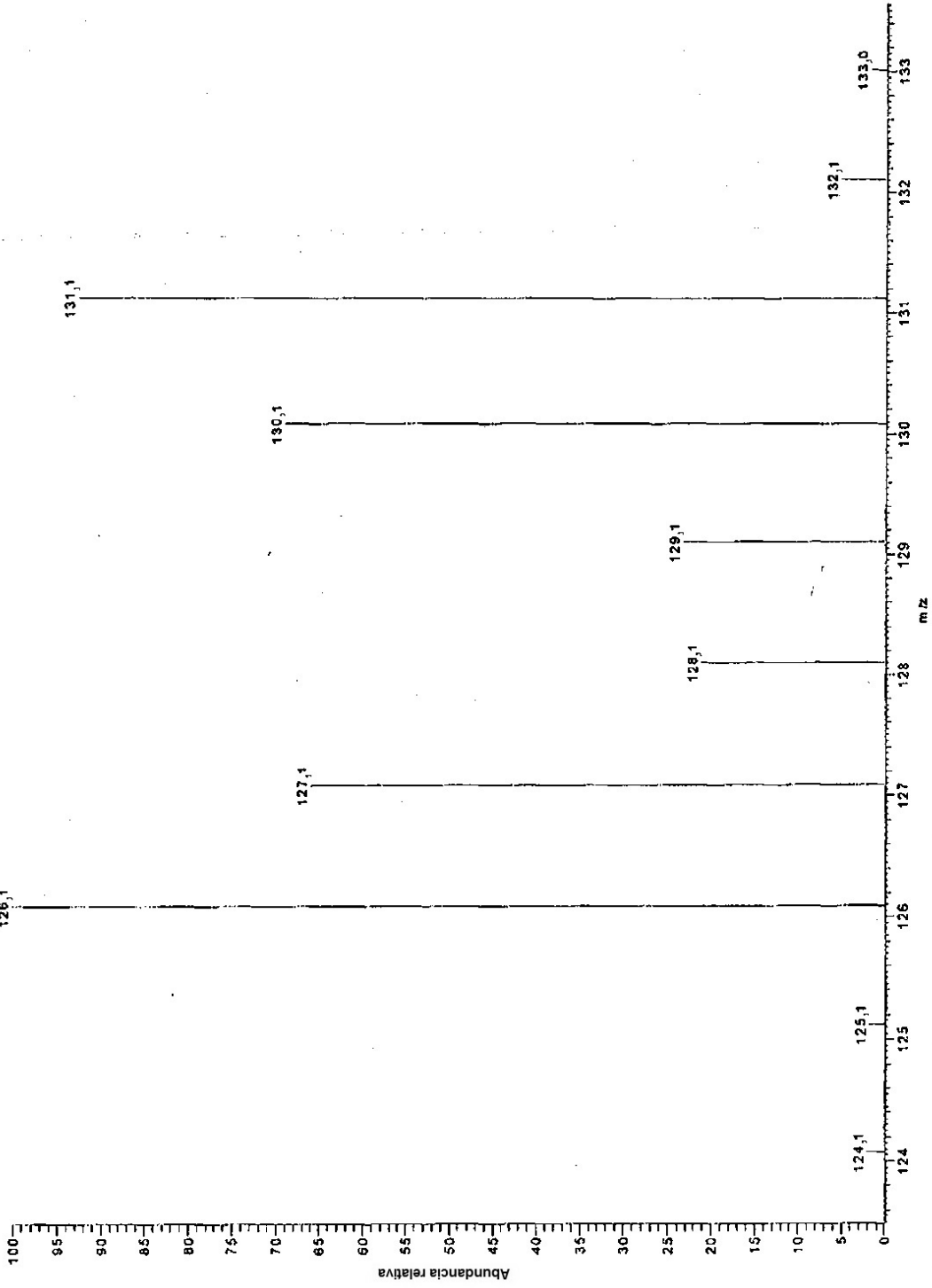
cb_m33_pe01-6-si/plex01#383-487 RT: 13.66-18.26 AV: 105 NL: 1.63E4
F: -c OFM m/z 461.40@35.00 320.10@35.00 [123.50-133.50]



Quantificación en modo EM/EM/EM : cuantificación selectiva, dado que los iones b1 son diferentes->proporciones correctas

Figura 18b

cb_m3_pep1-6-silixia-01 #350-812 RT: 21.08-32.56 AV: 262 NL: 1.69E4
F: +cCRM.m=3.451.40 @35.00 343.10 @35.00 [123.50-133.50]



Cuantificación en modo EM/EM /EM : cuantificación selectiva, dado que los iones b1 son diferentes->proporciones correctas

Figura 19

cb_ms3_per2-3-simplex01#3 RT: 0.30 AV: 1 NL: 4.42E7
T: + p Full ms [250.00-1500.00]

