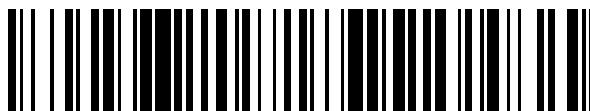


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 505 390**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2009 E 09720766 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.07.2014 EP 2252896**

54 Título: **Método para una detección y cuantificación altamente sensible de biomoléculas usando espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS)**

30 Prioridad:

**12.03.2008 US 35803 P**  
**09.01.2009 US 143504 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.10.2014**

73 Titular/es:

**BIOSIMS TECHNOLOGIES (100.0%)**  
**75, route de Lyons-la-forêt, Seine Biopolis 2**  
**76000 Rouen, FR**

72 Inventor/es:

**RIPOLL, CAMILLE;**  
**NORRIS, VICTOR;**  
**MISEVIC, GRADIMIR;**  
**LEGENT, GUILLAUME y**  
**DELAUNE, ANTHONY**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 505 390 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

Método para una detección y cuantificación altamente sensible de biomoléculas usando espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS)

5

**Campo de la invención**

La invención se refiere a un método para la detección y cuantificación de biomoléculas, tales como ADN, ARN o proteínas, usando marcaje isotópico y espectrometría de masas de iones secundarios, y matrices diseñadas para llevar a cabo dicho método.

10

**Antecedentes de la invención**

A principios de los sesenta, Castaing y Slodzian desarrollaron la microscopía de emisión de iones de masa filtrada usando iones secundarios, que es parte de una técnica que más tarde se denominó espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS). Con esta técnica, se usa un haz de iones (el haz de iones primarios) como sonda para la pulverización catódica de las capas atómicas superficiales de una muestra en átomos o grupos atómicos, una pequeña fracción de los cuales está ionizada. En un instrumento SIMS, estos iones secundarios se separan de acuerdo con la masa y después se usan para medir una corriente de iones secundarios para crear, por ejemplo, una imagen de la masa atómica cuantitativa de la superficie analizada.

15

20

La SIMS se ha convertido en una herramienta principal en estudios de ciencia de semiconductores y superficies, geoquímica, la caracterización de material orgánico, y cosmoquímica. Sin embargo, la microscopía de iones se ha considerado durante mucho tiempo solamente un método marginal para resolver problemas en ciencias de la vida, debido principalmente a la poca resolución lateral (1-0,5  $\mu\text{m}$ ) y capacidad de separación de masas insuficiente.

25

Las mejoras tecnológicas y conceptuales condujeron a un progreso significativo tanto en la capacidad de resolución lateral como en la resolución de masas, particularmente debido al uso de un haz de iones primarios finamente ajustado. La microscopía SIMS por lo tanto se ha convertido en una herramienta de captura de imágenes muy potente. Por ejemplo, Lechen *et al.* fueron capaces de usar la técnica SIMS para tomar imágenes de estereocilios individuales, de los orgánulos mecanosensoriales de las células internas de la cóclea (Lechene *et al.* Journal of Biology, 2006, 5:20). En otro experimento, fueron capaces de estudiar la fijación del nitrógeno en bacterias cultivadas en una atmósfera de  $^{15}\text{N}$ . El uso de la técnica SIMS también les permitió a Lechene *et al.* localizar, cuantificar y comparar la fijación de nitrógeno en células únicas y estructuras subcelulares (Lechene *et al.* Science 2007, 317 (1563)). Por lo tanto, la tecnología SIMS se usa ampliamente para tomar imágenes de células o tejidos, y es una herramienta diagnóstica potente.

30

35

La técnica SIMS también se usó para detectar la hibridación de ADN no marcado con micromatrices de ácidos nucleicos peptídicos (ANP) (Brandt *et al.*, 2003, Nucleic Acids Research, 31: 19; Brand *et al.*, 2006, Applied Surface Science, 252; 6935). En estos experimentos, las dobles cadenas ANP/ADN y ANP/ARN se visualizaron mediante SIMS detectando los fosfatos que son una parte integral de los ácidos nucleicos pero que no aparecen en absoluto en los ANP.

40

La invención tiene como objetivo proporcionar un método para detectar y cuantificar la presencia o ausencia de una serie de biomoléculas en una muestra usando la técnica SIMS. El método descrito en Brandt *et al.* presenta los siguientes inconvenientes (i) solo se puede aplicar con sondas ANP o sondas que no contengan fosfatos y (ii) no permite la cuantificación de la interacción sonda/diana. Por lo tanto, los solicitantes tienen como objetivo proporcionar un método universal que se pueda aplicar a un gran número de muestras para la detección y cuantificación de un gran número de interacciones sonda/diana en cada muestra usando la técnica SIMS, determinándose la detección y la cuantificación de dichas interacciones mediante el cálculo de la proporción isotópica sonda/diana (véase Figura 1):

45

50

**Sumario de la invención**

La presente invención usa una matriz que comprende un sustrato plano que tiene una superficie conductora y una serie de áreas discretas que contienen sondas que están marcadas con al menos un isótopo raro, estable o inestable o isótopo exógeno.

55

De acuerdo con una realización, dicho sustrato plano que tiene una superficie conductora es una oblea de silicio.

60

De acuerdo con una realización, dichas sondas están marcadas con al menos un isótopo pesado estable seleccionado del grupo  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{14}\text{S}$  y  $^{36}\text{S}$ , o con al menos un isótopo inestable seleccionado del grupo  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$  o con al menos un isótopo exógeno seleccionado del grupo de  $^{79}\text{Br}$  y  $^{81}\text{Br}$ .

65

De acuerdo con una realización, dicha matriz es una micromatriz donde cada área discreta tiene una de las dimensiones de longitud, anchura o diámetro que es de 1  $\mu\text{m}$  a 1000  $\mu\text{m}$ .

De acuerdo con una realización, cada área discreta es un micropocillo que comprende sondas que están marcadas con al menos un isótopo raro, estable o inestable o un isótopo exógeno.

5 De acuerdo con una realización, dicha matriz es una nanomatriz donde cada área discreta tiene una de las dimensiones de longitud, anchura o diámetro que es de 1 nm a 1000 nm.

De acuerdo con una realización, cada área discreta es un nanopocillo que comprende sondas que están marcadas con al menos un isótopo raro, estable o inestable o isótopo exógeno.

10 De acuerdo con una realización, cada micropocillo comprende una serie de nanopocillos, y dichos nanopocillos comprenden las sondas que están marcadas con al menos un isótopo raro, estable o inestable o isótopo exógeno.

La presente invención es un método para detectar y cuantificar en al menos una muestra la presencia o ausencia de al menos una biomolécula, que comprende:

- 15
- (a) poner en contacto dicha al menos una muestra con una matriz como se ha descrito anteriormente en el presente documento,
  - (b) lavar y secar la matriz,
  - 20 (c) detectar y contar mediante SIMS los iones secundarios comunes junto con los iones secundarios raros correspondientes.

De acuerdo con una realización, cada muestra a ensayar se pone en contacto con una o más áreas discretas de la matriz.

25 De acuerdo con una realización, dicha muestra a ensayar es una única célula.

De acuerdo con una realización, dicho método es para determinar un atlas molecular de la muestra ensayada, donde dicho atlas molecular es la determinación del transcriptoma, proteoma, lipidoma, metaboloma, glicoma y/o interactoma de dicha muestra.

30 De acuerdo con una realización, dicho método es para predecir una predisposición a una enfermedad, o para diagnosticar una enfermedad en un sujeto que lo necesite.

35 De acuerdo con una realización, dicho método es para controlar la eficacia de un agente terapéutico administrado a un sujeto para tratar una enfermedad.

De acuerdo con una realización, dicho método es para el cribado de agentes terapéuticos.

#### 40 Breve descripción de las figuras

**Figura 1:** Ilustración esquemática del principio de la detección SIMS de la unión de las sondas a sus proteínas diana. Las biomoléculas (sondas y dianas) se fragmentan hasta el nivel atómico (condiciones de SIMS dinámica). Por lo tanto, cada par individual de sonda/diana da cientos de átomos de  $^{15}\text{N}$  y  $^{14}\text{N}$  (en la forma de iones moleculares secundarios CN<sup>-</sup> en un experimento real) que se cuentan fácilmente en el analizador SIMS (amplificación). La medida del incremento de la proporción isotópica  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  permite la cuantificación de aquellas proteínas diana unidas a anticuerpos.