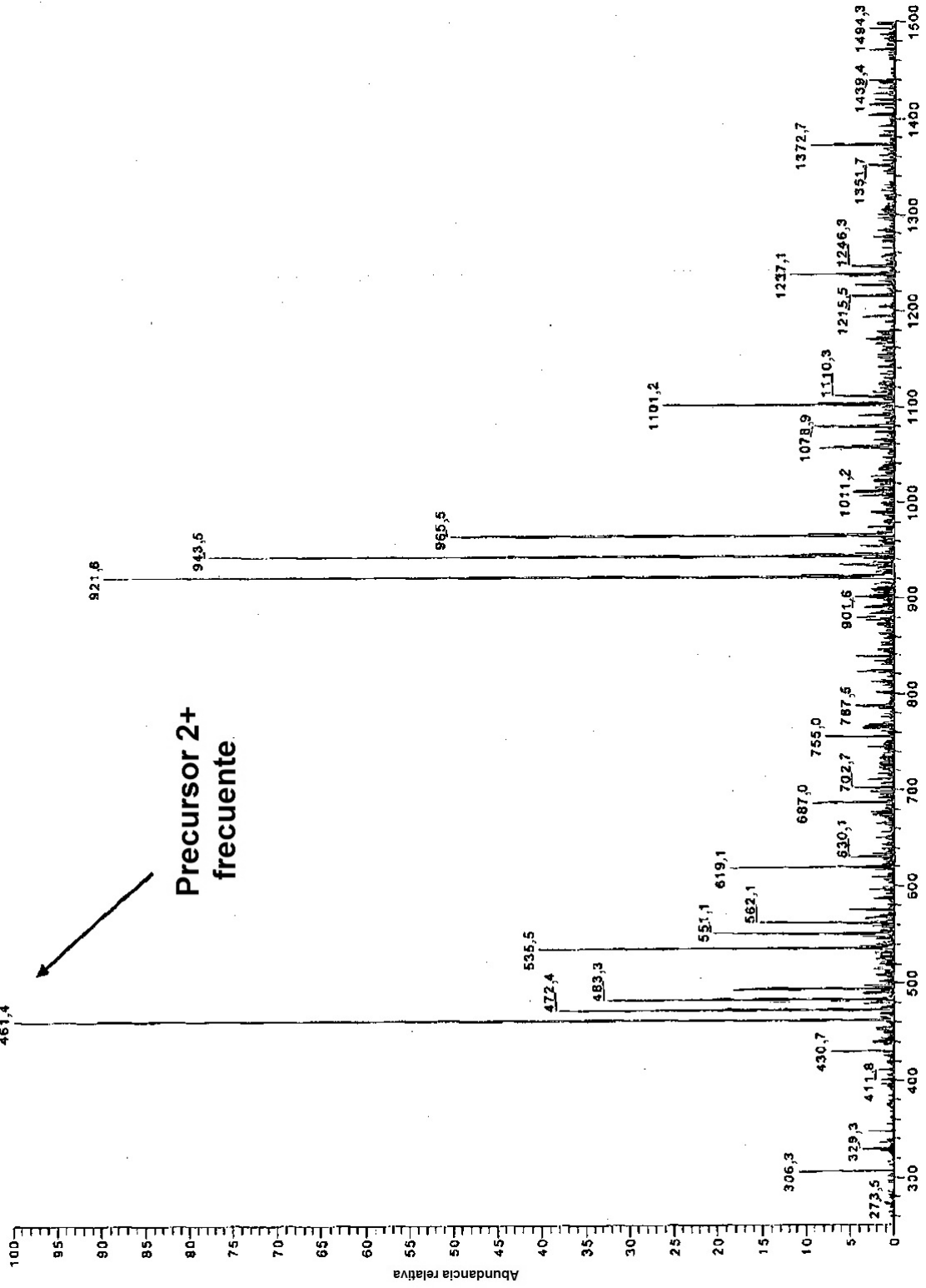


Figura 20

ch_ms3_pep2-3-s:plex-01 #11-44 RT: 0.80-2.58 AV: 34 NL: 4.77E7
T: + c:Full.ms2.481.40@35.00 [110.00-1000.00]

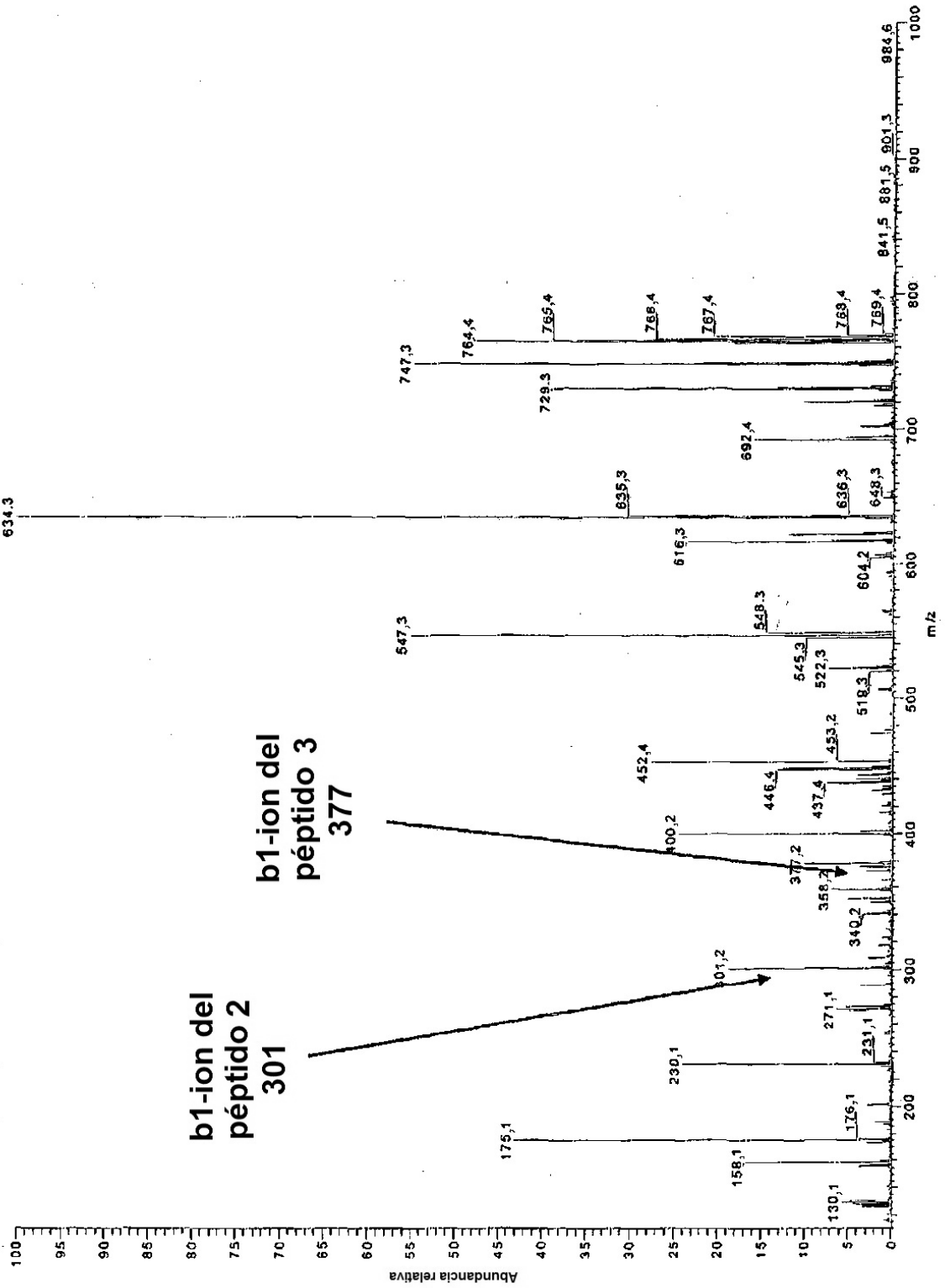
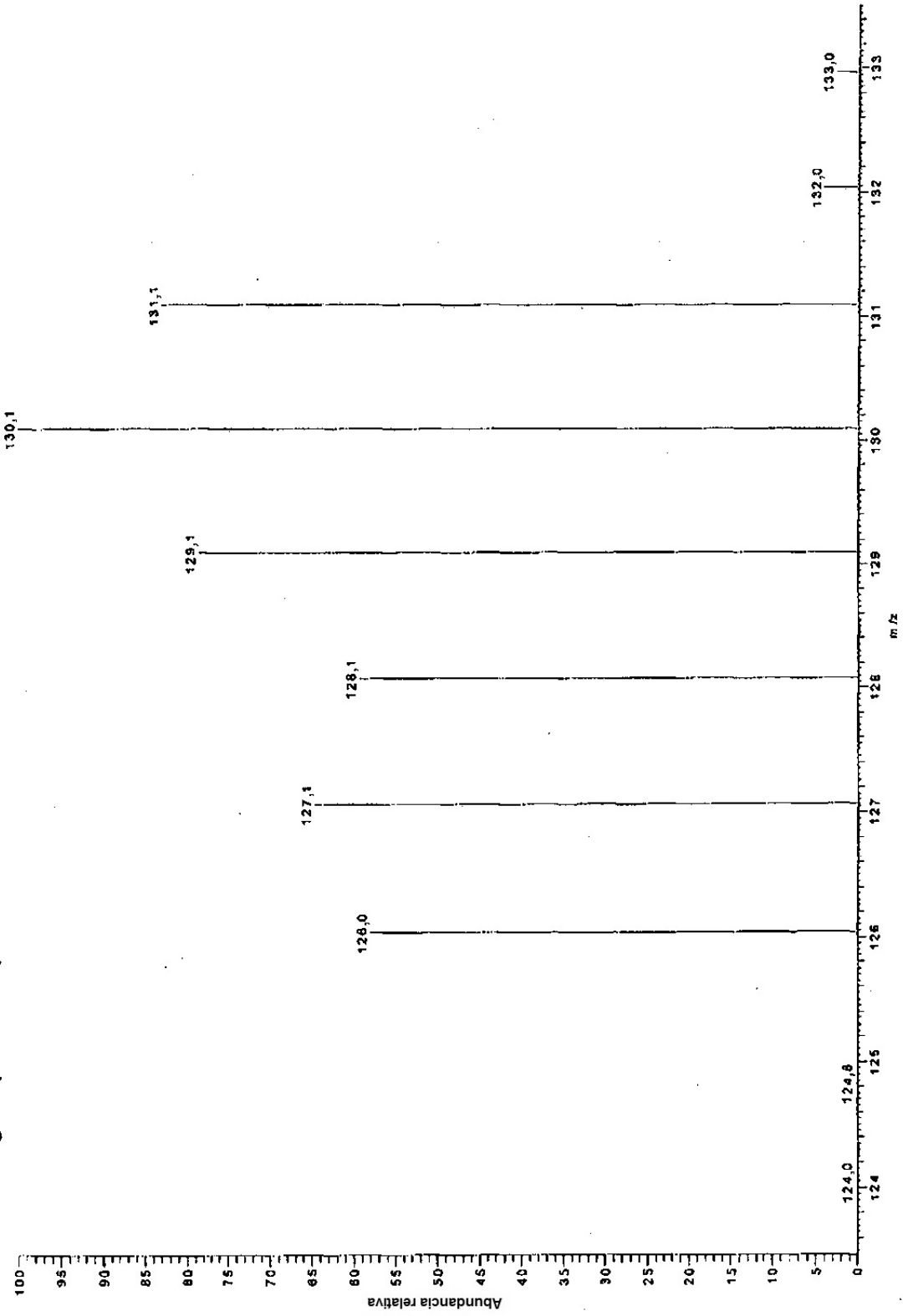