**Figura 2:** incremento o disminución de la PDI dependiendo de si la sonda o la diana están marcadas.

**Figura 3:** fracción isotópica de  $^{15}\text{N}$ .

**Figura 4:** fracción isotópica de  $^{13}\text{C}$ .

#### 50 Descripción detallada de la invención

##### Definiciones

- 55
- La expresión "ácido nucleico" como se usa en el presente documento significa un polímero compuesto de nucleótidos, por ejemplo, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o compuestos producidos sintéticamente tales como los ANP que pueden hibridar con ácidos nucleicos de origen natural de un modo específico de secuencia análogo al de los dos ácidos nucleicos de origen natural, por ejemplo, pueden participar en interacciones de emparejamiento de bases de Watson y Crick.
  - 60 • La expresión "ácido ribonucleico" y el término "ARN" como se usan en el presente documento significan un polímero compuesto de ribonucleótidos,
  - La expresión "ácido desoxirribonucleico" y el término "ADN" como se usan en el presente documento significan un polímero compuesto de desoxirribonucleótidos,
  - El término "oligonucleótido" como se usa en el presente documento denota multímeros de nucleótidos monocatenarios de desde aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos y hasta 200 nucleótidos de longitud.
- 65

- El término "muestra" como se usa en el presente documento se refiere a un material o mezcla de materiales, típicamente, aunque no necesariamente, en forma fluida, que contiene uno o más componentes de interés.
- Los términos "nucleósido" y "nucleótido" pretenden incluir los restos que contienen no solamente las bases purínicas y pirimidínicas conocidas, sino también otras bases heterocíclicas que se han modificado. Dichas modificaciones incluyen purinas o pirimidinas metiladas, purinas o pirimidinas aciladas, ribosas alquiladas u otros heterociclos. Además, Los términos "nucleósido" y "nucleótido" incluyen los restos que contienen no solamente azúcares de ribosa y desoxirribosa convencionales, sino también otros azúcares. Los nucleósidos o nucleótidos modificados también incluyen modificaciones en la fracción de azúcar, por ejemplo, donde uno o más de los grupos hidroxilo se reemplazan con átomos halógenos o grupos alifáticos, o se funcionalizan como éteres, aminas, o similares.
- El término "proteína" como se usa en el presente documento significa un polímero de restos de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. El término, como se usa en el presente documento, se refiere a proteínas, polipéptidos y péptidos de cualquier tamaño, estructura, o función. Típicamente, sin embargo, una proteína será de al menos seis aminoácidos de longitud. Preferentemente, si la proteína es un péptido corto, será de al menos aproximadamente 10 restos aminoácidos de longitud. Una proteína puede ser de origen natural, recombinante, o sintética, o cualquier combinación es estas. Una proteína también puede ser solamente un fragmento de una proteína o péptido de origen natural. Una proteína puede ser una única molécula o puede ser un complejo multimolecular. El término proteína también puede aplicarse a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un análogo químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente. Un polímero de aminoácidos en el que uno o más restos de aminoácidos son un aminoácido "no natural", que no corresponde a ningún aminoácido de origen natural, también está englobado por el uso del término "proteína" en el presente documento.
- La frase "oligonucleótido unido a una superficie de un soporte sólido" se refiere a un oligonucleótido o mimético de este, tal como ANP, que se inmoviliza en una superficie de un sustrato sólido en un punto, donde el sustrato puede tener una diversidad de configuraciones, por ejemplo, una lámina, microesfera, u otra estructura. En determinadas realizaciones, las colecciones de características de los oligonucleótidos que se emplean en el presente documento están presentes en una superficie del mismo soporte plano, por ejemplo, en la forma de una matriz,
- El término "matriz" engloba el término "micromatriz" y "nanomatriz". Las matrices, como se describe en más detalle más adelante, están hechas con una serie de distintas o diferentes sondas unidas a la superficie de un soporte sólido, también citadas como sondas inmovilizadas al sustrato. En una realización, la matriz que se usa en la invención es una homomatriz, en la que la matriz de la invención comprende sondas de un solo tipo químico, es decir solamente sondas de ácidos nucleicos o solamente sondas peptídicas o proteicas, etc. En otra realización, la matriz que se usa en la invención es una heteromatriz, en la que la matriz de la invención comprende una mezcla de tipos de sondas, tal como una mezcla de sondas de ácidos nucleicos y sondas proteicas.
- El término "nanopocillo" se aplica a un área de dimensiones nanométricas a la que se unen las sondas. El término "micropocillo" se aplica a un área de dimensiones micrométricas a la que se unen las sondas.
- La expresión "dispositivo de nanomatriz" o DNM se aplica a un elemento (que puede existir en numerosas copias idénticas o diferentes formas en un único chip) de dimensiones micrométricas. Un DNM puede comprender un conjunto de nanopocillos o solamente un conjunto de áreas discretas (sin pocillos pero que contienen sondas) que pueden estar en sí mismas o no estar dentro de un micropocillo.
- La expresión "iones secundarios comunes" se refiere a aquellos iones que se generan y se analizan en SIMS y NO contienen los isótopos raros, estables (o inestables) de sus elementos constitutivos. Los ejemplos de iones secundarios comunes incluyen  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ ,  $^{12}\text{C}^-$  etc.
- La expresión "iones secundarios raros" se refiere a aquellos iones que se generan y se analizan en SIMS y SÍ contienen al menos un isótopo raro, estable (o inestable) de sus elementos constitutivos en las proporciones que se usan en el marcaje de las sondas y/o moléculas diana. Los ejemplos de iones secundarios raros incluyen  $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}^{14}\text{N}^-$ ,  $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$ , y  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}^-$ .
- La expresión "iones secundarios comunes de fondo" se refiere a aquellos iones que se generan y se analizan en SIMS y que contienen isótopos raros, estables (o inestables) de sus elementos constitutivos en las proporciones que se dan naturalmente (como oposición a las proporciones que se usan en el marcaje de las sondas y/o moléculas diana). Los ejemplos de iones secundarios naturales en sus proporciones naturales incluyen  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ ,  $^{13}\text{C}^{14}\text{N}^-$ ,  $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$  y  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}^-$  en las proporciones 0,98538: 0,01096: 0,00362: 0,00004.
- La expresión "proporción de detección isotópica", o PDI, como se aplica a una área discreta o micropocillo o nanopocillo se refiere a la proporción del número de iones secundarios comunes respecto al total de los números de iones secundarios comunes más al menos uno de los iones secundarios raros obtenidos mediante SIMS o mediante métodos relacionados (por ejemplo,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^- / (^{12}\text{C}^{14}\text{N}^- + ^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-)$  o  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^- / (^{12}\text{C}^{14}\text{N}^- + ^{13}\text{C}^{14}\text{N}^-)$  o  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^- / (^{12}\text{C}^{14}\text{N}^- + ^{12}\text{C}^{15}\text{N}^- + ^{13}\text{C}^{14}\text{N}^-)$  o  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^- / (^{12}\text{C}^{14}\text{N}^- + ^{12}\text{C}^{15}\text{N}^- + ^{13}\text{C}^{14}\text{N}^- + ^{13}\text{C}^{15}\text{N}^-)$  o  $^{12}\text{C}^- / (^{12}\text{C}^- + ^{13}\text{C}^-)$ , etc.). La figura 2 muestra el incremento o la disminución de la PDI dependiendo de si la sonda o la diana están marcadas. (Si tanto la sonda como la diana están marcadas con, por ejemplo, diferentes isótopos, la dirección de cambio en la PDI se debe elaborar para cada caso particular).
- La expresión "isótopo exógeno" se refiere a aquellos isótopos que no están contenidos de forma natural en las biomoléculas (sondas y dianas) pero que se han añadido a estas moléculas por el usuario. Los isótopos exógenos pueden unirse covalentemente a las biomoléculas por medio de la química o bioquímica convencional. Como alternativa, los isótopos exógenos pueden adherirse covalentemente a una biomolécula que interactúa de

por sí, fuertemente, bien con la sonda o la diana y que no reduce significativamente el reconocimiento de dianas por sondas. Los ejemplos de isótopos exógenos incluyen:  $^{79}\text{Br}$  y  $^{81}\text{Br}$ .

- La expresión "área discreta de referencia" se refiere a áreas discretas, micropocillos o nanopocillos donde las sondas (marcadas o no marcadas) no se ponen en contacto con la muestra a ensayar, o donde no hay una interacción específica entre sonda y diana (es decir, la sonda no está presente en la muestra a analizar).

## La invención

### Naturaleza del material de soporte y la superficie

La invención usa una matriz que comprende un sustrato plano que tiene una superficie conductora y una serie de áreas discretas, que pueden estar o no en forma de pocillos, que contienen sondas que están marcadas con al menos un isótopo raro (por ejemplo, isótopo pesado, isótopo ligero o isótopo inestable) o con al menos un isótopo exógeno (por ejemplo,  $^{79}\text{Br}$ ,  $^{81}\text{Br}$ ). De acuerdo con la invención, un sustrato plano que tiene una superficie conductora es una oblea de silicio o cualquier otra superficie sólida o semisólida hecha de oro, plata, aluminio, cobre, platino, paladio u otro metal, o semiconductores tales como GaAs, InP, u otro material tratado para hacer la superficie conductora, por ejemplo, material polimérico, material recubierto de polímero, material superconductor, cerámica, óxidos de metal, óxidos de silicio, etc.

En una realización de la invención, dicho sustrato plano que tiene una superficie conductora es compatible con SIMS.

En una realización preferente de la invención, dicho sustrato plano compatible con SIMS que tiene una superficie conductora es una oblea de sílice.

### Áreas discretas que están en forma de micropocillos

En otra realización de la invención se usa una matriz de micropocillos como la micromatriz anteriormente descrita, donde las áreas discretas son micropocillos que contienen sondas marcadas con al menos un isótopo raro, estable o inestable. Los micropocillos pueden tener cualquier forma, por ejemplo puntos, líneas, círculos, cuadrados o triángulos, y pueden estar ordenados en cualquier patrón mayor, por ejemplo filas y columnas, redes, rejillas etc. Estos micropocillos contienen sondas marcadas con al menos un isótopo raro, estable o inestable.

En una realización de la invención, la matriz de micropocillos que se usa en la invención comprende de 10 a 100.000 micropocillos, en otra realización de 10 a 25.000 micropocillos, en otra realización de 100 a 10.000 micropocillos y en otra realización de 1.000 a 5.000 micropocillos.

En una realización de la invención, la forma y el tamaño de los micropocillos se determinan adecuadamente para almacenar una única célula en cada micropocillo.

En una realización, cada micropocillo tiene una de las dimensiones de longitud, anchura o diámetro en el intervalo de  $1\ \mu\text{m}$  a  $1.000\ \mu\text{m}$ , en otra realización de  $1\ \mu\text{m}$  a  $500\ \mu\text{m}$ , en otra realización de  $1\ \mu\text{m}$  a  $200\ \mu\text{m}$  y en otra realización de  $1$  a  $100\ \mu\text{m}$ .

En una realización, cada micropocillo tiene una profundidad de  $1\ \mu\text{m}$  a  $100\ \mu\text{m}$ , en otra realización de  $1\ \mu\text{m}$  a  $50\ \mu\text{m}$ , en otra realización  $5\ \mu\text{m}$  a  $20\ \mu\text{m}$ .

La distancia entre cada micropocillo puede ser de  $25$  a  $5000\ \mu\text{m}$ , en otra realización de  $100\ \mu\text{m}$  a  $1000\ \mu\text{m}$  y en otra realización de  $50\ \mu\text{m}$  a  $150\ \mu\text{m}$ .

El micropocillo puede tener cualquier forma: por ejemplo puede ser cilíndrico, no cilíndrico tal como un poliedro con múltiples caras (un paralelepípedo, columna hexagonal, columna octogonal), un cono invertido, una pirámide invertida, o puede tener una forma que combina dos o más de estas formas. Para las formas cónicas y paralelepípedicas, el fondo del micropocillo normalmente es plano, pero también son posibles las superficies curvadas (convexas o cóncavas).

En una realización de la invención, la superficie conductora plana que porta el conjunto de micropocillos puede tener la forma de un rectángulo sólido o de un disco (aunque otras formas son posibles), con una longitud de  $1\ \text{cm}$ , una anchura de  $1\ \text{cm}$  y un espesor de aproximadamente  $250\ \mu\text{m}$ .

### Áreas discretas en forma de nanopocillos

En otra realización de la invención se usa una matriz de nanopocillos como la nanomatriz anteriormente descrita, donde las áreas discretas son nanopocillos que contienen sondas marcadas con al menos un isótopo raro, estable o inestable. Los nanopocillos pueden tener cualquier forma, por ejemplo puntos, líneas, círculos, cuadrados o

triángulos, y pueden estar ordenados en cualquier patrón mayor, por ejemplo filas y columnas, redes, rejillas etc. Estos nanopocillos contienen sondas marcadas con al menos un isótopo raro, estable o inestable.

5 En una realización de la invención, la matriz de nanopocillos que se usa en la invención comprende de 10 a 100.000 nanopocillos, en otra realización de 10 a 25.000 nanopocillos, en otra realización de 100 a 10.000 nanopocillos y en otra realización de 1.000 a 5.000 nanopocillos.

10 En una realización, cada nanopocillo tiene una de las dimensiones de longitud, anchura o diámetro de 1 nm de a 1000 nm, en otra realización de 5 nm a 500 nm, en otra realización de 10 nm a 200 nm y en otra realización de 50 nm a 100 nm.

En una realización, cada nanopocillo tiene una profundidad de 1 nm a 100 nm, en otra realización de 1 nm a 50 nm, en otra realización de 5 nm a 20 nm,

15 La distancia entre cada nanopocillo puede ser de 10 a 1000 nm, en otra realización de 50 nm a 500 nm y en otra realización de 100 nm a 200 nm.

20 El nanopocillo puede tener cualquier forma: por ejemplo puede ser cilíndrico, no cilíndrico tal como un poliedro con múltiples caras (un paralelepípedo, columna hexagonal, columna octogonal), un cono invertido, una pirámide invertida, o puede tener una forma que combina dos o más de estas formas. Para las formas cónicas y paralelepípedicas, el fondo del nanopocillo normalmente es plano, pero también son posibles las superficies curvadas (convexas o cóncavas).

25 En una realización de la invención, la superficie conductora plana que porta el conjunto de nanopocillos puede tener forma de rectángulo sólido o de un disco (aunque otras formas son posibles), con una longitud de 1 cm, una anchura de 1 cm y un espesor de aproximadamente 250  $\mu\text{m}$ .

#### Áreas discretas que no están en forma de pocillos

30 En otra realización de la invención se usa una matriz que puede estar ordenada en un conjunto de áreas discretas, o unidades de patrón, que forman un patrón mayor en un sustrato. Las áreas discretas o unidades de patrón pueden tener cualquier forma, por ejemplo puntos, líneas, círculos, cuadrados o triángulos, y pueden estar ordenados en cualquier patrón mayor, por ejemplo filas y columnas, redes, rejillas etc. Estas áreas discretas contienen sondas marcadas con al menos un isótopo raro, estable (o inestable).

35 En una realización de la invención, la matriz que se usa en la invención comprende de 10 a 100.000 áreas discretas, en otra realización de 10 a 25.000 áreas discretas, en otra realización de 100 a 10.000 áreas discretas y en otra realización de 1.000 a 5.000 áreas discretas.

40 En una realización de la invención, la matriz que se usa en la invención es una micromatriz, En esta realización, cada área discreta tiene una de las dimensiones de longitud, anchura o diámetro que son de 1  $\mu\text{m}$  a 1000  $\mu\text{m}$ , en otra realización 5  $\mu\text{m}$  a 500  $\mu\text{m}$ , en otra realización de 10  $\mu\text{m}$  a 200  $\mu\text{m}$  y en otra realización de 50 a 100  $\mu\text{m}$ . La distancia entre cada área discreta puede ser de 10 a 1000  $\mu\text{m}$ . En otra realización de 50  $\mu\text{m}$  a 500  $\mu\text{m}$  y en otra realización de 100  $\mu\text{m}$  a 200  $\mu\text{m}$ .

45 En una realización de la invención, la matriz que se usa en la invención es una nanomatriz. En esta realización cada área discreta tiene una de las dimensiones de longitud, anchura o diámetro que son de 1 nm de 1000 nm, en otra realización de 5 nm a 500 nm, en otra realización de 10 nm a 200 nm y en otra realización de 50 nm a 100 nm. La distancia entre cada área discreta puede ser de 10 a 1000 nm, en otra realización de 50 nm a 500 nm y en otra realización de 100 nm a 200 nm.

50 En una realización de la invención, la membrana u oblea de sílice que porta el/los conjunto(s) de áreas discretas puede tener la forma de un sólido rectangular o de un disco (aunque otras formas son posibles), con una longitud de por ejemplo 1 cm, una anchura de 1 cm y un espesor de aproximadamente 250  $\mu\text{m}$ .

55 Sondas

#### Naturaleza química y composición isotópica de las sondas

60 De acuerdo con la invención, las sondas, que se unen a las biomoléculas diana (normalmente las biomoléculas que constituyen células pero incluso los virus, orgánulos o células en sí mismas), están hechas de moléculas biológicas o no biológicas tales como ácidos nucleicos (oligonucleótidos, ADN, ARN, ANP), péptidos o proteínas (anticuerpos, enzimas), ligandos (un antígeno, sustrato enzimático, receptor o ligando para el receptor), glucanos, lípidos, poliaminas, fagos, virus, o combinaciones de estas moléculas.

65

De acuerdo con la invención, las sondas contienen al menos un isótopo raro, estable o inestable: en una realización, las sondas contienen al menos un isótopo pesado estable tal como  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$  y  $^{36}\text{S}$ , en otra realización, las sondas contienen al menos un isótopo inestable tal como  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ , en otra realización, las sondas contienen al menos un isótopo exógeno tal como  $^{79}\text{Br}$  y  $^{81}\text{Br}$ .

5

#### **Adhesión o inserción de las sondas**

La adhesión o inserción de las sondas a la matriz se consigue mediante técnicas que se conocen bien en la materia. Las sondas pueden adsorberse, fisorberse, quimisorberse, o adherirse covalentemente a las matrices. También se puede usar la impresión litográfica para permitir que las sondas se transfieran y se adsorban directa o indirectamente a superficies en una forma de patrón.

10

Por ejemplo, la adhesión de las sondas puede conseguirse introduciendo grupos funcionales en la superficie mediante reacción química entre la superficie y la sonda a insertar.