Figura 21

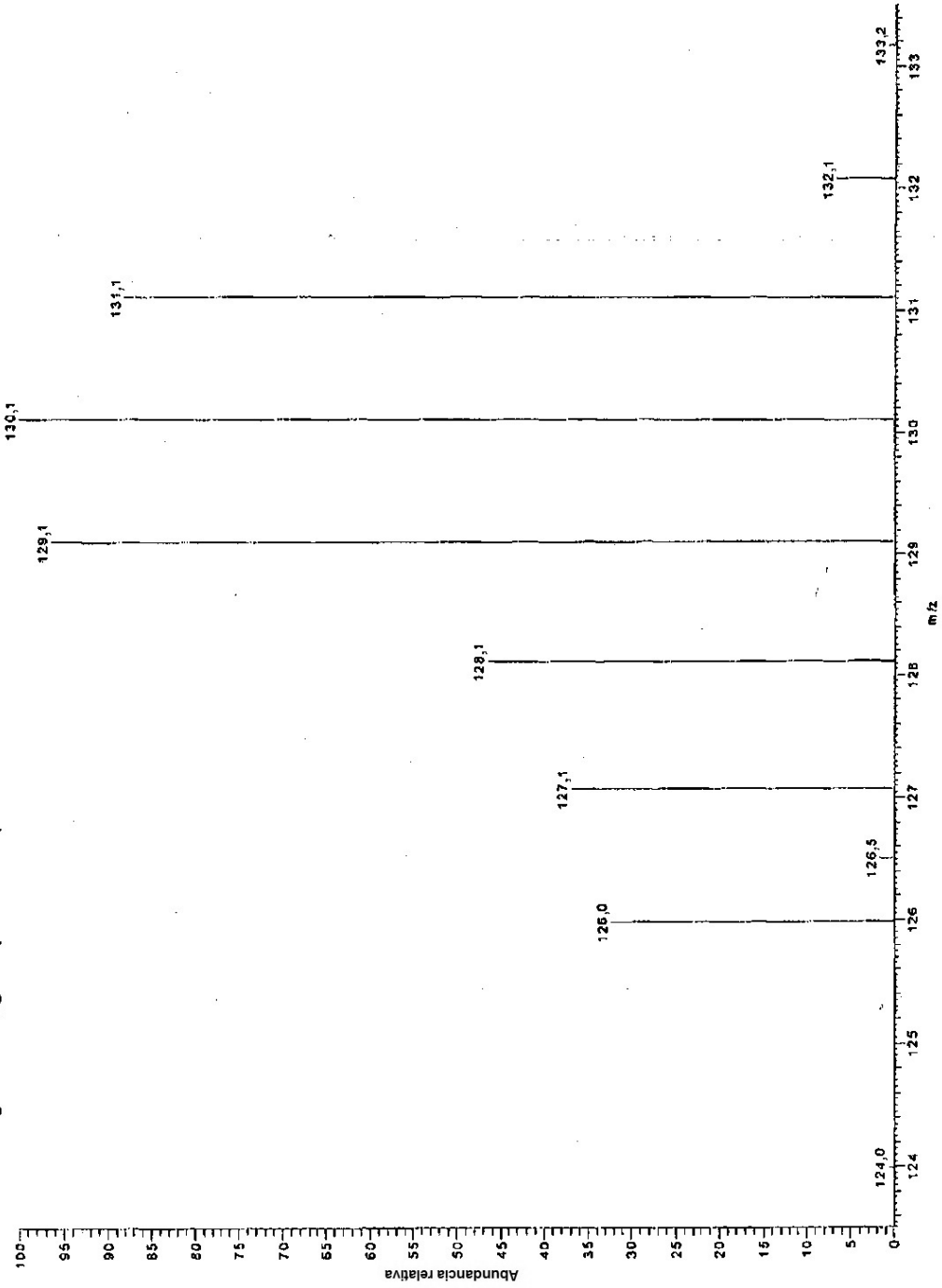
cb_ms3_pep23-sixplex-01_468-174 RT: 3.74-5.57 AV: 107 NU: 2.57E6
T: + cSRM ms2 461.40@35.00 (123.50-133.50)



Quantitation in MS/MS mode: mixed quantitation, because the 2 isobaric peptides were both selected → false ratio