15

El grupo carboxilo (COOH), es uno de los grupos funcionales más conocidos para la inserción. Se producen enlaces químicos entre los grupos amino de las proteínas y los grupos funcionales carboxilo. También se pueden usar ácido acrílico o vinil silano copolimerizado y ácido maleico anhídrido para generar sustratos de sílice-COOH que actúan como espaciadores para insertar proteínas en la superficie usando, por ejemplo, clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.

20

#### **Identificación de las sondas**

En una realización en la que una diversidad de diferentes sondas está unida a la matriz, las sondas se identifican por medio de la posición o coordenadas del área discreta que contiene las sondas.

25

#### **Naturaleza y origen de las muestras**

De acuerdo con la invención, la muestra a ensayar puede aislarse de células, tejidos, órganos, fluidos corporales tales como, por ejemplo, sueros, plasma, líquido seminal, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, sangre u orina, un cultivo celular, agua, tal como aguas residuales, agua dulce, agua marina costera, aguas subterráneas...

30

De acuerdo con la invención, la muestra a ensayar puede comprender ácidos nucleicos (oligonucleótidos, ADN, ARN, ANP), péptidos o proteínas (anticuerpos, enzimas), ligandos (un antígeno, sustrato enzimático, receptor o ligando para el receptor), glucanos, lípidos, poliaminas, fagos, virus o una combinación de estos. Por lo tanto las biomoléculas a detectar pueden ser ácidos nucleicos (oligonucleótidos, ADN, ARN, ANP, péptidos o proteínas (anticuerpos, enzimas, priones), ligandos (un antígeno, sustrato enzimático, receptor o ligando para el receptor), glucanos, lípidos, poliaminas, fagos, virus o una combinación de estos.

35

#### **Marcaje de las sondas**

De acuerdo con la invención, las sondas o las dianas, es decir, las biomoléculas presentes en la(s) muestra(s) a ensayar, se marcan con isótopos raros, estables o inestables, o isótopos exógenos.

45

En una realización, las sondas o dianas se pueden marcar con al menos un isótopo raro, estable tal como  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$  y  $^{36}\text{S}$ .

En otra realización, las sondas o dianas se pueden marcar con al menos un isótopo inestable tal como  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ .

50

En otra realización, las sondas o dianas se pueden marcar con al menos un isótopo exógeno tal como  $^{79}\text{Br}$  y  $^{81}\text{Br}$ .

Las sondas marcadas se pueden obtener mediante dos técnicas, *in vivo* e *in vitro*:

En el caso de marcaje *in vitro*, 1) se usa la reacción en cadena de la polimerasa para producir oligonucleótidos marcados, 2) se usa síntesis peptídica para producir péptidos marcados, 3) se usa transcripción/traducción *in vitro* para producir ARN marcado y proteínas marcadas, 4) se usa retrotranscripción para producir ADNc, 5) se usa síntesis química para producir ANP.

55

En el caso del marcaje *in vivo*, bien las células procariontas o eucariotas se cultivan en medios que contienen nutrientes (tales como  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , glucosa y aminoácidos) marcados con combinaciones de  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$  y  $^{36}\text{S}$  o con combinaciones de  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ , u otros isótopos inestables con semividas largas. Estas células por lo tanto producen sondas marcadas (tales como anticuerpos, bacteriófagos, ácidos nucleicos, proteínas o azúcares u otros constituyentes celulares).

60

Cuando las dianas, es decir, las biomoléculas presentes en la(s) muestra(s) a ensayar, se van a marcar, las células generalmente se cultivan en medios que contienen nutrientes (tales como  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , glucosa y aminoácidos) marcados

65

con combinaciones de  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$  y  $^{36}\text{S}$  o con combinaciones de  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ . Estas células por lo tanto producen biomoléculas marcadas.

#### **Contacto entre la muestra y la matriz**

5 En una realización de la invención, la muestra a ensayar se pone en contacto con la matriz (micromatriz o nanomatriz) que contiene una serie de diversas sondas.

10 En otra realización, donde se ensayarán una serie de muestras, cada muestra se pone en contacto con uno a más micropocillos de una matriz de micropocillos.

15 En otra realización, donde el número y diversidad de muestras a ensayar se corresponde con el número y la diversidad de células únicas, los contenidos de cada única célula, obtenidos mediante un método apropiado, se ponen en contacto con un micropocillo de una matriz de micropocillos.

#### **Condiciones de interacción entre sonda y diana**

20 La(s) muestra(s) se pone(n) en contacto con la matriz bajo condiciones que permitan a las sondas presentes en la matriz interactuar con las biomoléculas diana.

La unión de las sondas a sus dianas entonces se realiza en una diversidad de tampones de los cuales, típicamente, los isótopos comunes  $^{12}\text{C}$  y  $^{14}\text{N}$  están ausentes (tales como la solución salina tamponada con fosfato).

25 Después de lavar cuidadosamente con agua pura (preferentemente a baja temperatura para limitar la disociación de las sondas de sus dianas) para eliminar las sales (que pueden formar cristales en la etapa de secado), las moléculas no unidas y los residuos celulares grandes, la micromatriz se seca en una atmósfera libre de polvo bien en un horno al vacío o mediante secado por congelación.

#### **Detección mediante SIMS y otras técnicas relacionadas**

30 De acuerdo con la invención, contar los números de iones secundarios raros y comunes, de modo que se obtenga la proporción de detección isotópica permite la detección de las dobles cadenas sondas/diana.

35 En una realización, las dobles cadenas sondas/diana se detectan mediante espectrometría de masas de iones secundarios dinámica (D-SIMS). En otra realización, las dobles cadenas sondas/diana se detectan mediante espectrometría de masas de iones secundarios de tiempo de vuelo (TOF-SIMS).

40 La espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS) permite el análisis de la composición de la superficie de materiales inorgánicos y orgánicos basándose en el análisis del espectro de masas de los iones secundarios extraídos de la superficie (1 nm-1  $\mu\text{m}$  de profundidad) de una muestra sólida bajo el impacto de un haz energético de iones primarios. Las moléculas se fragmentan por el haz de iones primarios en la D-SIMS, bien totalmente en sus átomos constitutivos mediante D-SIMS dinámica o parcialmente en fragmentos moleculares tales como aminoácidos mediante ToF-SIMS. También se pueden tecnologías relacionadas con SIMS tales como el láser SNMS usar para detectar interacciones sonda/diana.

45 En una realización de la invención, las sondas que se adhieren a la matriz se marcan con isótopos raros, estables o inestables, o isótopos exógenos. En esta realización, la(s) muestra(s) a ensayar tiene(n) biomoléculas (dianas) que solamente contienen estos isótopos raros en sus proporciones naturales (o incluso menores que estas proporciones).

50 La presencia de una interacción sonda/diana se determina mediante la comparación de la proporción de detección isotópica obtenida de cada área discreta, micropocillo o nanopocillo respecto a la proporción de detección isotópica de fondo obtenida del área discreta, micropocillo o nanopocillo de referencia o de áreas discretas en las que no hay interacción específica entre la sonda marcada y la diana (es decir, la diana no está presente en la muestra a analizar) o en la que hay una interacción específica entre la sonda no marcada y la diana no marcada.

60 Por lo tanto, en el caso en el que las sondas estén marcadas y las dianas no estén marcadas, la presencia de una interacción sonda/diana se revela si la proporción de detección isotópica obtenida de un área discreta, micropocillo o nanopocillo es significativamente superior a la proporción de detección isotópica obtenida del área discreta, micropocillo o nanopocillo de referencia. Por ejemplo, en el caso en el que las sondas están marcadas con  $^{13}\text{C}$ , la presencia de una interacción sonda/diana se revela si la proporción de detección isotópica de  $^{12}\text{C}/(^{12}\text{C} + ^{13}\text{C})$  (o como alternativa  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}/(^{12}\text{C}^{14}\text{N} + ^{12}\text{C}^{15}\text{N})$ ) obtenida de un área discreta, micropocillo o nanopocillo es superior a la proporción de detección isotópica de fondo obtenida del área discreta, micropocillo o nanopocillo de referencia, para los mismos ajustes instrumentales.

65



- Por lo tanto, en el caso en el que las sondas no estén marcadas y las dianas estén marcadas, la presencia de una interacción sonda/diana se revela si la proporción de detección isotópica obtenida de un área discreta, micropocillo o nanopocillo es significativamente inferior a la proporción de detección isotópica obtenida del área discreta, micropocillo o nanopocillo de referencia. Por ejemplo, en el caso en el que las sondas estén marcadas con  $^{13}\text{C}$ , la presencia de una interacción sonda/diana se revela si la proporción de iones secundarios de  $^{12}\text{C}/(^{12}\text{C}+^{13}\text{C})$  (o como alternativa  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}/(^{12}\text{C}^{14}\text{N} + ^{12}\text{C}^{15}\text{N})$ ) obtenida de un área discreta, micropocillo o nanopocillo es inferior a esta proporción de iones secundarios obtenida del área discreta, micropocillo o nanopocillo de referencia, para los mismos ajustes instrumentales.
- 10 Por lo tanto, en el caso en que tanto sondas como dianas estén marcadas con el/los mismo(s) isótopo(s), la presencia de una interacción sonda/diana se revela si la proporción de detección isotópica obtenida de un área discreta, micropocillo o nanopocillo es significativamente diferente a la proporción de detección isotópica obtenida del área discreta, micropocillo o nanopocillo de referencia.
- 15 De acuerdo con la invención, las sondas o dianas se pueden marcar también con más de uno de los isótopos raros, estables o inestables o isótopos exógenos de sus elementos constitutivos. Por ejemplo, las sondas o las dianas se pueden marcar con  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ . El marcaje múltiple tal como  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$  de las sondas es particularmente útil para minimizar el fondo.
- 20 De acuerdo con la invención, cuando las sondas se marcan con isótopos raros, estables (o inestables), se pueden diferenciar diversas condiciones experimentales (por ejemplo, con y sin tratamientos con fármacos) por un marcaje diferencial de cada condición.

#### El método de detección y cuantificación

- 25 La invención es un método para detectar y cuantificar en al menos una muestra la presencia o ausencia de al menos una biomolécula, que comprende:
- 30 (a) poner al menos una de las muestras en contacto con una matriz que comprende un sustrato plano que tiene una superficie conductora y una serie de áreas discretas en condiciones que permitan a las sondas presentes en las áreas discretas interactuar con las biomoléculas diana, estando las sondas presentes en las áreas discretas y opcionalmente también las biomoléculas presentes en la muestra marcadas con al menos un isótopo raro, estable (o inestable).
- 35 (b) lavar y secar la matriz,
- (c) detectar y contar mediante SIMS los iones secundarios comunes junto con los iones raros correspondientes.

Esto permite la determinación de la PDI.

- 40 La PDI obtenida de cada área discreta, micropocillo o nanopocillo se compara después con la PDI obtenida del área discreta, micropocillo o nanopocillo de referencia; un cambio significativo de la PDI (véase la figura 2) es una prueba de la presencia (detección) de una interacción sonda/diana. Además, la determinación precisa de la PDI permite cuantificar el número de interacciones entre sonda y diana. La determinación precisa de la PDI se obtiene después de la pulverización catódica de la máxima cantidad de material de modo que se obtengan buenas estadísticas de conteo tanto de los iones secundarios comunes como de los iones secundarios raros. Para calcular el número de dianas que interactúan con las sondas por área discreta (micropocillos o nanopocillos o en efecto una unidad de área de muestra en el área discreta) es necesario saber: a) la densidad de las sondas en la superficie del área discreta y b) el número de átomos de cada isótopo de interés tanto en la sonda individual como en la diana individual. Este conocimiento entonces permite representar gráficamente la PDI como una función del número de dianas por área discreta.

#### Aplicaciones de la invención

- De acuerdo con otra realización, dicho método para detectar y cuantificar en al menos una muestra la presencia o ausencia de al menos una biomolécula, permite la determinación de un atlas molecular de dicha muestra, lo que significa la determinación del transcriptoma, proteoma, lipidoma, metaboloma, glicoma o interactoma de dicha muestra, o permite la determinación de las biomoléculas y sus interacciones en una única célula.

#### Aplicación al atlas molecular

- 60 De acuerdo con una realización de la invención, el método para detectar y cuantificar en una muestra la presencia o ausencia de al menos una biomolécula, se destina a la determinación de un atlas molecular de dicha muestra.

En una realización, la diversidad de biomoléculas a detectar y cuantificar son secuencias genómicas, que permiten la determinación de la variación genómica en dicha muestra.

65

En otra realización, la diversidad de biomoléculas a detectar y cuantificar es ARN, que permite la determinación del transcriptoma de dicha muestra.

5 En otra realización, la diversidad de biomoléculas a detectar y cuantificar son proteínas, que permiten la determinación del proteoma de dicha muestra.

En otra realización, la diversidad de biomoléculas a detectar y cuantificar son lípidos, que permiten la determinación del lipidoma de dicha muestra.

10 En otra realización, la diversidad de biomoléculas a detectar y cuantificar son metabolitos, que permiten la determinación del metaboloma de dicha muestra.

En otra realización, la diversidad de biomoléculas a detectar y cuantificar son proteínas glicosiladas, que permiten la determinación del glicoma de dicha muestra.

15 En otra realización, la diversidad de biomoléculas a detectar y cuantificar son proteínas que interactúan con al menos una sonda específica, que permiten la determinación del interactoma de dicha muestra.

**Aplicación a una única célula**

20 De acuerdo con otra realización de la invención, el método para detectar y cuantificar a nivel de una única célula la presencia o ausencia de al menos una biomolécula, se destina a la determinación de un atlas molecular a nivel de una única célula.

25 En una realización, la diversidad de biomoléculas a detectar y cuantificar son secuencias genómicas, que permiten la determinación de una variación genómica a nivel de una única célula.

En otra realización, la diversidad de biomoléculas a detectar y cuantificar es ARN, que permite la determinación del transcriptoma a nivel de una única célula.

30 En otra realización, la diversidad de biomoléculas a detectar y cuantificar son proteínas, que permiten la determinación del proteoma a nivel de una única célula.

35 En otra realización, la diversidad de biomoléculas a detectar y cuantificar son lípidos, que permiten la determinación del lipidoma a nivel de una única célula.

En otra realización, la diversidad de biomoléculas a detectar y cuantificar son metabolitos, que permiten la determinación del metaboloma a nivel de una única célula.

40 En otra realización, la diversidad de biomoléculas a detectar y cuantificar son proteínas glicosiladas, que permiten la determinación del glicoma a nivel de una única célula.

En otra realización, la diversidad de biomoléculas a detectar y cuantificar son proteínas que interactúan con al menos una sonda específica, que permiten la determinación del interactoma a nivel de una única célula.

45 **Aplicación a la enfermedad**

Otro objeto de la invención es el uso de dicho método para detectar y cuantificar al menos una biomolécula en una muestra o a un nivel de una única célula para:

- 50
- predecir una predisposición a una enfermedad, o para diagnosticar una enfermedad en un sujeto,
  - cribar agentes terapéuticos,
  - controlar la eficacia de un agente terapéutico administrado a un sujeto a fin de tratar una enfermedad.

55 Otro objeto de la invención es un método para predecir una predisposición para una enfermedad, o para diagnosticar una enfermedad en un sujeto. Este comprende:

(a) poner al menos una muestra aislada de dicho sujeto en contacto con una matriz en condiciones que permitan a las sondas presentes en la matriz interactuar con las biomoléculas diana conocidas por asociarse con o expresarse diferencialmente en dicha enfermedad, estando las sondas presentes en la matriz marcadas con al menos un isótopo raro, estable (o inestable).

(b) lavar y secar la matriz,

(c) detectar y contar mediante SIMS los iones secundarios comunes junto con los iones secundarios raros correspondientes, donde el número de interacciones entre la sonda y la diana se cuantifica mediante la comparación de la PDI obtenida de cada área discreta, micropocillo o nanopocillo respecto a la PDI obtenida del área discreta, micropocillo o nanopocillo de referencia o de áreas discretas en las que no hay interacción

65

específica entre sonda y diana (es decir, la diana no está presente en la muestra a analizar) o en las que hay una interacción específica entre sonda no marcada y diana no marcada,

- 5 (d) comparar dicho patrón de expresión con un patrón estándar, donde la presencia/ausencia o el incremento/disminución de dicha al menos una biomolécula conocida por asociarse con o expresarse diferencialmente en dicha enfermedad es indicativa de una probabilidad para desarrollar una enfermedad o de la presencia de una enfermedad.

En una realización, el sujeto es un mamífero. En una realización preferente, el sujeto es un ser humano.

- 10 De acuerdo con el método de la invención, la muestra a ensayar puede aislarse de células, tejidos, órganos, o fluidos corporales tales como por ejemplo sueros, plasma, líquido seminal, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, sangre u orina, del sujeto.

- 15 La muestra puede derivarse de células o tejidos enfermos. Por ejemplo, las células o tejidos pueden estar infectados por un patógeno tal como VIH, gripe, malaria, hepatitis, citomegalovirus, virus del herpes simple. En una realización, las células o tejidos están infectados por un patógeno vírico o bacteriano. En otra realización, la enfermedad es cáncer. En otra realización, la enfermedad es una enfermedad neurodegenerativa tal como Parkinson, Alzheimer o esclerosis múltiple.

- 20 En una realización de la invención, dicho método se destina a predecir una predisposición para un cáncer, o para diagnosticar un cáncer en un sujeto.

En otra realización de la invención, dicho método se destina a predecir una predisposición o a diagnosticar una enfermedad bacteriana.

- 25 En otra realización de la invención, dicho método se destina a predecir una predisposición o a diagnosticar una enfermedad vírica.