Figura 22a

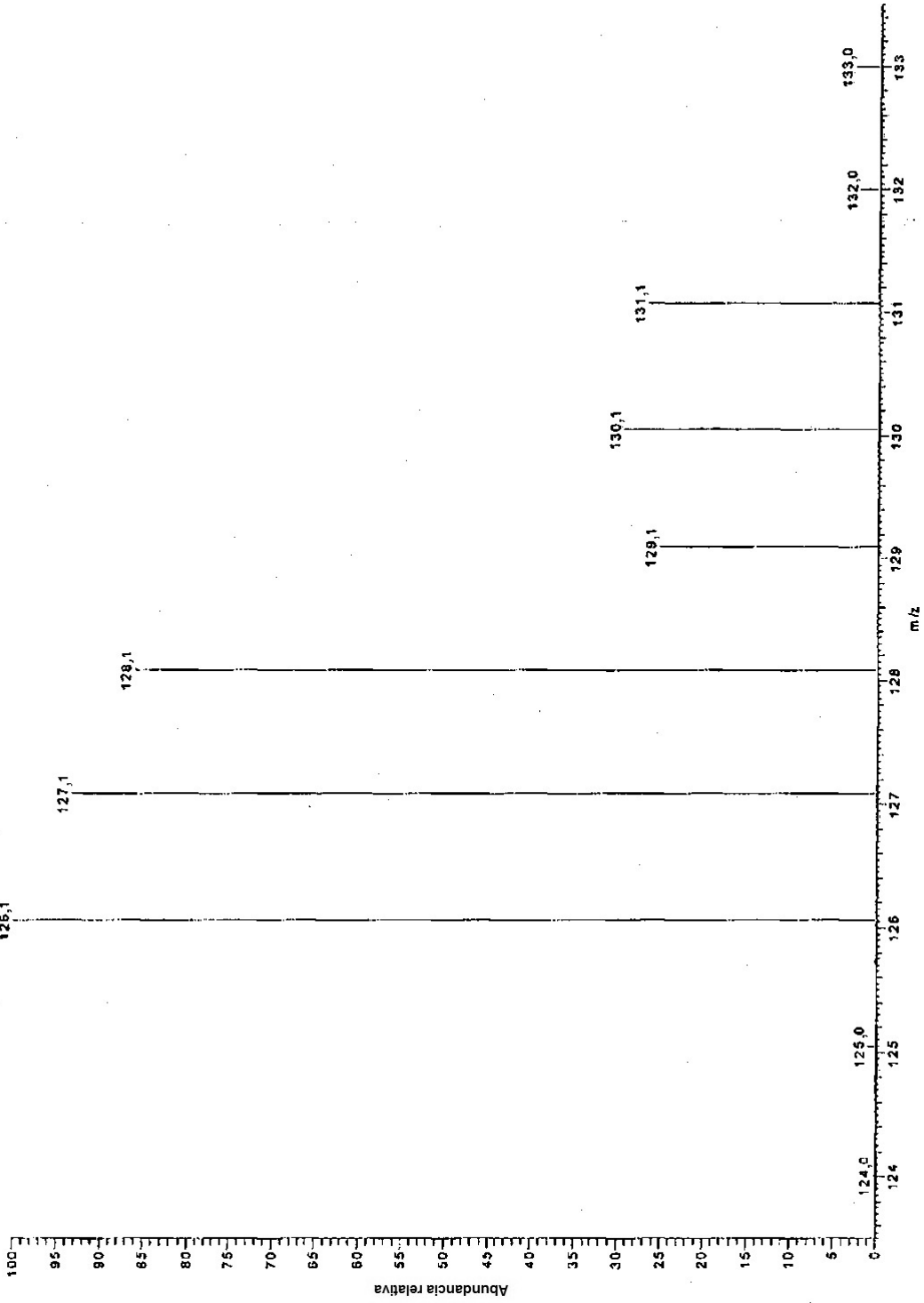
cb.ms3.pap2.3.isoplex-01 #209-386 RT: 7.70-16.05 AV: 135 NL: 6.74E3
F: + C.F.M.ms3-661.40@35.00 301.00@35.00 [123.50-133.50]



Quantificación en modo EM/EM/EM : cuantificación selectiva, dado que los iones b1 son diferentes->proporciones bastante correctas

Figura 22b

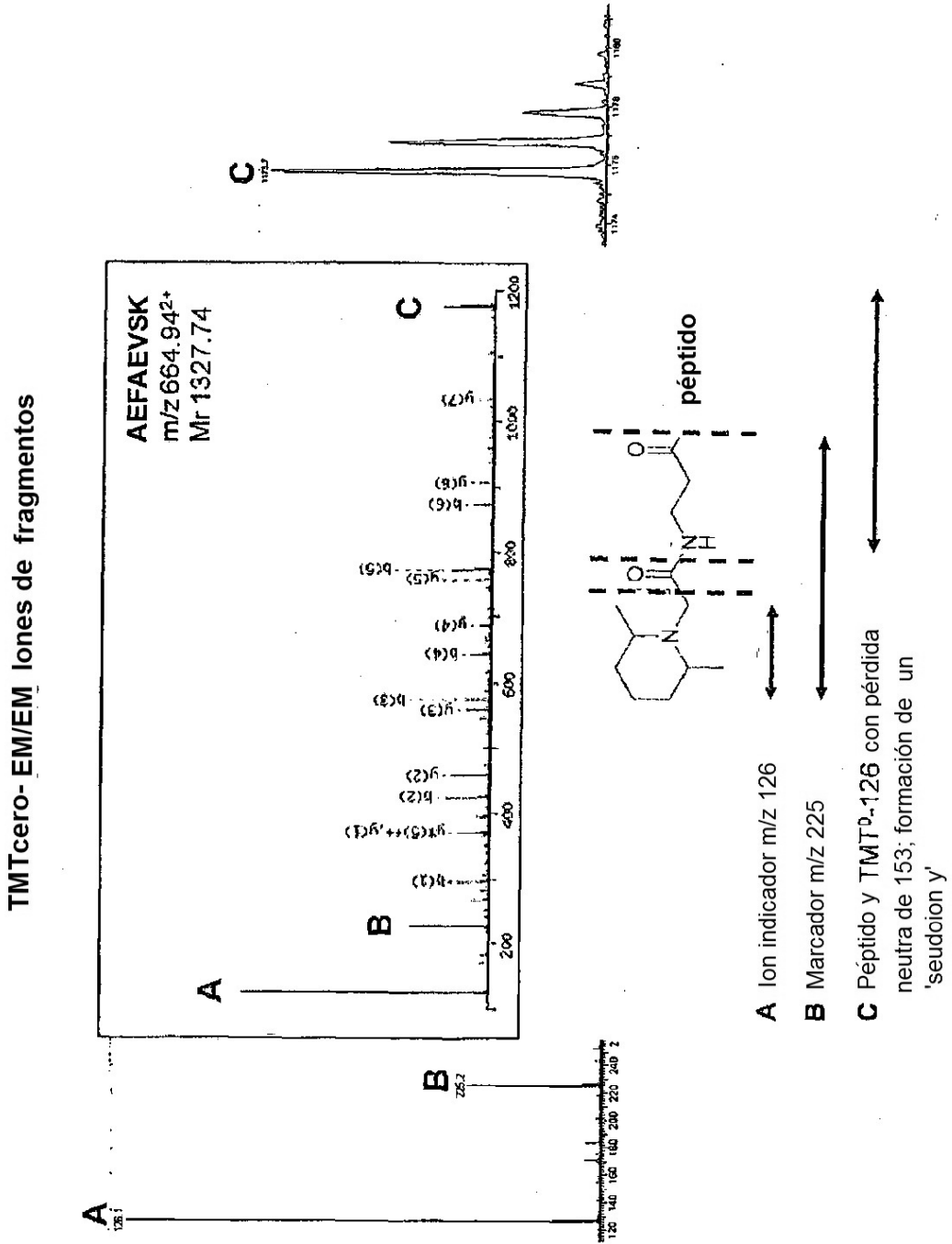
cb_ms0_pep2-3-siplex-01 #373-1282 RT: 16.76-59.50 AV: 910 NL: 7.76E3
F: + c CRM m.s.3 461.40@35.00 377.20@35.00 [122.50-133.50]
125,1



Cuantificación en modo EM/EM/EM : cuantificación selectiva, dado que los iones b1 son diferentes->proporciones