Otro objeto de la invención es un método para el cribado de agentes terapéuticos, que comprende:

- 30 (a) cultivar células con al menos un agente terapéutico de interés,  
 (b) poner al menos una muestra aislada de dicho cultivo en contacto con una matriz en condiciones que permitan a las sondas presentes en la matriz interaccionar con las biomoléculas diana, estando las sondas presentes en la matriz marcadas con al menos un isótopo pesado o inestable,  
 35 (c) lavar y secar la matriz,  
 (d) detectar y contar mediante SIMS los iones secundarios comunes junto con los iones secundarios raros correspondientes, donde el número de interacciones entre la sonda y la diana se cuantifica mediante la comparación de la PDI obtenida de cada área discreta, micropocillo o nanopocillo respecto a la PDI obtenida del área discreta, micropocillo o nanopocillo de referencia o de áreas discretas en las que no hay interacción  
 40 específica entre sonda y diana (es decir, la diana no está presente en la muestra a analizar) o en las que hay una interacción específica entre sonda no marcada y diana no marcada,  
 (e) comparar dicho patrón de expresión con un patrón convencional, donde el incremento o la disminución de ciertas biomoléculas es indicativo de la eficacia de dicho agente terapéutico.

- 45 Otro objeto de la invención de un método para controlar la eficacia de un agente terapéutico administrado a un sujeto para tratar una enfermedad, comprendiendo dicho método:

- 50 (a) poner al menos una muestra aislada de dicho sujeto en contacto con una matriz en condiciones que permitan a las sondas presentes en la matriz interaccionar con las biomoléculas diana, estando las sondas presentes en la matriz marcadas con al menos un isótopo pesado o inestable,  
 (b) lavar y secar la matriz,  
 (c) detectar y contar mediante SIMS los iones secundarios comunes junto con los iones secundarios raros correspondientes, donde el número de interacciones entre la sonda y la diana se cuantifica mediante la  
 55 comparación de la PDI obtenida de cada área discreta, micropocillo o nanopocillo respecto a la PDI obtenida del área discreta, micropocillo o nanopocillo de referencia o de áreas discretas en las que no hay interacción específica entre sonda y diana (es decir, la diana no está presente en la muestra a analizar) o en las que hay una interacción específica entre sonda no marcada y diana no marcada,  
 (d) obtener un patrón de expresión de dicha muestra de al menos una biomolécula a diferentes tiempos durante el tratamiento del sujeto,  
 60 (e) comparar dicho patrón de expresión con un patrón convencional, donde el incremento o la disminución de dichas biomoléculas conocidas por asociarse con o expresarse diferencialmente en dicha enfermedad es indicativo de la eficacia de dicho agente terapéutico para tratar al sujeto.

**Ejemplos**

En la siguiente descripción, todos los experimentos para los cuales no se da el protocolo detallado se realizan de acuerdo con el protocolo convencional.

5

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferentes de la invención.

**EXPERIMENTO 1:**

Este experimento muestra que la técnica SIMS permite una detección cuantitativa de la proporción del isótopo  $^{13}\text{C}$  en una mezcla que contiene proteínas isotópicamente marcadas y una diferente cantidad de moléculas no marcadas.

**Marcaje isotópico y dilución**

15

Las moléculas isotópicamente marcadas se suministran generalmente en un tampón que contiene protectores y conservantes tales como glicerol (una fuente de  $^{12}\text{C}$ ) y azida sódica (una fuente de  $^{14}\text{N}$ ). Estos agentes se usan para preservar membranas de diálisis (como las suministradas por Millipore). El objetivo de los siguientes experimentos es determinar las condiciones de diálisis necesarias para eliminarlos.

20

Las proteínas se extrajeron de *E. coli* que crecieron en un medio mínimo en el que el único nitrógeno disponible era  $^{15}\text{N}$ . Usando SIMS, se descubrió que la fracción isotópica de estas proteínas era del  $97,8\% \pm 0,02\%$ . Se dializaron  $20\ \mu\text{g}$  de estas proteínas marcadas durante 6 horas en agua en membranas de diálisis Millipore que bien no se lavaban o se habían lavado previamente. La figura 3 muestra la fracción isotópica de  $^{15}\text{N}$  en las soluciones dializadas.

25

El nivel de la fracción isotópica de la membrana lavada fue similar a la del control ( $97,9\% \pm 0,02\%$ ) mientras que la membrana sin lavar (que contenía el nitrógeno contaminante) fue menor ( $92,1\% \pm 1,4\%$ ). Por lo tanto, prelavar la membrana de diálisis restauró la fracción isotópica inicial.

30

Las proteínas también se extrajeron de bacterias que crecieron en un medio en el que el único carbono disponible era  $^{13}\text{C}$ . La fracción isotópica de estas proteínas tal como se midió mediante SIMS era de  $86\% \pm 0,5\%$ . Después se disolvieron estas proteínas en agua y se hizo una segunda disolución de estas en glicerol a una concentración final del  $10\%$ . La figura 4 muestra la fracción isotópica de  $^{13}\text{C}$  en estas soluciones.

35

La adición de glicerol redujo la fracción isotópica al  $78\% \pm 2\%$  pero la fracción inicial ( $86\% \pm 2\%$ ) se recuperó mediante la diálisis posterior que eliminó el glicerol.

**EXPERIMENTO 2:**

40

Este experimento muestra que el oligonucleótido isotópicamente marcado (sondas) se puede preparar usando la técnica de PCR y un tampón no convencional que no contiene compuestos nitrogenados (los cuales, como contaminantes, podrían perturbar la medida de la PDI descrita en la sección "Definiciones").

45

**Uso de un tampón borato para reducir la introducción de contaminación con nitrógeno****Introducción**

50

Numerosos métodos en biología usan tampones basados en Tris. Esta molécula orgánica es un tampón excelente y, además, no conduce a la precipitación de sales de calcio o de magnesio. Para el método de los inventores, sin embargo, el Tris tiene la desventaja de contener  $^{14}\text{N}$  y de tener fuerte afinidad para el ADN (y otras macromoléculas). Esta desventaja surge debido a que este  $^{14}\text{N}$  es un importante contaminante en el método de los inventores que depende de medir con precisión la proporción de  $^{15}\text{N}/(^{14}\text{N}+^{15}\text{N})$  resultante de la hibridación de una sonda  $^{15}\text{N}$  con una diana  $^{14}\text{N}$ .

55

Los dos enfoques para hacer ADN sin nitrógeno contaminante son bien i) usar Tris en los tampones y eliminarlo después una vez que el ADN está hecho o ii) usar tampones libres de Tris. Dado que el primer método conlleva métodos de purificación que llevan tiempo, son ineficientes y caros, se adoptó la segunda solución para proporcionar el pH correcto y las condiciones de concentración para PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Aunque, hasta donde se sabe, ninguna bibliografía describe el uso de tampones borato para PCR, se usó un tampón borato, un tampón inorgánico que no contiene nitrógeno y que mantiene los mismos valores de pH que los tampones Tris.

60

**Material y métodos**

65

Método de PCR

Productos químicos	C inic.	volumen	C final
Tampón borato	0,08 M	12,5	20 mM
KCl	1 M	2,5	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	4	2 mM
dNTP,	10 mM	2	0,8 mM
Taq polimerasa	1 U/ml	2,5	0,05 U/ml
Cebador S	100 μM	0,5	1 μM
cebador AS	100 μM	0,5	1 μM
muestra de ADN	-	1	
agua	-	24,5	
total		50	

Se amplificó una secuencia de 200 pb de ADN del gen PML. El molde en sí se hizo usando solamente una ronda de amplificación (para evitar la generación de errores). Bien se realizaron 20 ciclos de PCR para determinar cuantitativamente el efecto del tampón borato (y generación de errores límite) o se realizaron 60 ciclos para consumir el sustrato limitante y obtener la máxima amplificación. Los amplicones se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %. Los siguientes resultados se muestran para un tampón Tris y para un tampón borato.

### Resultados

En el caso de los 20 ciclos de amplificación, el tampón borato da la mitad del rendimiento que el tampón Tris y, significativamente, el tampón borato no generó amplicones de diferentes tamaños. Esto significa que la polimerasa continuó la replicación hasta el final de los moldes. En el caso de los 60 ciclos de amplificación, tanto el tampón Tris como el borato dieron resultados similares.

### Conclusión

Un tampón borato es perfectamente adecuado para reacciones tales como la amplificación por PCR y por lo tanto para la síntesis de sondas de oligonucleótidos. Por lo tanto este tampón se puede usar para evitar el nitrógeno contaminante como se requiere en los análisis SIMS que se proponen aquí.

### EXPERIMENTO 3:

Los inventores preparan actualmente matrices de ADN y proteínas para la detección mediante SIMS. Se han preparado sondas isotópicamente marcadas y no marcadas usando PCR para hibridar con la parte que contiene ADN del gen PML (que codifica la proteína de leucemia promielocítica). La secuencia de la sonda (298 bases de longitud) fue: TGTCTCCAAT ACAACGACAG CCCAGAAGAG GAAGTGCAGC CAGACCCAGT GCCCCAGGAA GGTCATCAAG ATGGAGTCTG AGGAGGGGAA GGAGGCAAGG TTGGCTCGGA GCTCCCCGGA GCAGCCCAGG CCCAGCACCT CCAAGGCAGT CTCACCACCC CACCTGGATG GACCGCCTAG CCCAGGAGC CCCGTCATAG GAAGTGAGGT CTTCTGCCCC AACAGCAACC ACGTGCCAG TGGCGCCGGG GAGGCAGAGG AACGCGTTGT GGTGATCAGC AGCTCGGAAG ACTCAGAT (SEC ID N°: 1).