bastante correctas

Figura 23



TMTduplex-EM/EM Iones de fragmentos

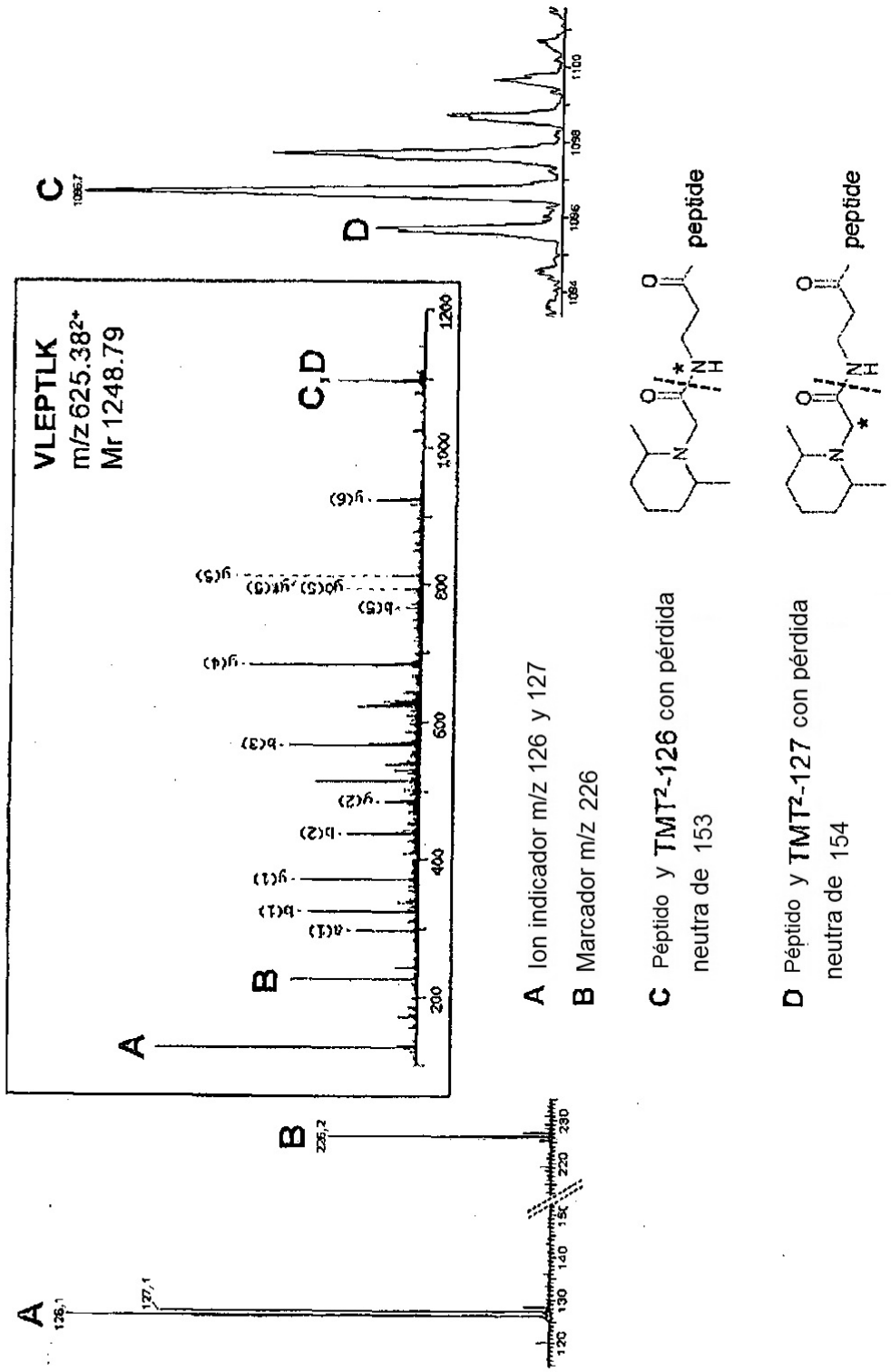


Figura 24

Figura 25a y Figura 25b

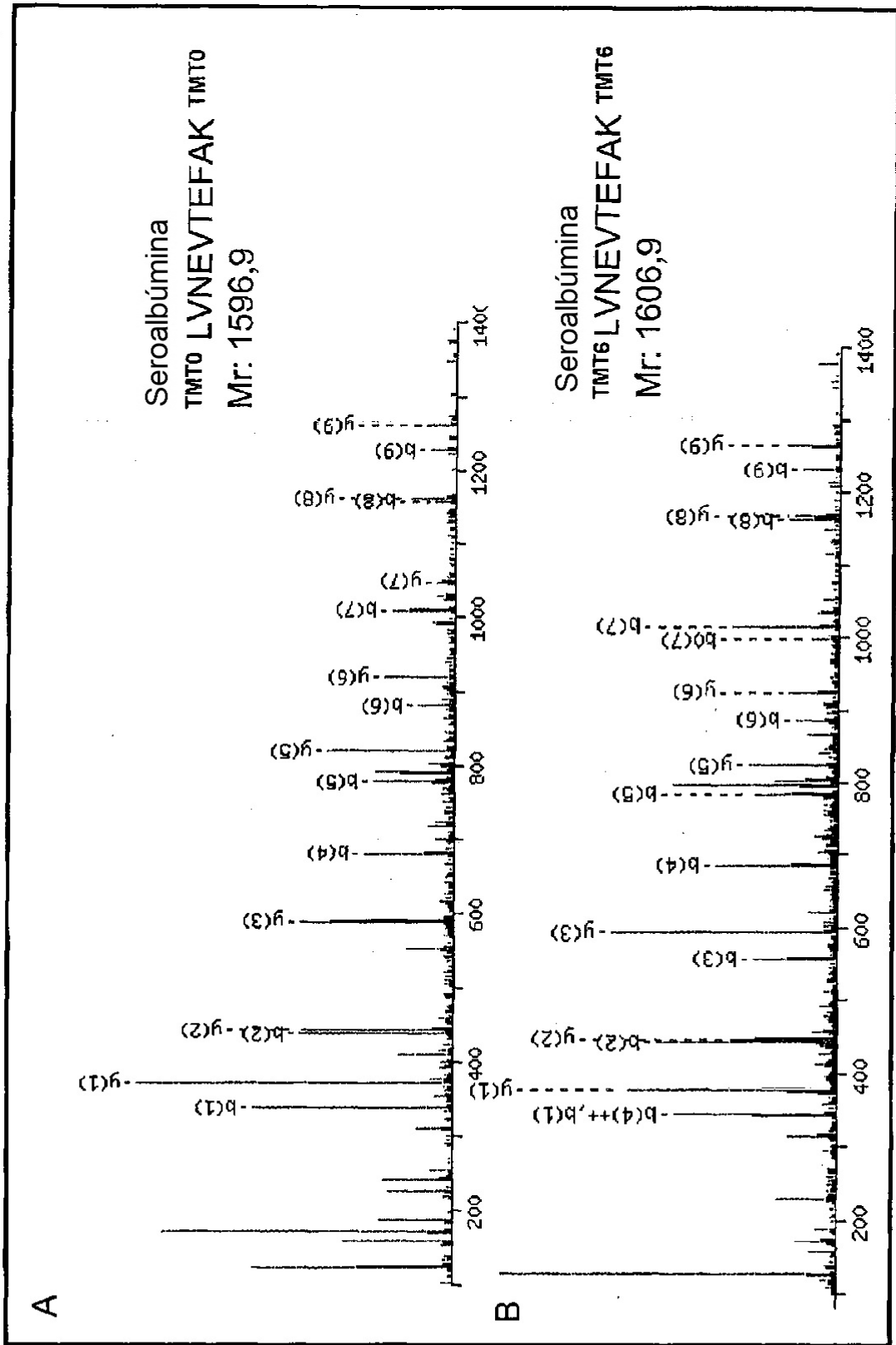


Figura 26a y 26b

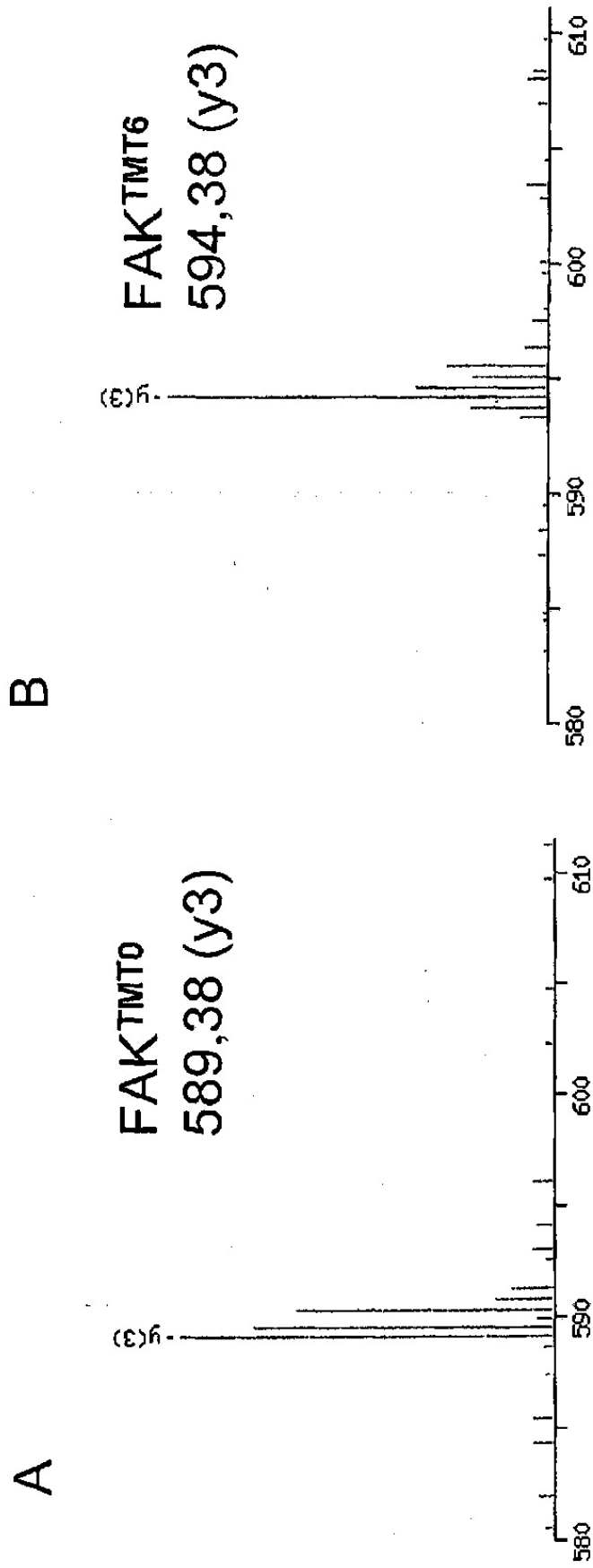


Figura 27a y 27b

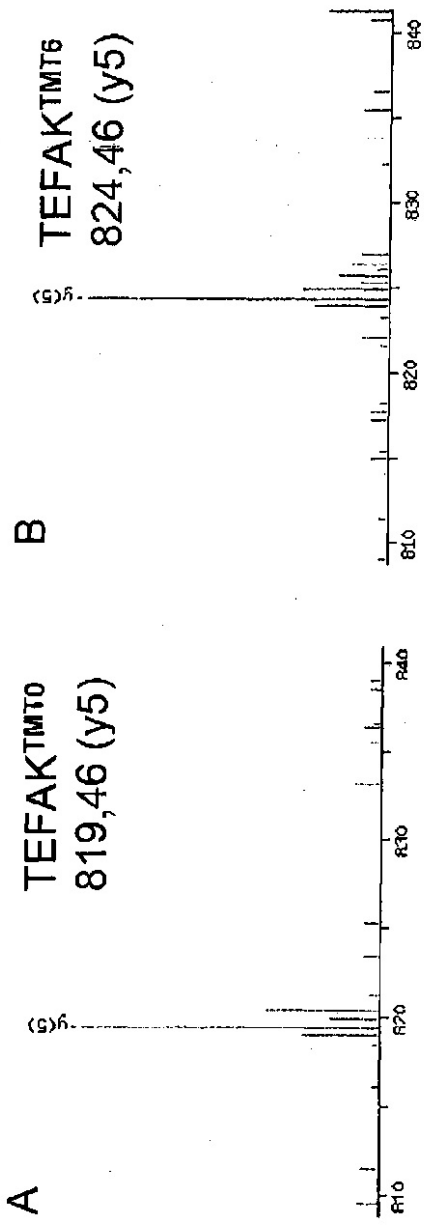