Los cebadores fueron: (directo) 5'-TGTCTCCAATACAACGACAGC-3' (SEC ID N°: 2), (inverso) 5'-ATCT-GAGTCTTCCGAGCTGCT-3' (SEC ID N°: 3).

Estas sondas de nucleótidos están unidas covalentemente a obleas de sílice usando técnicas químicas apropiadas. Esto conlleva las siguientes etapas:

- 1) Limpiar la oblea de sílice con una mezcla "piraña" (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:3) para dar una superficie oxidada de Si que contiene una alta concentración de grupos hidroxilo de superficie.
- 2) Acoplar los grupos hidroxilo de la superficie a tricloro o trialkiloxisilanos funcionales (por ejemplo, terminados en aldehídos).
- 3) Adherir las sondas de nucleótido poniéndolas en contacto con esta superficie funcionalizada.

Se han preparado sondas de anticuerpos isotópicamente marcadas y no marcadas. Estas incluyeron anti-CD34 y anti-clatrina. Estas sondas de anticuerpos están adheridas covalentemente a obleas de sílice mediante técnicas

apropiadas. Por ejemplo, primero se cubre la superficie de la oblea con proteína A (que se marcó isotópicamente, véase más adelante) y después se añaden los anticuerpos (que se unen a la proteína A).

5 El gen que codifica los aminoácidos 32-327 de la proteína A de *Staphylococcus aureus* se clona en un plásmido de modo que se crea una fusión N-terminal con una etiqueta de histidina (véase la secuencia más adelante). Se transformó *Escherichia coli* BL21 (DE3) con este plásmido y se cultivó en medio mínimo NG-5052 (véase la composición más adelante). Se cultivó un cultivo bacteriano de 25 ml en un matraz de 250 ml y se agitó durante toda la noche (a 220 rpm) a 18 °C. El cultivo se centrifugó (6.000 g, 10 minutos a 4 °C) y se resuspendieron los sedimentos en 5 ml de tampón A (Na<sup>+</sup>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,5). Se añadió lisozima (concentración final 10 1 mg/ml) y la suspensión se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de sonicarla (HD 2200/sonotrodo MS72) dos veces durante 30 segundos en pulsos de 0,5 segundos al 20 % de la potencia máxima. Las fracciones soluble e insoluble del lisado se separaron después por centrifugación (20.000g, 20 minutos a 4 °C). El sobrenadante después se añadió a una columna de intercambio iónico con níquel como contraión (1 ml de quelante HP, GE Healthcare) equilibrada previamente con 10 volúmenes de tampón A. La columna se lavó después con 20 15 volúmenes de tampón A seguidos de 10 volúmenes de tampón B (idéntico al tampón A excepto porque está a pH 6,5). La proteína de fusión, que se unió a la columna, se eluyó después con 10 volúmenes de tampón C (idéntico al tampón A excepto porque está a pH 3). El eluato se analizó usando SDS-PAGE con un gradiente de acrilamida (7,5 - 16 %) y las proteínas se visualizaron usando azul de Coomassie, nitrato de plata e inmunotransferencia con anticuerpos anti-His. La concentración de la proteína de fusión en el eluato se midió como 0,344 mg/ml (método de 20 Bradford) y la proteína tuvo una pureza del 92 % tal como se determinó por la densitometría del gel teñido con azul de Coomassie.

La proteína de fusión se marca con <sup>15</sup>N usando el método anterior de crecimiento en N-5052 pero usando cloruro de amonio marcado con <sup>15</sup>N en lugar de cloruro de amonio sin marcar.

25

#### Composición del medio NG-5052

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM
- 30 - NH<sub>4</sub>Cl 50 mM
- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM
- MgSO<sub>4</sub> 2 mM
- Metales traza 1x
- Glicerol 0,5 % (p/v)
- 35 - Glucosa 0,05 % (p/v)
- Kanamicina 50 µg/ml

**Composición del medio N-5052** (Studier *et al.*, 2005 Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. Protein expression and purification 41: 207-234)

40 Medio NG-5052  
Lactosa 0,2 % (p/v)

#### Composición de la solución 5.000x de "metales traza"

FeCl <sub>3</sub>	50 mM
CaCl <sub>2</sub>	20 mM
MnCl <sub>2</sub>	10 mM
ZnSO <sub>4</sub>	10 mM

45

**Secuencia de la proteína de fusión A:**

MGSSHHHHHSSGPAANAAQHDEAQQNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSL  
 KDDPSQSANVLGEAQKLNSQAPKADAQQNNFNKDQQSAFYEILNMPNLN  
 EAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNNFNKEQQNAFYE  
 ILNMPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLSEAKKLNESQAPKADNKFNK  
 EQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDQAP  
 KADNKFNKKEQQNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKDDPSVSKEILAEAK  
 KLNDQAPK (SEC ID N°:4).

- 5 La asociación sonda-diana se analizará mediante SIMS y se hará la comparación entre la técnica SIMS y la técnica de fluorescencia convencional.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> Université de Rouen Ripoll, Camille  
 <120> Método para una detección y cuantificación altamente sensible de biomoléculas usando espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS) y tecnologías relacionadas
- 15 <130> BCT090025 QT  
 <160> 4  
 <170> PatentIn versión 3.3
- 20 <210> 1  
 <211> 298  
 <212> ADN  
 <213> artificial
- 25 <220>  
 <223> sonda PML  
 <400> 1  
 tgtctccaat acaacgacag ccagaagag gaagtgcagc cagaccagc gcccaggaa 60  
 ggtcatcaag atggagtctg aggaggggaa ggaggcaagg ttggctcgga gctccccgga 120  
 gcagcccagg cccagcacct ccaaggcagt ctcaccacce cacctggatg gaccgcctag 180  
 ccccaggagc ccggtcatag gaagtgaggt cttcctgccc aacagcaacc acgtggccag 240  
 30 tggcgccggg gaggcagagg aacgcgttgt ggtgatcagc agctcggaag actcagat 298
- <210> 2  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> artificial
- 35 <220>  
 <223> cebador directo PML
- 40 <400> 2  
 tgtctccaat acaacgacag c 21  
 <210> 3  
 <211> 21

## ES 2 505 390 T3

<212> ADN  
<213> artificial

5 <220>  
<223> cebador directo PML

<400> 3  
atctgagtct tccgagctgc 21

10 <210> 4  
<211> 309  
<212> PRT  
<213> artificial

15 <220>  
<223> aminoácidos 32-327 de proteína A de *Staphylococcus aureus*

<400> 4



ES 2 505 390 T3

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Pro Ala Ala  
 1 5 10 15

Asn Ala Ala Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Gln Val  
 20 25 30

Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
 35 40 45

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Val Leu Gly Glu Ala  
 50 55 60

Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Ala Gln Gln Asn  
 65 70 75 80

Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met  
 85 90 95

Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys  
 100 105 110

Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu  
 115 120 125

Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln  
 130 135 140

Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu  
 145 150 155 160

Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser  
 165 170 175

Ala Asn Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro  
 180 185 190

Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu  
 195 200 205

Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile

ES 2 505 390 T3

210		215		220	
Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu					
225		230		235	240
Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe					
		245		250	255
Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn					
		260		265	270
Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp					
		275		280	285
Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp					
		290		295	300
Ala Gln Ala Pro Lys					
305					