Figura 28a y 28b

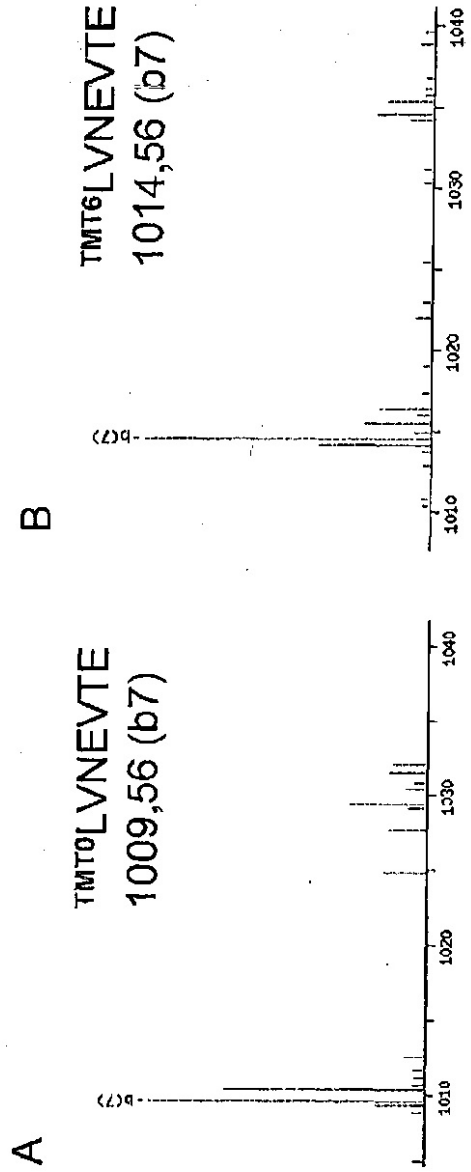


Figura 29a

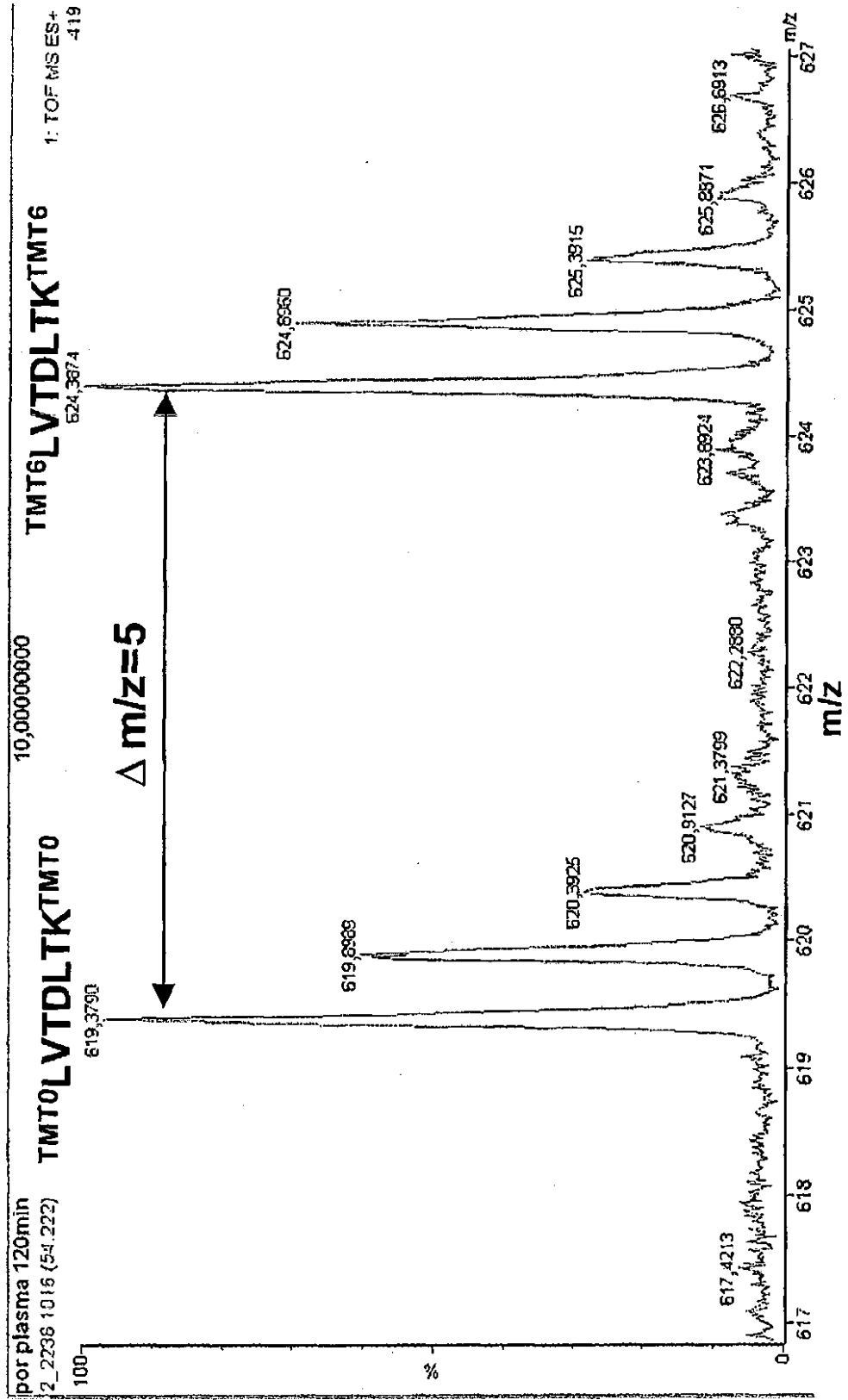
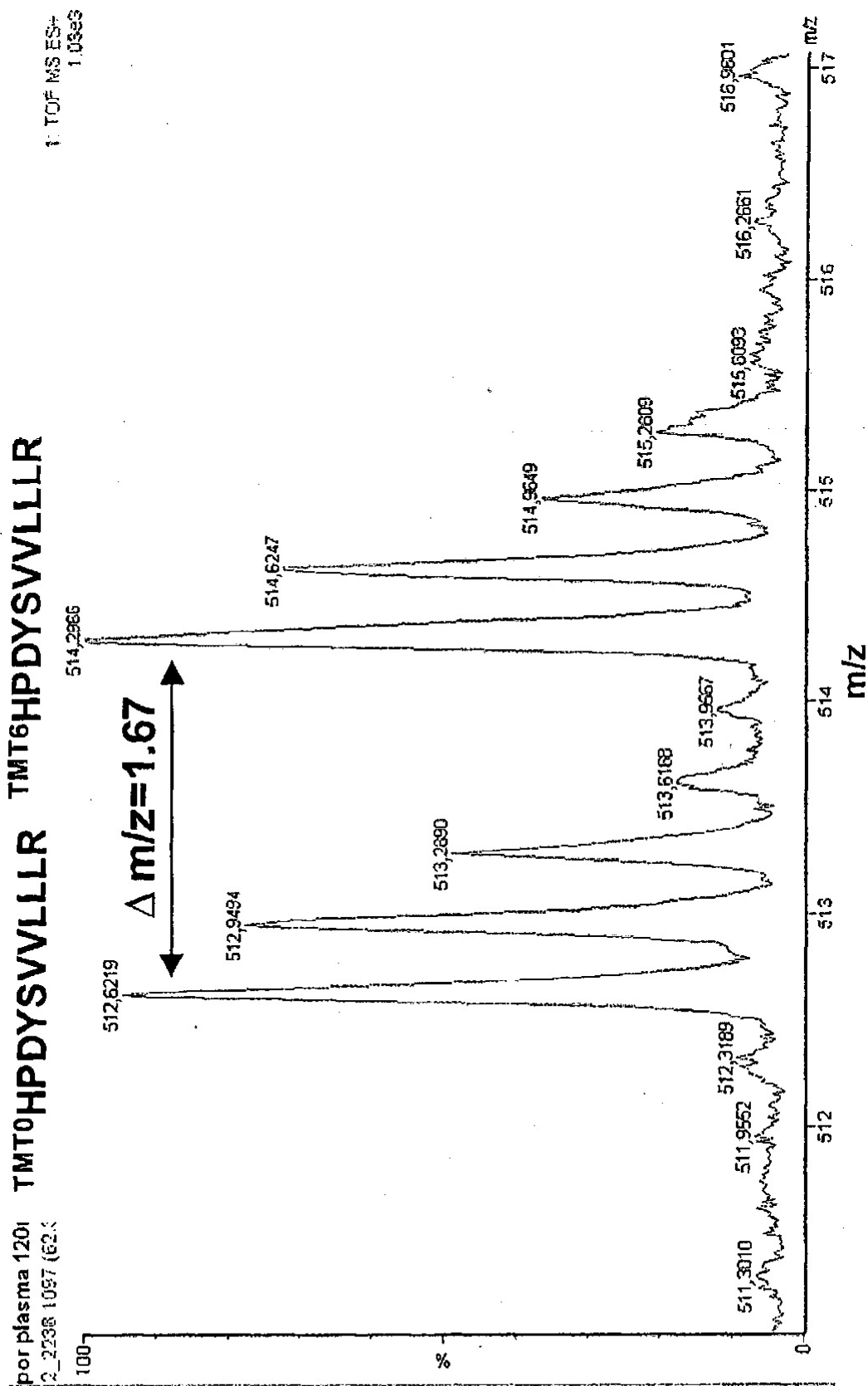


Figura 29



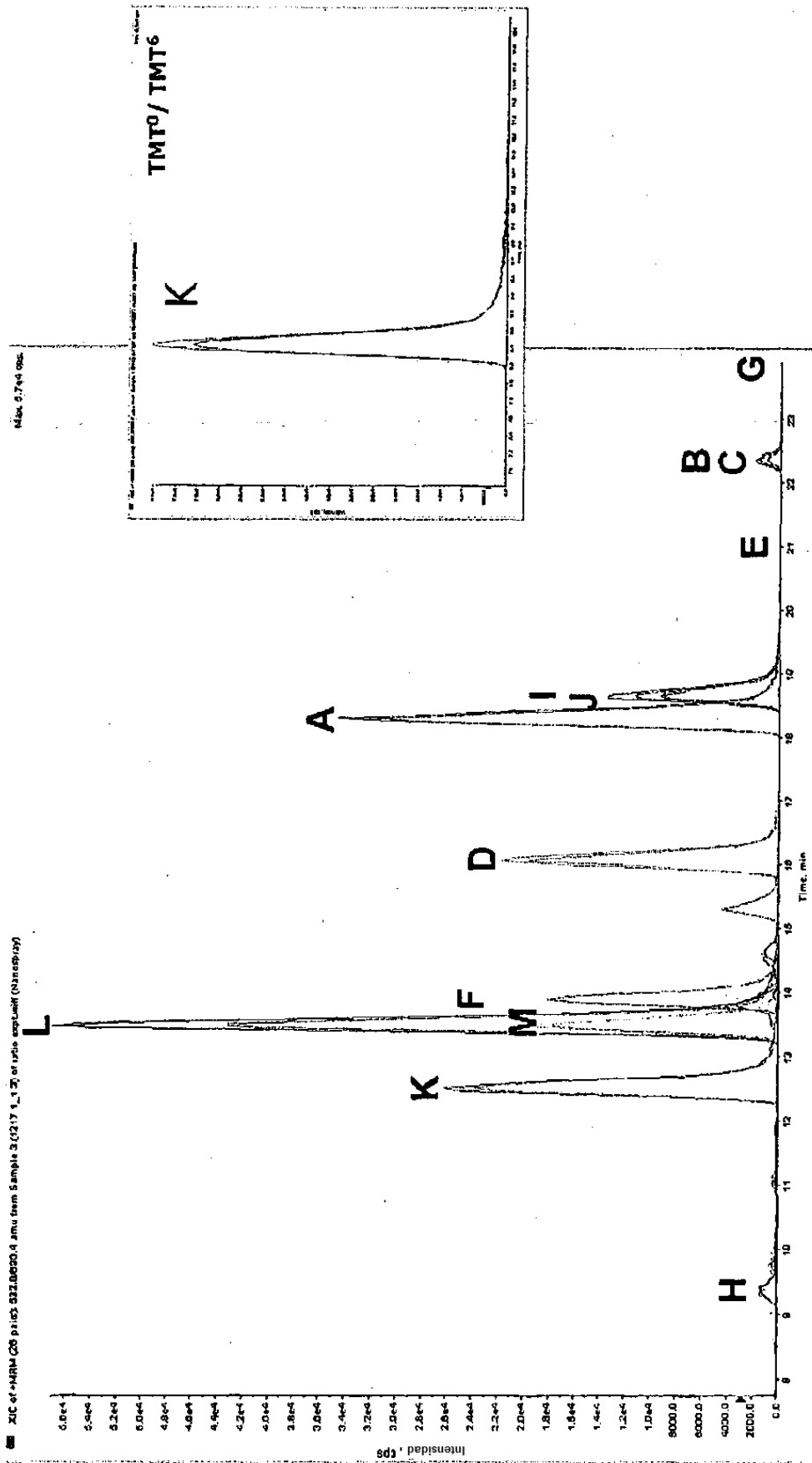


Figura 30

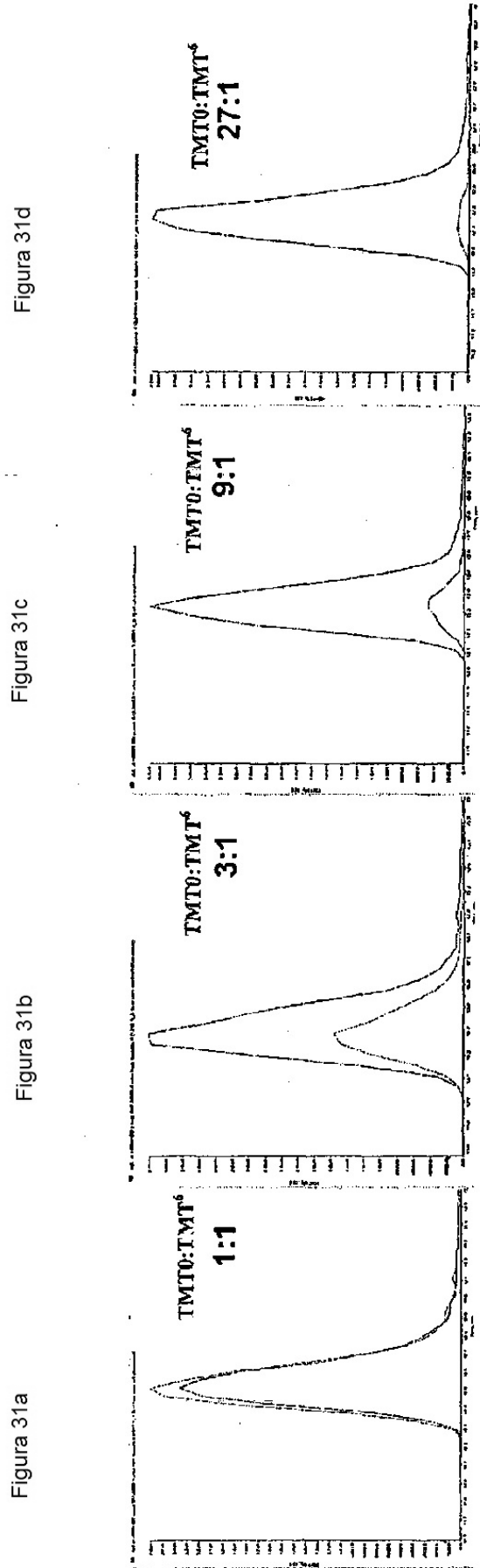


Figura 31a

Figura 31b

Figura 31c

Figura 31d

Cromatogramas iónicos MRM del péptido K marcado con TMT0/6 a proporciones de 1:1, 3:1,9:1 y 27:1

Figura 32

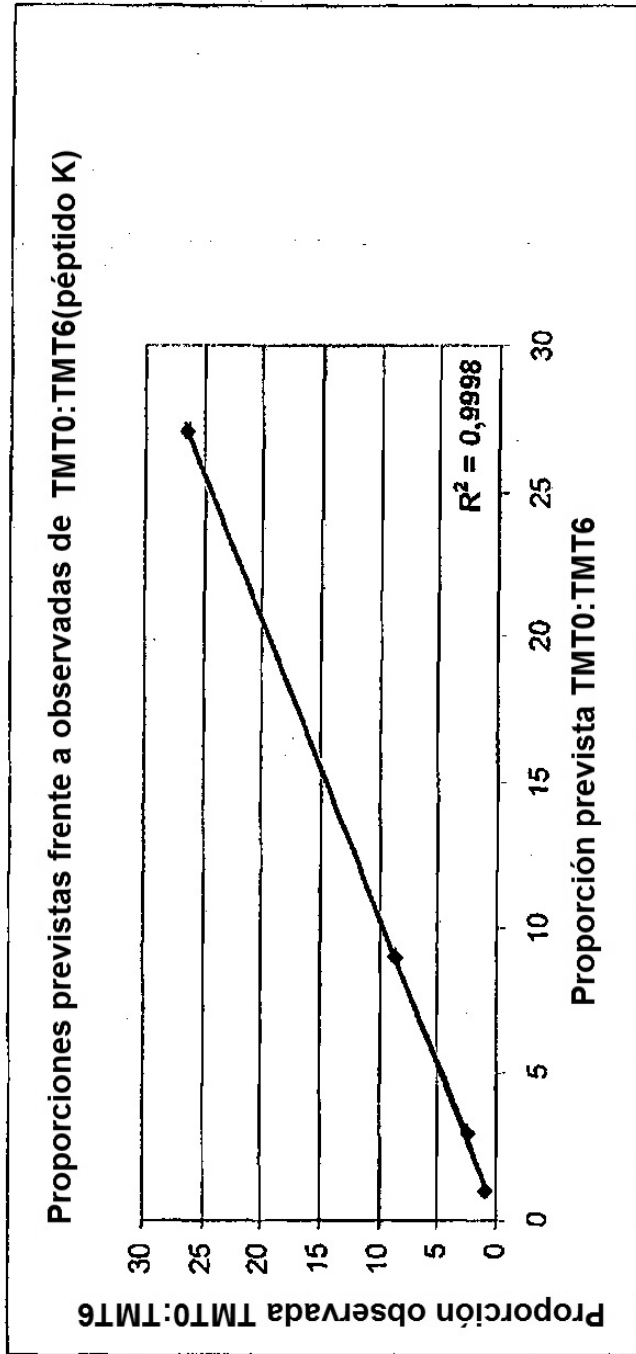


Figura 34