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para detectar y cuantificar en al menos una muestra la presencia o ausencia de al menos una biomolécula, que comprende:
- (a) poner en contacto dicha al menos una muestra con una matriz,  
 (b) lavar y secar la matriz,  
 (c) detectar y contar mediante SIMS los iones secundarios comunes junto con los iones secundarios raros correspondientes,
- 10 donde dicha una micromatriz comprende un sustrato plano que tiene una superficie conductora y una serie de áreas discretas que contienen sondas que están marcadas con al menos un isótopo raro, estable o inestable o isótopo exógeno, donde dichas sondas se unen a biomoléculas diana presentes en una muestra, y están hechas de cualquier molécula biológica o no biológica.
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho sustrato plano que tiene una superficie conductora es una oblea de silicio.
- 20 3. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, donde dichas sondas están marcadas con al menos un isótopo pesado estable seleccionado del grupo  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$  y  $^{36}\text{S}$ , o con al menos un isótopo inestable seleccionado del grupo  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$  o con al menos un isótopo exógeno seleccionado del grupo de  $^{79}\text{Br}$  y  $^{81}\text{Br}$ .
- 25 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, donde dicha matriz es una micromatriz donde cada área discreta tiene una de las dimensiones de longitud, anchura o diámetro que son de  $1\ \mu\text{m}$  a  $1.000\ \mu\text{m}$ .
- 30 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, donde cada área discreta es un micropocillo que comprende sondas que están marcadas con al menos un isótopo raro, estable o inestable o un isótopo exógeno.
- 35 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, donde dicha matriz es una nanomatriz donde cada área discreta tiene una de las dimensiones de longitud, anchura o diámetro que es de  $1\ \text{nm}$  a  $1000\ \text{nm}$ .
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, donde cada área discreta es un nanopocillo que comprende sondas que están marcadas con al menos un isótopo raro, estable o inestable o un isótopo exógeno.
- 40 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, donde cada micropocillo comprende una serie de nanopocillos, y dichos nanopocillos comprenden las sondas que están marcadas con al menos un isótopo raro, estable o inestable o un isótopo exógeno.
- 45 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde cada muestra a ensayar se pone en contacto con una o más áreas discretas de la matriz.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde dicha muestra a ensayar es una única célula.
- 50 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde dichas biomoléculas diana están marcadas con al menos un isótopo raro, estable o inestable o un isótopo exógeno.
12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 para determinar un atlas molecular de la muestra ensayada, donde dicho atlas molecular es la determinación del transcriptoma, proteoma, lipidoma, metaboloma, glicoma y/o interactoma de dicha muestra.
- 55 13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 para predecir una predisposición a una enfermedad, o para diagnosticar una enfermedad en un sujeto que lo necesite.
- 60 14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 para controlar la eficacia de un agente terapéutico administrado a un sujeto para tratar una enfermedad.
15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 para el cribado de agentes terapéuticos.

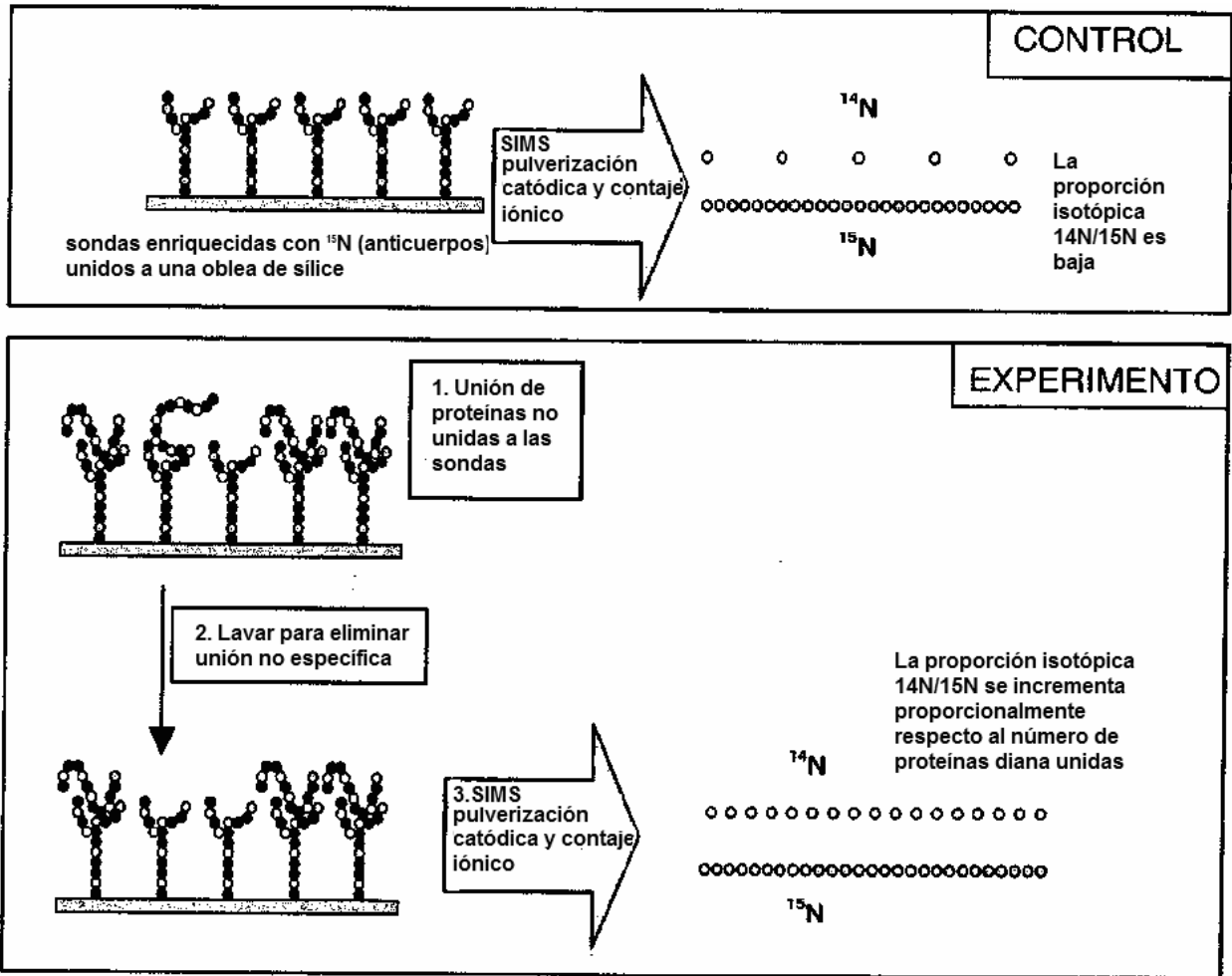


Figura 1

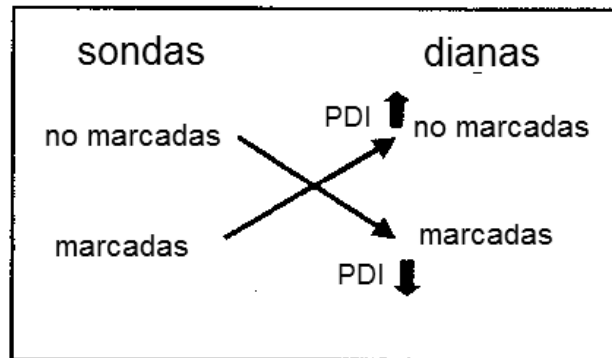


Figura 2

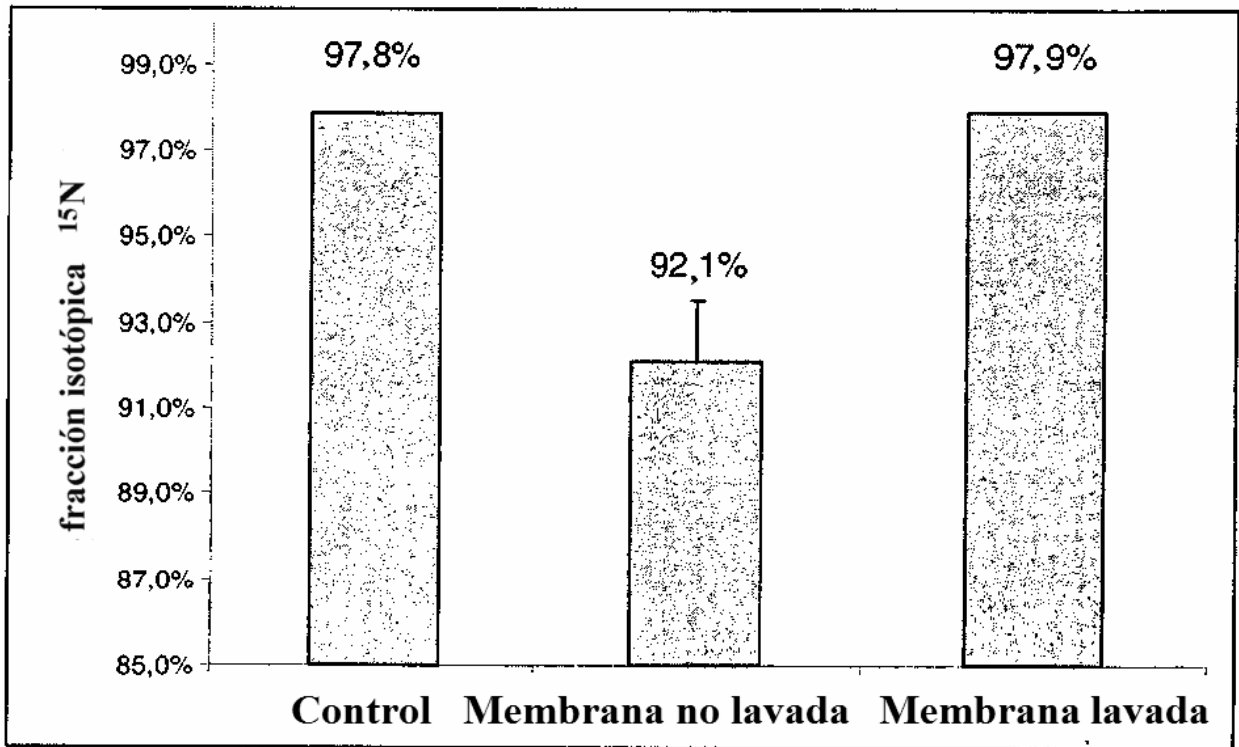


Figura 3

Figura 4

